

## 구아바잎 추출물이 난소절제 흰쥐에 미치는 항산화 및 혈관보호 효과

고은정 · 유아남 · 김현숙<sup>†</sup>

숙명여자대학교 생활과학대학 식품영양학과

### Effect of oral guava leaf extract administration on antioxidant and vasculoprotective activity in ovariectomized rats

Ko, Eun-Jung · Liu, Yanan · Kim, Hyun-Sook<sup>†</sup>

Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 04307, Korea

#### ABSTRACT

**Purpose:** The aim of this study was to assess the effects of guava leaf extract (GLE) supplementation on antioxidant enzyme activity and expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA in ovariectomized rats. **Methods:** All animals were randomly assigned to four groups (n = 7 for each group): non-ovariectomized control (Sham), the ovariectomized control (OVX), ovariectomy + 150 mg/kg b.w. of GLE (OVX · GL), and ovariectomy + 300 mg/kg b.w. of GLE (OVX · GH). Treatment groups were administered GLE for 8 weeks every day. **Results:** Body weight gain was significantly reduced in the OVX · GL group compared with the OVX group (p < 0.05). The level of serum 17 $\beta$ -estradiol (E2) was significantly lower in the OVX groups than the Sham group (p < 0.05). Serum triglyceride (TG) and HDL-cholesterol levels were not significantly different between all groups. However, serum total cholesterol (TC) level was significantly reduced in the OVX · GH group compared with the OVX group (p < 0.05). Serum free fatty acid (FFA) level and liver TG level were significantly reduced in both OVX · GL and OVX · GH groups compared with the OVX group (p < 0.05). Furthermore, serum glutathione peroxidase (GPx) activity was significantly elevated in the GLE groups (p < 0.05). The mRNA expression level of GPx was not affected by ovariectomy. However, administration of GLE resulted in significantly increased nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) and catalase (CAT) mRNA expression levels in the liver (p < 0.05). In addition, liver nitric oxide (NO) level was significantly reduced in the OVX · GH group compared with the OVX group (p < 0.05). Expression level of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was significantly elevated in the OVX · GH group compared with the OVX group (p < 0.05). **Conclusion:** These results suggest that GLE could have protective effects in OVX rats by stimulating eNOS expression and improving the antioxidant defense system.

**KEY WORDS:** guava leaf extract, ovariectomy, glutathione peroxidase, catalase, endothelial nitric oxide synthase

## 서 론

폐경으로 인한 에스트로젠 결핍은 혈중 총 콜레스테롤 (total cholesterol, TC), 저밀도 지단백질 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 뿐만 아니라 중성지방 (triglyceride, TG) 농도를 증가시키는 한편, 고밀도 지단백질 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)을 감소시킨다는 보고가 있다.<sup>1,2</sup> 또한 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx)의 활성이 저하되고 체내 활성산소종 (reactive oxy-

gen species, ROS)의 세포내 생성과 항산화 방어 기전의 불균형으로 인해 산화스트레스 및 세포손상이 유발된다고 보고되었다.<sup>3</sup> 이러한 산화적 손상이 내피세포의 기능장애에 직접적인 영향을 주며 특히 17 $\beta$ -estradiol의 결핍으로 estrogen receptor  $\alpha$ 에 의해 매개되는 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)가 감소되고 주로 면역반응 조절 및 세포독성에 관여하는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 활성이 증가하여 산화질소 (nitric oxide, NO)의 생성을 증가시킨다.<sup>4</sup> 따라서 폐경기 여성의 대사적 장애를 위해 호르몬 대체요법이 시도되었으나 에스트로젠 치료

Received: April 25, 2017 / Revised: May 10, 2017 / Accepted: June 7, 2017

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-710-9469, e-mail: hskim@sookmyung.ac.kr

© 2017 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 장기간 사용 시 부작용에 대한 보고가 있어,<sup>5</sup> 생리학적 부작용이 적은 천연물에서 해결책을 찾으려는 노력이 계속되고 있다.<sup>6-9</sup> 구아바 (*Psidium guajava* L.)는 도금양과 (Myrtaceae)의 쌍떡잎식물 (Dicotyledoneae)로 구아바잎은 catechins, gallic acid, quercetin, rutin, kaempferol 및 naringenin 등과 같은 폴리페놀 성분이 다량 함유되어 있다.<sup>10</sup> 최근 구아바 잎에 대한 연구를 살펴보면 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 뛰어난 항산화 활성을 보여주었다.<sup>11</sup> 또한 고지방 식이로 비만을 유도한 쥐에 혈중 지질 강하 및 혈관 내피세포의 보호효과가 나타났으며,<sup>12</sup> 인슐린 저항성 지표인 homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA IR)의 감소와 간 조직의 지질축적을 억제한다고 보고된 바 있다.<sup>13,14</sup> 더 나아가 염증유발 흰쥐에서 염증매개물질인 iNOS의 활성 억제 및 NO생성을 감소시킴으로써 항염증 효과에 대한 가능성이 보고되었다.<sup>15</sup> 최근 구아바 잎은 건조된 잎과 분말로 손쉽게 구매할 수 있으며 구아바 잎의 기능성에 대한 관심이 높아지면서 차로 마시는 경우가 증가하였으나 폐경기 여성의 대사적 기능 개선에 대한 연구는 국내외적으로 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 구아바잎 추출물이 폐경기 유도 흰쥐의 지질 대사, 항산화 효소 활성과 항산화 관련유전자 및 eNOS의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하고자 한다.

## 연구방법

### 구아바잎 추출물의 제조

본 연구에 사용된 시료인 구아바 (*Psidium guajava* L.)잎은 제주도에서 재배한 후 건조되어 순수 분말화 된 제품으로 (주)갑당약초 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

분말형태의 구아바잎 50 g을 70% 에탄올로 37°C에서 4시간동안 환류추출 (reflux extraction)을 시행하였다. 추출물은 filter paper (3MM CHr, Whatman, Maidstone, UK)와 0.45 µm bottle filter (Corning Bottle-Top Vacuum Filter System, Corning Inc, Massachusetts, USA)를 사용하여 두 번의 여과를 시행하였다. 회전진공 농축기 (N-21NS, EYELA, Tokyo, Japan)로 40°C에서 감압 농축을 시행하고 동결 건조 후 -70°C 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다. 구아바잎 추출물의 추출 수율은 13.2% 이었다.

