

난소절제로 비만이 유도된 암컷 쥐에서 제니스테인의 항비만 효과

정선효[†]

목원대학교 테크노과학대학 의생명·보건학부
(2017년 6월 15일 접수: 2017년 6월 17일 수정: 2017년 6월 29일 채택)

Anti-obesity Effects of Genistein in Female Ovariectomy-induced Obese Mice

Sun-Hyo Jeong[†]

*Division of Biomedical Engineering & Health, Science Management, College of Science & Technology,
Mokwon University, Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 302-729, Korea
(Received June 15, 2017; Revised June 17, 2017; Accepted June 29, 2017)*

요약 : 제니스테인(genistein)이 폐경으로 유도된 비만을 조절하는지를 알아보기 위해 폐경기 여성의 동물 모델인 난소절제 암컷 쥐에서 항비만 효과에 대한 제니스테인의 영향을 연구하였다. 7주령의 C57BL/6J 암컷 쥐를 무작위로 3그룹으로 나누어 8주 동안 고지방식 사료 또는 제니스테인이 첨가된 고지방식 사료를 섭취시킨 후 비만의 결정요소들을 측정하였다. 난소절제 쥐는 난소가 절제되지 않은 쥐에 비해 몸무게와 지방조직무게가 증가되었다. 그러나 제니스테인의 처리는 난소절제 쥐의 몸무게, 지방조직무게 및 지방세포 크기를 감소시켰다. 난소절제 쥐에 비해 제니스테인이 처리된 난소절제 쥐는 혈청 속의 중성지방과 총 콜레스테롤이 유의적으로 낮아졌다. 또한 난소절제 쥐에서 간조직의 지질성분 축적도 제니스테인에 의해 감소되었다. 이러한 결과는 제니스테인이 난소절제로 유도된 지방과다, 지방세포비대 및 지질이상을 효과적으로 개선시킬 수 있다는 것을 시사하고 있다. 따라서 본 연구는 폐경기 여성의 비만과 고지혈증을 포함한 신진대사 장애의 개선에 공헌할 것이다.

주제어 : 난소절제 쥐, 비만, 제니스테인, 몸무게, 지방조직무게

Abstract : To investigate whether genistein regulates menopause-induced obesity, it was studied the effects of genistein on anti-obesity effects in female ovariectomized (OVX) mice, an animal model of postmenopausal women. 7-week-old female mice (C57BL/6J) were randomly divided into three groups. All the animals received a high fat diet or a high fat diet supplemented with genistein for 8 weeks and variables and determinants of obesity were measured. The OVX mice had significantly higher body weight and adipose tissue mass than sham mice. However, genistein supplementation reduced body weight, adipose tissue mass, and adipocyte size of OVX mice. The OVX mice treated with genistein had significantly lower levels of serum triglycerides and total cholesterol than the vehicle-treated OVX

[†]Corresponding author
(E-mail: jsh0227@mokwon.ac.kr)

mice. Lipid accumulation in liver was also markedly decreased by genistein in OVX mice. The results suggest that genistein can effectively prevent adiposity, adipocyte hypertrophy, and lipid disorders caused by ovariectomy. Moreover, this study may contribute to the alleviation of metabolic syndrome, including obesity and hyperlipidemia in postmenopausal women.

Keywords : ovariectomized mice, obesity, genistein, body weight, adipose tissue mass

1. 서론

비만은 제 2형 당뇨병, 심장질환, 각종 암 등 신진대사 장애(metabolic syndrome)와 밀접한 관련이 있는 건강상의 위험요인이다[1]. 따라서 비만은 여러 질병들의 원인이 되므로 단순히 미용적인 관점뿐만 아니라 예방과 치료를 해야 하는 질병의 관점으로 인식되어야 한다.

비만은 불규칙적인 식습관, 과도한 열량의 음식섭취, 운동량 부족 등의 생활습관의 영향뿐만 아니라 유전적인 요인이 복합적으로 작용하여 유발된다. 특히 여성의 경우 난소기능이 상실되어 여성 호르몬인 에스트로겐(estrogen)의 생성이 감소되는 폐경기 시기가 되면 몸무게와 백색지방조직(white adipose tissue) 무게가 증가되는 현상이 발생한다[2,3]. 난소기능의 상실로 비만이 유도되는 현상은 폐경기 여성뿐만 아니라 폐경기 여성의 동물모델인 난소절제(OVX) 동물에서도 나타난다[4,5]. 그러나 폐경기 여성과 난소절제 동물에 에스트로겐을 처리하게 되면 몸무게, 백색지방조직무게 및 혈중 지질성분이 감소되면서 비만현상이 개선된다[2,4,5]. 이러한 연구결과들은 폐경현상이 갱년기 여성비만의 중요한 요인이며 폐경기 여성의 비만은 성 스테로이드 호르몬인 에스트로겐의 결핍과 깊은 관련이 있음을 시사하고 있다.

