

C57BL/6 Mice에서 이소플라본의 지질강하, 항산화, 항염증효과를 통한 항동맥경화 효과

조혜연¹ · 양정례² · 노경희³ · 김진주³ · 김영화³ · 허경혜⁴ · 송영선^{3*}

¹인제대학교 의과대학 백인제기념 임상의학연구소

²부산지방식품의약품안전청 신항수입식품검사소

³인제대학교 의생명공학대학 식품생명과학부, 식품과학연구소 및 바이오헬스소재연구센터

⁴인제대학교 분자의생명공학과

Anti-atherogenic Effect of Isoflavone through Hypolipidemic, Anti-oxidative and Anti-inflammatory Actions in C57BL/6 Mice

Hye-Yeon Cho¹, Jeong-Lye Yang², Kyung-Hee Noh³, Jin-Ju Kim³,
Young-Hwa Kim³, Kyung-Hye Huh⁴ and Young-Sun Song^{3*}

¹Paik Inje Memorial Clinical Research Institute, School of Medicine,
Inje University, Busan 614-735, Korea

²Busan Newport Import Food Inspection Office, Busan Regional Food &
Drug Administration, Busan 618-410, Korea

³School of Food and Life Sciences, Food Science Institute, and Biohealth Product
Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

⁴Major in Molecular & Biomedical Technology, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of isoflavone on the atherogenic effect in C57BL/6 mice. C57BL/6 female mice, 5 weeks of age, were fed on chow diets for 2 weeks during adjustment period. Mice weighing approximately 17.9±0.9 g were divided into 4 groups and were fed on the experimental diets containing isoflavone for 8 weeks. Experimental groups were control (atherogenic diet), IF-10 (atherogenic diet with isoflavone 10 mg/100 g diet), IF-40 (atherogenic diet with isoflavone 40 mg/100 g diet) and IF-100 (atherogenic diet with isoflavone 100 mg/100 g diet). Food efficiency ratio was not different among the experimental groups. Plasma triglyceride (TG) concentrations were lower after 4 weeks in isoflavone supplementation groups than in control group, whereas monocyte chemoattractant protein-1 and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels of plasma were significantly ($p < 0.05$) decreased in the isoflavone supplementation groups in a dose dependent manner. Both hepatic TG and cholesterol levels were significantly lowered in IF-100 than control. Hepatic glutathione concentrations were higher in the IF-100 group than in the other groups. Hepatic antioxidant enzyme activities including glutathione-reductase, glutathione-peroxidase, catalase, and Mn-superoxide dismutase were significantly higher in the isoflavone supplementation groups in a dose dependent manner. From the above results, it is concluded that isoflavone may reduce the risk of atherosclerosis via hypolipidemic, anti-oxidative and anti-inflammatory effects.

Key words: anti oxidative and anti inflammatory effect, antioxidant enzyme activity, atherosclerosis, isoflavone, lipid level, monocyte chemoattractant protein 1

서 론

최근 콩 섭취가 부족한 서구사회에서 심혈관질환과 전립선암, 유방암 및 골다공증 등 호르몬 관련 질환의 발병률이 콩 제품을 즐겨 먹는 아시아인들에 비해 현저히 높음이 밝혀져 콩의 생리활성에 대한 관심이 급격히 높아지고 있다(1).

심혈관질환으로의 진행에 있어 혈액 중의 지질 수준은 주요한 위험 요인으로 지적되고 있고(2), 많은 연구들은 콩 섭취가 혈장의 지질 수준을 개선시켜 심혈관계 질환의 발병 위험을 낮추준다고 보고하고 있다(3,4). 또한 고중성지방혈증이 동맥경화의 중요한 지표로 밝혀지고 있고, 특히 우리나라의 경우에는 고중성지방혈증의 빈도가 고콜레스테롤혈증의 빈

*Corresponding author. E mail: fdsnsong@inje.ac.kr
Phone: 82 55 320 3235, Fax: 82 55 321 0691

