

대두 이소플라본과 수영운동이 난소절제 쥐의 간 기능 개선에 미치는 시너지 효과

정선효[†]

목원대학교 생명과학부, 교수
(2023년 7월 17일 접수: 2023년 8월 19일 수정: 2023년 8월 21일 채택)

Synergistic effect of soy isoflavone and swimming exercise on improvement of liver function in ovariectomized mice

Sun-Hyo Jeong[†]

*Division of Biological Sciences, Mokwon University, Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 35349, Korea
(Received July 17, 2023; Revised August 19, 2023; Accepted August 21, 2023)*

요약 : 대두 이소플라본은 갱년기 증상에 대한 유익한 효과 때문에 폐경여성들의 관심을 끌고 있다. 본 연구는 난소절제 쥐에서 대두 이소플라본인 제니스테인과 수영운동의 동시처리(Gen+SE)가 제니스테인 단독처리(Gen)와 수영운동 단독처리(SE)에 비해 비만과 간 기능 개선에 유익한 시너지 효과를 나타낼 것 인지를 조사하였다. 난소절제 쥐는 무작위로 대조군(Con), Gen, SE 및 Gen+SE으로 나누어 8주 동안 고지방 식이를 섭취하였다. 몸무게, 백색지방조직의 무게, 간 조직의 지질축적 및 혈청 속 ALT와 AST 수치를 조사한 결과, Con에 비해 Gen과 SE는 감소하였고 Gen+SE는 Gen과 SE에 비해 더 효과적으로 감소하였다. 간 조직에서 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 유전자의 발현은 Con에 비해 Gen과 SE 모두에서 감소하였고, Gen+SE는 Gen과 SE에 비해 더욱 감소하였다. 그러나 adiponectin 유전자의 발현은 반대의 결과가 나타났다. 간 조직에서 지방산 산화와 관련된 유전자의 발현은 Con에 비해 Gen과 SE에서 증가하였고 Gen+SE는 Gen과 SE에 비해 더 증가하였다. 따라서 본 연구는 대두 이소플라본과 수영운동의 상호작용은 난소절제 비만 쥐에서 비만 조절과 저하된 간 기능 개선에 매우 효과적이며, 이것은 난소절제 쥐에서 간의 지방산 산화를 촉진함으로써 발생한 것이라는 것을 제안한다.

주제어 : 비만, 대두 이소플라본, 수영운동, 간, 염증

Abstract : Soy isoflavones are attracting attention from postmenopausal women because of their beneficial effects on menopausal symptoms. This study was investigated whether a combination of soy isoflavone genistein and swimming exercise (Gen+SE) would have a beneficial synergistic effect on obesity and improvement of liver function compared to the genistein only (Gen) and swimming exercise only (SE) in ovariectomized mice. Ovariectomized mice were randomly divided into control

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

group (Con), Gen, SE, and Gen+SE, and were fed a high-fat diet for 8 weeks. As a result of examining the body weight, weight of white adipose tissue, lipid accumulation of liver, and serum ALT and AST levels, both Gen and SE decreased compared to Con, and Gen+SE decreased more than compared to Gen and SE. The expression of inflammatory cytokines MCP-1, IL-6 and TNF- α genes in liver decreased in both Gen and SE compared to Con, and were further decreased in Gen+SE compared to Gen and SE. But The expression of adiponectin showed opposite results. The expression of fatty acid oxidation related genes in liver increased in both Gen and SE compared to Con, and were more effectively than increased in Gen+SE compared to Gen and SE. Therefore this study suggests that the interaction between soy isoflavone and swimming exercise is very effective controlling obesity and recovering decreased liver function, and this is caused by promoting fatty acid oxidation in the liver in ovariectomized mice.

Keywords : Obesity, Soy isoflavone, Swimming exercise, Liver, Inflammation

1. 서론

신체는 유입되는 에너지와 소모되는 에너지 간의 불균형으로 남는 에너지를 중성지방 형태로 지방조직에 축적하여 지방조직무게를 증가시키고 비만을 유발할 뿐만 아니라 간 조직에도 중성지방을 비정상적으로 축적하여 비알코올성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease)을 일으킨다[1].

비알코올성 지방간질환은 지방간(hepatic steatosis)에서 시작하여 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis), 간 섬유증(fibrosis) 및 간경변(cirrhosis)과 같은 심각한 간 손상으로 진행될 수 있는 광범위한 질환을 포함한다[2]. 간세포에 지방이 축적되는 단순 지방증(simple steatosis) 그 자체가 간을 손상시키지 않지만, 간의 지방축적이 지속되면 비알코올성 지방간염으로 이어져 결국 심각한 간 손상을 유발한다[3,4]. 지방간은 비알코올성 지방간질환의 첫 번째 단계로, 유리 지방산(free fatty acid) 흡수의 증가, 지방생성(lipogenesis)의 증가 및 지방산 β -산화(fatty acid β -oxidation)의 손상으로 인해 간세포 내 중성지방의 축적으로 특징된다[5-7]. 지질대사의 이상과 고지방식이 섭취로 비만이 유도되면 과량의 지방과 콜레스테롤이 간에 축적되어 간이 비대해지고 간 무게가 증가한다[8]. 에너지 불균형으로 발생하는 비만은 interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 등 염증성 사이토카인의 생산이 증가하는 낮은 수준

의 만성 염증상태가 일어난다[9]. 이러한 염증성 사이토카인의 증가는 비만과 관련된 만성 대사성 질환인 심혈관계질환, 지방간, 제2형 당뇨병 등 발생에 기여한다[10-13].

현대인들은 고열량 식품의 과도한 섭취, 운동 부족, 생리적 호르몬의 변화 등 원인으로 비만이 발생한다. 특히 여성들은 50대 전후로 여성호르몬 에스트로겐(estrogen)의 생성과 분비의 감소로 유발되는 폐경 현상으로 복부내장지방이 증가하는 내장형 비만이 발생하며 대사증후군 유발율도 증가한다[14,15]. 폐경여성의 동물모델인 난소가 절제된 암컷 쥐는 면역기능과 골밀도가 감소하고 혈당조절의 장애가 발생하며 간 조직의 지질축적 및 몸무게와 내장 백색지방조직무게가 증가하여 폐경여성과 유사하게 내장형 비만이 발생하며 암세포 생성이 촉진되었다[16-18].

비만과 비알코올성 지방간질환의 관리는 대사증후군 치료와 유사하게 여러 측면의 복합된 접근 방식으로 구성되며, 주로 건강기능식품 섭취, 식습관 및 신체활동 개선 등 생활습관 변화에 중점을 둔다. 폐경여성은 폐경으로 인한 증상을 완화하기 위해 에스트로겐 호르몬 대체요법(Hormone replacement therapy)을 사용하기도 하지만 호르몬 대체요법이 유방암, 심혈관계 질환의 발생과 관련이 있다고 보고되었다[19,20]. 따라서 현재 폐경여성은 신체 손상을 줄이면서 폐경으로 인한 증상을 예방하고 치료하는 관리법에 초점을 두고 있다.

이소플라본(isoflavone)은 에스트로겐과 분자구조적 유사성을 가지며 에스트로겐 수용체

(estrogen receptor)와 결합하여 에스트로겐과 비슷한 생리활성 작용을 하므로 식물성 에스트로겐이라고 한다[21]. 대두(soybeans)에 포함된 이소플라본은 주로 배당체(glycoside) 형태인 제니스테인(genistein)과 다이드제인(daidzein)이다[22]. 대두 이소플라본은 갱년기 증상에 대한 유익한 효과 때문에 최근 관심을 끌고 있으며, 항산화와 지질 저하 기능으로 대사 증후군 및 이와 관련된 질병을 개선하는 것으로 알려졌다[23-25]. 특히 제니스테인은 여러 종양 세포 배양(*in vitro* models)에서 여러 종양 세포의 증식을 억제함으로써 암 치료와 예방에 효과적인 이소플라본으로 여겨졌다[26]. 그리고 제니스테인은 건강한 폐경 여성 및 대사 증후군을 가진 폐경여성 모두에서 혈액 속 지질 성분을 개선하였다[27-30].

수영운동은 물속에서 하는 유산소 운동으로 물의 부력을 이용하므로 관절, 근육, 인대 및 뼈에 손상을 주지 않는다[31]. 따라서 수영운동은 골밀도가 약해지고 몸무게가 증가하는 폐경기 비만 여성의 건강개선에 도움이 된다. 고혈압을 가진 폐경여성이 수영운동을 한 경우 혈압이 감소하였고 동맥경화가 개선하였다[32]. 수영운동은 골다공증이 있는 폐경여성의 척추와 대퇴골 경부의 골밀도를 향상시켰다[33].