### 실험동물의 사육조건 및 난소적출수술

본 연구에 사용된 동물은 9주령의 female, Sprague-Dawley rat (180~190 g)으로 KOATECH (Gyeonggi-do, Korea)에서 분양 받아 본 실험에 사용하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 21 ± 2°C, 습도 40~60%를 유지하며

환기 횟수는 15~20회/시간, 암모니아 농도 20 ppm 이하, 명암은 12L/12D로 조성하였다. 본 연구에서 모든 동물실험은 숙명여자대학교 동물실험 윤리위원회로부터 실험계획승인 (SMWU-IACUC-1502-023)을 받은 후 진행하였다. 총 2주간의 적응기간 후 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 군을 나누어 난소절제술을 진행하였다. 마취유도를 위해 Zoletil (Virbac S.A, Carros cedex, France)과 Rompun (Bayer Korea, Seoul, Korea)을 1:1로 섞어 0.2~0.23 ml를 복강 내에 주입한 후 난소절제군 (n = 21), 모조수술군 (n = 7)의 수술을 시행하였다. 난소절제군은 양쪽 등 부위 피부와 근육을 절개하여 양쪽 난소를 제거한 후 절개부를 봉합하였고 모조수술군은 난소절제술과 같은 방법으로 진행되 난소 절제는 하지 않은 상태에서 동일한 스트레스에 노출시킨 후 다시 봉합하는 수술을 시행하였다.

### 실험동물의 식이 및 체중측정

실험군은 모조수술군 (non-ovariectomized control, Sham), 난소절제군 (ovariectomized control, OVX), 난소절제 및 저농도 구아바잎 추출물 급여군 (ovariectomy + 150 mg/kg b.w of guava leaf extract, OVX·GL), 난소절제 및 고농도 구아바잎 추출물 급여군 (ovariectomy + 300 mg/kg b.w of guava leaf extract, OVX·GH)과 같이 총 4개 군으로 나누었다. 총 8주동안 매일 오전 9시에 OVX·GL군과 OVX·GH군은 증류수에 녹인 구아바잎 추출물을 경구 투여로 제공하였으며 대조군인 Sham군과 OVX군은 증류수 1 ml를 제공하였다. 기본 식이로는 AIN-93G (Research diet, New Brunswick, NJ, USA)를 자율급식으로 이틀에 한번 오전 10시에 식이를 제공하였고 제공한 양과 남은 양의 무게를 각각 측정하였다. 체중은 일주일에 한번씩 동일한 시간에 측정하였으며 식이섭취효율 (food efficiency ratio, FER)은 다음과 같은 공식으로 측정하였다.

$$\text{FER (feed efficiency ratio)} = \frac{\text{the total amount of weight gain (g)}}{\text{the total intake of food (g)}} \times 100$$

### 혈청 및 장기 채취

혈청 및 장기를 채취하기 위해 12시간 절식 시킨 후 CO<sub>2</sub> 가스를 사용하여 실험동물을 희생하였다. 혈청은 심장천자 (cardiac puncture)를 통해 채취하였으며 채취한 혈액은 3,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심 분리한 뒤 -70°C 냉동고에 보관하였다. 조직은 간, 자궁 및 자궁지방을 적출하여 무게를 측정된 뒤 -70°C 냉동고에 보관하였다.

### 혈청 17 $\beta$ -estradiol 및 지질농도

혈청 내 17 $\beta$ -estradiol (E2)의 농도는 estradiol kit (ES180S-100-CalBiotech, Spring Valley, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 유리지방산 (free fatty acid, FFA)의 농도는 FFA assay kit (EFFA-100, BioAssay Systems, Hayward, USA)를 사용하여 ELISA reader (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, Vermont, USA)로 450 nm과 570 nm 흡광도를 측정 한 뒤, 표준곡선에 값을 대입하여 계산하였다. 혈청 중의 TG (3I1570; Asanpharm, Hwaseong, Korea), TC (3I2020; Asanpharm, Hwaseong, Korea), HDL-C (3I2030; Asanpharm, Hwaseong, Korea)은 각각의 효소 kit를 사용하여 측정하였다. 혈청 LDL-C 및 VLDL-C 농도는 Friedewald equation을 사용하여 아래와 같은 공식으로 산출하였다.

$$\text{LDL cholesterol (mg/dL)} = \text{total cholesterol level (TC)} \\ - (\text{HDL cholesterol level} + \text{TG level}/5) \text{ (mg/dL)}$$

$$\text{VLDL cholesterol (mg/dL)} = \text{TG level}/5 \text{ (mg/dL)}$$

### 혈청 항산화 효소 활성 측정

혈청 GPx 효소 활성 측정은 glutathione peroxidase activity colorimetric assay kit (K762-100, BioVision, CA, USA)를 사용하여 분석하였으며 CAT의 효소 활성 측정은 Aebi<sup>16</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0) 1.9 ml에 혈청 250  $\mu$ l를 혼합한 후 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액 1 ml를 혼합하여 240 nm에서 변화된 흡광도를 측정하였다.

### 간 조직 Nitric oxide, Triglyceride 및 TBARS 측정

간 조직의 NO 생성량은 채취한 간 조직에 lysis buffer로 균질화 시킨 후 Griess assay를 이용하여 측정하였다. 샘플 50  $\mu$ l와 Griess reagent (0.1% N-ethylene diamine (NED) in water and 1% sulfanilamide (SA), in 5% phosphoric acid) 50  $\mu$ l를 96 well plate에 각각 분주하고 10분간 실온에서 반응시킨 후 ELISA reader (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, Vermont, USA)를 사용하여 540 nm파장에서 NO 생성량을 측정하였으며 sodium nitrate (0.5~100 M)로 표준곡선을 작성한 후 NO 생성량을 정량하였다. 간 조직 TG 농도 측정은 Folche<sup>17</sup>의 방법을 이용하여 0.1 g의 간 조직을 2 ml chloroform/methanol (2:1, v/v)에 넣고 균질화 시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리를 시행하였다. 그 후 하층액 1 ml를 취해 분석에 사용하였으며 간 조직의 TG 농도는 TG-S kit (3I1570, Asan pharmaceutical, Hwaseong, Korea)로 측정하였다. 간 조직

의 지질과산화물 (malondialdehyde, MDA)함량 측정은 Buege와 August<sup>18</sup>의 방법에 따라 지질과산화의 최종산물인 MDA 생성량을 측정하는 방법으로 시행하였다. 간 조직을 10% TCA (trichloroacetic acid)와 혼합하여 균질화 시킨 뒤 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 TBA (thiobarbituric acid) 용액을 혼합하여 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 얼음에 10분간 식힌 뒤 3,000 rpm으로 실온에서 30분간 원심분리를 시행하였다. 그 후에 상층액을 취하여 450 nm, 532 nm, 600 nm에서 각각 흡광도를 측정 한 후에 다음 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{MDA content } (\mu\text{mol/L}^{-1}) \\ = 6.45 \times (\text{A532}-\text{A600}) - 0.56 \times \text{A450}$$