도를 낮추고 있는 실정으로 중성지방이 높으면 임상적 중요성이 더해 가고 있다. 중성지방이 높으면 HDL-콜레스테롤 감소, 혈압 상승, 인슐린 저항성 등 대사성 증후군이 복합적으로 나타나며 이로 인해 동맥경화성 질환의 위험이 더욱 높아질 수 있다고 한다(5). 콩 단백질의 이소플라본이 심혈관질환에 이로운 효과를 갖는 것으로 잘 알려져 있으며, 콩 단백질에 의한 혈중 콜레스테롤 저하 효과에 관한 연구는 오랫동안 많이 수행되어 왔으나 콩 단백질의 어떤 성분이 혈중 지질 농도에 영향을 미치는지에 대해서는 아직까지 명확하지 않다(6). 대두에 다량 함유된 이소플라본은 페놀 원형화합물로 주로 aglycone 형태인 genistein, daidzein, glycitein 등이 있으며 이들의 배당체인 conjugated glucoside 형태로는 genistin, daidzin, glycitin 등이 있고(7), aglycone 형태의 이소플라본은 구조적으로 에스트로젠과 유사하여 에스트로젠 활성을 나타내어 phytoestrogen으로 분류한다(8). 이러한 이소플라본은 항산화 활성(9,10)과 자유라디칼 소거능(11)이 있어 LDL-콜레스테롤 산화를 억제하고(12) LDL-콜레스테롤 수용체의 활성을 증가시켜(13) 콜레스테롤 수준을 감소시켜 동맥경화를 예방해 준다고 한다(14).

혈청의 지질수준이 동맥경화 유발을 설명하는 주요한 부분이지만 산화적 스트레스와 같은 다른 위험인자들, 내피세포의 활성과 염증 및 plaque의 안정성 등이 현재 동맥경화 유발의 중요한 기여자로서 인정되고 있다(15). 동맥경화와 산화적 스트레스, 염증과의 관련성은 죽상동맥경화의 진행 과정에서 활성화된 대식세포는 여러 가지 cytokine과 활성 산소종을 생성하여 염증반응의 전사인자인 nuclear factor-kappa B(NF- κ B)를 활성화시키며 그 결과 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)를 발현시켜 염증을 일으키고 adhesion molecule인 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)과 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 등을 발현시켜 혈액 중의 monocyte 유입을 도와 동맥경화를 계속 진행시킨다(16,17). 그러므로 동맥경화는 산화적 스트레스에 의해 활성화된 대식세포가 중요한 역할을 담당하는 만성적 염증질환이라 할 수 있다(18,19).

이소플라본의 항산화효과에 대해서는 *in vitro*에서 세포 내 산화적 스트레스에 대한 방어효과가 보고된 바 있으며(20,21), *in vivo*에서는 혈중 과산화물의 저하와 간세포에서의 catalase 활성 증가가 보고되었다(22-24). 그러나 이소플라본의 항산화 및 항염증작용에 대한 기작은 대부분이 *in vitro*에서 행해졌으며 *in vivo*에서의 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이소플라본이 초기 동맥경화 발생에 미치는 효과를 연구하기 위하여 동맥경화식에 첨가된 이소플라본의 섭취가 C57BL/6 mice의 지질농도, 혈관 내피세포 부착물질인 MCP-1의 농도와 산화적 스트레스, 그리고 항산화효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물의 관리 및 식이조성

5주령의 C57BL/6 mice종 암컷 40수를 (주)효창 사이언스로부터 구입하여 2주간의 적응기를 거쳐, 평균 체중 17.9 \pm 0.9 g인 실험동물을 완전임의배치로 한 군당 10수씩 4군으로 나누어 plastic cage에서 사육하였다. 사육실의 온도는 20~25°C로 유지하였으며 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다. 실험식은 AIN' 76에 기초해서 제조한 대조군식이(동맥경화식)(25)에 이소플라본을 첨가한 실험식을 8주간 급여하면서 사육하였다. 실험식에 첨가한 이소플라본(Amax Nutrasource Inc., CA, USA)은 100 g 당 daidzin 5.41%, daidzein 10.52%, genistin 15.42%, genistein 6.43%, glycitin 2.07%와 glycitein 0.54%의 조성으로 함유되어 있는 이소플라본 제품으로 식이 100 g 당 10 mg(IF-10)과 40 mg(IF-40) 및 100 mg(IF-100)이 되도록 조정하여 첨가하였다. 즉, IF-10은 실험에 사용한 이소플라본을 식이 1,000 g 당 0.25 g, IF-40은 식이 1,000 g 당 1.0 g, IF-100은 식이 1,000 g 당 2.5 g을 첨가하여 제조하였으며, 실험군의 식이 조성은 Table 1과 같다. 식이 제조에 사용한 vitamin mixture와 mineral mixture(AIN-76A), *w*-cellulose, vitamin free casein, cholesterol, DL-methionine, choline bitartrate와 sodium cholate 등은 ICN Biochemicals(ICN Aurora, Ohio, USA) 제품을 사용하였고, 옥수수 전분은 시판 두산 옥수수 전분을, 옥수수유는 시판 제일제당 옥수수유를, cocoa butter는 선인 제품을 시중에서 구입하여 사용하였다. 실험식이