이소플라본과 운동이 건강개선에 도움이 된다는 연구결과들이 보고되면서 최근 대두 이소플라본과 운동의 결합이 신체에 미치는 영향이 연구되고 있다[34-37]. 그러나 제니스테인과 수영운동의 동시처리가 폐경기 비만으로 유도된 간 염

증과 저하된 간 기능 개선에 관한 연구는 미비한 상태이다. 따라서 본 연구는 고지방식이 섭취로 비만이 유도된 난소절제 쥐에서 제니스테인과 수영운동의 동시처리가 각각의 단독처리에 비해 효과적으로 비만 및 간의 지질대사와 염증을 개선하는지를 조사하였다.

2. 실험

2.1. 실험동물

난소가 절제된 암컷 쥐는 폐경여성의 동물모델로 널리 사용되고 있다[16-18]. 암컷 쥐(C57BL/6J female mice, 7주령, Daehan Biolink, Chungcheongbuk-do, Korea)는 난소절제 수술을 한 후 1주일의 회복 기간 후 실험에 사용되었다. 난소절제 암컷 쥐는 무작위로 대조군(Con), 제니스테인 처리군(Gen), 수영운동군(SE) 및 제니스테인 처리+수영운동 군(Gen+SE)으로 나누어 8주 동안 고지방식이 사료를 섭취하면서 사육되었다(Fig. 1). 몸무게는 주당 2회씩, 4일 간격으로 측정하였고 혈액과 각 조직은 8주째에 채취하였다. 실험 쥐는 실험 기간 8주 동안 물과 먹이를 충분히 섭취하였으며 12시간 간격의 light/darkness cycle과 항균 상태가 유지되는 조건에서 사육되었다. 동물실험은 기관(M 대학교)의 동물실험윤리위원회 승인을 받아 수행하였다(No. NVRQS AEC-16).

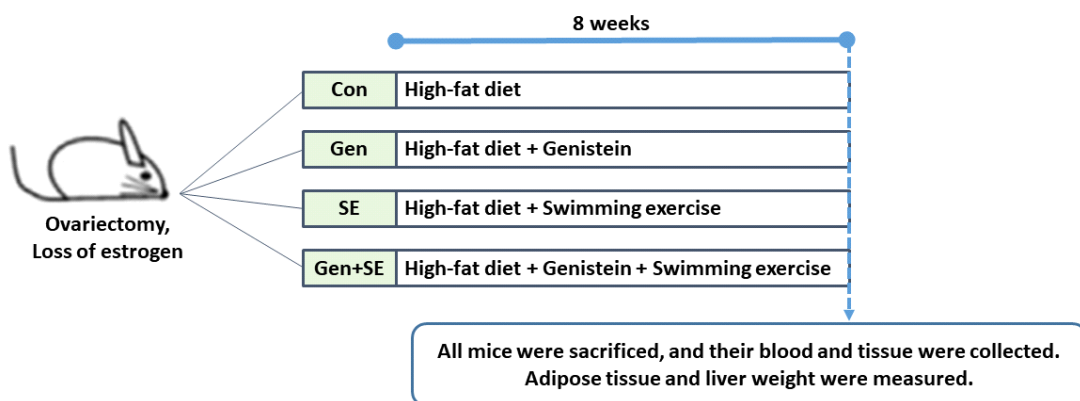


Fig. 1. Experimental design.

Female ovariectomized (OVX) mice (n=8/group) received high-fat diet or the same high-fat diet with Gen (0.1% wt/wt) for 8 weeks.

실험에 사용된 고지방식이 사료(D12451, High fat diet: 45% kcal fat)는 미국 Research Diets 사(Research Diet, New Brunswick, NJ, U.S.A.)의 것이며, 제니스테인(G6649, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)은 고지방식이 사료에 혼합하여 사용하였다(0.1% wt/wt). 수영운동은 수조(1m×1m, 35±1°C, Jeitech, Seoul, Korea)에서 8주 동안 주당 5일, 하루 60분씩 1회 실시하였다. 실험동물의 운동 적응을 위해 처음 1주 동안은 매일 10분씩 운동시간을 점진적으로 증가시켰다.

2.2. 간의 조직학적 분석

Hematoxylin & eosin 염색을 위해, 간 조직을 10% phosphate-buffered formalin에 1일 동안 고정하였다. 파라핀(paraffin) 절편을 위해 세척, 단계적인 탈수 및 xylene을 이용한 투명과정을 거친 후 파라핀 포매(embedding)과정을 실시하였다. 현미경 검사를 위해 포매한 조직을 4 μ m로 절단하여 hematoxylin & eosin으로 염색하였다.

2.3. 혈청 분석

혈액은 사료 제거 12시간 후 채취하였다. 혈청 분리를 위해 혈액을 4°C에서 1시간 응고시키고 원심분리(4,200 rpm, 20분, 4°C)하였다. 혈청 속 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate Aminotransferase (AST)는 녹십자 의료재단 (Green Cross Laboratories, Gyeonggi-do, Korea) 에서 분석하였다.

2.4. 유전자 발현 분석

간 조직 100mg에 용해 용액 trizol (k-3090, Bioneer, Daejeon, Korea) 1ml를 넣고 호모게나 이저로 파쇄하였다. 이것을 실온에 5분간 반응시키고 chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 200 μ l를 첨가한 후 20초간 위아래로 흔들어 전체적으로 잘 혼합한 후 실온에 3분간 반응시켰다. 원심분리(13,000rpm, 4°C, 15분)하여 상등액을 새로운 microtube에 옮겨 담고 같은 양의 isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 원심분리(13,000rpm, 4°C, 15분)하여 튜브 바닥에 생긴 RNA pellet만 남기고 용액을 제거하였다. 70% 에탄올 용액(1ml)으로 RNA pellet을 2회 세척한 후 실온에서 튜브 뚜껑을 열어둔 채 완전히 건조시켰다. 여기에 0.01%

DEPC (diethyl pyrocarbonate) 용액 30 μ l를 첨가하여 RNA pellet을 용해시켰다.

Complementary DNA (cDNA)를 합성하기 위해 total RNA (2 μ g)를 moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT, DR01601, Doctor Protein, Seoul, Korea)와 Oligo-dT (79237, Qiagen, Venlo, Netherlands)를 사용하여 역전사시켰다. 즉 RNA (2 μ g)에 MMLV-RT, MMLV-RT buffer, dNTP (deoxynucleotide) 및 oligo-dT mixture를 혼합하고 50°C에서 60분 반응시켰다. 합성된 cDNA는 95°C에서 2분간 predenaturation 후, denaturation (95°C, 30초), annealing (58°C, 30초) 및 elongation (72°C, 30초) 3단계를 반복(23회~40회)하여 DNA를 증폭시켰다. 실험에 사용된 PCR primers와 조건은 table 1에 제시하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여, Syngene GeneGenius Gel Documentation System (Syngene, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

2.5. 자료 통계분석

그룹 간 통계적 유의성을 분석하기 위해 SigmaPlot 2001 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.)의 unpaired, student's *t*-test를 이용하였고, 모든 값은 mean \pm standard deviation (M \pm SD)으로 표시하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 몸무게 변화에 대한 대두 이소플라본과 수영운동의 효과

8주 동안 고지방식이 사료를 섭취한 난소절제 암컷 쥐의 몸무게 변화에 대한 대두 이소플라본인 제니스테인과 수영운동의 영향을 조사하였다 (Fig. 2A). 실험 시작 시(0주) 몸무게 대비 8주째 몸무게 비율은 고지방식이를 섭취한 대조군 쥐 (Con)는 169.15 \pm 2.46%이며, 제니스테인이 첨가된 고지방식이를 섭취한 쥐(Gen)는 135.60 \pm 3.71%이며, 고지방식이를 섭취하면서 수영운동을 한 쥐(SE)는 127.48 \pm 2.75%이며, 그리고 제니스테인이 처리된 고지방식을 섭취하면서 수영운동을 한 쥐(Gen+SE)는 118.19 \pm 5.02%이다. 그리고 Gen과 SE의 0주째 몸무게 대비 8주째 몸무게 비율은 Con에 비해 각각 19.83%와 24.63%씩 감소

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers and PCR conditions

Gene	Size (bp)	Primer sequence	Annealing (°C)	Cycle
<i>Adiponectin</i>	700	F: 5' -gaagatgacgttactacaac-3' R: 5' -ggtagttgcagtcagttggt-3'	55	23
<i>CPT-1</i>	587	F: 5' -tatgtgaggatgctctcc-3' R: 5' -ctcgagagctagactgttc-3'	58	43
<i>MCAD</i>	321	F: 5' -gacattggaaagctgctagtg-3' R: 5' -tcacgagctatgatcagcctctg-3'	58	40
<i>IL-6</i>	155	F: 5' -tggagtcacagaaggagtgctaag-3' R: 5' -tctgaccagctgaggatgtccac-3'	58	30
<i>TNF-α</i>	300	F: 5' -ggcaggtctactttggagtcattgc-3' R: 5' -acattcgaggctccagtgattcgg-3'	58	34
<i>β-actin</i>	348	F: 5' -tggaatcctgtggcatccatgaaac-3' R: 5' -taaacgcagctcagtaacagctcc-3'	58	28

CPT-1: carnitine palmitoyltransferase 1, *MCAD*: medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, *IL-6*: interleukin-6, *TNF- α* : tumor necrosis factor- α

하였고, Gen+SE는 Gen과 SE 각각에 비해 12.84%, 7.29%씩 통계적으로 유의하게 감소하였다. 실험 8주째 쥐의 몸 형태도 몸무게 결과와 유사하게 나타났다(Fig. 2B). 고지방식이 섭취로 증가한 몸무게는 제니스테인과 수영운동에 의해 감소하였으며, 제니스테인과 수영운동의 동시처리는 제니스테인과 수영운동 각각의 단독처리에 비해 매우 효과적으로 감소시켰다.