### Nrf2, CAT, GPx 및 eNOS 유전자 발현 측정

간 내 mRNA의 발현을 확인하기 위해 easy-spin<sup>TM</sup> total RNA extraction kit (17221, iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)를 사용하여 추출하였다. 간 조직에서 추출한 RNA는 ELISA reader (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, Vermont, USA)를 이용하여 정량 한 뒤 DEPC를 첨가해 50 ng/ $\mu$ l로 희석하여 사용하였다. 분리된 RNA를 증폭하여 측정하기 위해서 Maxime RT-PCR Premix kit (25131, iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)를 사용하였다. 분리된 RNA 2  $\mu$ l와, forward primer 2  $\mu$ l, reverse primer 2  $\mu$ l, DEPC 14  $\mu$ l를 premix에 분주한 뒤 Thermal cycle (T-100, Bio-Rad Laboratories, CA, US)을 사용하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 시행하였다. 항존유전자인 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) PCR 조건은 94°C에서 30초간 DNA denaturing을 시행하고 56°C에서 1분 동안 2 종류의 primer는 각각 상보적인 한 가닥 주형 DNA에 annealing하였다. 그 후 72°C에서 30초간 extension을 시행하고 33cycle로 증폭시킨 후 마지막으로 72°C에서 5분간 보관하였다. 항산화 유전자 발현조절 전사인자인 Nrf2의 PCR 조건은 95°C에서 1분 동안 denaturation을 시행하고 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 시행하고 cycle 횟수는 30cycle로 증폭시킨 후 72°C에서 5분간 보관하였다. 항산화 효소인 GPx PCR 조건은 94°C에서 30초 denaturation, 58°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 시행하여 30 cycle로 증폭시킨 후 75°C에서 10분간 보관하였다. 또한 CAT PCR 조건은 94°C에서 30초 denaturation, 55.5°C에서 30초 annealing, 72°C에서 1분 extension을 시행하고 30cycle로 증폭시킨 후 72°C에서 10분간 보관하였다. 내피세포 산화질소 합성

효소인 eNOS는 94°C에서 30초 denaturation, 59°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 시행하고 45 cycle로 증폭시킨 후 마지막으로 72°C에서 7분간 보관하였다. 간 내 mRNA의 측정을 위해 사용된 primer는 Table 1과 같고 PCR 결과물은 2% agarose gel에 각각 15 µl씩 분주하여 전기영동을 시행하였다. 밴드 판독은 Gel Doc system (GDS-200D Biotech Co, Yeongi-do, Korea)을 이용하였으며 분석은 GelQuant version 2.7 beta 프로그램을 사용하였다.

### 통계처리

연구 결과는 SAS 프로그램 (package version 9.4, USA)을 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차 (Mean ± SD)로 나타내었다. 각 군에 따른 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA) 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 각 실험 군 간의 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 체중변화와 식이효율

총 8주간의 구아바잎 추출물의 경구투여로 인한 체중변화와 식이효율은 Table 2에 제시하였다. 초기 체중은 모든 군에서 유의적인 차이가 없었지만 실험종료 시 체중 증가량은 OVX군이 Sham군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ( $p < 0.0001$ ). 특히 OVX·GL군이 OVX군에 비해 체중 증가량이 15.9% 유의적으로 감소하였으며 ( $p = 0.0004$ ) OVX·GH군은 OVX군에 비해 감소하는 경향은 있었으나 유의적인 차이는 없었다. 식이효율 (feed efficiency ratio, FER)은 OVX군이 Sham군에 비해 유의적으로 증가하였으며 난소절제 대조군인 OVX군과 비교했을 때 OVX·GH군

은 감소하는 경향은 있었지만 유의적인 차이는 없었다. 또한 OVX·GL군은 OVX군에 비해 식이효율이 유의적으로 감소하여 Sham군과 유사한 수준을 보였다 ( $p = 0.0007$ ).

### 장기 무게 변화

실험동물의 장기무게는 Table 2와 같다. 난소절제 대조군인 OVX군은 간, 자궁지방의 무게가 모두 Sham군과 비교 시 유의적으로 증가하였으며 ( $p = 0.0029$ ,  $p = 0.0014$ ) 자궁무게는 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.0001$ ). 실험군인 OVX·GL군과 OVX·GH군은 난소절제 대조군인 OVX군과 비교해 볼 때 자궁무게가 OVX·GL군이 유의적으로 증가하였으며 ( $p = 0.0117$ ), OVX·GH군은 증가하는 경향은 있었지만 유의적인 차이는 없었다. 또한 간 무게는 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 OVX군에 비해 유의적으로 감소하였으며 ( $p = 0.0199$ ,  $p = 0.0387$ ) 자궁지방 무게는 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 OVX군에 비해 감소하는 경향은 있었지만 유의적인 차이는 없었다.

### 혈청 17β-estradiol 농도

혈청 17β-estradiol 수준에 대한 결과는 Table 2에 나타내었다. 난소를 절제한 모든 군이 모조수술 대조군인 Sham군과 비교해 보았을 때 각각 OVX군 16.9%, OVX·GL군 21.6%, OVX·GH군 38.5%로 혈청 17β-estradiol 수준이 유의적으로 감소하였으며 ( $p < 0.05$ ) 난소절제 대조군인 OVX군과 비교 시 OVX·GL군은 혈청 17β-estradiol 수준이 유의적인 차이가 없었으나 OVX·GH군은 유의적으로 감소하였다 ( $p = 0.0035$ ).

### 혈청 및 간 조직 지질 농도

총 8주간 구아바잎 추출물을 경구투여한 실험동물의 혈청 지질지표 및 간 조직 TG 농도를 Table 3에 제시하였다.

**Table 1.** Sequences of primers for RT-PCR

Gene	Primer	Molecule sequence (5'-3')	Annealing	Cycle
Nrf2 <sup>1)</sup>	Forward	CCATTACGGAGACCCAC	55°C	30
	Reverse	TGAGCGGCAACTTTATTC		
GPx <sup>2)</sup>	Forward	CTCTCCGCGGTGGCACAGT	58°C	30
	Reverse	CCACCACCGGGTCGGACATAC		
CAT <sup>3)</sup>	Forward	GCGAATGGAGAGGCAGTGATAC	55.5°C	30
	Reverse	GAGTGACGTTGTCTTCATTAGCACTG		
eNOS <sup>4)</sup>	Forward	ATGGATGAGCCAACCTCAAGG	59°C	45
	Reverse	CTGTCTCAGGAGGCTCTGC		
GAPDH <sup>5)</sup>	Forward	CCTCTCTCTGCTCTCAGTAT	56°C	33
	Reverse	GTATCCGTTGTGGATCTGACA		

1) nuclear factor erythroid 2-related factor  
 eraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