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

	Group ¹⁾			
	Control	IF 10	IF 40	IF 100
Isoflavone ²⁾		0.25	1	2.5
Casein	200	200	200	200
Sucrose	400	400	400	400
Corn starch	120	119.75	119	117.5
Cocoa butter	80	80	80	80
Corn oil	80	80	80	80
Cholesterol	12	12	12	12
Sodium cholate	5	5	5	5
<i>w</i> -Cellulose	50	50	50	50
Vitamin mixture ³⁾	10	10	10	10
Mineral mixture ⁴⁾	35	35	35	35
DL Methionine	6	6	6	6
Choline bitartrate	2	2	2	2
Total	1000	1000	1000	1000

¹⁾Control: fed atherogenic diet, IF 10: fed atherogenic diet and containing isoflavone 10 mg/100 g diet, IF 40: fed atherogenic diet and containing isoflavone 40 mg/100 g diet, IF 100: fed atherogenic diet and containing isoflavone 100 mg/100 g diet.

²⁾Isoflavone: containing daidzin 5.41%, daidzein 10.52%, genistin 15.42%, genistein 6.43%, glycitin 2.07% and glycitein 0.54% per 100 g (Amax Nutrasource Inc., CA, USA).

³⁾Vitamin mixture: AIN 76A (ICN).

⁴⁾Mineral mixture: AIN 76A (ICN).

와 물은 자유섭취방법(*ad libitum*)으로 급여하였으며 실험 동물의식이섭취량과 체중은 각각 1주일에 2회와 1회씩 정기적으로 측정하였다.

시료수집

실험 종료 전 실험동물을 하룻밤 절식시킨 후 dry ice로 마취시킨 후 희생시켰다. 혈액은 실험동물을 8주간 사육하면서 0주, 4주, 8주 간격으로 mouse의 안와정맥으로부터 취하였으며 채혈 6시간 전에 금식시켰다. 채취된 혈액은 3,000 rpm에서 20분 간 원심분리하여 분리된 혈장을 -20°C 에서 냉동 보관하면서 분석에 사용하였다.

간은 적출한 후 간에 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 차가운 생리식염수로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 제거하고 -70°C 에서 보관하며 간의 지질 농도와 항산화 효소계 활성을 측정하였다.

혈장 지질, TBARS, MCP-1 농도

8주간의 증성지방과 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도 변화를 효소법에 의한 정량용 kit(영동제약)를 사용하여 분석하였으며, LDL-콜레스테롤 농도는 Friedewald 공식(26)으로 계산하였고 지질과산화 정도는 TBARS 함량으로 확인하였다. TBARS 함량은 Buege와 Aust에 의한 방법(27)을 다소 수정하여 측정하였다. 즉, 0.4% TBA, 15% TCA, 그리고 2.5% HCl을 혼합한 TBARS 용액을 만든 후, 혈장 20 μL 에 180 μL 의 증류수를 혼합하여 전체 부피를 200 μL 로 조정하였다. 여기에 TBARS 용액을 400 μL 를 가하여 혼합하여 90°C 에서 20분간 가열하여 식힌 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 사용하였으며 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 malondialdehyde(MDA)의 양으로 환산하였다.

혈장의 MCP-1의 수준은 mouse용 MCP-1 ELISA kit (Biosource, USA)를 사용하여 분석하였다.

간 지질조성

간의 지질은 Folch 등의 방법(28)으로 추출하여 비중법으로 간의 총 지질함량을 구하였으며 Triton-X 100을 0.5% 첨가하여 탁도에 의한 오차를 최소화한 후 총 콜레스테롤과 증성지방 농도를 효소법으로 영동제약 kit를 사용하여 분석

하였다.