3.2. 백색지방조직 무게에 대한 대두

이소플라본과 수영운동의 효과

제니스테인과 수영운동이 백색지방조직(white adipose tissue, WAT) 무게에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3). Gen과 SE는 총 백색지방조직의 무게가 Con에 비해 감소하였으며 제니스테인과 수영운동 각각의 단독처리에 의해 감소된 백색지방조직의 무게는 제니스테인과 수영운동의 동시처리에 의해 더욱 감소하였다. 몸무게 대비 총 백색지방조직 무게의 비율 경우, Con에 비해 Gen과 SE 각각은 41.98%, 42.92%씩 감소하였으며, Gen+SE는 Gen과 SE 각각에 비해 각각은 33.43%, 32.34%씩 통계적으로 유의하게 감소하였다. 제니스테인과 수영운동에 의한 백색지방조직의 무게 변화는 몸무게 변화와 유사한 경향을

보였다. 이러한 연구결과는 제니스테인과 수영운동이 내장 백색지방조직을 감소시킴으로써 비만을 조절하고 제니스테인과 수영운동의 동시처리는 비만 관리에 매우 긍정적인 시너지 효과(synergistic effects)가 있음을 제시하였다.

3.3. 간 무게와 간세포의 지질축적에 대한

대두 이소플라본과 수영운동의 효과

Con에 비해 Gen과 SE의 간 무게는 각각은 29.39%, 33.88%씩 감소하였으며, Gen+SE는 Gen에 비해 7.23% 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4A). Hematoxylin & eosin 염색을 통한 간 조직의 지질축적을 분석한 결과, Gen과 SE는 Con에 비해 간세포의 지질축적이 증가하였으며 Gen+SE는 Gen과 SE 각각에 비해 현저히 감소하였다(Fig. 4B). 고지방식을 섭취한 난소절제 쥐는 과잉의 지질 성분이 간 내에 축적되어 지방간이 유도되고 간의 무게가 증가하였으며, 이러한 현상은 제니스테인과 수영운동에 의해 억제되고 제니스테인과 수영운동의 동시처리는 더 효과적으로 비알코올성 지방간을 개선하였다.

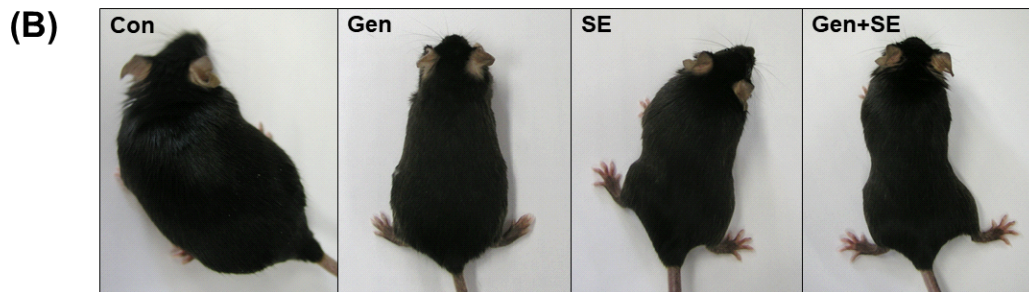
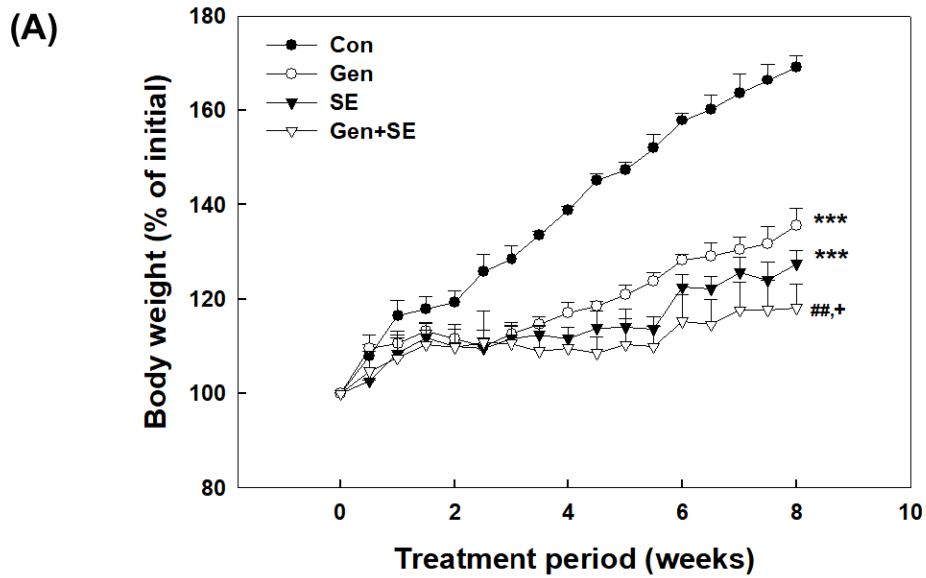


Fig. 2. Effects of soy isoflavone genistein and swimming exercise on body weight (A) and whole body shape (B).

Female ovariectomized (OVX) mice (n=8/group) received high-fat diet or the same high-fat diet with Gen (0.1% wt/wt) for 8 weeks. (A) Body weights were measured twice a week, 4 days apart, and (B) whole body shape were photographed at the end of the treatment period. All values are expressed as $M \pm SD$. *** $p < 0.001$, compared to Con, ## $p < 0.01$, compared to Gen, + $p < 0.05$, compared to SE. Con: control, Gen: genistein, SE: swimming exercise, Gen+SE: genistein plus swimming exercise.

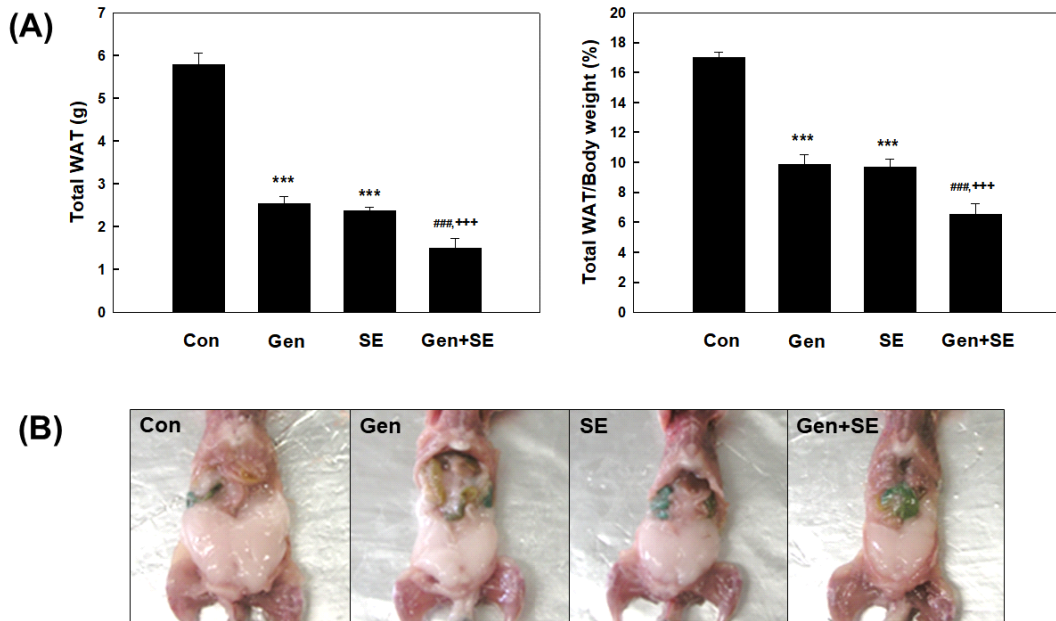


Fig. 3. Effects of soy isoflavone genistein and swimming exercise on white adipose tissue. (A) Total white adipose tissue (WAT) weight were measured and (B) abdominal WAT were photographed at the end of the treatment period. Female ovariectomized (OVX) mice ($n=8/\text{group}$) received high-fat diet or the same high-fat diet with Gen (0.1% wt/wt) for 8 weeks. All values are expressed as $M \pm SD$. *** $p < 0.001$, compared to Con, ### $p < 0.001$, compared to Gen, +++ $p < 0.001$, compared to SE. Con: control, Gen: genistein, SE: swimming exercise, Gen+SE: genistein plus swimming exercise.