2) Glutathione peroxidase

3) Catalase

4) Endothelial nitric oxide synthase

5) Glyc-

혈청 TG, VLDL-C 및 HDL-C의 농도는 모든 그룹간에 유의적인 차이가 없었으며 ( $p < 0.05$ ) 난소절제 대조군인 OVX군에서 TC, FFA, LDL-C의 농도는 Sham군과 비교 시 유의적으로 증가하였다 ( $p = 0.0259$ ,  $p = 0.0865$ ,  $p = 0.0341$ ). 구아바잎 추출물을 경구투여한 OVX·GL군과 OVX·GH군이 OVX군에 비해 혈청 TC 농도가 각각 6%와 14%로 감소하였고 특히 OVX·GH군에서 혈청 TC 농도가 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 혈청 FFA의 농도는 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 OVX 군보다 유의적으로 감소하였다 ( $p = 0.0003$ ,  $p = 0.0005$ ). 혈청 LDL-C은 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 OVX군에 비해 유의적인 차이가 없었다. 간 조직 TG 농도는 난소절제 대조군인 OVX군이 모조수술 대조군인 Sham군에 비해 증가하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 구아바잎 추출물을 경구투여한 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 OVX군에 비해 각각 49.7%, 41.9%로 간 조직 TG 농도가 유의적으로

감소하였으며 ( $p = 0.0032$ ,  $p = 0.0122$ ), Sham군보다도 감소하는 경향을 보였다.

### 간 조직 과산화지질 및 산화질소 함량

난소절제로 폐경을 유도한 흰쥐의 간 조직 NO 수준을 관찰하였다. 난소절제 대조군인 OVX군이 Sham군에 비해 33% 증가하였지만 유의적인 차이는 없었다. 그러나 구아바잎 추출물을 경구투여한 OVX·GL군과 OVX·GH군은 난소절제 대조군인 OVX군에 비해 간 조직의 NO 수준이 각각 23.6%, 34.2%로 감소하였으며 OVX·GH군에서 유의적으로 감소하였다 ( $p = 0.0091$ ). 간 조직의 TBARS 생성량은 모든 군에서 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 1).

### 혈청 catalase 및 glutathione peroxidase 측정

혈청 항산화 효소 활성은 Fig. 2에 제시하였다. 혈청 CAT 농도는 군간의 유의적인 차이가 없었으며 혈청 GPx 농도

**Table 2.** Serum estradiol, body weight, food intake, food efficiency ratio, and organ weight<sup>1)</sup>

	Sham	OVX	OVX·GL	OVX·GH
Estradiol	2.31 ± 0.28 <sup>a4)</sup>	1.92 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.81 ± 0.28 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.27 <sup>c</sup>
Body weight (g)				
Initial	210.49 ± 5.79 <sup>ns2)</sup>	212.20 ± 7.12	218.70 ± 9.72	200.36 ± 16.33
Final	264.87 ± 9.95 <sup>c</sup>	359.63 ± 19.57 <sup>a</sup>	302.47 ± 24.17 <sup>b</sup>	323.10 ± 42.61 <sup>b</sup>
Body weight gain	54.38 ± 6.30 <sup>b</sup>	147.43 ± 18.29 <sup>a</sup>	83.76 ± 30.36 <sup>b</sup>	122.74 ± 49.48 <sup>a</sup>
Food intake (g/day)	14.88 ± 4.34 <sup>ns</sup>	13.62 ± 0.38	13.33 ± 0.97	13.13 ± 0.93
FER <sup>3)</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.08 <sup>ab</sup>
Organ weight (g)				
Liver	7.21 ± 0.60 <sup>b</sup>	8.80 ± 0.95 <sup>a</sup>	7.73 ± 0.46 <sup>b</sup>	7.62 ± 0.95 <sup>b</sup>
Uterus	0.54 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.37 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.27 <sup>bc</sup>
Uterin fat	3.40 ± 1.16 <sup>b</sup>	7.37 ± 2.26 <sup>a</sup>	6.04 ± 1.07 <sup>a</sup>	6.67 ± 2.74 <sup>a</sup>

1) Sham; non-ovariectomized control, OVX; ovariectomized control, OVX·GL; ovariectomy + 150 mg/b.w. guava leaf extract, OVX·GH; ovariectomy + 300 mg/b.w. guava leaf extract 2) ns; not significant 3) FER; food efficiency ratio 4) Values are mean ± SD (n = 7 for each group). The different letters (a > b > c) within a column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) determined by Duncan's multiple range test.

**Table 3.** Serum lipid profile and liver triglyceride level<sup>1)</sup>

	Sham	OVX	OVX·GL	OVX·GH
Serum (mg/dl)				
Triglyceride	130.96 ± 13.22 <sup>ns2)</sup>	160.61 ± 71.21	159.47 ± 14.03	153.74 ± 9.37
TC <sup>3)</sup>	175.61 ± 14.45 <sup>b8)</sup>	207.28 ± 29.64 <sup>a</sup>	195.99 ± 11.99 <sup>ab</sup>	181.48 ± 22.22 <sup>b</sup>
HDL-C <sup>4)</sup>	73.71 ± 5.59 <sup>ns</sup>	75.22 ± 11.75	71.60 ± 5.61	67.49 ± 6.35
LDL-C <sup>5)</sup>	75.71 ± 9.28 <sup>b</sup>	99.54 ± 23.25 <sup>a</sup>	92.49 ± 10.56 <sup>ab</sup>	83.24 ± 24.29 <sup>ab</sup>
VLDL-C <sup>6)</sup>	26.19 ± 2.64 <sup>ns</sup>	32.12 ± 14.24	31.89 ± 2.81	30.75 ± 1.87
FFA <sup>7)</sup>	164.60 ± 61.95 <sup>b</sup>	234.36 ± 77.06 <sup>a</sup>	59.36 ± 47.48 <sup>c</sup>	54.12 ± 27.47 <sup>c</sup>
Liver (mg/g)				
Triglyceride	402.61 ± 140.10 <sup>ab</sup>	532.28 ± 169.23 <sup>a</sup>	267.89 ± 87.27 <sup>b</sup>	309.14 ± 48.84 <sup>b</sup>

1) Sham : non-ovariectomized control, OVX : ovariectomized control, OVX·GL : ovariectomy + 150 mg/b.w. guava leaf extract, OVX·GH; ovariectomy + 300 mg/b.w. guava leaf extract 2) ns; not significant 3) TC; total cholesterol 4) HDL-C; high density lipoprotein cholesterol 5) LDL-C; low density lipoprotein cholesterol 6) VLDL-C; very low density lipoprotein cholesterol 7) FFA; free fatty acid 8) Values are mean ± SD (n = 7 for each group). The different letters (a > b > c) within a column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) determined by Duncan's multiple range test.

