

칼슘과 제니스테인 섭취가 고지방식이로 유도된 비만 모델 마우스의 체지방과 지질대사에 미치는 영향

김미현* · 김설희* · 박현우** · 김완기** · 이연숙*

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과, 생활과학연구소,*
아모레퍼시픽 기술연구원 식품연구소 건강식품연구팀**

Effects of Calcium and Genistein on Body Fat and Lipid Metabolism in High Fat-induced Obese Mice

Kim, Mi Hyun* · Kim, Seol Hee* · Park, Hyun-Woo** · Kim, Wan Gi** · Lee, Yeon Sook**

Department of Food & Nutrition, *Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea
Health Product Research Team, **Food Research Institute, Amorepacific Corporation R & D Center, Yongin 446-729, Korea

ABSTRACT

The study was conducted to investigate the effects of dietary calcium and soy isoflavone on body fat and lipid metabolism in high fat-induced obesity. Four week old female C57/BL6J mice, known as a good model of diet-induced obesity, were fed low Ca and high fat diet for 6 weeks. After induced obesity, mice were divided into six groups according to diets varying calcium contents (0.1 or 1.5%) and genistein contents (0 or 500 or 1,000 ppm). Body weight, fat pad (perirenal fat and parametrial fat), adipocyte size, serum total lipid and total cholesterol were significantly decreased by both high Ca intake and genistein supplementation. However, the effect of genistein supplementation showed in low Ca-fed groups. Serum LDL-cholesterol and TG were significantly decreased by high Ca intake and genistein supplementation, respectively. In liver, lipogenic enzymes (fatty acid synthase and malic enzyme) activity and TG were significantly decreased by both high Ca intake and genistein supplementation. This inhibitory effect of genistein on lipogenic enzymes showed in low Ca-fed groups. But liver total cholesterol and total lipid were significantly decreased by high Ca intake and genistein supplementation, respectively. Fecal excretion of total lipid, total cholesterol and TG were significantly increased by high Ca intake, not by genistein supplementation. In conclusion, high calcium intake and genistein supplement may be beneficial for suppression of obesity through direct anti-adipogenesis by decreasing fat weight and size and indirect anti-lipogenesis by inhibiting lipogenic enzymes activity and improving lipid profile. (*Korean J Nutrition* 39(8) : 733~741, 2006)

KEY WORDS : calcium, genistein, lipid profile, lipogenic enzymes activity, fat size.

서 론

최근 비만의 유병률은 전세계적으로 빠르게 증가하고 있으며 세계보건협회 (WHO, 2004)에서는 세계인의 3억 1500만 명이 비만이라고 보고하였다.¹⁾ 우리나라의 경우는 2001년 국민건강·영양조사에서 WHO 기준 (BMI > 30 kg/m²)을 적용하였을 때는 비만 유병률이 약 3.2%로 아직 낮은 수치를 보이지만, 대한 비만학회의 기준 (BMI > 25 kg/m²)

을 적용하였을 때는 31%로 선진국들과 비슷한 수치를 보였다. 그러나 동양인은 서양인과 같은 체격이라도 근육량이 적고 체지방 함량이 높아 BMI에 의한 비만판정 시, 비만율은 낮게 평가되지만, 비만으로 인한 대사성 질환 (metabolic disease; metabolic syndrome)으로 발전할 가능성은 더 높다.²⁾

비만은 에너지 대사 불균형 이외에도 칼슘, 아연, 셀레늄, 비타민 D, 건강 기능성 성분 등의 미량 영양소들이 직·간접적으로 관련 되어 있는데, 근래에 대규모 역학조사인 NHANESS III survey 자료를 바탕으로 칼슘과 체중의 상호관련성을 연구한 Jacquain 등³⁾의 연구에서 칼슘 섭취와 체중은 역의 상관관계를 보였다. 또한 여러 선행연구에서도 칼슘을 많이 섭취하는 사람이나 동물에서 BMI가 낮으며 체지방·복부지방 축적이 덜 이루어졌으며, 체내 지질 대사가 개선

접수일 : 2006년 10월 13일

채택일 : 2006년 11월 29일

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail : lysook@snu.ac.kr

되는 것으로 보고하였다.^{3,4)}

한편 건강 기능성 성분의 하나인 이소플라본은 *in vivo*, *in vitro* 연구에서 항산화기능, 항암기능, 항동맥경화기능 및 에스트로젠 유사작용, tyrosine kinase 억제작용 등의 효능을 나타내고 있으며,⁵⁾ 그 외에도 항비만 효과가 있다고 보고⁶⁾ 되고 있다. Goodman-Gruen와 Kritz-Slivestein⁷⁾는 폐경기 여성을 대상으로 한 연구에서 평균 1.3 mg/day 제니스테인 섭취에 따라 BMI는 유의적으로 낮았으며, HDL 콜레스테롤은 유의적으로 높았다고 보고하였다. 비만 동물을 이용한 연구에서도 제니스테인 섭취는 간의 총 콜레스테롤과 중성지방을 낮춘다고 보고하였다.⁸⁾ 또한 제니스테인은 간과 지방조직에 지방축적을 저해한다고 보고되었다.⁹⁾

그러나 최근 비만에 대한 관심의 증가로 칼슘과 제니스테인을 이용한 연구는 많이 진행되고 있으나 이 두 물질을 복합 처방하여 상호작용에 대한 연구는 미흡하다. 또한 대부분의 연구가 폐경기 여성이나 난소절제 동물을 이용하여 지질 개선 효과를 보고하고 있어서 일반여성이나 정상 암컷 동물을 대상으로 한 연구가 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 유전자 변이 없이도 고지방식이에 의해 비만이 잘 유발되는 C57BL/6J 암컷 마우스를 이용하여 식이 중 칼슘과 제니스테인 조성을 달리하여 칼슘과 제니스테인이 지질대사 및 체지방에 미치는 영향 및 이들 성분의 상호효과에 대해 살펴보고자 하였다. 혈액과 간 조직의 지질함량과 분을 통한 지질배설량을 분석하였고, 간의 지방합성 관련 효소들의 활성 및 지방세포 크기, 지방 조직 축적

