

고지방식으로 유도된 고지혈증 모델 흰쥐에서 지방과 제니스테인 섭취가 지질대사 및 항산화능에 미치는 영향*

김미현 · 장소영 · 이연숙[§]

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과, 생활과학 연구소

Effect of Dietary Fat and Genistein on Lipid Metabolism and Antioxidant Activity in Hyperlipidemic Male Rats induced High Fat Diet*

Kim, Mi Hyun · Jang, So Young · Lee, Yeon Sook[§]

Department of Food & Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate whether dietary factors, normal fat and genistein leads to beneficial improvement of lipid metabolism and oxidative stress in adult hyperlipidemic male rats. Seven wk-old male SD rats were fed high fat diet (15% fat, 1% cholesterol) for 4 wks for induction of hyperlipidemic model rat. Weight-matched rats were then assigned to four groups according to dietary fat level (7% or 15% fat) and genistein contents (0 or 320 mg/kg diet). Food intake was significantly decreased by both high fat intake and genistein supplementation compared with normal fat intake and genistein no supplementaion. But weight gain was significantly decreased by genistein supplementation in normal fat intake compared with the other groups. Total lipid, total cholesterol and triglyceride in serum and liver were significantly decreased by normal fat intake compared with high fat intake. But total cholesterol in liver was significantly increased by genistein supplementation in both high fat and normal fat intake. TBARS in serum and liver was less produced by normal fat intake compared with high fat intake but TBARS in liver was significantly increased by genistein supplementation compared with genistein no supplementation in normal fat intake. Glutathione reductase activity in erythrocytes was significantly reduced by genistein supplementation in normal fat intake compared with the other groups. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in liver were significantly inhibited by normal fat intake compared with high fat intake. Catalase activity in liver was significantly increased by genistein supplementation compared with genistein no supplementation in high fat intake. Nitrite was significantly decreased by normal fat intake compared with high fat intake. These results suggest that normal fat intake has the treatment effect against risk factors related with cardiovascular disease by reducing lipid profiles, lipid peroxidation. And genistein shows action as a antioxidant replacing antioxidant enzymes but also may act as prooxidant causing the production of TBARS. (*Korean J Nutrition* 39(2): 100~108, 2006)

KEY WORDS : fat and genistein, lipid profiles, antioxidant enzyme activities, TBARS, nitrite.

서 론

서구에서는 오래전부터 심혈관계 질환은 남성과 여성 모두에게 있어 중요한 사망 원인 중의 하나로 알려져 왔으며

2004년 통계청 자료¹⁾에 따르면 우리나라도 사망원인의 2위와 3위가 뇌혈관질환과 심장질환인 것으로 발표되었다. 이런 심혈관계 질환의 주요한 발병 요인들로는 유전적 요인이외에도 비만, 고지혈증, 고혈압 및 당뇨, 담배와 술, 운동부족, 스트레스, 잘못된 식습관과 생활패턴 등이 알려져 있다.²⁾

접수일 : 2006년 2월 2일

채택일 : 2006년 3월 19일

*This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (02-PJ1-PG-22003-0007).

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail : lysook@snu.ac.kr

특히 동맥경화성 심혈관계 질환은 예방과 치료에서 식사 요법이 매우 중요한데, 총 지방 및 포화지방의 섭취량 감소식이섬유 섭취 증가, 콜레스테롤 섭취 제한, 복합 당질 섭취 등이 권장되고 있다. 최근에는 천연 항산화제로 각광받고 있는 비타민류 (비타민 A, C, E), EGCG (epigalloca-

techin-3-gallate), 이소플라본 (genistein, daidzein, glycitein) 등이 심혈관계 질환의 저감인자로 검토되고 있으며,³⁾ 그 외에도 주된 에너지 원인 지방과 탄수화물 섭취가 심혈관계 질환에 미치는 영향에 대한 재검토를 필요로 하고 있다.

일반적으로 지방의 과다 섭취는 혈중 LDL 콜레스테롤 상승, 지방의 축적, 인슐린 저항증, 체중 증가 등⁴⁾을 가져와 심혈관계 환자에게 정상 및 저지방 식이를 권장해 오고 있다. 그러나 정상지방 및 저지방 식이는 대체로 탄수화물의 섭취 비율이 높아 혈중 중성지방량의 증가로 인한 동맥경화 발전 가능성이 제기되고 있다. 실질로 Chahoud 등⁵⁾의 연구에서 혈중 중성지방 수준이 높은 사람에게서는 오히려 정상 및 저지방 식이가 고중성지질혈증을 유발하여 심혈관계 질환을 악화시킨다고 보고하였다. 한편 고지방으로 비만을 유도한 암컷 Sprague-Dawley 흰쥐에게 단기간 고지방과 저지방을 공급한 연구⁶⁾에서는 저지방이 지방유발 유전자 (PPAR γ 2, Lipoprotein lipase)의 발현을 감소시켜 지방조직의 무게 및 지방세포 양을 감소시켰다고 하였다. 그러나 장기간의 저지방 섭취는 오히려 지질 합성이 증가하여 지방 축적이 잘 이루어진다고 보고한 연구⁷⁾도 있어 심혈관계 질환에 어느 수준의 지방 섭취가 가장 적절한지에 대한 부가적인 연구가 필요한 실정이다.

또한 천연항산화제 중 골다공증, 유방암, 전립선암과 같은 만성 질환 및 심혈관계 질환의 위험도를 낮추준다고 알려져 있는 이소플라본은 대두에 풍부하며, 폐경기 고지혈증에서 혈중 지질 함량을 개선하며,⁸⁾ LDL 콜레스테롤의 산화를 방지하고, LDL 수용체 형성⁹⁾에 영향을 주어 동맥경화를 예방하는 것으로 알려졌다.