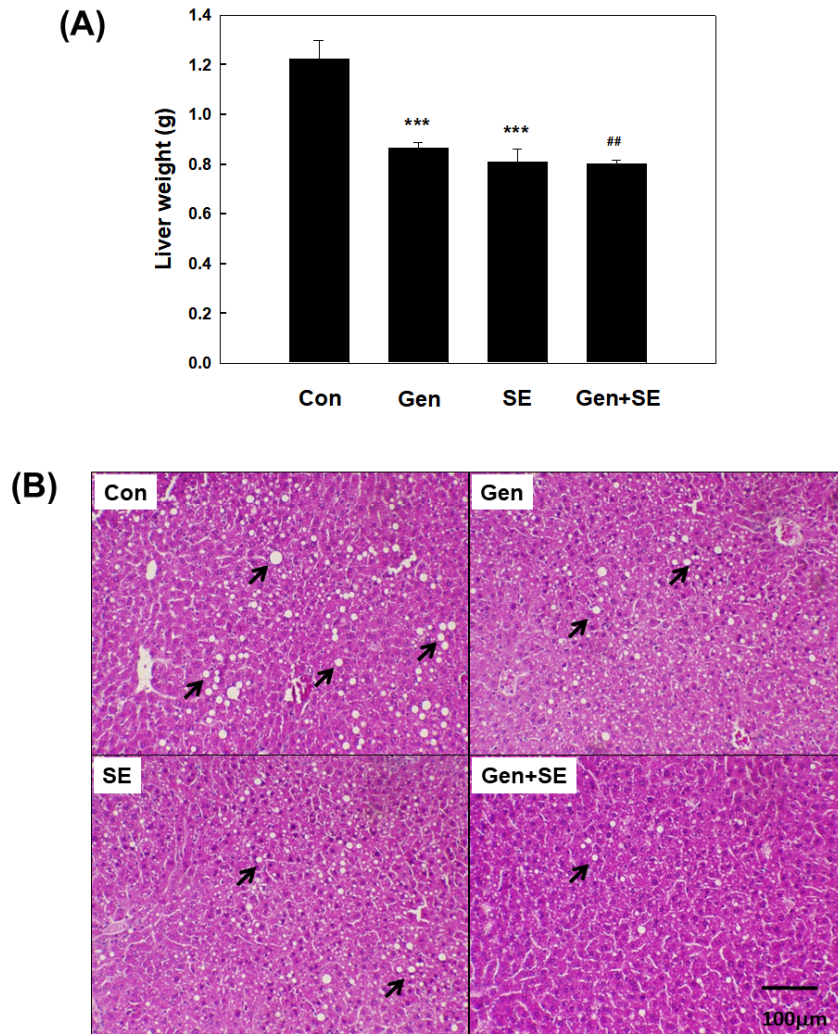


Fig. 4. Effects of soy isoflavone genistein and swimming exercise on liver weight (A) and hepatic lipid accumulation (B).

Female ovariectomized (OVX) mice (n=8/group) received high-fat diet or the same high-fat diet with Gen (0.1% wt/wt) for 8 weeks. (A) Liver weight were measured at the end of the treatment period. (B) Representative hematoxylin and eosin-stained sections of livers (original magnification, $\times 100$). Arrows indicate the lipid droplets in hepatocytes. All values are expressed as $M \pm SD$. *** $p < 0.001$, compared to Con, ## $p < 0.01$, compared to Gen. Con: control, Gen: genistein, SE: swimming exercise, Gen+SE: genistein plus swimming exercise.

3.4. 혈청 속 ALT와 AST에 대한 대두

이소플라본과 수영운동의 효과

간 기능 장애를 측정하는 평가지표인 혈청 속 ALT와 AST에 대한 제니스테인과 수영운동의 영향을 조사하였다(Fig. 5). Con에 비해 Gen과 SE의 혈청 속 ALT 수치는 각각은 33.7%, 34.24%씩 감소하였으며, Gen+SE는 Gen과 SE 각각에 비해 각각은 14.75%, 14.05%씩 통계적으로 유의하게 감소하였다. Gen과 SE의 혈청 속 AST는 Con에 비해 각각 16.76%와 17.63%씩 감소하였으며, Gen+SE는 Gen과 SE 각각에 비해 16.67%, 15.79%씩 통계적으로 유의하게 감소하였다. 이러한 연구결과는 제니스테인과 수영운동은 고지방식이 섭취로 증가한 간 내의 지질 성분을 감소시킴으로써 간 기능을 개선하며 제니스테인과 수영운동의 동시처리가 더욱 효과적임을 밝혔다.

3.5. 간 염증에 대한 대두 이소플라본과 수영운동의 효과

고지방식이 사료를 섭취한 난소절제 쥐의 간에서 염증성 사이토카인 유전자 발현에 대한 제니스테인과 수영운동의 영향을 조사하였다(Fig. 6). IL-6 유전자의 발현은 Con에 비해 Gen과 SE는 각각 29.03%, 22.58%씩 감소하였으며, Gen+SE

는 Gen과 SE 각각에 비해 각각 31.82%, 37.5%씩 통계적으로 유의하게 감소하였다. Gen과 SE의 TNF- α 유전자의 발현은 Con에 비해 각각 21.0%와 19.0%씩 감소하였으며, Gen+SE는 Gen과 SE 각각에 비해 15.19%, 17.28%씩 통계적으로 유의하게 감소하였다. 그러나 adiponectin 유전자 발현은 Con에 비해 Gen과 SE는 각각 33.57%, 27.23%씩 증가하였으며, Gen과 SE에 비해 Gen+SE는 각각 24.77%, 31.03%씩 통계적으로 유의하게 증가하였다. 고지방식이 사료의 섭취로 비만이 유도된 난소절제 쥐는 제니스테인과 수영운동에 의해 간에서의 염증성 사이카인 유전자의 발현이 감소하여 비만에 의한 염증을 개선하였으며, 이러한 결과는 제니스테인과 수영운동의 단독처리보다는 제니스테인과 수영운동의 동시처리가 더 효과적으로 나타났다.

3.6. 지방산 산화에 대한 대두 이소플라본과 수영운동의 효과

고지방식이 사료를 섭취한 난소절제 쥐의 간에서 지방산 산화와 관련된 PPAR α 표적 유전자 발현에 대한 제니스테인과 수영운동의 영향을 조사하였다(Fig. 7). Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1) 유전자의 발현은 Con에 비해 Gen과 SE는 각각 43.18%, 53.43%씩 증가하였으며,

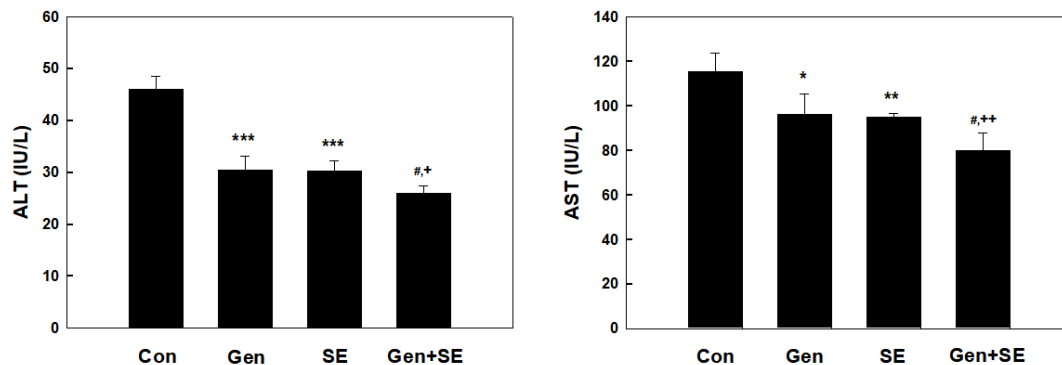


Fig. 5. Effects of soy isoflavone genistein and swimming exercise on serum ALT and AST. Serum ALT and AST were measured at the end of the treatment period. Female ovariectomized (OVX) mice (n=8/group) received high-fat diet or the same high-fat diet with Gen (0.1% wt/wt) for 8 weeks. All values are expressed as M \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, compared to Con, # p <0.05, compared to Gen, + p <0.05, ++ p <0.01, compared to SE. Con: control, Gen: genistein, SE: swimming exercise, Gen+SE: genistein plus swimming exercise, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate Aminotransferase.