량을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험 설계 및 식이

평균 체중 15.6 g의 4주령 암컷 마우스 (C57BL/6J mouse) 108마리를 서울대학교 실험동물 자원관리원에서 구입하여 6주간 고지방·저칼슘 식이 (식이 중 beef tallow 15%, cholesterol 1%, Ca 0.1%)를 급여하여 비만을 유발하였다. 이들 마우스는 한 군당 18마리씩 완전임의 배치하여 6군으로 나누어 칼슘 (0.1%, 1.5%)과 제니스테인 (0, 500, 1,000 mg/kg diet)의 함량을 달리하여 다시 8주간 사육하였다. 즉 실험군은 1) 저칼슘 제니스테인 무첨가군 (LCa-G0) 2) 저칼슘 제니스테인 500 ppm 첨가군 (LCa-G500) 3) 저칼슘 제니스테인 1,000 ppm 첨가군 (LCa-G1000) 4) 고칼슘 제니스테인 무첨가군 (HCa-G0) 5) 고칼슘 제니스테인 500 ppm 첨가군 (HCa-G500) 6) 고칼슘 제니스테인 1,000 ppm 첨가군 (HCa-G1000)으로 나누었다. 실험식이 (Table 1)는 기본적으로 AIN-93M 정제식이 조성을 따랐으나 고지방 식이의 지방 급원으로는 우지 15%와 콜레스테롤 1%를 첨가하였다. 또한 제니스테인 (태평양 주식회사, 서울)은 콩에서 추출한 것으로 순도 90% 이상이며, 선행연구⁸⁾에서 고지방식으로 비만을 유도한 수컷 C57BL/6J 마우스에서 항비만 효과를 보인 제니스테인 500과 1,000 ppm을 본 실험의 제니스테인 dose로 선정하였다. 고칼슘식

Table 1. The composition of experimental diets

(g/kg diet)

| Ingredient | Low calcium | | | High calcium | | |
|---------------------------------|------------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|
| | G0 ¹⁾ | G500 | G1000 | G0 | G500 | G1000 |
| Cornstarch | 498.192 | 497.692 | 497.192 | 449.992 | 449.492 | 448.992 |
| Casein | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 |
| Sucrose | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Beef tallow | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |
| Cholesterol | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Fiber | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Mineral mix ²⁾ | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Vitamin mix ³⁾ | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Methionin | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.8 |
| Choline-bitartrate | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| TBHQ | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 |
| CaCO ₃ | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 |
| KH ₂ PO ₄ | - | - | - | 13.2 | 13.2 | 13.2 |
| Genistein | - | 0.5 | 1 | - | 0.5 | 1 |

1) LCa-G0: High fat diet + low Ca (0.1%), LCa-G500: High fat diet + low Ca + Genistein 500 mg/kg, LCa-G1000: High fat diet + low Ca + Genistein 1000 mg/kg, HCa-G0: High fat diet + high Ca (1.5%), HCa-G500: High fat diet + high Ca + Genistein 500 mg/kg, HCa-G1000: High fat diet + high Ca + Genistein 1,000 mg/kg

2) Ca Free-Mineral Mixture based on AIN-93M-MX (ICN, USA)

3) AIN-93-VX (ICN, USA)

이는 칼슘보충 (CaCO₃)에 따라 칼슘과 인의 비율을 2대 1로 조정하기 위해 KH₂PO₄를 첨가하였다. 실험동물 사육실의 온도 22 ± 2°C, 상대 습도 65 ± 5%, 명암 12시간 주기 (light: 06:00~18:00)로 조절하였다. 실험 식이와 식수는 완전 자유급식 (ad-libitum)으로 급여하였으며, 실험 기간 동안 식이 섭취량은 일주일에 두 번, 체중은 일주일에 한번 일정 시간에 측정하였다.

2. 시료 수집 및 전처리

실험 기간 최종일에 실험동물을 약 12시간 절식시킨 후 염산케타민 (케타라, 유한양행)으로 마취하여 모세관을 이용한 안와정맥총 (orbit venous plexus)으로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 하룻밤 방치 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 간조직은 적출 후 생리식염수에 세척하여 여과지에 물기를 제거한 다음 중량을 측정하고 액체 질소로 즉시 동결시켰다.

간 조직에서의 지방합성 효소 활성 측정을 위해 약 1g의 간 조직을 떼어내어 잘게 다진 후 5 ml의 차가운 균질 완충 용액 (50 mM Tris-HCl buffer, 154 mM KCl, 1 mM EDTA buffer, pH 7.4)에 넣고 4°C에서 균질화한 후 균질액을 원심 분리 (4°C, 10,000 × g, 20분)하여 세포 조각들 (cell debris)과 지방층은 버리고 상층액을 다시 취해 초고속 원심 분리 (4°C, 105,000 × g, 60분)하여 세포질 분획 (상층액)을 얻었다. 시료는 1.5 ml 튜브에 나누어 담아 액체 질소에 급속 냉동시켰다.

자궁 주변 지방은 자궁 조직에 부착되어 있는 지방만을 떼어내어 무게를 측정한 후 지방세포의 크기를 측정하기 위해 10% 포르말린용액에 고정하였다. 분은 실험 종료 전 4일 동안 수집하여 중량을 재고 냉동건조하고 분쇄하여 분석에 이용하였다.

시료는 분석조건에 따라 임의로 3마리씩 합하여 분석에 이용하였다.

3. 생화학적 분석

1) 혈청과 간조직 및 분변의 지질 분석

혈청의 총지질 농도는 Frings & Dunn⁹⁾의 방법을 이용하여 540 nm에서 spectrophotometer (Beckman DU-530, USA)로 비색 정량하였다. 혈청의 중성지방, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 농도는 혈액 자동 분석기 (Spotchem, KDK Co., Japan)를 이용하여 측정하였으며, LDL 콜레스테롤 농도는 Friedwald 등¹⁰⁾ 법 {LDL 콜레스테롤 = 총콜레스테롤 - HDL 콜레스테롤 - (중성 지방/5)}을 이용하여 계산하였다.

간과 분은 냉동건조 (freeze-dryer: Labconco, USA)

하여 균질화한 뒤 총 지질 함량은 Floch 등¹¹⁾의 방법을 이용하여 정량하였고, 간의 콜레스테롤과 중성 지방의 농도는 추출한 총 지방을 이소프로판올 용매로 녹인 후 각각 cholesterol hydrolase를 포함한 효소 시약 kit (영동 제약, 한국)와 lipoprotein lipase와 glycerokinase를 포함한 효소 시약 kit (영동 제약, 한국)를 이용하여 측정하였다. 간의 콜레스테롤 농도는 500 nm에서, 간의 중성 지방 농도는 546 nm에서 spectrophotometer (Beckman DU-530, USA)로 비색 정량하였다.