그러나 대부분의 연구들이 이소플라본의 에스트로겐 유사작용에 초점을 두고 있어 에스트로겐 결핍과는 별도로 유발되는 남성의 심혈관계 질환에서 이소플라본의 섭취효과에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않고 있다. 남성에게서 나타나는 심혈관계 질환은 주로 에스트로겐 결핍으로 인한 여성의 폐경성 고지혈증과는 달리 노화에 따른 성호르몬의 감소뿐만 아니라 식이 요인, 비만, 흡연 등의 복합적인 원인에 의해서 유발된다. 따라서 남성에서 이소플라본의 심혈관계 예방 효과는 에스트로겐 대체 효과와는 독립적인 메커니즘에 의한 것일 가능성이 높다. 실질로 고지방식이와 이소플라본을 처음부터 같이 공급한 수컷 흰쥐의 항산화 효소 활성과 nitrite 함량을 측정 한 선행연구¹⁰⁾에서 이소플라본은 항산화효소들의 활성과 혈관확장제인 nitrite의 수치를 증가시켜 심혈관계 질환의 위험 요소들을 감소시키는 것으로 나타났다.

따라서 본 연구는 고지방식이로 고지혈증을 유발시킨 후 지방의 섭취 수준에 따른 이소플라본(제니스테인)의 심혈관계 질환 억제효과를 체내 지질대사와 항산화능 변화 측정을 통해 알아보고 지방과의 상호작용에 대해서도 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 식이 및 사육

성숙한 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley male rats, 평균 체중 210 g)에게 4주간 고지방 식이 (15% fat, 1% cholesterol of diet wt.)를 급여하여 고지혈증 모델로 설정하였다. 이들 고지혈증 흰쥐들을 지방 (7% or 15% of diet wt.)과 제니스테인 (0 or 320 mg/kg diet) 함량을 달리한 실험 식이로 다시 6주간 사육하였다. 실험군은 지방과 이소플라본 첨가 수준에 따라 고지방 제니스테인 무첨가군 (HF-G0), 고지방 제니스테인 320 ppm 첨가군 (HF-G320), 정상지방 제니스테인 무첨가군 (NF-G0), 정상지방 제니스테인 320 ppm 첨가군 (NF-G320)으로 나누었다. 실험 식이는 기본적으로 AIN-93M 패턴을 따랐으며, 지방과 제니스테인 수준은 선행연구¹⁰⁾ 결과를 기준으로 정하였다. 지방 공급원으로는 우지 (beef tallow)를, 제니스테인 (genistein, 순도 >90%)은 태평양 주식회사로부터 제공받아 사용하였다 (Table 1). 실험동물은 서울대학교 실험동물 자원 관리원의 사육실에서 사육하였으며, 사육실의 온도는 22 ± 2°C, 상대 습도 65 ± 5%, 명암은 12시간 주기 (light: 06:00~18:00)로 조절하였다.

실험 식이와 식수는 자유 섭취시켰고, 실험 기간 동안 식

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

	HF-G0 ⁴⁾	HF-G320	NF-G0	NF-G320
Cornstarch	539.50	539.14	629.50	629.14
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0
Beef tallow	150.0	150.0	70.0	70.0
Cholesterol	10.0	10.0	-	-
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral Mix. ¹⁾	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamine Mix. ²⁾	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
Methionine	3.0	3.0	3.0	3.0
Genistein ³⁾	-	0.32	-	0.32
Total (g)	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

1) AIN-93M-MX. 2) AIN-93-VX. 3) Genistein(purity: over 90%). 4) HF-G0: High fat (15% fat) diet, HF-G320: High fat (15% fat) diet with genistein (320 mg/kg diet), NF-G0: Normal fat (7% fat) diet, NF-G320: Normal fat (7% fat) diet with genistein (320 mg/kg diet)

이 섭취량은 일주일에 2회 일정한 시간에 급여하였고, 체중은 일주일에 1회 일정 시간에 측정하였다.

2. 시료 수집 및 전처리

최종일에 실험동물을 하룻밤 절식시킨 후 염산캐타민(케타라, 유한양행)으로 마취하여 복대 동맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액 중 일부는 일반 튜브에 채취하여 800 × g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 나머지는 EDTA 튜브에 채취하여 800 × g에서 20분간 원심분리 후 혈장과 적혈구를 분리하였다. 혈장과 buffy coat층을 제거한 적혈구는 0.9% 생리식염수를 첨가하여 800 × g에서 10분간 원심 분리하는 세척 과정을 거친 후 0.9% 생리 식염수를 첨가하여 적혈구 현탁액이 되도록 처리되었다. 간 조직은 생리 식염수에 세척한 다음 무게를 측정하였다. 간 조직에서의 항산화 효소 활성 및 지질과산화물 측정을 위해서 간 조직을 균질 완충 용액 (154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA buffer, pH 7.4)과 함께 넣어 균질화한 다음 4°C, 600 × g에서 10분간 원심분리하였다. 지방층을 제거하고 중간층을 취하여 원형질 (cytoplasm) 분획을 취하였으며, 나머지는 4°C, 12,000 × g에서 20분간 원심 분리하여 상층액만 취한 후 다시 이를 초고속 원심 분리기에서 4°C, 38,000 × g에서 60분간 원심 분리하여 세포질 분획 (상층액)과 소포체 분획 (pellet)으로 분리하였다. 소포체 분획은 완충 용액 (균질 완충 용액 : 글리세롤 = 80 : 20, v/w)을 넣어 균질화하였다. 모든 시료는 생화학적 분석을 위해 -85°C에 냉동 보관되었다.

3. 생화학적 분석

1) 혈청과 간조직의 지질 분석

혈청의 총지질 농도는 Frings & Dunn¹¹⁾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 등¹²⁾ 법 {LDL 콜레스테롤 = 총콜레스테롤 - HDL 콜레스테롤 - (중성 지방/5)}을 이용하여 계산하였다.