Glutathione 농도 및 항산화 효소계 활성

항산화 효소계 활성 측정으로는 Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD 활성을 Marklund와 Marklunds의 방법(29)으로 측정하였고, catalase의 측정은 Aebi 법(30)으로 측정하였고, glutathione 함량은 Tietze(31)의 방법으로 분석하였다. Glutathione peroxidase와 glutathione reductase 활성은 Lawrence과 Burk의 방법(32)과 Inger와 Bengt의 방법(33)으로 각각 분석하였으며, 단백질 농도는 Bradford 방법(34)으로 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 SPSS/PC+ package를 사용하여 분석하여 평균±표준편차로 표시하였으며, 일원배치분산분석으로 비교하여 Duncan 다중범위 분석에 의해 각 실험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

체중증가량 및 식이효율

이소플라본의 섭취에 따른 체중증가량 및 식이효율은 Table 2에서 보듯이 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이소플라본의 첨가가 체중증가와 식이섭취량 및 식이효율에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

혈장의 지질조성

이소플라본 섭취에 의한 8주간의 혈장 지질 수준은 Table 3에서 보는 바와 같다. 이소플라본 함유 식이섭취 4주 후 TG 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 추세를 보였으며 8주 후에는 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 4주 후의 TG 농도를 실험식이 섭취 전과 비교하면 대조군에서는 TG 농도가 증가하였으나 이소플라본 섭취군에서는 TG 농도가 현저하게 감소하였으며, 농도의존적인 효과는 나타내지 않았다. 8주 후의 TG 농도 변화는 대조군에 비해 이소플라본을 제공한 식이를 섭취한 군에서 감소효과가 다소 높았으나 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈장 콜레스테롤 수준의 변화를 비교하면 유의적인 차이는 보이지 않았으나 이소플라본 섭취 8주 후의 콜레스테롤 함

Table 2. Effect of isoflavone supplementation on the weight gain, food intake and food efficiency ratio in rats fed atherogenic diets

Group ¹⁾	Initial BW (g)	Final BW (g)	Weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER ²⁾
Control	17.9±1.26 ³⁾	20.1±4.73	0.035±0.011	2.17±0.68	0.016±0.012
IF 10	18.1±0.73	20.2±1.13	0.036±0.011	2.26±0.43	0.016±0.004
IF 40	17.7±0.95	19.4±2.88	0.038±0.023	2.50±0.23	0.015±0.008
IF 100	17.9±0.50	18.1±3.53	0.030±0.009	1.89±0.81	0.016±0.038

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Food efficiency ratio.

³⁾Mean±SD (n=10 per group).

Table 3. Effect of isoflavone supplementation on the plasma lipid levels and anti-atherogenic index in rats fed atherogenic diets

	Week	Group ¹⁾			
		Control	IF 10	IF 40	IF 100
TG ²⁾ (mg/dL)	0	77.2±23.7 ⁷⁾	85.4±12.1	77.8±22.7	90.0±17.3
	4	89.4±26.7 ⁸⁾ (12.2±20.5 ⁹⁾)	63.8±10.8 ^b (21.6±8.8 ^b)	54.6±9.4 ^b (23.2±11.6 ^b)	71.5±11.1 ^{ab} (18.5±7.0 ^b)
	8	68.8±9.8 (8.4±5.0)	69.8±23.7 (15.6±10.1)	56.2±8.8 (21.6±9.4)	69.0±18.9 (21.0±9.7)
TC ³⁾ (mg/dL)	0	78.2±22.4	93.6±9.3	84.1±16.4	92.4±19.8
	4	153±10.9 (74.8±12.6)	170±17.5 (76.2±8.6)	171±23.8 (86.6±7.9)	193±19.6 (100±15.2)
	8	155±4.4 ^{ab} (76.8±6.7)	175±11.9 ^a (81.4±1.9)	146±20.3 ^b (61.9±14.1)	152±4.1 ^{ab} (59.6±13.8)
HDL C ⁴⁾ (mg/dL)	0	38.7±4.9	37.7±2.9	33.8±9.3	38.0±3.5
	4	37.5±10.4 (1.2±0.5)	33.8±5.7 (3.9±2.6)	32.4±7.6 (1.4±0.9)	33.0±12.5 (5.0±3.4)
	8	39.2±5.9 (0.6±0.2)	38.9±11.3 (1.2±0.5)	35.3±3.8 (1.5±0.3)	35.2±4.6 (1.2±0.5)
LDL C ⁵⁾ (mg/dL)	0	41.9±17.6	38.9±10.3	39.6±12.6	43.5±10.6
	4	131±18.8 (90.3±17.9)	123±19.1 (84.4±9.9)	119±20.8 (79.4±8.7)	132±14.4 (88.8±12.5)
	8	123±17.2 (81.7±4.4 ^{ab})	129±25.1 (89.6±8.19 ^a)	96.5±27.4 (55.3±11.8 ^b)	105±6.26 (61.4±3.9 ^{ab})
AI ⁶⁾	0	0.53±0.18	0.40±0.04	0.42±0.09	0.43±0.12
	4	0.25±0.07 (0.28±0.09)	0.20±0.03 (0.20±0.02)	0.19±0.06 (0.22±0.05)	0.17±0.03 (0.25±0.02)
	8	0.24±0.05 (0.29±0.09)	0.20±0.07 (0.19±0.05)	0.25±0.04 (0.17±0.09)	0.24±0.03 (0.19±0.10)