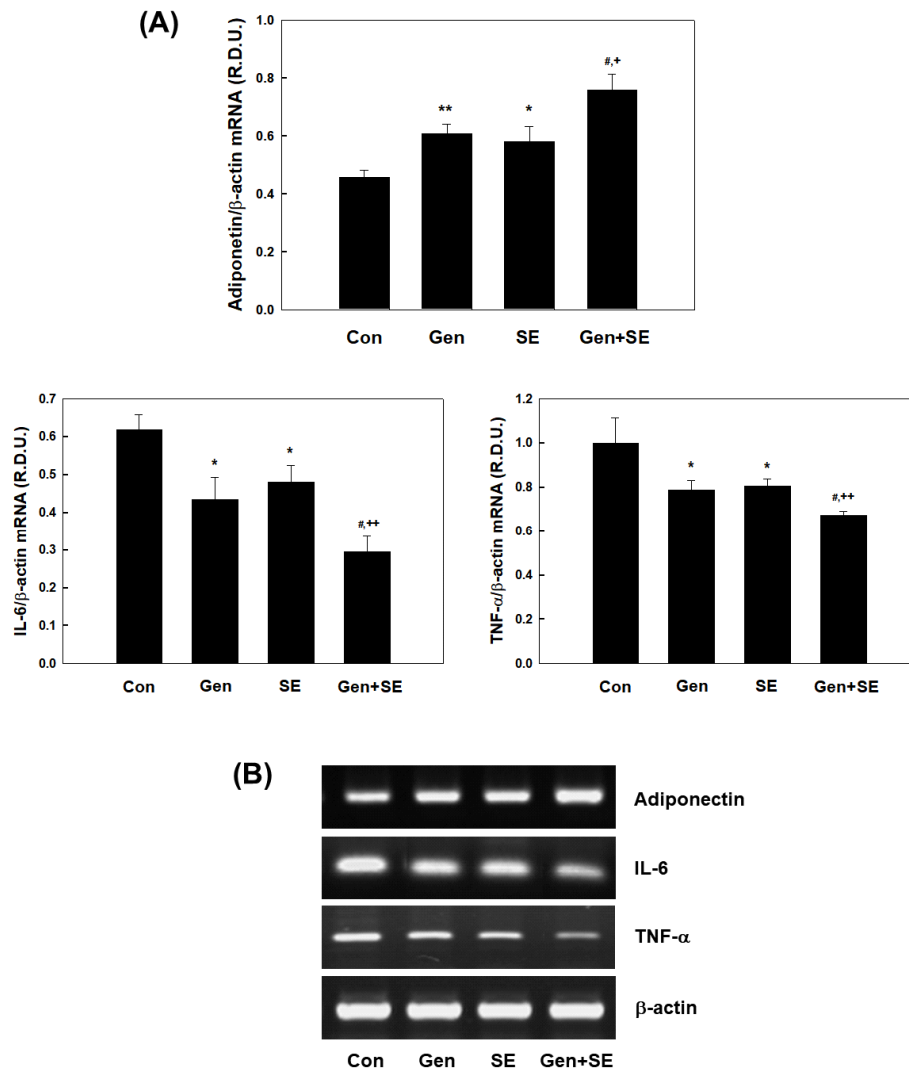


Fig. 6. Effects of soy isoflavone genistein and swimming exercise on expression of inflammation genes.

(A) Quantitative analyses of RT-PCR. Female ovariectomized (OVX) mice (n=8/group) received high-fat diet or the same high-fat diet with Gen (0.1% wt/wt) for 8 weeks. Total RNA was extracted from the liver. All values are expressed as $M \pm SD$ of relative density units (R.D.U.) of three independent experiments using β -actin. * p <0.05, ** p <0.01, compared to Con, # p <0.05, compared to Gen, + p <0.05, ++ p <0.01, compared to SE. (B) Representative RT-PCR bands from an independent experiment. Con: control, Gen: genistein, SE: swimming exercise, Gen+SE: genistein plus swimming exercise.

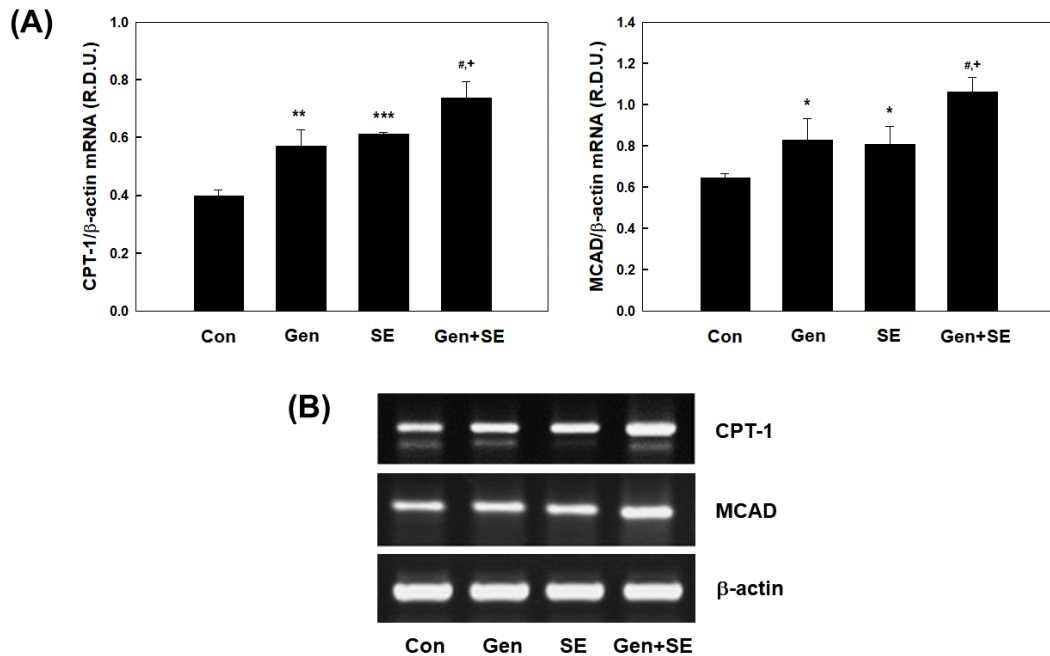


Fig. 7. Effects of soy isoflavone genistein and swimming exercise on expression of fatty acid oxidation genes.

(A) Quantitative analyses of RT-PCR. Female ovariectomized (OVX) mice (n=8/group) received high-fat diet or the same high-fat diet with Gen (0.1% wt/wt) for 8 weeks. Total RNA was extracted from the liver. All values are expressed as $M \pm SD$ of relative density units (R.D.U.) of three independent experiments using β -actin. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to Con, # $p < 0.05$, compared to Gen, + $p < 0.05$, compared to SE. (B) Representative RT-PCR bands from an independent experiment. Con: control, Gen: genistein, SE: swimming exercise, Gen+SE: genistein plus swimming exercise.

Gen+SE는 Gen과 SE 각각에 비해 각각 28.92%, 20.30%씩 통계적으로 유의하게 증가하였다. Gen과 SE의 medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) 유전자의 발현은 Con에 비해 각각 27.90%, 24.75%씩 증가하였으며, Gen+SE는 Gen과 SE 각각에 비해 28.47%, 31.71%씩 통계적으로 유의하게 증가하였다. 따라서 본 연구결과는 제니스테인과 수영운동이 간에서 PPAR α 활성을 통해 지방산 산화를 촉진함으로써 간세포의 지질 성분과 염증성 사이토카인의 수치를 감소시킨다는 것을 나타내었으며, 이것은 제니스테인과 수영운동의 동시처리에 의해 더욱 효과적으로 나타난다는 것을 제시하였다.

3.5. 고찰

폐경여성은 심혈관계 질환, 암 등 발생은 줄이면서 비만과 관련된 만성 대사성 질환의 예방 및 치료를 위해 식물성 에스트로겐 섭취 및 생활습관 개선을 선호하고 있다. 따라서 본 연구는 폐경여성의 동물모델인 난소절제 쥐에게 8주 동안 고지방식이 섭취와 함께 대두 이소플라본인 제니스테인과 수영운동의 동시처리가 각각의 단독처리에 비해 비만 조절과 간 기능 개선에 탁월한 효과가 있음을 밝힘으로써, 대두 이소플라본과 수영운동의 동시처리가 폐경여성의 비만 예방과 간 건강개선을 위한 효과적인 방법임을 제시하였다.