간의 총 지질 함량은 Bligh & Dyer¹³⁾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. 간

의 콜레스테롤 농도는 500 nm에서, 간의 중성 지방 농도는 546 nm에서 spectrophotometer (Beckman DU-530, USA)로 비색 정량하였다.

2) 적혈구 및 간 조직의 항산화 효소 활성 측정

적혈구와 간 조직의 catalase 활성도는 Aebi¹⁴⁾의 방법을, glutathione peroxidase (GPx) 활성도는 Tappel¹⁵⁾의 방법을, glutathione reductase (GR) 활성도는 Carlberg & Mannervik¹⁶⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 적혈구의 항산화효소 활성도는 헤모글로빈 mg 당으로 나타내고, 간의 원형질과 세포질에서의 항산화효소 활성도는 단백질 mg 당으로 나타내었다.

적혈구의 헤모글로빈 함량은 Cyanmethemoglobin법을 이용한 시약 kit (아산 제약, 한국)를 사용하여 측정하였으며, 간의 원형질과 세포질의 단백질 함량은 혈청 알부민을 표준 용액으로 하여 Biuret법을 이용한 시약 kit (아산 제약, 한국)를 사용하여 측정하였다.

3) 혈청과 간조직의 지질 과산화물 함량

혈청과 간 조직내의 지질 과산화물 함량은 Buege & Aust¹⁷⁾의 thiobarbituric acid (TBA)법을 이용하여 생성된 TBARS의 양을 spectrophotometer (Beckman DU-530, USA)로 535 nm에서 측정하여 단백질 mg 당으로 나타내었다.

4) 혈장의 nitrite 함량

혈장의 nitrite 함량은 Griess¹⁸⁾의 방법을 이용한 Griess Reagent System (Promega #G2930, USA)을 사용하여 microplate reader (Bio-Rad Model 680, USA)로 비색 정량하여 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 test로 유의성을 검증하였다. 또한 지방과 이소플라본 섭취에 따른 효과는 Two-way ANOVA를 이용하여 $p < 0.01$, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중증가량 및 식이섭취량

고지혈증 흰쥐의 초기체중은 약 320 g로 실험군 간에 차이가 없었다. 6주간의 실험식이 급여 후 최종 체중은 실험

험군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 체중증가량은 정상지방 제니스테인 320 ppm 첨가군 (NF-G320)이 정상지방 제니스테인 무첨가군 (NF-G0)보다 유의적 ($p < 0.05$)으로 18.4% 적게 증가하여 제니스테인 섭취 따른 체중증가 제어효과가 나타났다. 식이섭취량은 고지방섭취군 (HF-G0, HF-G320)이 정상지방섭취군 (NF-G0, NF-G320)보다 약 9% 더 적게 섭취하였고, 제니스테인 첨가군 (NF-G320, HF-G320)이 제니스테인 무첨가군 (NF-G0, NF-G320)보다 7% 더 적게 섭취하였는데 그 중 고지방 제니스테인 320 ppm 첨가군 (HF-G320)이 유의적 ($p < 0.05$)으로 가장 낮은 식이 섭취량을 보여 고지방과 제니스테인을 섭취할수록 식이섭취량이 감소하는 것으로 나타났다. 이상과 같이 제니스테인 섭취에 따른 체중증가의 제어효과는 제니스테인 섭취에 따른 식이 섭취량 감소에 기인한 것을 보인다(Table 2).

본 연구의 고지방 식이에 의한 식이섭취량의 감소 및 정상 지방식이에 의한 식이섭취량 증가 결과는 식사횟수와 연관이 있는 것으로 보이는데, Melanson 등¹⁹⁾의 연구를 보면 실험대상자에게 동량의 에너지와 부피를 가지는 지방과 탄수화물이 첨가된 레몬 주스를 각각 공급한 후 식사간격과 횟수를 체크해본 결과, 고지방 첨가 레몬 주스를 섭취한 그룹이 섭취한 지방의 산화로 배고픔이 억제되어 식사 간격과 횟수가 줄어 덜 먹게 되었다고 보고하였다. 또한 Westerterp-Plantenga 등²⁰⁾의 연구에서는 저지방을 섭취한 그룹에서 식사횟수가 늘어 고지방을 섭취한 그룹보다 식이 섭취량이 증가되었다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 결과를 얻었다. 그런데 이런 저지방 식이는 에너지 밀도가 낮아 섭취량이 증가하더라도 전체적인 에너지 섭취량 면에서는 고지방 식이와 유사하였고 보고하였는데 본 연구에서도 정상지방 섭취군 (NF-G0)이 고지방 섭취군 (HF-G0, HF-G320)보다 식이를 더 많이 섭취하긴 하였으나, 체중증가량은 고지방 섭취군과 유의적인 차이를 보이지 않아 위의 연구 결과들을 뒷

받침하였다.

또한 본 연구의 제니스테인 첨가에 따른 체중 증가 억제 결과는 208명 폐경기여성을 대상으로 평균 1.4 mg/day 제니스테인을 섭취한 여성에서 BMI가 유의적으로 낮다고 보고한 Goodman-Gruen 등²¹⁾의 연구와 마우스에게 제니스테인 섭취수준을 달리하여 공급 시 섭취 수준에 따라 유의적으로 체중이 감소하였다고 보고한 Kyselova 등²²⁾의 연구 결과와 유사하였다. 그러나 사람을 대상으로 한 일부 연구²³⁾에서는 제니스테인이 포함된 이소플라본 섭취가 체중에 영향을 주지 않는 것으로 보고하여, 제니스테인에 의한 체중감소는 좀더 부가적인 연구가 필요한 것으로 보인다.