현대인들은 비만조절을 위해 식습관, 운동, 약물치료 등 여러 방법을 사용하고 있으며, 이 중 비만 예방 및 치료를 위해 식습관 관리를 중요시하고 있다. 특히 갱년기 여성들은 폐경으로 발생할 수 있는 신진대사 장애들의 예방을 위해 식류, 콩 등에 함유되어 있는 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)에 대한 관심이 증가되고 있다. 화학적으로 식물성 에스트로겐은 쿠메스탄(coumesta), 이소플라본(isoflavone) 및 리그난(ligna)으로 구분되며, 이 중 이소플라본은 대두에서 많이 발견되는 식물성 에스트로겐이다[6,7].

이소플라본은 에스트로겐과 구조적으로 유사하여 에스트로겐의 농도가 낮은 곳에서는 에스트로겐 수용체(ERs: estrogen receptor)와 결합한다[8].

제니스테인(genistein)은 콩에 함유되어 있는 이소플라본으로써 항암작용, 항산화 작용, 항당뇨 현상등 인체에 유익한 영향을 준다고 보고되고 있다[9-13]. 특히 제니스테인이 골감소증(osteopenia)이 있는 폐경기 여성과 골다공증(osteoporosis)이 있는 난소절제 동물모델 모두에서 골밀도를 증가시키는 효과가 있다는 연구결과와 보고는 제니스테인이 폐경기 여성의 골(bone) 건강증진에 유익한 영향을 가지고 있음을 시사하고 있다[14,15]. 또한 제니스테인은 신진대사 장애를 가진 폐경기 여성에서 혈중의 염증성 아디포카인(inflammatory adipokine) visfatin을 감소시킴으로써 안면 홍조증(hot flashes)을 개선하였다[16]. 그러나 제니스테인은 난소절제 동물모델에서 몸무게 조절에 대해 다른 결과들을 나타내고 있으며[17,18] 폐경으로 인해 유발될 수 있는 비만 조절작용에 대한 제니스테인의 연구는 미비한 상태이다. 따라서 본 연구는 제니스테인이 폐경기 여성의 비만을 조절하는지를 조사하기 위해 폐경기 비만여성의 동물모델인 고지방식이로 섭취한 난소절제 암컷 쥐에서의 항비만 효과에 대한 제니스테인의 영향을 측정하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

2.2.1. 실험식이

실험에 사용된 사료는 45 kcal%의 지방이 함유된 고지방식이 사료이며 Research diets사(New Brunswick, NJ, USA)의 D12451을 사용하였다(Table 1).

Table 1. Composition of high-fat diet

Ingredient	High fat diet	
	gm(%)	kcal(%)
Protein	24	20
Carbohydrate	41	35
Fat	24	45
Total		100
kcal/gm	4.73	

제니스테인은 Aladdin사(City of Industry, CA, USA)로부터 구입하여 총 칼로리의 45%가 지방인 고지방식이 사료에 첨가하여 사용하였다 (0.05% wt/wt) (Fig 1).

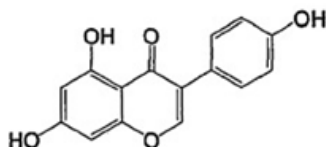


Fig. 1. The chemical structure of genistein

2.2.2. 실험대상

모든 실험에서 7주령의 wild-type 암컷 쥐 (C57BL/6J mice)를 (주대한바이오링크 (Chungbuk, Korea)로부터 구입하여 사용하였으며, 항균 상태에서 12시간 light/darkness cycle 조건 하에서 먹이와 물을 충분히 주면서 사육하였다.

암컷 쥐는 무작위로 3그룹 즉, 모조수술 그룹 (Sham), 난소절제수술 그룹(OVX), 그리고 난소절제수술 후 실험기간 8주 동안 제니스테인 (0.05% wt/wt)을 고지방식이 사료에 섞어서 섭취한 그룹(OVX/G)으로 분류하였다.