2) 간 조직의 지방합성 효소 활성 측정

간 세포질 분획에서 Malic enzyme 활성은 Ashton¹²⁾의 방법을, Fatty acid synthase 활성은 Linn¹³⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. Malic enzyme은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 4 mM L-malate, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺가 포함된 반응 혼합물에 세포질 분획을 넣고 30°C에서 incubation 시킨 후 340 nm에서 spectrometer (Beckman Du-650, USA)로 NADPH의 생성을 측정하였다. 효소의 활성은 단백질 1 mg당 1분당 생성된 NADPH의 nmol로 나타내었다. Fatty acid synthase 활성은 100 mM potassium phosphate (pH 7.0), 20 mM EDTA, 5 mM acetyl-CoA, 4 mM NADPH이 포함된 반응 혼합물에 세포질 분획을 넣은 후 37°C에서 6분간 incubation 시킨 후 10 mM malonyl-CoA를 넣고 340 nm에서 spectrometer (Beckman Du-650, USA)로 NADPH의 산화를 측정하였다. 효소의 활성은 단백질 1 mg당 1분당 산화된 NADPH의 nmol로 나타내었다.

간의 세포질 분획의 단백질 함량은 혈청 알부민을 표준 용액으로 하여 Biuret법을 이용한 시약 kit (아산 제약, 한국)를 사용하여 측정하였다.

3) 지방세포의 크기 측정

10% 포르말린에 고정시킨 지방조직을 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin 염색하였다. 염색한 조직을 현미경 하에서 관찰하였고 kodak MDS290 Digital Camera system을 이용하여 무작위로 5부위를 촬영하여 NIH Image J program을 이용한 형태학적 변화를 관찰하고 지방세포의 단위 면적당 세포의 크기를 측정하였다.

4. 통계 분석

실험 결과는 SAS program (SAS 6.12 version)을 이용하여 통계 처리하였으며, 모든 결과는 평균과 표준 오차 (Mean ± SE)로 나타내었다. 실험군 간의 유의성은 ANOVA test 후 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test

로 검증하였다. 칼슘과 제니스테인의 상호효과는 Two-way ANOVA를 이용하여 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중증가량 및 식이섭취량

평균체중 15.6 g의 마우스에게 고지방식을 급여하여 사육한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 14주간의 실험식이 섭취 후 평균 체중은 약 4 g정도 증가하였다. 그 증가량을 실험 군 간에 비교해 보면 실험 종료 시 체중과 일일 체중 증가량은 저칼슘 제니스테인 무첨가군 (LCa-G0)에 비해 저칼슘 제니스테인 첨가군 (LCa-G500, 1000)과 고칼슘 섭취군 (HCa-G0, 500, 1000)에서 유의적으로 낮아 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가가 유의적으로 체중 증가폭을 억제시키는 것으로 나타났다. 그러나 실험 종료 시 체중은 HCa-G0, HCa-G500, HCa-G1000군 간의 유의적인 차이는 없어, 제니스테인 첨가에 따른 최종 체중의 억제는 저수준의 칼슘 섭취 시에만 나타났다. 특히 고칼슘 제니스테인 1,000 ppm 첨가군 (HCa-G1000)의 일일 체중 증가량은 LCa-G0의 1/2이하 수준 이었다. 그러나 식이섭취량은 실험 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 2). 이상의 결과는 평소 400 mg 칼슘을 섭취하는 비만한 아프리카계 미국인에게 일년간 1,000 mg의 칼슘 섭취시켰을 때 체중이 4.9 kg 감소하였다고 보고한 Zemel 등⁴⁾의 연구와 골다공증모델 흰쥐에게 8주간 0.5%, 1.5%, 2.5% 칼슘 섭취 시 2.5% 칼슘을 섭취한 그룹에서 일일 체중증가가 유의적으로 낮았다고 보고한 Lee와 Lee¹⁴⁾의 연구결과와 유사하였다. 또한 본 연구는 208명 폐경기여성을 대상으로 평균

1.4 mg/day 제니스테인을 섭취한 여성에서 BMI가 유의적으로 낮았다고 보고한 Goodman-Gruen와 Kritz-Slivesstein⁷⁾의 연구와 동일한 종의 수컷 마우스에게 고지방식을 공급하면서 제니스테인 섭취 수준을 달리했을 때 섭취 수준이 증가할수록 유의적으로 체중이 감소하였다고 보고한 Lee 등⁸⁾의 연구결과와도 유사하였다. 반면에 사람을 대상으로 한 일부연구¹⁵⁾에서는 제니스테인이 포함된 이소플라본 섭취가 체중에 영향을 주지 않는 것으로 보고하여, 제니스테인 섭취로 인한 체중감소는 좀 더 심도 있는 연구가 필요할 것이라 생각된다.

2. 혈청의 지질 함량

혈청 총 지질은 저칼슘 제니스테인 무첨가군 (LCa-G0)에 비해 저칼슘 제니스테인 첨가군 (LCa-G500, 1000)과 고칼슘 섭취군 (HCa-G0, 500, 1000)에서 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 그러나 HCa-G0, HCa-G500, HCa-G1000군 간에 유의적인 차이가 없어, 제니스테인 첨가에 의한 총 지질량의 감소는 저수준의 칼슘 섭취 시에만 나타났다. 중성지방은 제니스테인 무첨가군 (LCa-G0, HCa-G0)에 비해 제니스테인 첨가군 (LCa-G500, 1000 & HCa-G500, 1000)에서 유의적으로 낮은 수치를 보여 제니스테인 섭취에 의해서만 중성지방이 유의적으로 낮아졌다. 총 콜레스테롤은 LCa-G0에 비해 저칼슘 제니스테인 500 ppm 첨가군 (LCa-G500)과 고칼슘 제니스테인 1,000 ppm 첨가군 (HCa-G1000)에서 유의적으로 낮은 수치를 보여 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가는 혈청의 총 콜레스테롤 함량을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. HDL 콜레스테롤은 저칼슘 제니스테인 1,000 ppm 첨가군 (LCa-G1000)이 다른 실험 군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보여 고수준의 칼슘 섭취는 HDL 콜레스테롤을 유의적으로 증가시키고, 제니스테인 섭취는 HDL 콜레스테롤을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 제니스테인 첨가에 의한 HDL 콜레스테롤 감소는 저수준의 칼슘 섭취 시에만 나타났다. LDL 콜레스테롤은 저칼슘 섭취군 (LCa-G0, LCa-G1000)에 비해 HCa-G0, 500, 1000에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내어 고수준의 칼슘섭취는 LDL 콜레스테롤을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 저수준의 칼슘 섭취 시 제니스테인 첨가는 1,000 ppm 수준에서는 LDL 콜레스테롤을 증가시켰지만 500 ppm 수준에서는 콜레스테롤을 감소시켜 상반된 결과를 나타내었다 (Table 3).