2. 혈청 및 간의 지질함량

혈청 총 지질과 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤의 농도는 정상지방 섭취군 (NF-G0, NF-G320)이 고지방 섭취군 (HF-G0, HF-G320)보다 유의적 ($p < 0.05$)으로 각각 69.9%, 51.1%, 58.3%, 70% 감소하여 정상지방 섭취가 고지혈증 유발 흰쥐의 혈청 지질대사를 개선하는 것으로 나타났다. HDL 콜레스테롤 농도는 실험군 간에 유의적인 차이가 없어, 지방과 제니스테인 섭취에 의한 효과는 나타나지 않았다 (Table 3).

간 조직의 총 지질, 총 콜레스테롤, 중성지방 농도는 정상지방 섭취군 (NF-G0, NF-G320)이 고지방 섭취군 (HF-G0, HF-G320)보다 유의적 ($p < 0.05$)으로 각각 59.1%, 66.4%, 73.5% 감소하여 정상지방 섭취가 간조직의 지질 함량을 낮추는 것으로 나타났다. 그러나 총 콜레스테롤 함량은 제니스테인 첨가군 (NF-G320, HF-G320)이 제니스테인 무첨가군 (NF-G0, HF-G0)보다 유의적 ($p < 0.05$)으로 63.9% 높아, 제니스테인 섭취에 의해 오히려 총 콜레스테롤 함량이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

본 연구의 정상지방 섭취에 따른 혈청 지질농도의 감소 결과는 폐경기 여성에게 식이 지방의 함량을 낮추었을 때

Table 2. Body weight, weight gain, food intake of rats fed fat and genistein

Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g/d)	Food intake (g/d)
HF-G0	319.4 ± 6.2 ^{NS}	409.4 ± 9.1 ^{NS3)}	2.14 ± 0.19 ^{ab2)}	14.9 ± 0.3 ^{bc}
HF-G320	319.0 ± 6.3 ¹⁾	402.6 ± 9.8	2.02 ± 0.19 ^{ab}	14.2 ± 0.3 ^c
NF-G0	320.7 ± 8.5	416.9 ± 9.1	2.29 ± 0.12 ^a	16.5 ± 0.3 ^a
NF-G320	318.2 ± 6.6	396.4 ± 7.3	1.86 ± 0.07 ^b	15.1 ± 0.3 ^b
Fat level	NS	NS	NS	**4)
Genistein	NS	NS	**	**
Interaction	NS	NS	NS	NS

1) Values are means ± SE, n = 9, 2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05, 3) NS: Not significant among groups, 4) *, **: p < 0.05, 0.01

Table 3. Serum total lipid, triglyceride and cholesterol concentration of rats fed fat and genistein

Group	Total Lipid (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Cholesterol		
			Total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
HF-G0	440.0 ± 18.6 ⁰²⁾	87.9 ± 9.9 ^a	177.1 ± 12.7 ^a	25.6 ± 2.0 ^{NS3)}	128.1 ± 14.1 ^a
HF-G320	479.6 ± 21.7 ^a	90.3 ± 9.4 ^a	186.1 ± 7.7 ^a	25.4 ± 1.3 ²⁾	143.7 ± 7.7 ^a
NF-G0	269.3 ± 11.2 ^b	39.7 ± 3.4 ^b	76.0 ± 2.3 ^b	26.2 ± 1.7	41.8 ± 1.4 ^b
NF-G320	271.8 ± 12.8 ^b	47.5 ± 5.1 ^b	75.4 ± 3.2 ^b	27.6 ± 2.2	39.6 ± 1.3 ^b
Fat level	**	**	**	NS	**4)
Genistein	NS	NS	NS	NS	NS
Interacton	NS	NS	NS	NS	NS

1) Values are means ± SE, n = 9, 2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05, 3) NS: Not significant among groups, 4) **: p < 0.01

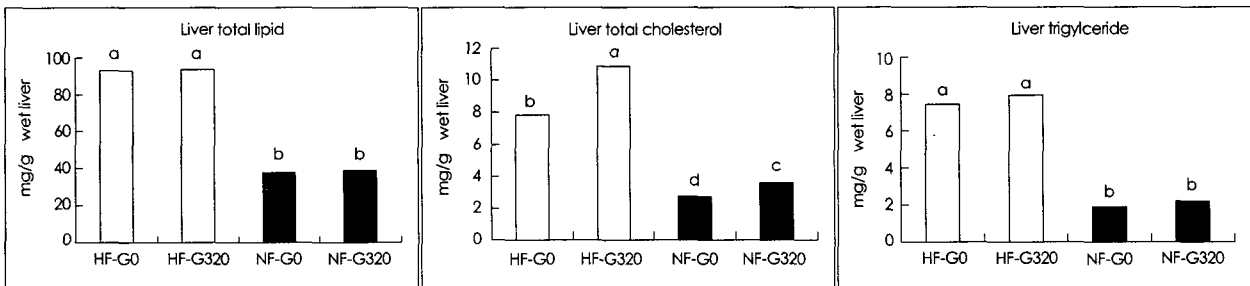


Fig. 1. Total lipid, total cholesterol and triglyceride concentration in liver of rats fed fat and genistein. Values are means ± SE, n = 9. Values with different alphabet are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05.

혈청의 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤이 저하하였다는 Barnard 등²⁴⁾의 연구와 유사하였다. 정상지방 섭취에 의한 총콜레스테롤 감소는 식이로 지방을 적게 섭취하였을 경우 acetyl-CoA carboxylase의 활성이 증가되어 acetyl-CoA가 콜레스테롤 합성보다는 지방산의 연소과정에 많이 이용되기 때문인 것²⁵⁾으로 사료되며, 정상지방 섭취에 의한 LDL 콜레스테롤의 감소는 정상 및 저지방은 LDL 수용체수와 친화도를 증가시켜 혈중 LDL 제거율을 증가시키고, lipoprotein lipase의 활성을 억제하여 VLDL이 LDL로 전환되는 것을 막아주기 때문인 것²⁶⁾으로 사료된다.