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Triglyceride. ³⁾Total cholesterol. ⁴⁾High density lipoprotein cholesterol. ⁵⁾Low density lipoprotein cholesterol.

⁶⁾Anti atherogenic index. ⁷⁾Mean±SD (n=10).

⁸⁾Values within the same row with different superscripts differ significantly (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

⁹⁾(): change between 0 week and 4 or 8 weeks.

량은 섭취 전에 비하여 증가하였으나 이소플라본의 섭취량이 높을수록 대조군에 비해 증가량이 다소 낮은 경향으로 나타났다. HDL-콜레스테롤 농도 변화는 실험식이 섭취 전과 비교하면 이소플라본 섭취 8주 후 대조군에 비해 이소플라본을 제공한 군이 다소 높은 경향을 보였으나 각 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. LDL-콜레스테롤 농도 변화는 이소플라본 섭취 8주 후 각 군 간의 유의적인 차이를 보였다(p<0.05). 실험식이 제공 전과 이소플라본 섭취 8주 후의 항동맥경화지수 변화를 비교하면 각 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았으나 대조군에 비해 이소플라본을 섭취한 군에서 다소 증가하는 경향을 보였다. Zhou 등(35)의 meta-analysis 연구에 의하면 이소플라본 함량이 높은 콩 단백질이 이소플라본 함량이 낮은 콩 단백질에 비해 LDL-콜레스테롤을 유의적으로 감소시킨다고 조사되었으나 혈중 지질감소효과를 갖지 않는 것으로 사료되어 혈중 콜레스테롤을 저하시키기 위해서 이소플라본을 섭취하는 것을 권장하기에는 자료가 충분하지 않다는 보고도 있다(36,37). 또한 Peluso 등(38)은 고콜레스테롤 식이를 공급한 경우 genistein의 고콜레스테롤혈증 저하 효과는 미약하다고 보고하였다. 본 실험에서는 이소플라본의 첨가가 혈장 중성지방 저하 효과가 있었으며 혈장 콜레스테롤 수준도 다소 영향을 미치는 것을 확인하였다.

혈장의 MCP-1 수준 및 지질과산화 정도

MCP-1은 cytokine으로 혈액 중의 monocyte 유입을 도와 콜레스테롤을 축적하는 대식세포로 전환시키고 염증을 유발하는 물질로 혈중의 MCP-1의 수준은 내피세포의 염증 및 초기 동맥경화 발생과 관련이 깊은 물질이다. 이소플라본

의 섭취가 8주간의 MCP-1 생성 변화에 미치는 영향은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 대조군의 MCP-1 생성은 식이섭취 4주와 8주째에 큰 변화를 보이지 않았으나 이소플라본을 제공한 군에서는 감소하는 경향을 보였다. 즉 4주 후 혈장의 MCP-1 생성은 대조군에 비해 이소플라본 10 mg을 첨가한 IF-10과 40 mg을 첨가한 IF-40에서는 변화가 없었으나, 이소플라본 100 mg을 첨가한 IF-100은 유의적으로 낮은 수준을 보였다. 8주 후의 MCP-1의 생성은 이소플라본을 첨가하지 않은 대조군에 비해 이소플라본을 첨가한 군에서는 현저하게 저하되었으며(p<0.05) 이소플라본의 첨가량이 높을수록 MCP-1의 생성량이 현저하게 감소되는 농도의존적인 효