폐경여성의 동물모델인 난소가 절제된 쥐는 난소절제 1주 후에 실험에 이용하였으며 실험기간 8주 동안 모든 실험 쥐는 고지방식이 사료(High fat diet: 45% kcal fat, Reseach Diets, New Brunswick, NJ)를 섭취하였다. 모든 연구에 사용된 쥐의 수는 각 그룹 당 8마리이다(n=8/group).

모든 실험 군은 일주일에 2회 체중을 측정하였고 쥐를 죽이기 12시간 전에 사료를 제거하였다. 혈액은 채취하여 4°C에서 1시간 응고시킨 후 원심분리(4,200 rpm, 20분, 4°C)하여 혈청을 얻었으며 조직은 무게 측정 후 사용할 때까지 -80°C

에서 보관하였다[19].

본 연구는 동물실험윤리위원회 승인(No. NVRQS AEC-16)을 얻어 시행하였다.

2.2 실험방법

2.2.1. 조직형태학적 분석

내장 백색지방조직과 간 조직은 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 동안 고정하였다. Paraffin section (5 μm)은 탈수와 세척 과정을 실시한 후, hematoxylin과 eosin으로 염색하였다. 염색한 조직은 현미경 하에서 관찰하였고 Image Analysis System (Image pro-plus, MD, USA)을 이용하여 형태학적 변화를 분석하였다 [20].

2.2.2 혈청 속의 중성지방과 총 콜레스테롤 분석

혈청 속의 지질성분 함량은 녹십자 의료재단 (Green Cross Laboratories, Gyeonggi-do, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

2.3. 분석방법

모든 값은 mean ± standard deviation (M ± SD)으로 표시하였다. 통계분석은 Tukey's multiple-comparison test에 의한 one-way ANOVA를 실시하였다. 유의수준은 p<0.05로 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 몸무게와 지방조직무게 변화에 대한 제니스테인의 효과

폐경기 여성의 비만조절에 대한 제니스테인의 효과를 조사하기 위해, 폐경기 여성의 동물모델인 OVX 쥐에 제니스테인이 첨가된 고지방식을 8주 동안 섭취시킨 후 몸무게와 지방조직무게를 측정하였다(Fig. 2 and 3).

Sham 쥐에 비해 OVX 쥐의 경우 몸무게가 통계적으로 유의하게 44.9% 증가되었다. 그러나 난소절제로 인해 증가된 몸무게는 제니스테인 처리에 의해 21.8% 감소되었다. 또한 제니스테인에 의한 지방조직무게 변화도 몸무게 변화와 유사한 경향을 나타내었다. Sham 쥐에 비해 OVX 쥐는 총 지방조직무게와 내장 백색지방조직무게 모두

통계적으로 유의하게 증가하였으나, 제니스테인은 OVX에 의해 증가된 총 지방조직무게와 내장 백색지방조직무게를 각각 51.2%와 51.7% 씩 감소시켰다($p < 0.05$).

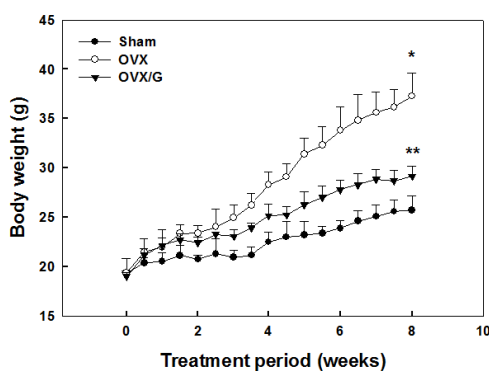


Fig. 2. Effects of genistein on the body weight in female OVX mice.

All values are expressed as $M \pm SD$. *Significantly different from Sham mice, $p < 0.05$. **Significantly different from OVX mice, $p < 0.05$. Sham, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; OVX/G, ovariectomized mice treated with genistein.

폐경기 여성은 폐경 전보다 체중이 증가되면서 체지방체중(lean body mass)와 근육량이 감소되

는 반면 복부 지방조직무게가 증가되어 비만이 발생한다[21,22]. 본 연구결과들은 제니스테인이 폐경기 여성의 동물모델인 OVX 쥐의 총 지방조직무게와 내장 백색지방조직무게를 효과적으로 감소시킴으로써 몸무게가 감소된 것으로 판단되며, 폐경기 여성의 비만조절에 대한 제니스테인의 항비만 효과를 시사하고 있다.