또한 본 연구의 총에너지의 20%를 지방으로 공급받은 정상지방 섭취군에서의 혈중 중성지방 저하는 인슐린 비 의존형 당뇨병 환자와 일반인에게 총에너지의 21%를 지방으로 공급하였을 때 혈중 중성지방 및 VLDL 중성지방 농도가 총에너지의 42%를 지방으로 공급받은 군과 유사하다고 보고한 Abbott 등²⁶⁾의 연구와는 달랐으나, 이런 본 연구의 결과는 심혈관계 질환의 치료식으로 지방의 함량을 낮추었을 경우 나타나는 단점 중의 하나였던 고중성지질혈증에 대한 우려를 없애주는 결과였다. 그러나 아직 여러 연구들에서 상반된 결과들이 많아 좀 더 부가적인 연구가 필요한 실정이다.

본 연구의 제니스테인 첨가에 의한 간 내 총 콜레스테

롤 증가는 이소플라본이 콜레스테롤 합성의 핵심 효소인 HMG-CoA의 활성은 억제하고, 콜레스테롤을 담즙산으로 분해하는 cholesterol 7 α -hydroxylase의 활성은 증가시켜 콜레스테롤을 낮추어 준다는 Kawakami 등²⁷⁾의 연구와는 반대되는 것이다. 이런 차이는 식이에 첨가된 이소플라본의 함량 차이 때문인 것으로 사료되는데, 본 연구에서는 제니스테인을 식이무게의 0.032% 첨가하는데 비해, Kawakami 등²⁷⁾의 연구에서는 이소플라본을 식이무게의 0.2%로 첨가하였다.

3. 혈청과 간 조직의 지질과산화물 함량

혈청과 간조직의 TBARS 함량은 정상지방 섭취군 (NF-G0, NF-G320)이 고지방 섭취군 (HF-G0, HF-G320)보다 유의적 (p < 0.05)으로 각각 14.1%, 61.8% 낮아져 식이 지방의 함량을 낮출수록 지질과산화물이 덜 생성되었다. 그러나 혈청과 간의 TBARS는 제니스테인 첨가에 의해 각각 7.8%, 16.1% 정도 증가하는 경향을 보였는데, 그 중 간의 TBARS는 정상지방 제니스테인 320 ppm 첨가군 (NF-G320)이 정상지방 제니스테인 무첨가군 (NF-G0)보다 유의적 (p < 0.05)으로 148.9% 증가하여 정상지방 섭취 시에는 제니스테인 첨가가 TBARS 생성을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

본 연구에서의 고지방 섭취에 따른 지질과산화물 생성

증가 결과는 식이지방의 섭취량이 증가할수록 체내 free radical의 생성이 증가하고 이를 방어하는 체내 항산화시스템도 과량의 유리기 제거로 그 기능이 저하되어 결국은 지질 과산화물의 체내 축적이 이루어졌기 때문으로 보인다. 이는 저지방과 고지방식이를 6주간 공급한 흰쥐에서 저지방식이에서 체내 항산화제인 토코페롤에 의한 지질 과산화물 생성 억제가 이루어 졌다는 Nam & Park²⁸⁾의 연구와 고지방식이를 토끼에게 공급하자 활성산소들의 생성이 증가하여 지질과산화물 생성이 증가하였다는 Yamakoshi 등²⁹⁾의 연구가 뒷받침 해준다. 또한 Nam & Park²⁸⁾의 연구에서 고지방식은 중성지방의 함량을 높이고, LDL 수용체와 결합능이 떨어지는 변형된 LDL를 생성하여, 혈중에서 자유 유리기에 의해 쉽게 산화되어 더 많은 지질과산화물을 생성한다고 보고 하였다. 본 연구에서도 중성지방 수치가 높았던 고지방 섭취군 (HF-G0, HF-G320)이 저지방 섭취군 (NF-G0, NF-G320)보다 TBARS 수치가 높았다.

본 연구의 제니스테인 첨가에 의한 지질과산화물 증가는 고지혈증 모델 토끼에게 식이무게의 0.33%, 1% 이소플라본을 공급하자 대동맥궁에서 지질과산화 산물인 MDA (malondialdehyde)의 함량이 유의적으로 낮아졌다는 Yamakoshi 등²⁹⁾의 연구결과와 상반된 것으로 이는 Yamakoshi 등²⁹⁾의 연구에서는 이소플라본의 함량을 식이무게의 0.33%, 1% 첨가한데 비해 본 연구에서는 0.032%의 낮

은 이소플라본 함량을 첨가했기 때문인 것으로 보인다. 그 외에도 Yamakoshi 등²⁹⁾에서는 식이무게의 3.2%를 지방으로 공급하였으나 본 연구에서는 식이무게의 7%와 15%를 지방으로 공급하여 지질과산화물 생성이 더 잘 생성되는 조건하에 있었기 때문인 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서는 제니스테인이 이미 항산화제로서 다 사용되고 phenoxyl radicals 상태로 남아 산화촉진제로서 작용한 것으로 사료된다.³⁰⁾

4. 적혈구와 간조직의 항산화 효소 활성도

적혈구의 catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px)의 활성은 실험군 간의 유의적인 차이가 없었으며 glutathione reductase (GR) 활성은 정상지방 제니스테인 320 ppm 첨가군 (NF-G320)이 정상지방과 고지방의 제니스테인 무첨가군 (NF-G0, HF-G0)보다 유의적 (p < 0.05)으로 각각 25.3%, 34.4% 낮아져 정상지방과 이소플라본 섭취에 의해 GR의 활성이 낮아지는 것으로 나타났다 (Table 4).