위의 칼슘 섭취에 따른 혈청 총지질, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤의 감소와 HDL 콜레스테롤 증가는 폐경기 여성을 대상으로 1년간 칼슘 1,000 mg 섭취시켰을 때 HDL 콜

Table 2. Body weight, weight gain and food intake of mice fed experimental diet containing Ca or genistein

| Groups | Final weight (g) | Weight gain (g/wk) | Food intake (g/wk) |
|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| LCa-G0 | 26.7 ± 0.5 ^{1a} | 0.63 ± 0.06 ^a | 28.8 ± 1.0 ^(NS3) |
| LCa-G500 | 24.4 ± 0.5 ^{b2)} | 0.37 ± 0.03 ^{bc} | 28.2 ± 1.9 |
| LCa-G1000 | 24.5 ± 0.3 ^b | 0.38 ± 0.02 ^{bc} | 27.5 ± 0.9 |
| HCa-G0 | 24.8 ± 0.4 ^b | 0.41 ± 0.04 ^b | 28.8 ± 1.1 |
| HCa-G500 | 24.1 ± 0.4 ^b | 0.33 ± 0.02 ^{bc} | 28.5 ± 1.2 |
| HCa-G1000 | 23.9 ± 0.4 ^b | 0.29 ± 0.02 ^c | 28.9 ± 1.2 |
| Ca effect | **4) | ** | NS |
| Gen effect | ** | ** | NS |
| Interaction | NS | * | NS |

1) Values are means ± SE, n = 18; Initial body weight of rat in approximately 15.6 g

2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05

3) NS: not significantly different among groups

4) **: p < 0.01, *: p < 0.05 by two-way ANOVA test

Table 3. Serum lipid files in mice fed experimental diet containing Ca or genistein

| Groups | Total lipid (mg/dl) | TG (mg/dl) | Total cholesterol (mg/dl) | HDL-C (mg/dl) | LDL-C (mg/dl) |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| LCa-G0 | 928.7 ± 43.2 ^{1)a} | 49.2 ± 2.31 ^c | 135.8 ± 8.3 ^c | 55.3 ± 4.3 ^{ab} | 71.8 ± 4.5 ^b |
| LCa-G500 | 642.3 ± 33.9 ^{2b)} | 38.7 ± 3.1 ^b | 119.8 ± 1.6 ^b | 49.8 ± 2.4 ^b | 62.3 ± 2.1 ^c |
| LCa-G1000 | 628.4 ± 59.6 ^b | 37.7 ± 1.6 ^b | 129.0 ± 3.1 ^{ab} | 39.7 ± 2.6 ^c | 81.8 ± 3.1 ^c |
| HCa-G0 | 706.8 ± 63.9 ^b | 43.3 ± 1.7 ^{ab} | 123.0 ± 2.7 ^{ab} | 55.0 ± 2.1 ^{ab} | 59.6 ± 3.4 ^c |
| HCa-G500 | 660.3 ± 32.6 ^b | 41.3 ± 2.9 ^b | 127.3 ± 4.2 ^{ab} | 59.8 ± 3.1 ^c | 59.2 ± 3.1 ^c |
| HCa-G1000 | 621.6 ± 31.1 ^b | 39.7 ± 2.4 ^b | 118.7 ± 9.1 ^b | 60.2 ± 4.6 ^c | 56.6 ± 8.7 ^c |
| Ca effect | * ⁴⁾ | NS ³⁾ | * | * | ** |
| Gen effect | ** | ** | * | * | ** |
| Interaction | * | NS | ** | * | * |

1) Values are means ± SE, n = 18

2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05

3) NS : not significantly different among groups

4) **: p < 0.01, *: p < 0.05 by two-way ANOVA test

Table 4. Total lipid, triglyceride and total cholesterol concentration in liver of mice fed experimental diet containing Ca or genistein

| Groups | Total lipid (mg/g, dry wt.) | TG (mg/g, dry wt.) | Total cholesterol (mg/g, dry wt.) |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| LCa-G0 | 594.4 ± 13.4 ^{1)a} | 80.9 ± 3.6 ^c | 63.9 ± 3.2 ^c |
| LCa-G500 | 455.6 ± 14.1 ^{2b)} | 70.2 ± 3.8 ^{ab} | 57.8 ± 4.9 ^{ab} |
| LCa-G1000 | 500.0 ± 52.8 ^{ab} | 66.9 ± 2.9 ^{ab} | 58.5 ± 1.8 ^{ab} |
| HCa-G0 | 538.9 ± 63.9 ^{ab} | 68.9 ± 4.2 ^{ab} | 53.8 ± 2.2 ^b |
| HCa-G500 | 500.0 ± 32.7 ^{ab} | 65.9 ± 8.6 ^{ab} | 56.9 ± 3.1 ^{ab} |
| HCa-G1000 | 483.3 ± 25.5 ^b | 64.7 ± 4.1 ^b | 50.1 ± 2.0 ^b |
| Ca effect | NS ³⁾ | * | * |
| Gen effect | * ⁴⁾ | * | NS |
| Interaction | NS | NS | NS |

1) Values are means ± SE, n = 18

2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05

3) NS : not significantly different among groups

4) *: p < 0.05 by two-way ANOVA test

레스테롤이 증가하였다고 보고한 Reid 등¹⁶⁾의 연구결과와 Quebec인 중 많은 양의 칼슘을 섭취한 그룹에서 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤이 유의적으로 낮았다는 Jacqmain 등³⁾의 연구결과와 유사하였다. 또한 흰쥐를 대상으로 고지방식과 함께 고수준의 칼슘을 섭취 시켰을 때 유의적으로 혈청 총 지질, 총 콜레스테롤이 감소하였다는 Lee와 Shin¹⁷⁾의 연구결과와도 유사한 결과를 나타내었다. 이런 칼슘의 저콜레스테롤혈증, 저지혈증은 소화관에서 칼슘이 담즙산과 결합하여 담즙산을 배설시킴으로써 체내 콜레스테롤 pool 감소와 식이 지방의 흡수감소를 가져오기 때문인 것으로¹⁸⁾ 보고되고 있다.