3.2. 지방세포의 형태학적 변화에 대한 제니스테인의 효과

지방조직의 증가는 지방세포로의 지방축적으로 지방세포의 크기가 비대해지는 과정(hypertrophy)과 지방세포생성(adipogenesis)으로 생성된 성숙한 지방세포의 수가 증가되는 과정(hyperplasia)을 통해 일어난다[23,24].

본 연구는 OVX 쥐에서 제니스테인에 의한 지방조직무게의 감소가 제니스테인에 의한 지방세포 크기의 형태학적 변화와 관련이 있는지를 조사하였다(Fig. 4). 조직형태학적 분석에 의하면 OVX 쥐의 내장 백색지방조직을 구성하는 지방세포의 크기는 Sham 쥐에 비해 증가되었다. 그리고 내장 백색지방조직의 무게에 대한 제니스테인의 영향과 일치되게 제니스테인은 OVX 쥐의 내장 백색지방세포의 크기를 감소시켰다. 따라서 본 연구결과는 제니스테인에 의한 지방조직무게의 감소는 제니스테인이 지방세포의 크기를 감소시킨 것에서 기인된 것임을 시사하고 있다.

비만동안 지방세포의 크기가 비대해지는 현상은 증가된 혈중 유리 지방산(free fatty acid)이 지방세포 내로의 유리 지방산 유입을 증가시켜

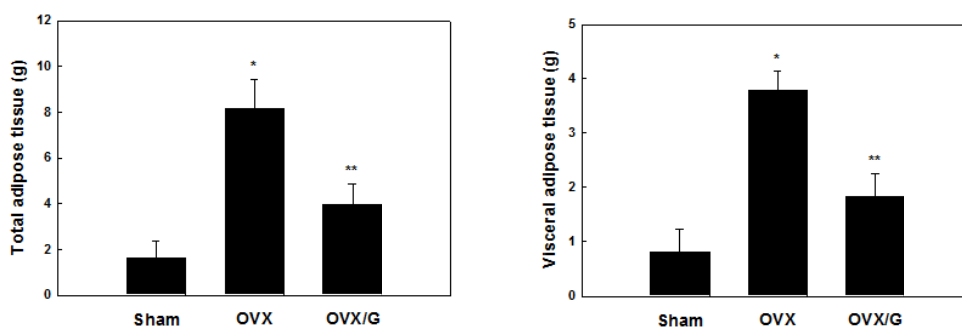


Fig. 3. Effects of genistein on the adipose tissue mass in female OVX mice.

All values are expressed as $M \pm SD$. *Significantly different from Sham mice, $p < 0.05$. **Significantly different from OVX mice, $p < 0.05$. Sham, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; OVX/G, ovariectomized mice treated with genistein.

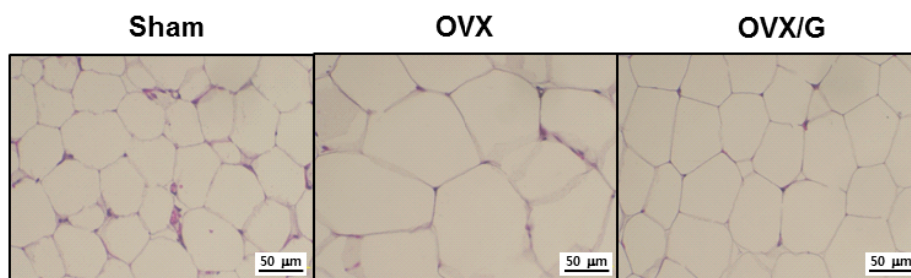


Fig. 4. Effects of genistein on adipocyte size in female OVX mice. Sham, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; OVX/G, ovariectomized mice treated with genistein.

중성지방(triglyceride)의 합성이 증가된 것에서 기인된다[25,26]. 그리고 제니스테인은 혈중 유리 지방산을 감소시키는 효과가 있다고 보고되었다 [27]. 따라서 제니스테인에 의한 혈중 유리 지방산의 감소가 지방세포의 크기를 감소시킴으로써 지방조직무게를 감소시킨 것으로 사료된다.

3.3. 혈청 속의 지질성분에 대한 제니스테인의 효과

난소의 기능상실은 혈중 중성지방과 저밀도 지단백 콜레스테롤(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)이 증가되는 반면 고밀도 지단백 콜레스테롤(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)이 감소되는 것과 관련이 있다[28,29].