간조직의 glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR)의 활성도는 정상지방 섭취군 (NF-G0, NF-G320)이 고지방 섭취군 (HF-G0, HF-G320)보다 유의적 (p < 0.05)으로 각각 46.6%, 18.9% 감소하여 정상 지방 섭취 시 항산화효소들의 활성이 낮아지는 것으로 나타났다. catalase의 활성은 고지방 이소플라본 320

Fig. 2. Concentration of TBARS in serum and liver of rats fed fat and genistein. Values are means ± SE, n = 9. Values with different alphabet are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05.

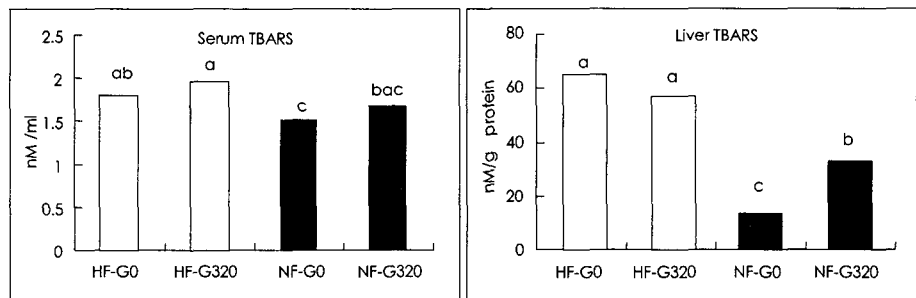


Table 4. Activities of catalase, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase

Group	Catalase Activity (μM of decomposed H ₂ O ₂ /min/mg Hb)	GPx Activity (nM of oxidized NADPH/min/mg Hb)	GR Activity (nM of oxidized NADPH/min/mg Hb)
HF-G0	61.1 ± 2.9 ^{NS3)}	52.2 ± 3.0 ^{NS}	165.2 ± 10.2 ²⁾
HF-G320	66.0 ± 4.9 ¹⁾	49.3 ± 4.5	142.5 ± 13.6 ^{ab}
NF-G0	66.0 ± 6.6	51.1 ± 4.8	145.2 ± 13.8 ^a
NF-G320	59.3 ± 4.8	40.2 ± 3.2	108.4 ± 8.4 ^b
Fat level	NS	NS	* ⁴⁾
Genistein	NS	NS	*
Interaction	NS	NS	NS

1) Values are means ± SE, n = 9, 2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05, 3) NS: Not significant among groups, 4) *: p < 0.05

Table 5. Activities of catalase, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) in liver of rats fed fat and genistein

Group	Catalase Activity (μM of decomposed $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ protein)	GPx Activity (nM of oxidized NADPH/min/mg protein)	GR Activity (nM of oxidized NADPH/min/mg protein)
HF-G0	112.5 \pm 9.3 ^{2a)}	62.5 \pm 6.8 ^a	51.4 \pm 1.6 ^a
HF-G320	134.8 \pm 8.4 ^a	53.7 \pm 5.1 ^{ab}	52.2 \pm 2.4 ^a
NF-G0	97.0 \pm 3.3 ^b	47.2 \pm 3.2 ^b	43.7 \pm 1.9 ^b
NF-G320	101.9 \pm 2.7 ^{1b)}	41.9 \pm 2.2 ^b	40.3 \pm 1.9 ^b
Fat level	**4)	**	**
Genistein	*	NS	NS
Interaction	NS ³⁾	NS	NS

1) Values are means \pm SE, n = 9, 2) Values with different superscript within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05, 3) NS: Not significant among groups, 4) *, **: p < 0.05, 0.01

ppm 첨가군 (HF-G320)이 고지방 이소플라본 무첨가군 (HF-G0)와 정상지방 섭취군 (NF-G0, NF-G320)보다 유의적 (p < 0.05)으로 증가하여 고지방 섭취와 고지방 섭취 시 이소플라본 첨가에 의해 catalase의 활성이 증가하는 것으로 나타났다 (Table 5).

고지방식에 의한 간 내 항산화효소들의 활성 증가 결과는 고지방섭취에 따른 과도한 지질물의 산화과정 중 생긴 다량의 자유 유리기를 제거하기 위함인 것으로 사료된다. 마우스를 이용하여 간조직의 지질과산화물 양과 항산화제 GSH, 항산화효소인 GSH-Px의 활성을 측정 한 Ahotupa 등³¹⁾의 연구에서도 식이 무게의 15%을 지방으로 공급한 군에서 지질과산화물인 TBARS의 함량이 증가하였고 그로 인해 GSH량과 GSH-Px의 활성이 증가하였다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 얻었다.

제니스테인에 의한 적혈구의 GR의 활성 감소는 제니스테인이 폴리페놀 구조를 가지고 있어 양성자를 제공해 주는 역할을 할 수 있기 때문인 것으로 사료된다. 이는 일중항산소 (O_2)로 유도한 적혈구의 광용혈 과정에 있어 제니스테인의 첨가 (10~100 μM)가 농도-의존적으로 양성자를 제공하여 적혈구 용혈을 억제하였다는 Park³²⁾의 연구에 의해 뒷받침된다. 그러나 고지방 섭취 시 제니스테인 첨가에 의한 간 내 catalase 활성 증가는 고지방 섭취 시 생성된 다량 유리기 제거를 위해 제니스테인이 항산화제로 사용되고 나서 산화촉진제 형태인 phenoxyl radicals 전환되었기³⁰⁾ 때문으로 사료되나 제니스테인의 자유 유리기 제거능이 어느 정도 수준인지는 더 많은 연구가 필요하다.