본 연구의 제니스테인 섭취에 의한 혈청 총지질, 총콜레스테롤, 중성지방 감소는 본 연구와 동일한 종인 C57BL/6J 수컷 마우스에게 고지방식이에 제니스테인 0.1%, 0.2%, 0.4% 첨가한 식이를 공급하였을 때 혈청의 총콜레스테롤과 중성지방이 제니스테인의 농도-의존적으로 감소하였다는 Lee 등⁸⁾ 연구결과와 유사하였다. 이런 이소플라본의 지질개선 효과는 식이섬유처럼 담즙산 배설을 증가시키고, LDL-receptor의 활성을 증가시켜 체내 지질량을 감소시켰기 때문으로⁹⁾ 사

료된다. 그러나 본 연구에서 제니스테인 섭취는 LDL 콜레스테롤을 증가 또는 감소시키는 상반된 결과를 보였고, 저수준의 칼슘 섭취 시에는 HDL 콜레스테롤을 감소시키는 결과를 보여 이소플라본의 혈청 지질 개선효과에 대해서는 아직 명확한 결론을 내리기 어렵고 좀 더 많은 연구들이 필요할 것이라 사료된다.

3. 간조직의 지질대사

1) 지질 함량

간 조직의 총 지질은 저칼슘 제니스테인 무첨가군 (LCa-G0)에 비해 저칼슘 제니스테인 500 ppm첨가군 (LCa-G500)과 고칼슘 제니스테인 1,000 ppm 첨가군 (HCa-G1000)이 유의적으로 낮았다. 그러나 HCa-G1000군은 저칼슘 제니스테인 1,000 ppm 첨가군 (LCa-G1000군)과 유의적인 차이를 보이지 않아, LCa-G500, HCa-G1000군의 총 지질 감소 효과는 고수준의 칼슘 섭취에 의한 것보다 제니스테인 첨가에 의한 것이었다. 중성지방은 LCa-G0에 비해 HCa-G1000에서 유의적으로 낮아져, 고수준의 칼슘과 제니스테인 섭취에 의해 중성지방이 유의적으로 감소하였다.

총 콜레스테롤은 LCa-G0에 비해 고칼슘 섭취군 (HCa-G0, 1000)에서 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 그러나 HCa-G0과 HCa-G1000군 간에는 유의적인 차가 없어, 제니스테인 첨가에 의한 변화는 보이지 않았고, 고수준의 칼슘 섭취에 의해서만 총 콜레스테롤이 유의적으로 낮아졌다. 그러나 이런 고수준의 칼슘 섭취에 의한 총 콜레스테롤 감소는 제니스테인 500 ppm 첨가 시에는 낮아지지 않았다 (Table 4).

본 연구의 고칼슘 섭취에 의한 지질 감소 효과는 고수준의 칼슘섭취가 흰쥐의 간의 지질을 개선시켜준다고 보고한 Lee와 Shin¹⁷⁾의 연구결과와 유사하였다. 이는 칼슘이 소화관에서 지방산 및 담즙산과 결합하여 배설시킴으로써 식이 지방의 흡수를 막아 간으로 이동하는 지방량이 감소되었기 때문¹⁸⁾으로 사료된다.

또한 본 연구의 이소플라본 섭취에 의한 총 지질 및 중성 지방의 감소 효과는 C57BL/6J 수컷 마우스의 간조직의 총 지질과 중성지방량이 제니스테인 섭취 시 유의적으로 감소한다고 보고한 Lee 등⁸⁾의 연구결과와 유사하였다. 이런 제니스테인의 간조직 지질개선 효과는 제니스테인이 지방산 산화 과정에 관여하는 medium chain acyl Co A dehydrogenase 및 TCA회로에 관여하는 succinate dehydrogenase의 발현을 증가시켰기⁹⁾ 때문으로 사료된다. 그러나 본 연구에서는 이소플라본의 콜레스테롤 저하 효과는 나타나지 않아 흰쥐에게 5주간 200 mg 이소플라본 공급 시 콜레스테롤 합성에 관여하는 3-hydroxy-3 methyl (HMG)-CoA 활성은 감소하고, 콜레스테롤을 담즙산으로 분해하는 cholesterol 7 α -hydroxylase의 활성은 증가하여 콜레스테롤이 감소하였다고 한 Kawakami 등²⁰⁾의 연구와는 일치하지 않았다.

이상의 결과에서 고칼슘 섭취와 제니스테인 섭취는 간의 지질 함량을 개선하는 효과를 보였다. 그러나 지질대사에 있어서 동물 종에 따라, 칼슘과 이소플라본 종류 및 함량, 섭취기간에 따라 다른 효과가 나타날 수 있으므로 여러 가지 요소를 고려한 연구가 계속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

2) 간조직의 지방합성 효소의 활성도

간조직의 malic enzyme (ME)의 활성도는 저칼슘 제니스테인 무첨가군 (LCa-G0)에 비해 저칼슘 제니스테인 첨가군 (LCa-G500, 1000)과 고칼슘 섭취군 (HCa-G0, 500, 1000)이 유의적으로 낮아 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가가 유의적으로 ME의 활성을 낮추어졌다. 그러나 HCa-G0, HCa-G500, HCa-G1000 군 간에는 유의적인 차이가 보이지 않아 제니스테인 첨가에 의한 ME의 활성 감소는 저수준의 칼슘 섭취 시에서만 나타났다. 간조직의 fatty acid synthase (FAS)의 활성도도 ME의 활성도처럼 LCa-G0

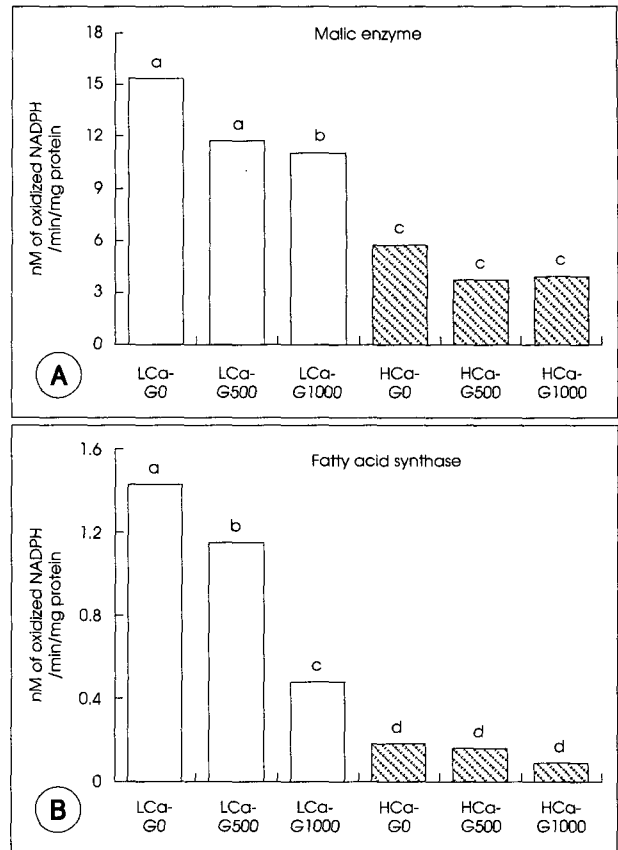


Fig. 1. Activities of malic enzyme (A) and fatty acid synthase (B) in liver of mice fed experimental diet containing Ca or genistein. Data are expressed as Mean \pm SE, n = 18. Values with different superscript are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05.