본 연구에서는 제니스테인이 혈중 지질농도를 낮추는데 효과적임을 확인하기 위해 혈청 속의 총 콜레스테롤과 중성지방을 측정하였다(Fig. 6). Sham 쥐에 비해 OVX 쥐는 혈청 속의 총 콜레스테롤과 중성지방이 각각 25.9%와 23.1% 씩 증가하였으나($p < 0.05$), 제니스테인이 처리된 OVX 쥐는 OVX에 의해 증가된 혈청 속의 총 콜레스테롤과 중성지방이 각각 24.5%와 14.4% 씩 감소되었다($p < 0.05$). 본 연구결과는 난소절제로 발생하는 이상지질혈증(dyslipidemia)이 제니스테인에 의해 개선된다는 것을 시사하고 있다.

3.4. 간조직의 지질 축적에 대한 제니스테인의 효과

혈중 지질성분의 농도는 간세포에서의 지질 이화작용(hepatic lipid catabolism)에 의해 감소된

다[30-32].

제니스테인에 의한 혈중 지질성분의 변화가 간조직의 지질성분 변화와 관련이 있는지 알아보기 위해 조직형태학적 분석을 통해 간조직의 지질성분 축적(hepatic lipid accumulation)에 대한 제니스테인의 영향을 조사하였다(Fig. 5). OVX 쥐는 Sham 쥐에 비해 간조직의 지질성분 축적이 증가되었다. 그러나 OVX에 의해 증가된 간조직의 지질성분 축적은 제니스테인에 의해 억제되었다.

본 연구결과는 제니스테인이 간조직의 지방축적을 감소시킴으로써 혈중 지질성분을 감소시킨 것임을 시사하고 있다.

본 연구는 폐경여성의 동물모델인 난소절제 암컷 쥐에서 제니스테인이 난소절제로 증가된 몸무게와 지방무게를 효과적으로 감소함으로써 제니스테인이 폐경으로 유도되는 여성비만을 효과적으로 개선할 것임을 지적하고 있으며, 이러한 본 연구결과는 폐경여성을 대상으로 매일 제니스테인의 섭취가 폐경여성의 body mass index (BMI), 허리둘레 및 총 지방무게를 유의적으로 감소시켰다고 보고된 연구결과에 의해 뒷받침된다[33].

제니스테인은 지방세포생성(adipogenesis)의 전사조절자인 CCAT/enhancerbinding protein 1 (C/EBP1)과 peroxisome proliferator activated receptor γ 2 (PPAR γ 2)의 발현을 억제시킨다고 보고되고 있다[34]. 따라서 본 연구에서 제니스테인에 의한 지방무게의 감소는 제니스테인이 C/EBP1과 PPAR γ 2의 발현을 억제함으로써 지방세포생성이 억제되었기 때문인 것으로 사료된다.

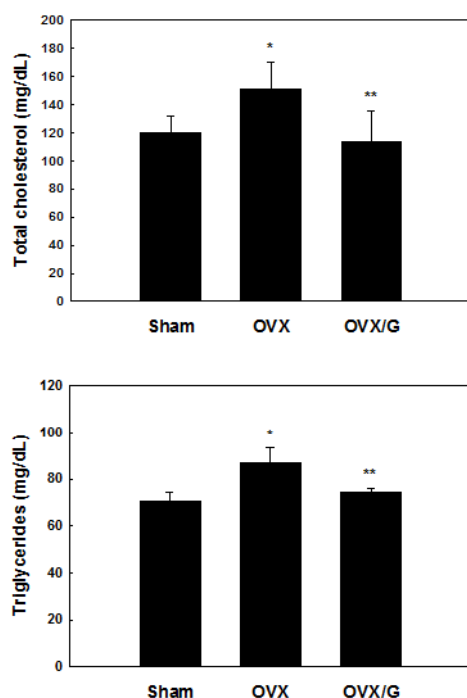


Fig. 5. Effects of genistein on serum triglycerides and total cholesterol in female OVX mice.

All values are expressed as $M \pm SD$. *Significantly different from Sham mice, $p < 0.05$. **Significantly different from OVX mice, $p < 0.05$. Sham, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; OVX/G, ovariectomized mice treated with genistein.