5. 혈장의 Nitrite 농도

혈장의 nitrite 농도는 고지방 섭취군 (HF-G0, HF-G320)에 비해 정상지방 섭취군 (NF-G0, NF-G320)에서 유의적 (p < 0.05)으로 65% 낮았으며 제니스테인 첨가에 의한 효과는 유의적으로는 나타나지 않았으나 고지방 섭취 시 nitrite 함량을 15% 정도 다소 증가시키는 것

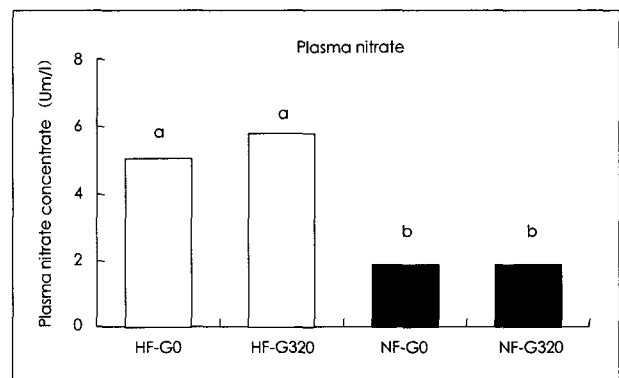


Fig. 3. Nitrate concentration in plasma of rats fed fat and genistein. Values are means \pm SE, n = 9. Values with different alphabet are significantly different by Duncan's multiple range test, p < 0.05.

으로 나타났다 (Fig. 3).

NO (nitric oxide)는 혈관 세포의 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)에 의해 생성되어 혈액 중으로 분비되어 혈관을 확장시키는 혈관확장제로 작용한다고 알려져 있을 뿐만 아니라 혈소판의 활성화와 응집을 억제하며, 혈관 내피세포에 백혈구가 유착되는 것을 감소시켜 심혈관계 질환을 완화시킬 수 있는 중요한 인자 중에 하나이다.

이런 NO는 식이 지방에 의해 영향을 받는데, 2개월간 에너지의 40% 이상을 지방으로 공급한 암컷 쥐를 대상으로 한 Roberts 등³³⁾의 연구에서는 고지방식이 활성화산소들의 생성을 증가시켜, 증가된 활성화산소에 의한 NO synthase 활성의 저하 및 NO 산화로 인해 고혈압이 유도되었다고 보고하여 본 연구와는 상반된 결과를 보였다. 그러나 4% 콜레스테롤 식이를 공급하여 고지혈증을 유도시킨 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 대상으로 한 Rahman 등³⁴⁾의 연구에서는 고지방 식이를 먹인 군에서 NO synthase의 활성이 증가하였다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 얻었다. 그런데 여러 연구들마다 상반된 결과를 나타내고 있는 것은 아마도 NO가 환경에 따라 산화촉진제와 항

산화제로 모두 작용할 수 있기 때문으로 사료되며,³⁵⁾ 이에 대해서는 보다 장기간의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

NO에 미치는 이소플라본의 효과는 최근 폐경기 여성을 대상으로 한 Squadrito 등³⁶⁾의 연구에서 6개월간 매일 54 mg 제니스테인을 섭취하였을 때 혈장의 nitrite 함량이 유의적으로 증가하였고, 혈관계에서 NO와 반대 작용을 하는 endothelin-1의 함량이 제니스테인 섭취에 의해 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 제니스테인 섭취에 의해 NO의 수치가 유의적으로는 증가하지는 않았으나, 전체적으로 제니스테인 320 ppm를 섭취한 군에서 다소나마 증가하는 추세를 보여 위 연구와 유사한 패턴을 보였다.

요약 및 결론

본 연구는 고지방식 섭취로 유도된 고지혈증 모델 숫컷 흰쥐를 이용하여 심혈관계 질환과 관련 있는 영양소 성분인 지방과 제니스테인 섭취가 체내 지질대사와 항산화능에 어떤 영향을 주는지 알아보고 이들 두 성분간의 상호작용에 대해 검토하였다. 결과를 요약하면 아래와 같다.

1) 식이섭취량은 고지방 섭취군과 제니스테인 첨가군이 정상지방 섭취군과 제니스테인 무첨가군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 체중증가 제어효과는 그 중 정상지방에 제니스테인을 320 ppm 첨가한 군에서 유의적으로 나타났다.

2) 혈청과 간조직의 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방은 정상지방 섭취군이 고지방 섭취군에 비해 유의적으로 감소하였으나 간조직의 총콜레스테롤은 정상지방 및 고지방 섭취 시 모두 제니스테인 첨가군이 제니스테인 무첨가군에 비해 유의적으로 증가하였다.

3) 혈청과 간조직의 지질과산화물 (TBARS) 함량은 정상지방 섭취군이 고지방 섭취군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 제니스테인 섭취에 의해서는 오히려 증가하는 경향을 보였다. 특히 간의 TBARS 함량은 정상지방 섭취 시에 제니스테인 첨가군이 제니스테인 무첨가군에 비해 유의적으로 증가되었다.

4) 적혈구의 glutathione reductase의 활성은 정상지방에 제니스테인을 첨가군이 다른 군들에 비해 유의적으로 감소하였다. 간조직의 glutathione reductase, glutathione peroxidase, catalase의 활성은 정상지방 섭취군이 고지방 섭취군에 비해 유의적으로 감소하였고, catalase의 활성은 고지방 섭취 시 제니스테인 첨가군이 제니스테인 무첨가군에 비해 오히려 유의적으로 증가하였다.

5) 혈장의 nitrite 농도는 정상지방 섭취군이 고지방 섭취군에 비해 유의적으로 낮아졌다. 또한 제니스테인 섭취에 의한 효과는 유의적이지 않았으나, 고지방 섭취 시 제니스테인 첨가는 nitrite 함량을 다소 증가시키는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 보면 지방과 제니스테인 섭취가 심혈관계 질환에 미치는 영향은 제니스테인보다는 식이 지방에 의한 것이 더 큰 것으로 나타나 심혈관계 질환의 예방과 치료 차원 면에서 소량 섭취하는 기능성 식품보다는 주된 에너지원인 지방의 제한이 더 우선적으로 이루어져야 될 것을 시사하였다. 또한 본 연구에서 제니스테인은 항산화제로서도 작용할 수 있으나 산화촉진제로서도 작용이 가능함을 시사해주었다. 그러나 천연 항산화제로서도 작용할 수 있는 제니스테인의 용량에 대해서는 좀 더 많은 부가적인 실험이 필요한 것으로 보인다.