군에 비해 LCa-G500, LCa-G1000군과 HCa-G0, HCa-G500, HCa-G1000군이 유의적으로 낮아 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가가 유의적으로 FAS의 활성을 낮추어졌다. 그러나 HCa-G0, HCa-G500, HCa-G1000군 간에는 유의적인 차이가 보이지 않아 제니스테인 첨가에 의한 FAS의 활성 감소는 저수준의 칼슘 섭취 시에서만 나타났다 (Fig. 1).

ME는 지방합성 시 NADPH를 공급해주는 효소로서, 갑상선 호르몬 (thyroid hormone)이 증가할수록 ME의 발현 및 활성이 유의적으로 증가한다고 보고²¹⁾ 되었다. 본 연구에서의 제니스테인에 의한 ME의 활성감소는 제니스테인에 의한 thyroid peroxidase (TPO)의 억제로 갑상선 호르몬인 T3, T4의 합성이 방해되었기 때문으로 사료된다.²²⁾ 또한 흰쥐에게 매일 304 mg의 두류를 섭취시킨 군에서 ME활성이 유의적으로 감소하였다고 보고한 Schmutzler 등²³⁾의 연구는 본 연구결과와 유사하였다.

FAS는 사람과 쥐의 지방세포 내 [Ca²⁺] i 농도가 증가하

Table 5. Fecal excretion of total lipid, triglyceride and total cholesterol of mice fed experimental diet containing Ca or genistein

| Groups | Weight (g/day) | Total lipid (mg/day) | TG (mg/day) | Total cholesterol (mg/day) |
|-------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|
| LCa-G0 | 1.13 ± 0.08 ^{1b} | 334.4 ± 23.6 ^b | 2.3 ± 0.2 ^b | 94.1 ± 6.3 ^b |
| LCa-G500 | 0.09 ± 0.03 ^{2b} | 320.8 ± 20.7 ^b | 2.2 ± 0.3 ^b | 66.9 ± 3.8 ^b |
| LCa-G1000 | 1.04 ± 0.05 ^c | 305.9 ± 34.8 ^b | 2.3 ± 0.3 ^b | 88.1 ± 4.1 ^b |
| HCa-G0 | 1.84 ± 0.04 ^c | 604.8 ± 36.3 ^c | 5.1 ± 0.4 ^c | 184.6 ± 16.7 ^c |
| HCa-G500 | 1.84 ± 0.05 ^c | 553.9 ± 28.4 ^c | 4.5 ± 0.5 ^c | 159.8 ± 14.4 ^c |
| HCa-G1000 | 1.85 ± 0.03 ^c | 584.5 ± 28.7 ^c | 4.5 ± 0.6 ^c | 165.3 ± 20.7 ^c |
| Ca effect | **4) | ** | ** | ** |
| Gen effect | NS ³⁾ | NS | NS | NS |
| Interaction | NS | NS | NS | NS |

1) Values are means ± SE, n = 18

2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05

3) NS: not significantly different among groups

4) **: p < 0.01 by two-way ANOVA test

면 그의 활성과 발현이 증가되어 지방합성을 증가시키는 중요한 효소이다.²⁴⁾ 저칼슘 섭취로 인해 혈중 칼슘농도가 감소하면 칼슘조절 호르몬인 부갑상선 호르몬 (PTH)과 활성형 비타민 D (1,25 (OH)₂D₃)의 분비가 증가하여 지방세포내로의 칼슘 유입이 증가되어 [Ca²⁺]_i 높아져 칼슘-의존적인 FAS 활성이 증가된다.²⁴⁾ 따라서 고칼슘을 섭취하면 혈중 칼슘 조절 호르몬들의 분비가 감소하여 지방세포내로 유입되는 칼슘량이 감소되어 FAS 활성이 감소된다. 그런데 본 연구에서도 고수준의 칼슘 섭취가 FAS의 활성을 감소시켜 위의 이론을 뒷받침 해주었다. 또한 aP2-agouti transgenic mice를 이용하여 비만유도 후 고칼슘을 급여한 Xue 등²⁵⁾의 연구에서도 본 연구의 결과와 마찬가지로 FAS 활성이 감소되었다. 한편 본 연구에서 저 칼슘 섭취 시 제니스테인 첨가는 사람의 FAS의 활성을 감소시켰는데, 전립선 암세포 (prostate cancer cell)를 이용한 *in vitro* 실험²⁶⁾에서도 제니스테인과 같은 플라보노이드 종류인 루테올린, 케세틴을 100 μm 처리해 준 결과 FAS의 활성이 감소하였다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 얻었다.

이상의 결과에서 칼슘과 제니스테인 섭취는 지방합성 효소인 ME, FAS 활성을 감소시켜 체내 지방 합성 감소시키는 효과를 줄 것이라 사료된다.

4. 분변의 지질 함량

일일 분변량 및 분변의 총 지질, 중성지방, 총콜레스테롤 배설량은 저칼슘 섭취군 (LCa-G0, 500, 1000)에 비해 고칼슘 섭취군 (HCa-G0, 500, 1000)이 유의적으로 높아, 고수준의 칼슘 섭취에 의한 지질 배설량은 유의적으로 증가하였다. 그러나 제니스테인 섭취에 의한 분변 지질 배설량의 변화는 나타나지 않았다 (Table 5). 이런 결과는 성인 남성에게 400 mg/day 칼슘을 섭취하였을 때보다 1,800 mg/day 칼슘을 섭취시켰을 때 포화지방산 배설이 두 배 증가하였다