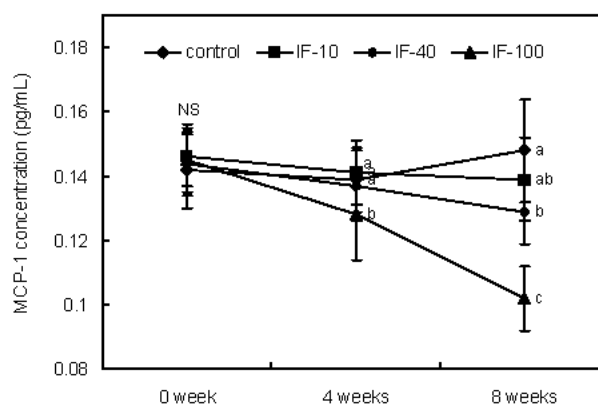


Fig. 1. Effect of isoflavone supplementation on plasma MCP-1 levels in rats fed atherogenic diets.

Groups are the same as in Table 1.

Values within the same column with different superscripts differ significantly (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Bar represent standard deviation of mean value.

과를 보였다.

이소플라본의 섭취에 따른 혈장의 지질과산화 정도는 Fig. 2에서 보는 바와 같으며 각각 다른 농도의 이소플라본을 섭취한 8주 후 혈장의 TBARS 생성 정도는 이소플라본의 첨가량이 높을수록 유의적($p < 0.05$)으로 저하되는 것으로 나타나 이소플라본의 섭취가 혈장에서의 지질과산화물의 생성을 억제하는 것으로 보인다. 자유 반응기에 의해 개시되는 지질과산화는 여러 항산화 물질들에 의해 지질과산화가 억제될 수 있는 것으로 알려져 있으며(39) Ruiz-Larrea 등(9)은 이소플라본이 항산화 활성을 가진다고 보고하였다. 이소플라본은 지질과산화의 효과적인 저해제이며(9) 이소플라본의 이러한 작용은 자유 반응기 때문이라고 Kameoka 등(40)은 보고하였다. 본 연구는 고지혈증 모델 토끼에게 이소플라본을 식이무게의 0.33%와 1%의 공급하자 대동맥궁에서 지질과산화산물인 malondialdehyde의 함량이 유의적으로 낮아졌다는 Yamakoshi 등(41)의 연구와 유사한 결과를 보였다. 본 연구에서는 동맥경화식을 섭취한 동물의 고지혈 상태에서 이소플라본이 혈장의 지질과산화를 억제하여 산화적 스트레스로부터 동물을 보호하는 것으로 생각된다.

따라서 이소플라본의 섭취가 동맥경화 식이에서 염증 유발 물질인 MCP-1과 지질과산화물의 생성을 저하시켜 항염

증 및 항동맥경화에 효과가 있는 것으로 사료된다.

간의 지질 농도

이소플라본을 첨가한 식이를 섭취한 실험군에서 체중 g 당 간의 무게가 낮았으며(Table 4), 특히 이소플라본의 첨가량이 많을수록 현저하게 낮아 이소플라본 100 mg을 첨가한 IF-100에서 가장 낮은 수준을 보였다. 간의 지질 농도에 미치는 이소플라본의 영향은 Table 4에서 보는 바와 같다. 간의 TG와 콜레스테롤 농도는 이소플라본의 첨가량이 IF-100에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 이소플라본 IF-10과 IF-40을 처리한 군에서는 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$). Jeong 등(42)은 이소플라본 섭취가 흰쥐의 지방대사에 미치는 연구에서 간의 TG와 콜레스테롤량이 이소플라본 섭취에 따라 농도의존적으로 유의하게 감소하였다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과였다. 따라서 본 연구의 결과에서는 이소플라본의 첨가량이 높을수록 간 조직에 지방 축적을 저해하여 지질 농도를 낮추고 따라서 간의 무게에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

간의 항산화 효소계 활성

항산화 영양소인 glutathione 함량은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군과 이소플라본 10 mg을 첨가한 IF-10과 40