제니스테인은 혈중 유리 지방산을 감소시키는 효과가 있다고 보고되고 있으므로[27], 제니스테인에 의한 혈중 유리 지방산의 감소는 지방세포 내로의 유리 지방산 유입을 감소시켜 지방세포의 크기가 감소됨으로써 지방무게도 감소된 것으로 사료된다.

또한 제니스테인은 에스트로겐 수용체에 대해 agonistic activity를 지니고 있고, 에스트로겐의 농도가 낮은 곳에서는 에스트로겐 수용체와 결합한다[8,35]. 난소 호르몬인 에스트로겐은 간, 근육 등 신진대사가 활발한 조직에서 지질대사를 조절한다. 17β -에스트라다이올(17β -estradiol)은 난소절제 쥐의 근육조직에서 지질산화작용에 관여하는 유전자인 carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1)과 pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4)의 mRNA 발현을 증가시켰다[36]. 또한 aromatase-knockout 쥐(ArKO mice)에서 17β -에스트라다이올 처리는 간에서의 지방산 β -산화(fatty acid β -oxidation)에 관여하는 효소들의 작용을 증가시켰다[37]. 이러한 연구결과들은 에스트로겐이 결핍된 환경인 OVX 쥐에서 제니스테인은 에스트로겐 수용체와 결합하여 지질대사에 대한 에스트로겐의 작용과 유사한 효과인 지질산화작용의 촉진효과를 나타낼 수 있다는 것을 시사하고 있다. 따라서 제니스테인은 OVX 쥐에서 간세포의 지질 이화작용을 조절함으로써 간조직의 지방축적과 혈중의 지질성분을 감소시켰을 뿐만 아니라 지방세포의 크기와 지방조직의 무게를 감소시킨 것으로 사료된다.

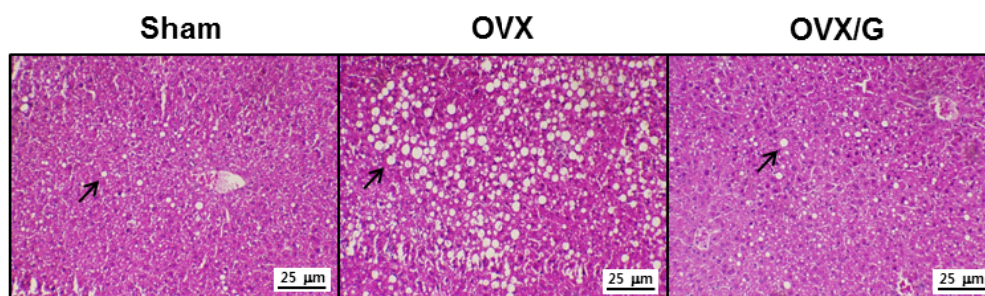


Fig. 6. Effects of genistein on hepatic lipid accumulation in female OVX obese mice. Arrows indicate the lipid droplets in hepatocytes. Sham, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; OVX/G, ovariectomized mice treated with genistein.

4. 결론

본 연구는 제니스테인이 폐경으로 유도된 비만을 효과적으로 조절하는지를 조사하기 위해 폐경기 여성의 동물모델인 난소절제(OVX) 쥐에서 제니스테인의 항비만 효과를 연구하였다. 연구의 결과를 요약정리하면 다음과 같다.

1. 몸무게와 지방조직무게를 측정된 결과, OVX에 의해 증가된 몸무게, 총 지방조직무게 및 내장 백색지방조직무게는 제니스테인 처리에 의해 감소되었다.
2. 지방조직의 형태학적 분석에 의하면 OVX에 의해 지방세포의 크기가 증가되었으며 이러한 현상은 제니스테인 처리에 의해 감소되었다.
3. 조직형태학적 분석을 통한 간조직의 지질성분 축적은 OVX에 의해 증가되었으나 제니스테인 처리에 의해 감소되었다.
4. OVX 쥐에서 제니스테인은 OVX에 의해 증가된 혈청 속의 총 콜레스테롤과 중성지방을 감소시켰다.

이러한 연구결과를 종합해 보면, 본 연구는 폐경기 여성의 동물모델인 OVX 쥐에서의 제니스테인 처리가 OVX에 의해 유도된 비만현상을 긍정적으로 개선한다는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구결과는 제니스테인에 의한 폐경기 여성의 비만조절 뿐만 아니라 비만 관련 대사증후군의 치료와 예방에 대한 기초자료를 제공할 것으로 기대된다.