는 Denke 등⁸⁾의 연구와 0.1% 저칼슘을 섭취하는 흰쥐에 비해 1.5% 고칼슘을 섭취하는 흰쥐에서 분의 배설량 140%가 증가하였고, 총 지질, 총 콜레스테롤 배설이 유의적으로 증가하였다고 보고한 Lee와 Shin¹⁷⁾의 연구와 유사하였다. 그러나 동물 대상으로 한 연구들^{19,20)}에서 이소플라본이 담즙산과 중성 스테로이드 배설을 증가시켜 담즙 형성을 방해한다고 보고하였으나 본 연구 결과에서는 제니스테인에 의한 담즙 배설 증가로 인한 식이 지질 배설량 증가는 나타나지 않았다. 이상의 결과에서 칼슘에 의한 총 지질 및 중성지방, 총 콜레스테롤 배설량 증가는 간조직과 혈청 중의 낮은 지질 함량과 좋은 상관관계를 이룬다. 즉, 소화관에서 칼슘이 지방산 및 담즙산과 결합하여 이들을 배설시킴으로써 담즙산을 통한 체내 콜레스테롤 배설 증가와 장내로 흡수되는 식이 지방량 감소로 간조직과 혈청의 지질량이 감소되는 것으로 사료된다.

5. 지방조직의 무게와 크기의 변화

자궁주변 지방의 무게 및 체중대비 무게는 저칼슘 제니스테인 무첨가군 (LCa-G0)에 비해 저칼슘 제니스테인 첨가군 (LCa-G500, 1000)과 고칼슘 섭취군 (HCa-G0, 500, 1000)이 유의적으로 낮아, 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가가 지방조직의 축적을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 HCa-G0, HCa-G500, HCa-G1000 군 간에 유의적인 차이가 없어, 제니스테인 첨가에 의한 지방조직 무게 감소 효과는 저수준의 칼슘 섭취 시에서만 나타났다 (Table 6).

자궁주변 지방세포의 크기는 LCa-G0군에 비해 저칼슘 제니스테인 1,000 ppm 첨가군 (LCa-G1000)과 HCa-G0, HCa-G500이 유의적으로 낮아 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가는 지방세포의 크기를 유의적으로 감소시켰다. 그러나 HCa-G0, HCa-G500군 간의 유의적인 차가 없어,

Table 6. Weight and size of parametrial fat tissue in mice fed experimental diet containing Ca or genistein

| Groups | Fat weight (mg) | Relative fat weight ⁵⁾ | Fat size ($\mu\text{m}/\text{cell}$) |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------------|--|
| LCa-G0 | 719.2 \pm 38.3 ^{1)a} | 2.60 \pm 0.11 ^a | 52.2 \pm 2.5 ^a |
| LCa-G500 | 326.5 \pm 37.8 ^{b2)} | 1.30 \pm 0.13 ^b | 49.0 \pm 1.9 ^{ab} |
| LCa-G1000 | 335.5 \pm 19.4 ^b | 1.37 \pm 0.07 ^b | 42.4 \pm 2.2 ^{bc} |
| HCa-G0 | 314.6 \pm 31.8 ^b | 1.28 \pm 0.12 ^b | 41.1 \pm 1.8 ^b |
| HCa-G500 | 310.3 \pm 18.5 ^b | 1.39 \pm 0.07 ^b | 42.0 \pm 3.4 ^{bc} |
| HCa-G1000 | 286.3 \pm 27.6 ^b | 1.19 \pm 0.12 ^b | 46.1 \pm 1.0 ^{abc} |
| Ca effect | ** | ** | * ⁴⁾ |
| Gen effect | ** | ** | NS ³⁾ |
| Interaction | ** | ** | * |

1) Values are means \pm SE, n = 18

2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05

3) NS: not significantly different among groups

4) **: p < 0.01, *: p < 0.05 by two-way ANOVA test

5) Relative fat weight; (fat weight/body weight) \times 100

제니스테인 첨가에 의한 지방세포의 크기 감소는 저수준의 칼슘 섭취 시에만 나타났다 (Table 6).

본 연구의 고수준의 칼슘 섭취에 따른 지방 무게 및 크기 감소 결과는 평균 BMI가 35인 비만한 사람을 대상으로 500 kcal 열량제한과 800 mg/day 칼슘을 24주간 보충한 결과 단순 에너지 제한 군에서는 복부 지방량이 19% 감소한 반면, 에너지 제한과 더불어 칼슘을 섭취시킨 군에서는 50%가 감소하였다고 보고한 Zemel 등²⁴⁾의 연구와 유사하였다.

이런 칼슘에 의한 지방합성 억제효과는 고칼슘 섭취로 인해 지방세포내로 칼슘유입이 적어 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 농도가 낮아지면서 지방합성 관련 유전자의 발현과 활성이 감소되어 지질 합성은 감소하고 지질 분해가 증가되었기 때문인 것²⁴⁾으로 사료된다.

제니스테인에 의한 지방 무게 및 크기 감소는 제니스테인이 지방합성 전사조절자인 C/EBP1 (CCAT/enhancer-binding protein 1), PPAR γ 2 (peroxisome proliferator activated receptor γ 2) 등의 발현을 억제시키고²⁷⁾ 인슐린 신호전달 과정을 방해하여 지방세포내로 당의 유입을 방해하여 글루코코르티코이드가 지방으로 전환되는 것을 방해하기 때문인 것²⁷⁾으로 보인다. 본 실험과 같은 동물종인 C57/BL6J 암컷 마우스를 이용한 실험에서 제니스테인 500, 1,000, 1,500 ppm 섭취수준에 따라 자궁주변 지방 무게가 37%, 40%, 57% 감소하였다고 보고 한 Naaz 등⁶⁾의 연구와 같은 종인 수컷 마우스에게 제니스테인 1,000, 2,000, 4,000 ppm 공급 시 정낭주변 지방의 무게가 제니스테인의 농도-의존적으로 감소하였다는 Lee 등⁸⁾의 연구와 본 연구는 유사한 결과를 얻었다.

요약 및 결론

본 연구에서는 6주간의 고지방식으로 유도된 비만 암컷 마우스를 이용해서 8주간의 칼슘과 제니스테인 함량을 달리하여 칼슘과 제니스테인 항비만 효과 및 메커니즘을 규명하고자 하였다. 본 연구의 결과를 요약하면 아래와 같다.

1) 실험 종료 시 체중과 일일 체중 증가량은 고수준의 칼슘과 제니스테인 첨가에 의해 유의적으로 감소하였다. 그러나 제니스테인 첨가에 의한 최종 체중 억제 효과는 저수준의 칼슘 섭취 시에서만 나타났다.