는 난소절제 대조군인 OVX군이 Sham군에 비해 감소하는 경향이 있었지만 유의적인 차이는 없었다. 구아바잎 추출물을 경구투여한 OVX·GL군과 OVX·GH군은 난소절제 대조군인 OVX군과 비교 시 혈청 GPx 농도가 각각 35.2%, 34%으로 유의적으로 증가하였으며 ( $p = 0.0187$ ,  $p = 0.0026$ ) 모조수술 대조군인 Sham군보다 증가하는 경향을 보였다.

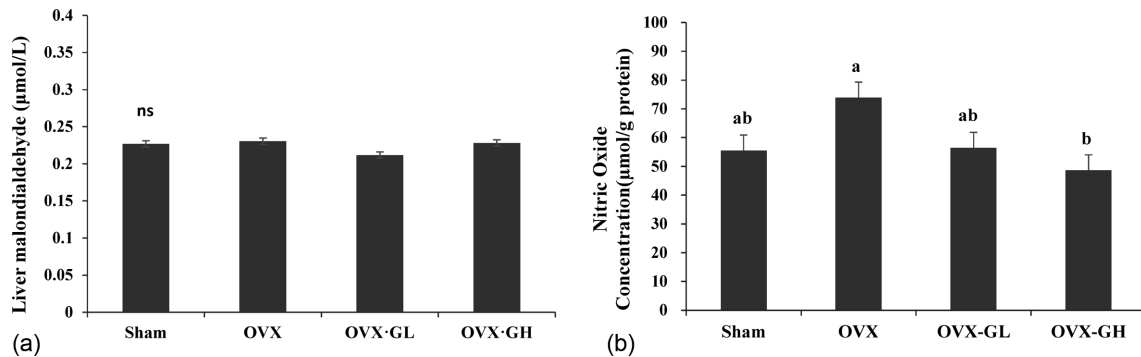
### 간 조직의 항산화 효소 및 eNOS의 mRNA 수준

간 조직에서 RT-PCR을 통해 측정된 Nrf2, GPx, CAT, eNOS의 mRNA 발현 수준은 Fig. 3에 나타내었다. 간 조직에서 GPx의 mRNA의 발현 수준은 모든 군에서 유의적인 차이가 없었으며 Nrf2의 mRNA 발현 수준은 OVX군이 Sham군에 비해 24.6% 감소하였지만 유의적인 차이는 없었다. 구아바잎 추출물을 경구투여한 OVX·GL군과 OVX·GH군은 난소절제 대조군인 OVX군과 비교 시 Nrf2의 mRNA 발현 수준이 유의적으로 증가하였다 ( $p = 0.0045$ ,  $p = 0.0092$ ). 또한 CAT의 mRNA의 발현 수준은 OVX군이

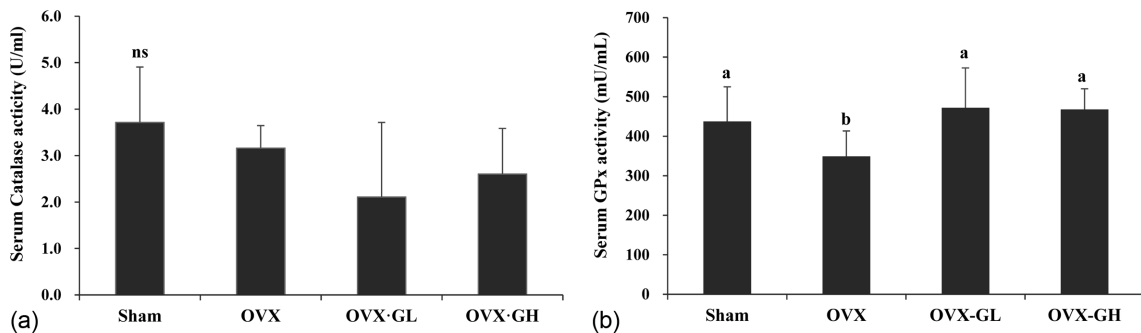
Sham군에 비해 유의적으로 감소하였으며 ( $p < 0.05$ ), 구아바잎 추출물을 경구투여한 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 OVX군과 비교하였을 때 CAT의 mRNA 발현 수준이 각각 64.8%, 45.9%로 유의적으로 증가하였다 ( $p = 0.0034$ ,  $p = 0.003$ ). 내피세포 산화질소 합성효소인 eNOS의 mRNA 발현 수준은 OVX군이 Sham군에 비해 22% 감소하였지만 유의적인 차이는 없었다. 구아바잎 추출물을 경구투여한 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 OVX군에 비해 eNOS의 mRNA 발현 수준이 증가하였으며 OVX·GH군에서 유의적으로 증가하였다 ( $p = 0.0076$ ).