비알코올성 지방간질환은 비만과 밀접한 관련이 있는 단순 지방간에서 시작한다. 따라서 비만으로 유도된 단순 지방간은 비알코올성 지방간으로 진행되는 것을 막을 수 있는 중요한 단계이다. 간세포 속의 지질축적은 고지방식이 섭취의 증가, 간세포로의 혈액 속 자유 지방산의 유입 증가 및 간세포의 지질대사 이상이 주된 원인이라고 볼 수 있다[38]. 간에서 높게 발현되는 전사인자(transcription factor)인 peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)는 간 지질대사(lipid metabolism)와 염증에 중요한 역할을 한다[39-41]. PPAR α 는 지방산 β -산화와 지방산 수송에 관여하는 여러 유전자의 전사를 유도하여 간의 지질축적을 억제한다[42]. 비알코올성 지방간질환을 가진 환자는 간에서 PPAR α 와 PPAR α target gene인 미토콘드리아 막으로의 지방산 수송에 관여하는 CPT-1 유전자의 발현이 감소하였다[43].

대두 이소플라본의 기대되는 효과는 항비만 작용이다. 대두 이소플라본이 처리된 고지방식이를 섭취한 비만 쥐는 몸무게와 내장지방조직 무게가 감소되었다[44]. 콩에 가장 풍부한 이소플라본인 제니스테인은 난소절제 암컷 쥐의 몸무게를 감소시켰다[45]. 제니스테인을 8주 동안 섭취한 비알코올성 지방간질환 환자는 간세포에서 지방 대사 개선과 함께 산화 및 염증 지수가 감소하였다[46]. 제니스테인은 지방간의 *in vitro* 모델에서 지방산 합성에 관여하는 sterol regulatory element-binding protein 1c를 억제하여 간세포의 지질축적을 감소시켰다[47]. 그리고 본 연구는 제니스테인이 난소절제 쥐의 간세포에서 지방산 산화에 관련된 PPAR α target gene인 CPT-1과 MCAD 유전자의 발현을 증가시켰고 혈액 속 ALT와 AST 수치를 개선하였다. 이러한 본 연구 결과들은 제니스테인이 간세포의 지질대사를 긍정적으로 조절함으로써 간 기능을 개선한다는 것을 의미한다.

PPAR α 가 간의 지질축적과 전염증(proinflammatory) 상태를 억제하므로, PPAR α 는 간 지방증(hepatic steatosis)에서 지방간염으로 질병이 진행되는 것을 막아준다고 보고되었다[40,41]. 본 연구에서 제니스테인은 간세포의 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 유전자의 발현을 감소시키고 adiponectin 유전자 발현은 증가시키는 항염증 작용을 나타냈다. 따라서 이러한 본 연구결과는 제니스테인이 간세포의 지방산 산

화를 촉진하여 간 기능을 개선함으로써 지방간염을 억제하였다는 것을 시사하고 있다.

수영운동은 지질대사와 관련된 PPAR α 신호 경로를 조절한다. 수영운동은 고지방식이를 섭취한 고콜레스테롤혈증 동물모델의 간에서 CPT-1과 MCAD를 증가시킴으로써 간세포 내의 지질축적을 억제하였다[48]. 수영운동은 고지방식이를 섭취한 수컷 쥐에서 간세포로의 지방산 유입과 지방산 β -산화에 관여하는 유전자의 발현을 증가시켜 간의 지질축적을 감소시켰다[49]. 이러한 선행연구들은 수영운동이 간세포로의 지방산 유입을 증가시켜 지방산 산화를 촉진함으로써 간세포의 지질축적을 감소시킨다는 것을 의미한다.

규칙적인 운동은 비만과 관련된 염증을 조절한다. 과체중 여성은 8주 동안 규칙적인 운동을 통해 혈중 adiponectin과 high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) 수치를 개선하였다[50]. 8주 동안 유산소 운동을 한 비만 쥐는 간에서 NF- κ B 신호 경로(NF- κ B signaling)가 억제하였고 혈중 TNF- α 농도가 감소하였다[51]. 규칙적인 운동은 간에서 NF- κ B 신호 경로에 의존적으로 조절되는 염증성 사이토카인(IL-4와 IL-6)을 감소시키고 비만으로 유발되는 비알코올성 지방간을 개선하였다[52]. 또한 8주 동안 유산소 운동은 고지방식이를 섭취한 쥐의 간에서 PPAR α 단백질 발현을 증가시키고 NF- κ B 인산화에 비의존적으로 염증성 사이토카인(IL-6, TNF- α , MCP-1)을 감소시킴으로써, PPAR α 신호 경로를 통해 간 지방증과 간 염증을 개선하였다[53]. 선행연구 결과와 유사하게, 본 연구는 8주 동안 수영운동이 난소절제 비만 쥐의 간세포에서 PPAR α 신호 경로를 통해 조절되는 지방산 산화 관련 유전자의 발현을 촉진함으로써 염증성 사이토카인을 감소시켰다는 것을 밝혔다. 따라서 본 연구는 수영운동이 PPAR α 신호 경로로 조절되는 지방산 산화의 촉진을 통해 간 염증을 억제한다는 것을 제시하였다.

이소플라본과 운동의 동시처리가 지질대사에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구가 보고되고 있다. Zheng 등 (2018)은 이소플라본과 트레드밀 운동의 동시처리는 이소플라본과 트레드밀 운동 각각의 단독처리보다 가자미근(soleus muscle)에서 지방산 산화에 관여하는 PPAR δ 와 peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC)-1 α 발현을 촉진하였다고 보고하였다[54]. 고지방고당 사료(high fat-high

sugar diet)를 섭취한 쥐에서 12주 동안 제니스테인과 트레드밀 운동의 동시처리는 간의 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 1과 CPT-1a 단백질 발현을 감소시켜 대사이상 관련 지방간질환을 조절하였다[55]. 난소절제 쥐에서 대두 이소플라본과 유산소 운동의 동시처리는 운동 단독처리에 비해 몸무게, 지방무게 및 혈중 중성지방 수치를 감소시켰고 간에서의 항산화 작용을 촉진시켰다[56]. 이러한 선행연구는 이소플라본과 유산소 운동의 동시처리는 보다 효과적으로 지방산 대사와 비만을 개선한다는 것을 시사한다. 그리고 이러한 선행연구들과 유사하게, 본 연구는 고지방식을 섭취한 난소절제 비만 쥐에서 제니스테인과 수영운동의 동시처리가 각각의 단독처리보다 간에서 지방산 산화와 간 염증을 보다 효과적으로 관리하였다는 것을 밝혔다.

본 연구의 주목할 점은 난소절제 비만 쥐에서 제니스테인과 수영운동의 동시처리가 제니스테인과 수영운동 각각의 단독처리보다 더 효과적으로 간의 PPAR α 신호 경로를 통해 조절되는 지방산 산화와 관련된 유전자를 촉진함으로써 간의 항염증 작용을 밝힌 것이다. 결론적으로 본 연구는 고지방식을 섭취한 난소절제 쥐가 제니스테인과 수영운동의 동시처리로 간 기능과 간 염증이 개선된 것은 PPAR α 관련 지방산 산화 경로에 대한 제니스테인과 수영운동의 시너지 효과의 결과로 판단된다. 따라서 본 연구는 대두 이소플라본과 수영운동의 조합은 폐경여성의 비만 및 비만 관련 대사성 질환을 예방할 수 있는 효과적인 중재 전략 일 수 있다는 것을 제안한다.

4. 결론

대두 이소플라본은 폐경 여성의 여러 갱년기 장애, 심혈관질환, 골다공증, 압 등 폐경과 관련된 질환을 개선한다. 따라서 본 연구는 대두 이소플라본 베타글루코시데이스 제니스테인과 수영운동의 동시처리가 폐경여성의 동물모델에서 비만과 간 기능 개선에 시너지 효과가 있는지를 조사하였다.

본 연구결과는 고지방식을 섭취한 난소절제된 쥐에서 제니스테인과 수영운동의 동시처리는 제니스테인 및 수영운동 각각의 단독처리에 비해 몸무게, 백색지방조직의 무게, 간 무게, 간 조직의 지질축적 및 혈청 속 ALT와 AST 수치를 감소시켰다. 그리고 제니스테인과 수영운동의 동시

처리는 간 조직에서 염증성 사이토카인 유전자 발현을 긍정적으로 개선하였으며 지방산 산화와 관련된 PPAR α 표적 유전자의 발현을 보다 효과적으로 증가시켰다. 따라서 본 연구는 고지방식을 섭취한 난소절제된 쥐에서 대두 이소플라본과 수영운동의 동시처리는 간 조직의 지질대사를 조절하여 비만과 간 기능을 보다 효과적으로 개선하였다는 것을 밝혔다. 결론적으로 본 연구는 대두 이소플라본과 수영운동의 복합처방이 폐경여성의 대사성 질환을 예방하고 치료하기 위한 안전하고 효과적인 방법임을 시사한다.