References

1. G. A. Bray, "Risks of obesity", *Endocrinol Metab Clin North Am*, **32**, 787-804 (2003).
2. A. Tchernof, J. Calles-Escandon, C. K. Sites, E. T. Poehlman, "Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy", *Coron Artery Dis*, **9**, 503-511 (1998).
3. R. R. Wing, K. A. Matthews, "Weight gain at the time of menopause", *Arch Intern Med*, **151**, 97-102 (1991).
4. N. Geary, L. Asarian, "Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **281**, R1290-R1294 (2001).
5. S. Jeong, M. Yoon, "Inhibition of the actions of peroxisome proliferator-activated receptor α on obesity by estrogen", *Obesity (Silver Spring)*, **15**, 1430-1440 (2007).
6. M. S. Kurzer, X. Xu, "Dietary phytoestrogens", *Annu Rev Nutr*, **17**, 353-381 (1997).
7. J. W. Anderson, B. M. Smith, C. S. Washnock, "Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake", *Am J Clin Nutr*, **70(3 Suppl)**, 464S-474S (1999).
8. P. M. Martin, K. B. Horwitz, D. S. Ryan, W. L. McGuire, "Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells", *Endocrinology*, **103(5)**, 1860-1867 (1978 Nov).
9. Z. Zhang, C. Z. Wang, G. J. Du, L. W. Qi, T. Calway, T. C. He, W. Du, C. S. Yuan, "Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via atm/p53-dependent pathway in human colon cancer cell", *Int J Oncol*, **1**, 289-296 (2013).
10. K. A. Hwang, N. H. Kang, B. R. Yi, H. R. Lee, M. A. Park, K. C. Choi, "Genistein, a soy phytoestrogen, prevents the growth of BG-1 ovarian cancer cells induced by 17beta-estradiol or bisphenol A via the inhibition of cell cycle progression", *Int J Oncol*, **2**, 733-740 (2013).
11. F. Afaq, H. Mukhtar, "Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging", *Exp Dermatol*, **15(9)**, 678-684 (2006).
12. Z. Fu, E. R. Gilbert, L. Pfeiffer, Y. Zhang, Y. Fu, D. Liu, "Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes", *Appl Physiol Nutr Metab*, **37(3)**,

- 480–488 (2012).
13. Z. Fu, D. Liu, “Long-term exposure to genistein improves insulin secretory function of pancreatic beta-cells”, *Eur J Pharmacol*, **616(1–3)**, 321–327 (2009).
 14. H. Marini, L. Minutoli, F. Polito, A. Bitto, D. Altavilla, M. Atteritano, A. Gaudio, S. Mazzaferro, A. Frisina, N. Frisina, C. Lubrano, M. Bonaiuto, R. D’Anna, M. L. Cannata, F. Corrado, E. B. Adamo, S. Wilson, F. Squadrito, “Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial”, *Ann Intern Med*, **146(12)**, 839–847 (2007).
 15. A. Bitto, B. P. Burnett, F. Polito, H. Marini, R. M. Levy, M. A. Armbruster, L. Minutoli, V. Di Stefano, N. Irrera, S. Antoci, R. Granese, F. Squadrito, D. Altavilla, “Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol”, *Br J Pharmacol*, **155(6)**, 896–905 (2008).
 16. A. Bitto, V. Arcoraci, A. Alibrandi, R. D’Anna, F. Corrado, M. Atteritano, L. Minutoli, D. Altavilla, F. Squadrito, “Visfatin correlates with hot flashes in postmenopausal women with metabolic syndrome: effects of genistein”, *Endocrine*, **55(3)**, 899–906 (2017).
 17. S. Reinwald, L. P. Mayer, P. B. Hoyer, C. H. Turner, S. Barnes, C. M. Weaver, “A longitudinal study of the effect of genistein on bone in two different murine models of diminished estrogen-producing capacity”, *J Osteoporos*, **2010(pii: 145170)**, 14 pages (2010).
 18. Y. Zhang, Q. Li, H. Y. Wan, W. G. Helferich, M. S. Wong, “Genistein and a soy extract differentially affect three-dimensional bone parameters and bone-specific gene expression in ovariectomized mice”, *J Nutr*, **139(12)**, 2230–2236 (2009).
 19. M. Yoon, S. Jeong, “17 β -estradiol prevents the expression of CEBP α -mediated adipocyte marker genes in female ovariectomized C57BL/6 mice”, *J Exp Biomed Sci*, **14**, 131–137 (2008).
 20. S. Jeong, H. Choi, M. Yoon, “Morphological changes in adipose and liver tissue by 17 β -estradiol in female ovariectomized C57BL/6J mice”, *J Exp Biomed Sci*, **13**, (2007).
 21. T. Fukunaga, Y. Ishida, M. Konodo, “Subcutaneous fat and muscle distribution patterns in middle and aged Japanese”, *J Therm Biol*, **18**, 303–306 (1993).
 22. E. T. Poehlman, M. J. Toth, A. W. Gardner, “Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study”, *Ann Intern Med*, **123**, 673–675 (1995).
 23. L. Liu, Y. Li, T. O. Tollefsbol, “Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases”, *Curr Issues Mol Biol*, **10**, 25–36 (2008).
 24. E. D. Rosen, B. M. Spiegelman, “Molecular regulation of adipogenesis”, *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 145–171 (2000).
 25. K. N. Frayn, “Insulin resistance lipid metabolism”, *Cur Opin Lipidol*, **4**, 197–204 (1993).
 26. K. Yagi, D. Kondo, Y. Okazaki, K. Kano, “A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes”, *Biochemica and Biophysical Research Communications*, **321(4)**, 967–974 (2004).
 27. Y. Takahashi, T. O. Odbayar, T. Ide, “A comparative analysis of genistein and daidzein in affecting lipid metabolism in rat liver”, *J Clin Biochem Nutr*, **44(3)**, 223–30 (2009).
 28. L. Pilote, K. Dasgupta, V. Guru, K. H. Humphries, J. McGrath, C. Norris, D. Rabi, J. Tremblay, A. Alamian, T. Barnett, J. Cox, W. A. Ghali, S. Grace, P. Hamet, T. Ho, S. Kirkland, M. Lambert, D. Libersan, J. O’Loughlin, G. Paradis, M. Petrovich, V. Tagalakis, “A comprehensive view of sex-specific issues related to