### 고 찰

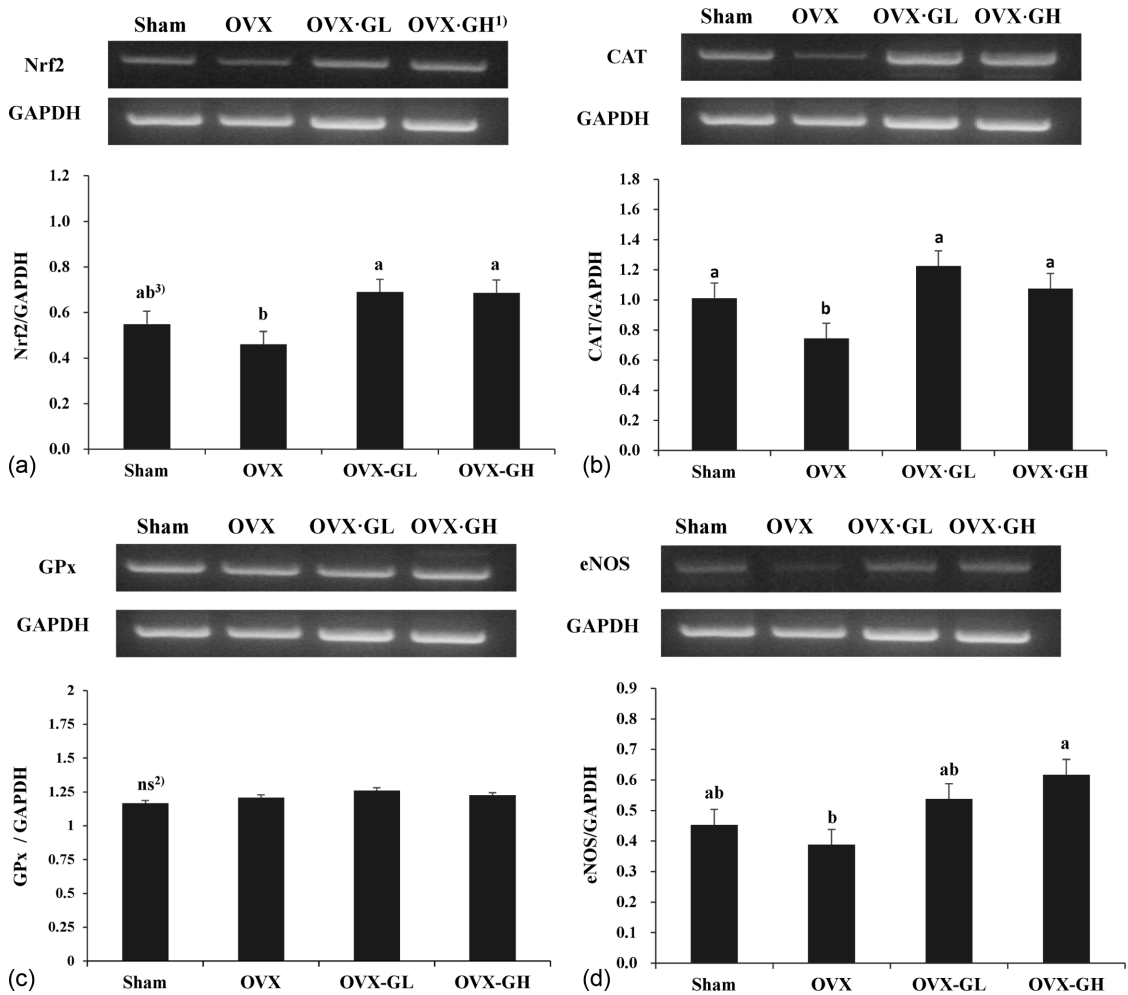
본 연구에서는 폐경 동물 모델로서 난소 절제 흰쥐를 사용하여 구아바잎 추출물을 8주간 경구투여 한 다음 지질대사, 항산화 효소 활성, 항산화 관련유전자 및 eNOS의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.



**Fig. 1.** Liver malondialdehyde and nitric oxide levels of each group. (a) Liver malondialdehyde, (b) Liver nitric oxide. Sham; non-ovariectomized control, OVX; ovariectomized control, OVX·GL; ovariectomy + 150 mg/b.w. guava leaf extract, OVX·GH; ovariectomy + 300 mg/b.w. guava leaf extract, ns; not significant. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 7$  for each group). The different letters ( $a > b > c$ ) within a column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) determined by Duncan's multiple range.



**Fig. 2.** Serum catalase and glutathione peroxidase levels of each group. (a) Serum catalase, (b) Serum glutathione peroxidase. Sham; non-ovariectomized control, OVX; ovariectomized control, OVX·GL; ovariectomy + 150 mg/b.w. guava leaf extract, OVX·GH; ovariectomy + 300 mg/b.w. guava leaf extract, ns; not significant. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 7$  for each group). The different letters ( $a > b > c$ ) within a column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) determined by Duncan's multiple range test.



**Fig. 3.** mRNA expression of Nrf2, CAT, GPx and eNOS in liver of each group. (a) Nrf2; nuclear factor erythroid 2-related factor, (b) CAT; catalase, (c) GPx; glutathione peroxidase, (d) eNOS; endothelial nitric oxide synthase. 1) Sham; non-ovariectomized control, OVX; ovariectomized control, OVX-GL; ovariectomy + 150 mg/b.w. guava leaf extract, OVX-GH; ovariectomy + 300 mg/b.w. guava leaf extract, 2) ns; not significant. Values are mean  $\pm$  SD (n = 7 for each group). The different letters (a > b > c) within a column indicate significant differences (p < 0.05) determined by Duncan's multiple range test.

### 혈청 17 $\beta$ -estradiol에 미치는 영향

실험 종료 시 난소를 절제한 모든 군에서 Sham군보다 혈청 17 $\beta$ -estradiol 농도가 유의적으로 감소하였으며 이러한 결과는 다른 선행연구에서도 난소절제를 확인하는 수단으로 사용된 바 있다.<sup>6-8</sup> 또한 구아바잎 추출물을 급여한 OVX·GH군에서 OVX군과 비교 시 유의적으로 감소하였는데 Das<sup>19</sup>의 연구에 따르면 난소절제 흰쥐에 홍차 추출물을 급여한 결과 홍차에 함유한 폴리페놀 성분 및 식물성 에스트로겐이 포유류의 에스트로겐 수용체와 결합함으로써 혈청 estradiol의 농도가 증가한다는 결과와 다소 상이하였다. 선행연구에 따르면 폐경기로 인한 에스트로겐 결핍의 보상기전으로 지방조직을 포함한 말초조직에서 에스트로겐 합성을 촉진시키는 효소인 aromatase의 유전자

발현이 증가되는 것으로 밝혀졌다.<sup>20</sup> 또한 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 catechin, epicatechin, gallic acid등과 같은 폴리페놀 성분이 aromatase 효소 활성을 저해하는 것으로 보고된 바 있어,<sup>21,22</sup> 본 연구에서는 구아바 잎에 함유된 폴리페놀 성분으로 인해 혈중 aromatase의 효소 활성을 억제 시킴으로써 혈중 17 $\beta$ -estradiol의 농도가 감소된 것으로 사료된다.

### 체중 증가량 및 지방 대사에 미치는 효과

폐경기에는 체내 에너지 저장이 증가되고 에너지 효율은 감소하며 에스트로겐을 생성하기 위해 체지방을 증가시키려는 보상기전과 함께 lipoprotein lipase (LPL) 활성의 감소로 지방조직이 축적된다.<sup>23,24</sup> 또한 폐경 후에는 혈