References

1. S. L. Faria, O. P. Faria, C. S. Menezes, H. R. de Gouvêa, M. de Almeida Cardeal, "Metabolic Profile of Clinically Severe Obese Patients", *Obesity Surgery*, Vol.22, No.8 pp. 1257-1262, (2012).
2. G. Marchesini, E. Bugianesi, G. Forlani, F. Cerrelli, M. Lenzi, R. Manini, S. Natale, E. Vanni, N. Villanova, N. Melchionda, M. Rizzetto, "Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis, and the Metabolic Syndrome", *Hepatology*, Vol.37, pp. 917-923, (2003).
3. S. Singh, A. M. Allen, Z. Wang, L. J. Prokop, M. H. Murad, R. Loomba, "Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-biopsy Studies", *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Vol.13, No.4 pp. 643-654, (2015).
4. Z. M. Younossi, A. B. Koenig, D. Abdelatif, Y. Fazel, L. Henry, M. Wymmer, "Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes", *Hepatology*, Vol.64, No.1 pp. 73-84, (2016).
5. C. Wallstab, D. Eleftheriadou, T. Schulz, G. Damm, D. Seehofer, J. Borlak, H. G. Holzhütter, N. Berndt, "A Unifying Mathematical Model of Lipid Droplet

- Metabolism Reveals Key Molecular Players in the Development of Hepatic Steatosis", *The FEBS Journal*, Vol.284, No.19 pp. 3245–3261, (2017).
6. F. W. B. Sanders, A. Acharjee, C. Walker, L. Marney, L. D. Roberts, F. Imamura, B. Jenkins, J. Case, S. Ray, S. Virtue, A. Vidal-Puig, D. Kuh, R. Hardy, M. Allison, N. Forouhi, A. J. Murray, N. Wareham, M. Vacca, A. Koulman, J. L. Griffin, "Hepatic Steatosis Risk is Partly Driven by Increased de novo Lipogenesis Following Carbohydrate Consumption", *Genome Biology*, Vol.19, No.1 pp. 79, (2018).
 7. D. H. Ipsen, J. Lykkesfeldt, P. Tveden-Nyborg, "Molecular Mechanisms of Hepatic Lipid Accumulation in Non-alcoholic Fatty Liver Disease", *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, Vol.75, No.18 pp. 3313–3327, (2018).
 8. J. H. Kim, Y. I. Lim, "Anti-obesity Effect of Commercial Kochujang and Fermented Wheat Grain Products in Sprague-dawley Rats", *The Korean Journal of Food and Nutrition*, Vol.27, No.4 pp. 641–649, (2014).
 9. P. Zhang, Y. Wang, Y. Fan, Z. Tang, N. Wang, "Overexpression of Adiponectin Receptors Potentiates the Antiinflammatory Action of Subeffective dose of Globular Adiponectin in Vascular Endothelial Cells", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Vol.29, No.1 pp. 67–74, (2009).
 10. A. Gastaldelli, Y. Miyazaki, M. Pettiti, M. Matsuda, S. Mahankali, E. Santini, R. A. DeFronzo, E. Ferrannini, "Metabolic Effects of Visceral Fat Accumulation in Type 2 Diabetes", *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol.87, No.11 pp. 5098–5103, (2002).
 11. P. S. Patel, E. D. Buras, A. Balasubramanyam, "The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance", *Journal of Obesity*, Vol.2013, No.616193 pp. 1–9, (2013).
 12. M. Satish, S. K. Saxena, D. K. Agrawal, "Adipokine Dysregulation and Insulin Resistance with Atherosclerotic Vascular Disease: Metabolic Syndrome or Independent Sequelae?", *Journal of Cardiovascular Translational Research*, Vol.12, No.5 pp. 415–424, (2019).
 13. J. H. Stern, J. M. Rutkowski, P. E. Scherer, "Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk", *Cell Metabolism*, Vol.23, No.5 pp. 770–784, (2016).
 14. M. C. Carr, "The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause", *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol.88, No.6 pp. 2404–2411, (2003).
 15. R. I. Pasquali, F. Casimirri, A. M. Labate, O. Tortelli, G. Pascal, B. Anconetani, M. R. Gatto, R. Flaminia, M. Capelli, L. Barbara, "Body Weight, Fat Distribution and the Menopausal Status in Women. The VMH Collaborative Group", *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, Vol.18, No.9 pp. 614–621, (1994).
 16. J. W. Gu, E. Young, S. G. Patterson, K. L. Makey, J. Wells, M. Huang, K. B. Tucker, L. Miele, "Postmenopausal Obesity Promotes Tumor Angiogenesis and Breast Cancer Progression in Mice", *Cancer Biology & Therapy*, Vol.11, No.10 pp. 910–917, (2011).
 17. J. Lorenzo, "From the Gut to Bone: Connecting the Gut Microbiota with Th17 T Lymphocytes and Postmenopausal Osteoporosis", *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.131, No.5 pp. e146619, (2021).
 18. S. Jeong, M. Yoon, "Inhibition of the actions of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α on Obesity by Estrogen", *Obesity*, Vol.15, No.6 pp. 1430–1440, (2007).

19. J. Z. Cerne, S. Novakovic, S. Frkovic-Grazio, M. Pohar-Perme, V. Stegel, K. Gersak, " Estrogen Metabolism Genotypes, Use of Long-term Hormone Replacement Therapy and Risk of Postmenopausal Breast Cancer" , *Oncology Reports*, Vol.26, No.2 pp. 479-485, (2011).
20. R. C. Speth, M. D'Ambra, H. Ji, K. Sandberg, " A Heartfelt Message, Estrogen Replacement Therapy: Use It or Lose It" , *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, Vol.315, No.6 pp. H1765-H1778, (2018).
21. J. Kinjo, R. Tsuchihashi, K. Morito, T. Hirose, T. Aomori, T. Nagao, H. Okabe, T. Nohara, Y. Masamune, " Interactions of Phytoestrogens with Estrogen Receptors Alpha and Beta (III). Estrogenic Activities of Soy Isoflavone Aglycones and their Metabolites Isolated from Human Urine" , *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol.27, No.2 pp. 185-188, (2004).
22. S. Nakai, M. Fujita, Y. Kamei, " Health Promotion Effects of Soy Isoflavones" , *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Vol.66, No.6 pp. 502-507, (2020).
23. M. Messina, " Soy Foods, Isoflavones, and the Health of Postmenopausal Women" , *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol.100(Suppl. S1) pp. 423S-430S, (2014).
24. J. C. Merritt, " Metabolic Syndrome: Soybean Foods and Serum Lipids" , *Journal of the National Medical Association*, Vol.96, No.8 pp. 1032-1041, (2014).
25. M. Akhlaghi, " Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Beneficial Effects of Flavonoids" , *Phytotherapy Research : PTR*, Vol.30, No.10 pp. 1559-1571, (2016).
26. S Barnes, " Effect of Genistein on in vitro and in vivo Models of Cancer" , *The Journal of Nutrition*, Vol.125(3 Suppl) pp. 777S-783S, (1995).
27. A. Bitto, F. Polito, M. Atteritano, D. Altavilla, S. Mazzaferro, H. Marini, E. B. Adamo, R. D'Anna, R. Granese, F. Corrado, S. Russo, L. Minutoli, F. Squadrito, " Genistein Aglycone does not Affect Thyroid Function: Results from a Three-Year, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial" , *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol.95, No.6 pp. 3067-3072, (2010).
28. C. De Gregorio, H. Marini, A. Alibrandi, A. Di Benedetto, A. Bitto, E. B. Adamo, D. Altavilla, C. Irace, G. Di Vieste, D. Pancaldo, R. Granese, M. Atteritano, S. Corrao, G. Licata, F. Squadrito, V. Arcoraci, " Genistein Supplementation and Cardiac Function in Postmenopausal Women with Metabolic Syndrome: Results from a Pilot Strain-Echo Study" , *Nutrients*, Vol.9, No.6 pp. 584, (2017).
29. F. Squadrito, H. Marini, A. Bitto, D. Altavilla, F. Polito, E. B. Adamo, R. D'Anna, V. Arcoraci, B. P. Burnett, L. Minutoli, A. Di Benedetto, G. Di Vieste, D. Cucinotta, C. de Gregorio, S. Russo, F. Corrado, A. Saitta, C. Irace, S. Corrao, G. Licata, " Genistein in the Metabolic Syndrome: Results of a Randomized Clinical Trial" , *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol.98, No.8 pp. 3366-3374, (2013).
30. P. Villa, B. Costantini, R. Suriano, C. Perri, F. Macrì, L. Ricciardi, S. Panunzi, A. Lanzone, " The Differential Effect of the Phytoestrogen Genistein on Cardiovascular Risk Factors in Postmenopausal Women: Relationship with the Metabolic Status" , *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol.94, No.2 pp. 552-558, (2009).
31. G. Tuuri, M. Loftin, J. Oescher, " Association of Swim Distance and Age with Body Composition in Adult Female Swimmers" , *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Vol.34, No.12 pp. 2110-2114, (2002).
32. A. Wong, Y. S. Kwak, S. D. Scott, E. J.