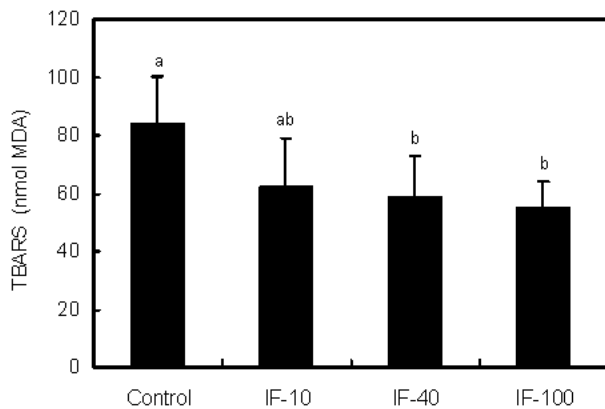


Fig. 2. Effect of isoflavone supplementation on plasma TBARS levels in rats fed atherogenic diets.

Groups are the same as in Table 1. Values within the same with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Bar represent standard deviation of mean value.

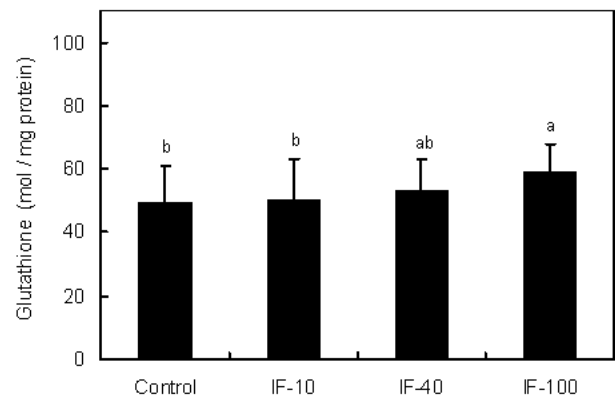


Fig. 3. Effect of isoflavone supplementation on hepatic glutathione levels in rats fed atherogenic diets.

Groups are the same as in Table 1. Values within the same with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Bar represent standard deviation of mean value.

Table 4. Effect of isoflavone supplementation on liver weight, TG and cholesterol levels in rats fed atherogenic diets

	Group ¹⁾			
	Control	IF 10	IF 40	IF 100
Liver weight (g/g BW)	0.10 ± 0.00 ^{2)a3)}	0.09 ± 0.00 ^a	0.08 ± 0.00 ^b	0.08 ± 0.01 ^b
TG (mg/g liver)	79.2 ± 7.8 ^a	73.2 ± 6.9 ^{ab}	69.6 ± 6.0 ^{ab}	60.3 ± 6.6 ^b
Cholesterol (mg/g liver)	4.9 ± 0.7 ^a	4.4 ± 0.5 ^a	4.1 ± 0.3 ^{ab}	2.9 ± 0.4 ^b

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Mean ± SD (n=10).

³⁾Values within the same row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Bar represent standard deviation of mean value.

Table 5. Effect of isoflavone supplementation on anti-oxidative enzyme activity of liver in rats fed atherogenic diets

	Group ¹⁾			
	Control	IF 10	IF 40	IF 100
GSH reductase (unit/mg protein)	343±72 ^{2)bc3)}	377±71 ^b	383±80 ^{ab}	616±165 ^a
GSH peroxidase (unit/mg protein)	5.9±0.5 ^b	6.1±0.6 ^b	6.3±1.1 ^b	8.3±0.9 ^a
Catalase (mmol/mg protein)	10.7±2.5 ^b	12.3±1.2 ^{ab}	13.4±1.6 ^a	14.6±1.5 ^a
Cu,Zn SOD (unit/mg protein)	42.1±5.1 ^a	42.9±4.7 ^a	40.5±4.4 ^{ab}	36.4±6.0 ^b
Mn SOD (unit/mg protein)	69.7±4.7 ^b	78.0±5.4 ^{ab}	75.8±4.7 ^{ab}	84.2±6.1 ^a

¹⁾Refer to Table 1.²⁾Mean±SD (n=10)³⁾Values within the same row with different superscripts differ significantly (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

mg을 첨가한 IF-40이 유사한 농도를 보였으나 이소플라본을 100 mg 첨가한 IF-100에서는 유의적으로(p<0.05) 높은 수준을 보였다. 동물조직 중 비단백성 티올의 대부분을 차지하는 GSH는 유리기 제거제 역할과 H₂O₂(이하 과산화수소) 및 과산화지질을 대사시키는 GSH-px의 기질로서 세포내 항산화제 중 중요한 역할을 담당한다(43). 따라서 본 연구의 결과를 볼 때 혈장에서의 TBARS의 농도 감소와 간조직의 GSH 함량 증가는 이소플라본의 항산화 기능이 향상됨을 보여주는 것으로 사료된다.