중 TC 및 LDL-C 농도가 증가되어 혈관질환의 발병률이 높아지는 것으로 보고되었다.<sup>25,26</sup> 본 연구에서 나타난 식이섭취량은 군간의 유의적인 차이가 없었으며 체중 증가량, 식이효율, 간 및 자궁지방의 무게에서 OVX군이 Sham군에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였다. 반면 자궁무게는 난소절제 대조군인 OVX군에서 유의적으로 감소하였는데 이러한 결과는 난소절제술로 인한 자궁의 퇴화가 자궁무게를 감소시킨다는 연구결과와 일치하였다.<sup>27</sup> 구아바 잎 추출물을 급여한 OVX·GL군의 체중 증가량 및 식이섭취효율이 OVX군에 비해 유의적으로 감소하였으며, OVX·GH군에서는 유의적인 차이가 없었다. 자궁무게는 OVX·GL군에서 난소절제 대조군인 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였으며 OVX·GH군에서는 유의적인 차이가 없었다. 또한 혈청 LDL-C 및 HDL-C의 농도는 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 OVX군과 비교 시 유의적인 차이는 없었지만, TC의 농도는 OVX·GH군이 OVX군에 비해 유의적으로 감소하였다. Gue 등<sup>28</sup>의 연구에 따르면 구아바 잎 추출물이 실험동물에서 지방산의 esterification의 감소 및 지방산 합성 효소를 억제함으로써 체중감소에 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 당뇨모델 쥐를 사용한 연구에서 구아바 잎 추출물이 HDL-C 농도를 증가시키고 TC, TG, LDL-C의 농도는 감소시키는 것으로 나타났다.<sup>25,26</sup> 이러한 연구결과를 근거로 하여 볼 때 현재까지 대부분 구아바 잎의 기능성에 관한 연구가 당뇨모델 흰쥐로 이루어졌으며 폐경기 동물모델을 사용한 연구가 없어 직접적인 비교는 할 수 없지만 구아바 잎의 특정 폴리페놀 성분이 에스트로젠 결핍으로 인한 에너지 효율 및 대사적 변화에 미치는 효과가 다소 차이가 있을 것으로 사료된다. 또한 폐경기에는 혈중 FFA농도 및 간 내 TG 농도가 증가하며 과도한 FFA 생성 및 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6)와 같은 adipocytokine 분비로 인해 인슐린 저항성의 위험이 증가하는 것으로 나타났다.<sup>29-31</sup> 본 연구에서는 OVX군이 Sham군에 비해 혈청 FFA 농도가 유의적으로 증가함을 확인하였으며 간 내 TG 농도 또한 증가하는 경향은 있었지만 유의적인 차이는 없었다. 그에 반해 OVX·GL군과 OVX·GH군에서 혈청 FFA 및 간 내 TG 농도가 OVX군보다 유의적으로 감소하였다. Yoshitomi 등<sup>13</sup>의 연구에 따르면 대사증후군 모델인 수컷 쥐에 구아바 잎 추출물을 급여한 결과 간 조직의 지질 축적 억제 및 인슐린 저항성을 개선하는 것으로 나타났으며, 본 연구에서도 폐경기 모델인 흰쥐에 구아바 잎 추출물이 간 내 지질축적 및 인슐린 저항성의 위험을 낮출 수 있는 가능성을 보여주었다.

### 항산화 효소 활성 및 mRNA 발현에 미치는 효과

폐경기 여성은 노화 및 에스트로젠 결핍으로 인해 산화 스트레스가 증가함으로써 심혈관계 질환의 위험이 증가한다.<sup>32,33</sup> 이와 같은 산화스트레스로부터 세포를 보호하는 분자기전인 Nrf2는 핵 내 유전자 상류에 존재하는 antioxidant response element (ARE)와 결합하여 SOD, CAT, GPx 등 체내 산화스트레스를 억제할 수 있는 항산화 효소 및 phase II 효소의 발현을 촉진시키는 것으로 보고되었다.<sup>34,35</sup> 한편 간 독성을 유도한 흰쥐에서 구아바 잎 추출물을 투여한 결과 간 내 CAT 및 GPx와 같은 항산화 효소의 활성이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며,<sup>36</sup> *in vitro* 실험에서도 높은 항산화 작용을 나타내는 것으로 보고되었다. 이는 구아바 잎에 함유한 ferulic acid, quercetin, guavin B, ascorbic acid, gallic acid 및 caffeic acid와 같은 폴리페놀 성분과 관련이 있는 것으로 나타났다.<sup>37</sup> 본 연구에서는 난소절제로 폐경을 유도한 흰쥐에 구아바 잎 추출물을 8주간 급여한 결과 간 내 Nrf2 및 CAT mRNA 발현 수준을 증가시켰으며 혈청 GPx 효소 활성을 증가시켰으므로 유의적인 항산화 효과가 있음을 확인하였다.

### eNOS 발현 수준을 통한 혈관 보호에 미치는 효과

난소절제 동물모델에서 iNOS 활성 및 간 조직의 미트콘드리아 분획에서 NO 방출이 증가함으로써<sup>38,39</sup> 세포증식 및 세포독성과 관련하여 혈관장애를 유발하는 것으로 보고되었다.<sup>40-42</sup> 본 연구에서는 구아바 잎 추출물을 경구투여한 모든 군에서 간 내 NO 수준이 감소 하였으며, 특히 OVX군과 비교 시 OVX·GH군에서 유의적으로 NO수준이 감소함을 확인하였다. 더 나아가 OVX·GL군과 OVX·GH군 모두 혈관수축이완, 혈소판응집억제, 신생혈관형성 등의 기능을 하는 eNOS의 mRNA 발현 정도가 OVX군에 비해 증가하였으며 농도 의존적으로 OVX·GH군이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

따라서 본 연구의 결과를 종합해 볼 때, 폐경을 유도한 흰쥐에 구아바 잎 추출물을 8주간 투여한 결과 항산화 효소 및 항산화 관련유전자와 eNOS의 mRNA 발현 수준을 증가 시킴으로써 항산화 기능 증강 및 폐경으로 인한 혈관장애 개선에 유리한 보호작용을 할 것이라 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 난소절제 흰쥐에 구아바 잎 추출물을 8주 동안 경구투여한 결과 난소절제 대조군인 OVX군과 비교 시 체중 증가량 및 혈중 유리지방산이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다. 또한 간 내 중성지방 농도가 OVX·GL군



과 OVX·GH군에서 모두 유의적으로 감소하였으며 혈중 항산화 효소인 GPx 농도가 유의적으로 증가하였다. 간 내 항산화 효소 및 eNOS의 mRNA 발현 정도를 측정된 결과 OVX군에 비해 구아바잎 추출물 급여군인 OVX·GL군과 OVX·GH군에서 모두 Nrf2 및 CAT의 mRNA 발현 정도가 유의적으로 증가하였으며 eNOS 또한 OVX·GH군에서 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과를 종합해 볼 때 구아바잎 추출물 경구투여는 항산화 효소의 활성을 증가시키고 혈관내피세포의 기능을 향상시킴으로써 폐경 후 나타날 수 있는 혈관질환과 산화스트레스로 인한 대사적 장애 개선에 도움이 될 것으로 사료된다.