- cardiovascular disease”, *Canadian Medical Association Journal*, **176**, S1-S44 (2007).
29. Y. Y. Tan, G. C. Gast, Y. T. van der Schouw, “Gender differences in risk factors for coronary heart disease”, *Maturitas*, **65**, 149-160 (2010).
 30. M. Yoon, S. Jeong, H. Lee, M. Han, J. Kang, E. Y. Kim, M. Kim, G. T. Oh, “Fenofibrate improves lipid metabolism and obesity in ovariectomized LDL receptor-null mice”, *Biochem Biophys Res Commun*, **302**, 29-34 (2003).
 31. S. Jeong, M. Kim, M. Han, H. Lee, J. Ahn, M. Kim, Y-H. Song, C. Shin, K-H. Nam, T. Kim, G. T. Oh, M. Yoon, “Fenofibrate prevents obesity and hypertriglyceridemia in low-density lipoprotein null mice”, *Metabolism*, **53**, 607-613 (2004).
 32. S. Jeong, M. Yoon, “Troglitazone lowers serum triglycerides with sexual dimorphism in C57BL/6J mice”, *J Exp Biomed Sci*, **12**, 65-72 (2006).
 33. D. Goodman-Gruen, D. Kritz-Silverstein, “Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women”, *Menopause*, **10(5)**, 427-432 (2003).
 34. M. Heim, O. Frank, G. Kampmann, N. Sochocky, T. Pennimpede, P. Fuchs, W. Hunziker, P. Weber, I. Martin, I. Bendik, “The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells”, *Endocrinology*, **145(2)**, 848-859 (2004).
 35. M. L. Ricketts, D. D. Moore, W. J. Banz, O. Mezei, N. F. Shay, “Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors”, A review, *J Nutr Biochem*, **16(6)**, 321-30 (2005).
 36. S. E. Campbell, K. A. Mehan, R. J. Tunstall, M. A. Febbraio, D. Cameron-Smith, “17beta-estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and lipid oxidative genes in skeletal muscle”, *J Mol Endocrinol*, **31(1)**, 37-45 (2003).
 37. K. Toda, K. Takeda, S. Akira, T. Saibara, T. Okeda, S. Onishi, Y. Shizuta, “Alterations in hepatic expression of fatty-acid metabolizing enzymes in ArKO mice and their reversal by the treatment with 17 beta-estradiol or a peroxisome proliferator”, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 11-17 (2001).