- Pekas, W. M. Son, J. S. Kim, S. Y. Park, "The Effects of Swimming Training on Arterial Function, Muscular Strength, and Cardiorespiratory Capacity in Postmenopausal Women with Stage 2 Hypertension", *Menopause*, Vol.26, No.6 pp. 653–658, (2018).
33. Y. Su, Z. Chen, W. Xie, "Swimming as Treatment for Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analysis", *BioMed Research International*, Vol.2020 pp. 6210201, (2020).
34. C. P. Ortega-Santos, L. Al-Nakkash, C. M. Whisner, "Exercise and/or Genistein Treatment Impact Gut Microbiota and Inflammation after 12 Weeks on a High-Fat, High-Sugar Diet in C57BL/6 Mice", *Nutrients*, Vol.12, No.11 pp. 3410, (2020).
35. C. Wu, S. Zhou, S. Ma, K. Suzuki, "Effect of Genistein Supplementation on Exercise-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Mice Liver and Skeletal Muscle", *Medicina (Kaunas)*, Vol.57, No.10 pp. 1028, (2021).
36. P. Habibi, S. Babri, N. Ahmadiasl, H. Yousefi, "Effects of Genistein and Swimming Exercise on Spatial Memory and Expression of MicroRNA 132, BDNF, and IGF-1 Genes in the Hippocampus of Ovariectomized Rats", *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Vol.20, No.8 pp. 856–862, (2017).
37. D. Nakajima, C. S. Kim, T. W. Oh, C. Y. Yang, T. Naka, S. Igawa, F. Ohta, "Suppressive Effects of Genistein Dosage and Resistance Exercise on Bone Loss in Ovariectomized Rats", *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science*, Vol.20, No.5 pp. 285–291, (2001).
38. S. H. Koo, "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Molecular Mechanisms for the Hepatic Steatosis", *Clinical and Molecular Hepatology*, Vol.19, No.3 pp. 210–215, (2013).
39. T. Varga, Z. Czimmerer, L. Nagy, "PPARs are a Unique Set of Fatty Acid Regulated Transcription Factors Controlling both Lipid Metabolism and Inflammation", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1812, No.2 pp. 1007–1022, (2011).
40. P. Gervois, R. Kleemann, A. Pilon, F. Percevault, W. Koenig, B. Staels, T. Kooistra, "Global Suppression of IL-6-Induced Acute Phase Response Gene Expression after Chronic in vivo Treatment with the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha Activator Fenofibrate", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.279, No.16 pp. 16154–16160, (2004).
41. R. Stienstra, S. Mandard, D. Patsouris, C. Maass, S. Kersten, M. Müller, "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation", *Endocrinology*, Vol.148, No.6 pp. 2753–2763, (2007).
42. M. Pawlak, P. Lefebvre, B. Staels, "Molecular Mechanism of PPAR α Action and its Impact on Lipid Metabolism, Inflammation and Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease", *Journal of Hepatology*, Vol.62, No.3 pp. 720–733, (2015).
43. M. Kohjima, M. Enjoji, N. Higuchi, M. Kato, K. Kotoh, T. Yoshimoto, T. Fujino, M. Yada, R. Yada, N. Harada, R. Takayanagi, M. Nakamura, "Re-evaluation of Fatty Acid Metabolism-related Gene Expression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease", *International Journal of Molecular Medicine*, Vol.20, No.3 pp. 351–358, (2007).
44. J. Tan, C. Huang, Q. Luo, W. Liu, D. Cheng, Y. Li, Y. Xia, C. Li, L. Tang, J. Fang, K. Pan, Y. Ou, A. Cheng, Z. Chen, "Soy Isoflavones Ameliorate Fatty Acid Metabolism of Visceral Adipose Tissue by Increasing the AMPK Activity in Male Rats with Diet-Induced Obesity (DIO)", *Molecules*, Vol.24, No.15 pp. 2809, (2019).

45. L. Al-Nakkash, B. Markus, L. Batia, W. C. Prozialeck, T. L. Broderick, " Genistein Induces Estrogen-Like Effects in Ovariectomized Rats but Fails to Increase Cardiac GLUT4 and Oxidative Stress" , *Journal of Medicinal Food*, Vol.13, No.6 pp. 1369-1375, (2010).
46. S. Amanat, M. H. Eftekhari, M. Fararouei, K. Bagheri Lankarani, S. J. Massoumi, " Genistein Supplementation Improves Insulin Resistance and Inflammatory State in Non-alcoholic Fatty Liver Patients: A Randomized, Controlled Trial" , *Clinical Nutrition*, Vol.37, No.4 pp. 1210-1215, (2018).
47. L. Seidemann, A. Krüger, V. Kegel-Hübner, D. Seehofer, G. Damm, " Influence of Genistein on Hepatic Lipid Metabolism in an In Vitro Model of Hepatic Steatosis" , *Molecules*, Vol.26, No.4 pp. 1156, (2021).
48. F. Zheng, Y. Cai, " Concurrent Exercise Improves Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Upregulating PPAR- γ and Genes Involved in the Beta-Oxidation of Fatty Acids in ApoE-KO Mice Fed a High-Fat Diet" , *Lipids in Health and Disease*, Vol.18, No.1 pp. 6, (2019).
49. A. Song, C. Wang, L. Ren, J. Zhao, " Swimming Improves High-fat Induced Insulin Resistance by Regulating Lipid and Energy Metabolism and the Insulin Pathway in Rats" , *International Journal of Molecular Medicine*, Vol.33, No.6 pp. 1671-1679, (2014).
50. R. Bagheri, A. Rashidlamir, D. Ashtary-Larky, A. Wong, M. Alipour, M. S. Motevalli, A. Chebbi, L. Laher, H. Zouhal, " Does Green Tea Extract Enhance the Anti-Inflammatory Effects of Exercise on Fat Loss?" , *British Journal of Clinical Pharmacology*, Vol.86, No.4 pp. 753-762, (2020).
51. J. Cho, S. Kim, S. Lee, H. Kang, " Effect of Training Intensity on Nonalcoholic Fatty Liver Disease" , *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Vol.47, No.8 pp. 1624-1634, (2015).
52. P. A. Monteiro, W. L. do Prado, T. R. Dos Santos Tenório, L. M. Tomaz, D. H. St-Pierre, F. S. Lira, " Immunometabolic Changes in Hepatocytes Arising from Obesity and the Practice of Physical Exercise" , *Current Pharmaceutical Design*, Vol.24, No.27 pp. 3200-3209, (2018).
53. T. A. Diniz, E. A. de Lima Junior, A. A. Teixeira, L. A. Biondo, L. A. F. da Rocha, I. C. Valadão, L. S. Silveira, C. Cabral-Santos, C. O. de Souza, J. C. Rosa Neto, " Aerobic Training Improves NAFLD Markers and Insulin Resistance through AMPK-PPAR- α Signaling in Obese Mice" , *Life Sciences*, Vol.266 pp. 118868, (2021).
54. W. Zheng, J. Rogoschin, A. Niehoff, K. Oden, S. E. Kulling, M. Xie, P. Diel, " Combinatory Effects of Phytoestrogens and Exercise on Body Fat Mass and Lipid Metabolism in Ovariectomized Female Rats" , *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.178 pp. 73-81, (2018).
55. C. R. St Aubin, A. L. Fisher, J. A. Hernandez, T. L. Broderick, L. Al-Nakkash, " Mitigation of MAFLD in High Fat-High Sucrose-Fructose Fed Mice by a Combination of Genistein Consumption and Exercise Training" , *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity : Targets and Therapy*, Vol.15 pp. 2157-2172, (2022).
56. G. A. Yoon, S. Park, " Antioxidant Action of Soy Isoflavones on Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activities in Exercised Rats" , *Nutrition Research and Practice*, Vol.8, No.6 pp. 618-24, (2014).