## References

- Salpeter SR, Walsh JM, Ormiston TM, Greyber E, Buckley NS, Salpeter EE. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8(5): 538-554.
- Pasquali R, Casimirri F, Pascal G, Tortelli O, Morselli Labate A, Bertazzo D, Vicennati V, Gaddi A; Virgilio Menopause Health Group. Influence of menopause on blood cholesterol levels in women: the role of body composition, fat distribution and hormonal milieu. *J Intern Med* 1997; 241(3): 195-203.
- Nasirzadeh M, Rasouli A. Pretreatment effect of alcoholic olive leaf extract on oxidative and antioxidative enzymes status in ovariectomized rats. *Int J Womens Health Reprod Sci* 2016; 4(2): 77-80.
- Ramezani Tehrani F, Behboudi-Gandevani S, Ghasemi A, Azizi F. Association between serum concentrations of nitric oxide and transition to menopause. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015; 94(7): 708-714.
- Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N; HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288(1): 49-57.
- Yoo JH, Liu Y, Kim HS. Hawthorn fruit extract elevates expression of Nrf2/HO-1 and improves lipid profiles in ovariectomized rats. *Nutrients* 2016; 8(5): E283.
- Hwang HJ, Kang MS, Kim BK, Jung BM, Kim M. The effect of *Opuntia humifusa* seed extracts on platelet aggregation and serum lipid level in ovariectomized rats. *J Life Sci* 2012; 22(12): 1680-1687.
- Patki G, Allam FH, Atrooz F, Dao AT, Solanki N, Chugh G, Asghar M, Jafri F, Bohat R, Alkadhi KA, Salim S. Grape powder intake prevents ovariectomy-induced anxiety-like behavior, memory impairment and high blood pressure in female Wistar rats. *PLoS One* 2013; 8(9): e74522.
- Sevastre B, Taulescu M, Marcus I, Benedec D, Mocanu A, Hanganu D. Protective effect of grape seed extract in experimental menopausal syndrome. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2014; 118(3): 860-865.
- Hsieh CL, Huang CN, Lin YC, Peng RY. Molecular action mechanism against apoptosis by aqueous extract from guava budding leaves elucidated with human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) model. *J Agric Food Chem* 2007; 55(21): 8523-8533.
- Ironi EA, Agboola SO, Oboh G, Boligon AA, Athayde ML, Shode FO. Guava leaves polyphenolics-rich extract inhibits vital enzymes implicated in gout and hypertension in vitro. *J Intercut Ethnopharmacol* 2016; 5(2): 122-130.
- Diaz-de-Cerio E, Rodriguez-Nogales A, Algieri F, Romero M, Verardo V, Segura-Carretero A, Duarte J, Galvez J. The hypoglycemic effects of guava leaf (*Psidium guajava* L.) extract are associated with improving endothelial dysfunction in mice with diet-induced obesity. *Food Res Int* 2017; 96: 64-71.
- Yoshitomi H, Guo X, Liu T, Gao M. Guava leaf extracts alleviate fatty liver via expression of adiponectin receptors in SHRSP.Z-Lepr<sup>fa/lzm</sup> rats. *Nutr Metab (Lond)* 2012; 9: 13.
- Deguchi Y, Miyazaki K. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of guava leaf extract. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7: 9.
- George L, Rajendran B, Manickam V, Ragothaman A, Sirajudeen K, Tamizhselvi R. *Psidium guajava* leaf extract modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated primary mouse neutrophils thereby inhibiting NF- $\kappa$ B activity. *Int J Biol Pharm Res* 2014; 5(11): 870-875.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1): 497-509.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
- Das AS, Das D, Mukherjee M, Mukherjee S, Mitra C. Phytoestrogenic effects of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (*Rattus norvegicus*) model of osteoporosis. *Life Sci* 2005; 77(24): 3049-3057.
- Misso ML, Jang C, Adams J, Tran J, Murata Y, Bell R, Boon WC, Simpson ER, Davis SR. Adipose aromatase gene expression is greater in older women and is unaffected by postmenopausal estrogen therapy. *Menopause* 2005; 12(2): 210-215.
- Satoh K, Nonaka R, Ishikawa F, Ogata A, Nagai F. In vitro screening assay for detecting aromatase activity using rat ovarian microsomes and estrone ELISA. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(3): 357-362.
- Monteiro R, Azevedo I, Calhau C. Modulation of aromatase activity by diet polyphenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2006; 54(10): 3535-3540.
- Wade GN, Gray JM, Bartness TJ. Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes* 1985; 9 Suppl 1: 83-92.
- Serra MC, Ryan AS, Goldberg AP. Reduced LPL and subcutaneous lipid storage capacity are associated with metabolic syndrome in postmenopausal women with obesity. *Obes Sci Pract* 2017; 3(1): 106-114.
- Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol* 1994; 9(5): 619-626.
- Campos H, Wilson PW, Jiménez D, McNamara JR, Ordovas J, Schaefer EJ. Differences in apolipoproteins and low-density lipoprotein subfractions in postmenopausal women on and off estrogen therapy: results from the Framingham Offspring Study. *Metabolism* 1990; 39(10): 1033-1038.
- Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao YL, Yan CD, Gu SL. Oestrogen

- changed cardiomyocyte contraction and  $\beta$ -adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol* 2008; 93(9): 1034-1043.
28. Guo X, Yoshitomi H, Gao M, Qin L, Duan Y, Sun W, Xu T, Xie P, Zhou J, Huang L, Liu T. Guava leaf extracts promote glucose metabolism in SHRSPZ-Leprfa/Izm rats by improving insulin resistance in skeletal muscle. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 52.
  29. Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, Rosato FE, Goldstein BJ. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(12): 5662-5667.
  30. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 2006; 281(36): 26602-26614.
  31. Geer EB, Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med* 2009; 6 Suppl 1: 60-75.
  32. Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci (Lond)* 2011; 120(9): 357-375.
  33. Effendy NM, Shuid AN. Time and dose-dependent effects of *Labiisia pumila* on bone oxidative status of postmenopausal osteoporosis rat model. *Nutrients* 2014; 6(8): 3288-3302.
  34. Dong J, Sulik KK, Chen SY. Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol in vivo: implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(12): 2023-2033.
  35. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47(1): 89-116.
  36. Dash DK, Yeligar VC, Nayak SS, Ghosh T, Rajalingam R, Sengupta P, Maiti BC, Maity TK. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) R.Br. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Trop J Pharm Res* 2007; 6(3): 755-65.
  37. Thaipong K, Boonprakob U, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36 Suppl 4: 254-257.
  38. Kireev RA, Tresguerres AF, Vara E, Ariznavarreta C, Tresguerres JA. Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens, and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. *Biogerontology* 2007; 8(5): 469-482.
  39. Lee YM, Cheng PY, Hong SF, Chen SY, Lam KK, Sheu JR, Yen MH. Oxidative stress induces vascular heme oxygenase-1 expression in ovariectomized rats. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(1): 108-117.
  40. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1997; 1(2): 107-120.
  41. Laurent M, Lepoivre M, Tenu JP. Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 1996; 314(Pt 1): 109-113.
  42. Cau SB, Carneiro FS, Tostes RC. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Front Physiol* 2012; 3: 218.