Literature cited

- 1) Statistics of Death Cause, Korea National Statistical Office, Seoul, 2004
- 2) Cardiovascular disease risk factors: new areas of research, World Health Organization, Geneva, 1994
- 3) Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 10(1): 38-44, 2000
- 4) Frantz ID, Jr, Dawson EA, Ashman PL, Gatewood LC, Bartsh GE, Kuba K, Brewer ER. Test of the effect of lipid lowering by diet on cardiovascular risk. The Minnesota Coronary Survey. *Atherosclerosis* 9: 129-135, 1989
- 5) Chahoud G, Aude YW, Metha JL. Dietaray recommendations in the prevention and treatment of coronary heart disease: do we have the ideal diet yet? *Am J Cardiol* 94: 1260-1267, 2004
- 6) McNeel RL, Mersmann HJ. Low-and high-carbohydrate diets: body composition differences in rats. *Obes Res* 13(10): 1651-1660, 2005
- 7) Shah M, Garg A. High-fat and high-carbohydrate diets and energy balance. *Diabetes Care* 19(10) : 1142-1152, 1996
- 8) Kim MS, Lee YS. The effect of isoflavone and/or estrogen treatments on bone metabolism in the ovariectomized rats. *J Med Food* 8: 439-445, 2005
- 9) Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, Le boeuf RC. Dietary isoflavones reduces plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 128: 954-959, 1998
- 10) Lee YS, Jang SY, Kim KO. Effect of soy isoflavone intake on nitrite content and antioxidant enzyme activities in male rats fed high-fat diet. *Korean J Nutrition* 38(2): 89-95, 2005
- 11) Frings CS, Dunn RT. The colorimetric method for determination of serum total lipids based on the sulfo-phosphanilin reaction. *Am J Clin Pathol* 52: 89-91, 1970
- 12) Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the con-

- centration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifugation. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972
- 13) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1959
 - 14) Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984
 - 15) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 52: 506-513, 1978
 - 16) Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113: 484-490, 1985
 - 17) Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310, 1978
 - 18) Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H. H. Weselsky un Benedikt Ueber einige azoverbindungen. *Chem Ber* 12: 426, 1879
 - 19) Melanson KJ, Westerterp-Plantenga MS, Saris WHM, Campfield LA. Blood glucose patterns and appetite in time-blinded humans: carbohydrate versus fat. *Regul Integr Comp Physiol* 46: R337-345, 1999
 - 20) Westerterp-Plantenga MS, Kovacs EMR, Melanson KJ. Habitual meal frequency and energy intake regulation in partially temporally isolated men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 102-110, 2002
 - 21) Goodman-Gruen D, Kritiz-Silverstein D. Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women. *Meno-pause* 10 (5): 427-432, 2003
 - 22) Kyselova V, Peknicova J, Boubelik M, Buckiova D. Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *Theriogenology* 61 (7): 1307-1325, 2004
 - 23) Wang Y, Jones PJ, Ausman LM, Lichtenstein AH. Soy protein reduces triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis* 173 (2): 269-275, 2004
 - 24) Barnard ND, Scialli AR, Bertron P, Hurlock D, Edmonds K, Talev L. Effectiveness of a low-fat vegetarian diet in altering serum lipids in healthy premenopausal women. *Am J Cardiol* 85: 969-972, 2000
 - 25) Bocehnek W, Rodges JB. Effect of saturated and unsaturated fats give with and without cholesterol on hepatic cholesterol synthesis and hepatic lipid metabolism. *Biochem Biophys Acta* 528: 1, 1978
 - 26) Abbott WGH, Swinburn B, Ruotolo G, Hara H, Patt Li, Harper I, Grundy SM, Howard BV. Effect of a high-carbohydrate, low-saturated-fat diet on apolipoprotein B and triglyceride metabolism in pima indians. *J Clin Invest* 86: 642-650, 1990
 - 27) 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
 - 28) Nam JH, Park HS. Effect of quality and quantity of dietary fat on status of tocopherol and lipid peroxidation of plasma and tissue in rats. *Korean J Nutrition* 26 (5): 566-577, 1993
 - 29) Yamakoshi J, Piskula MK, Izumi T, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Obata A, Kikuchi M. Isoflavone aglycon-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol fed rabbits. *J Nutr* 130: 1887-1893, 2000
 - 30) Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, Parks DA, Barnes S, Darley-Usmar V. Antioxidant mechanism of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxyl radical scavenging. *Free Radic Biol Med* 31 (12): 1570-1581, 2001
 - 31) Ahotupa M, Bereziat JC, Mantyla E, Bartsch H. Dietary fat-and phenobarbital-induced alternations in hepatic antioxidant functions of mice. *Carcinogenesis* 14 (6): 1225-1228, 1993
 - 32) Park SN. Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean J Food Sci Technol* 35 (3): 510-518, 2003
 - 33) Roberts CK, Vaziri ND, Wang XQ, Barnard RJ. Enhanced NO inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet. *Hypertension* 36: 423-429, 2000
 - 34) Rahman MM, Varghese Z, Moorhead JF. Paradoxical increase in nitric oxide synthase activity in hypercholesterolaemic rats with impaired renal function and decreased activity of nitric oxide. *Nephrol Dial Transplant* 16: 262-268, 2001
 - 35) Hiramoto K, Ohkawa T, Oikawa N, Kikugawa K. In nitric oxide (NO) an antioxidant or a prooxidant for lipid peroxidations? *Hem Pharm Bull* 51: 1046-1050, 2003
 - 36) Squadrito F, Altavilla D, Morabito N, Crisafulli A, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Campo GM, Calapai G, Caputi AP, Squadrito G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 163: 339-347, 2002