2) 혈청 총 지질, 총 콜레스테롤은 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가에 의해 유의적으로 감소하였으나 제니스테인 첨가에 의한 총 지질 감소는 저수준의 칼슘 섭취 시에서만 나타났다. 중성지방은 고수준과 저수준 칼슘 섭취 시 둘 다 제니스테인 첨가에 의해 유의적으로 감소하였다. HDL 콜레스테롤은 고수준의 칼슘 섭취에 의해 유의적으로 증가하였으나, 저수준의 칼슘 섭취 시에는 제니스테인 첨가에 의해 감소하였다. LDL 콜레스테롤은 고수준의 칼슘 섭취에 의해 유의적으로 감소하였으며, 저수준의 칼슘 섭취 시에는 제니스테인 첨가에 의해서 감소 또는 증가하였다.

3) 간조직의 총 지질은 제니스테인 첨가에 의해서 유의적으로 감소하였으며, 중성지방은 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가에 의해 유의적으로 감소하였다. 또한 총 콜레스테롤은 고수준의 칼슘 섭취에 의해 유의적으로 감소하였으나, 고수준의 칼슘에 제니스테인 500 ppm 첨가 시에는 감소하지 않았다.

간조직의 malic enzyme과 fatty acid synthase 활성은 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가에 의해 유의적으로 감소하였으나, 제니스테인 첨가에 의한 지방 합성 효소의 활성 감소는 저수준의 칼슘 섭취 시에만 나타났다.

4) 일일 분변량 및 분변의 총 지질, 중성지방, 총콜레스테롤 배설량은 고수준의 칼슘 섭취에 의해서만 유의적으로 증가하였다.

5) 자궁주변 지방조직의 무게와 크기는 고수준의 칼슘 섭취와 제니스테인 첨가에 의해 유의적으로 감소하였으나 제니스테인 첨가에 의한 지방 무게와 크기의 감소는 저수준의 칼슘 섭취 시에서만 나타났다.

이상의 결과로부터 계속된 고지방 섭취로 인한 혈청과 간의 지질 상승에 대하여 칼슘과 제니스테인은 지질 배설량을 증가시키고, 지방합성 효소들의 활성을 억제하여 체내 지질 대사와 지방 축적의 개선효과를 나타내었다. 따라서 비만 동물에서도 충분한 칼슘과 제니스테인 섭취는 비만개선에 긍정적인 효과를 발휘할 수 있을 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) James PT. Obesity: The worldwide epidemic. *Clin Dermatol* 22 (4) : 276-280, 2004
- 2) National Health and Nutrition Survey, Ministry of Health and Welfare, Seoul, 2001
- 3) Jacqmain M, Doucet E, Despres JP, Bouchard C, Tremblay A. Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. *Am J Clin Nutr* 77 (6) : 1448-1452, 2003
- 4) Zemel MB, Shi H, Greer B, DiRienzo D, Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 14 : 1132-1138, 2000
- 5) Watanabe S, Uesugi S, Kikuchi Y. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. *Biomed Pharm* 56 (6) : 302-312, 2002
- 6) 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 : 3315-3320, 2003
- 7) Goodman-Gruen D, Kritiz-Silverstein D. Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women. *Meno-pause* 10 (5) : 427-432, 2003
- 8) Lee YM, Choi JS, Kim MH, Jung MH, Lee YS, Song JH. Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diet. *J Nutr* 22 : 956-964, 2006
- 9) Frings CS, Dunn RT. The colorimetric method for determination of serum total lipids based on the sulfo-phosphovanilin reaction. *Am J Clin Pathol* 52 : 89-91, 1970
- 10) Friedwald WT, Levy RI, 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
- 11) Folch J, Less M, Stanley GHS. A Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226 : 497-502, 1957
- 12) Ashton AR. NADP-malic enzyme from C4 plant *Flaveria bidentis*: Nucleotide substrate specificity. *Arch Biochem Biophys* 345 : 251-258, 1997
- 13) Linn TC. Purification and crystallization of rat liver fatty acid synthetase. *Arch Biochem Biophys* 209 (2) : 613-619, 1981
- 14) Lee JH, Lee YS. Effect of excess calcium and iron supplement on bone loss, nephrocalcinosis and renal function in osteoporotic model rats. *Korean J Nutrition* 33 (2) : 147-158, 2000
- 15) Jenkins DJ, Kendall CW, Jackson CJ, Connelly PW, Parker T, Faulkner D, Vidgen E, Cunnane SC, Leiter LA, Josse RG. Effects of high- and low- isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocystein, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr* 76 : 365-372, 2002
- 16) Reid IR, Mason B, Home A, Ames R, Clearwater J, Bava U, Orr-Walker B, Wu F, Evans MC, Gamble GD. Effects of calcium supplementation on serum lipid concentrations in normal older women: a randomized controlled trial. *Am J Med* 112 (5) : 343-347, 2002
- 17) Lee YS, Shin DM. Effect of dietary calcium and sodium level on lipid metabolism in hyperlipidemic/hypercholesterolemic rats. *Korean J Nutrition* 33 (4) : 403-410, 2000
- 18) Denke MA, Fox MM, Schulte MC. Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. *J Nutr* 123 (6) : 1047-1053, 1993
- 19) Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 128 (6) : 954-959, 1998
- 20) Kawakami Y, Tsurugasaki W, Yoshida Y, Igarashi Y, Nakamura S, Osada K. Regulative actions of dietary soy isoflavone on biological antioxidative system and lipid metabolism in rats. *J Agric Food Chem* 52 (6) : 1764-1768, 2004
- 21) Sood A, Harold LS, Jack HO. Tissue-Specific Regulation of Malic Enzyme by Thyroid Hormone in the Neonatal Rat. *Biochem Biophys Res Commun* 22 (2) : 287-291, 1996
- 22) Divi RL, Chang HC, Doerge DR. Anti-Thyroid Isoflavones from Soybean. *Biochem Pharmacol* 54 (10) : 1087-1096, 1997
- 23) Schmutzler C, Inka H, Peter JH, Gabor K, Luise S, Birgit M, Lutz S, Petra A, Annetic G, Dana S. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone level in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 205 : 95-102, 2004
- 24) Zemel MB. Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr* 21 (2) : 146S-151S, 2002
- 25) Xue B, Zemel MB. Relationship between human adipose tissue agouti and fatty acid synthase (FAS). *J Nutr* 130 (10) : 2478-2481, 2000
- 26) Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 1-29, 2004
- 27) Heim M, Frank O, Kampmann G, Sochocky N, Pennimpede T, Fuchs P, Hunziker W, Weber P, Martin I, Bendik I. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 145 (2) : 848-859, 2004