Table 5에서 보듯이 GSH-reductase와 GSH-px 활성은 대조군에 비해 IF-10과 IF-40에서는 유사한 수준을 보였으나 이소플라본 100 mg을 첨가한 IF-100에서는 현저하게 높은 활성을 보였으며 이소플라본의 함량이 높을수록 증가하는 것으로 나타났다(p<0.05). GSH-px는 셀레늄 의존성 항산화효소로 지질과산화와 과산화수소의 무독화과정을 촉매하며 식이지방산 조성보다 총 식이지방 섭취량에 더 영향을 받는다고 보고되고 있다(44). 본 실험에서 GSH-px의 활성이 증가된 것은 콜레스테롤 투여로 생성된 산소유리기를 제거하려는 이소플라본의 항산화작용으로 GSH 함량의 증가와 관련이 있는 것으로 사료된다. Catalase 활성은 대조군에 비해 이소플라본 40 mg과 100 mg을 첨가한 IF-40과 IF-100에서 유의적으로 높은 수준을 보였다(p<0.05). Catalase는 조직 내에서 SOD 등의 효소적 반응에 의해 생성된 과산화수소를 제거하여 생체를 방어하는 기능을 나타낸다(45). 또한 대사과정 중 발생하는 활성 산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라 이들 활성 산소종에 의해 비가역적으로 불활성화 될 수도 있으며 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 알려져 있다(46). 본 연구의 결과에서 이소플라본을 첨가한 식이를 제공받은 실험군의 catalase의 증가는 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생긴 과산화수소를 분해하기 위하여 활성이 증가(47)된 것으로 생각되며 따라서 이소플라본은 항산화 효소계의 활성에 영향을 미쳐 간 조직에서의 활성 산소종에 의한 손상을 감소시키는데 기여를 하는 것으로 보인다. 산소를 이용하는 생물체에는 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 생체는 superoxide에 의한 손상으로부터 보호되고 있다. Cu,Zn-SOD는 대조군에 비해 이소플라본을 첨가한 군에서 다소 감소하는 경향을 보였

며, IF-10과 IF-40에서는 대조군과 유사한 수준을 보였으나 이소플라본 100 mg을 첨가한 IF-100에서 유의적으로(p<0.05) 감소하는 경향인 반면 Mn-SOD는 대조군에 비해 이소플라본을 첨가한 군에서 높은 수준이었으며, 이소플라본 10 mg을 첨가한 IF-100에서는 대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 이소플라본의 섭취가 Mn-SOD에는 영향을 미쳐 superoxide로부터 조직을 보호하는 것으로 보인다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 이소플라본의 섭취는 혈장의 중성지방을 낮추고, 간 지질을 감소시키는 효과가 있을 뿐 아니라 초기 동맥경화 발생과 밀접한 관계가 있는 MCP-1의 생성을 현저하게 저하하고, glutathione 및 항산화 효소계 활성을 증진시켜 생체 내 산화적 스트레스를 억제하는 효과가 있으므로 이러한 이소플라본의 장기간 섭취는 항염증, 항산화 및 지질강하 효과를 통한 동맥경화 발생을 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

5주령의 C57BL/6 mice중 암컷 40수를 2주간의 적응기를 거쳐, 평균 체중 17.9±0.9 g인 실험동물을 완전임의배치로 한 군당 10수씩 4군으로 나누어 실험식은 동맥경화식이(control)에 이소플라본을 첨가한 실험식을 각각 8주간 급여하면서 사육하였다. 이소플라본의 첨가량은 식이 100 g 당 10 mg(IF-10)과 40 mg(IF-40) 및 100 mg(IF-100)이 되도록 조정하여 제조하였다. 이소플라본의 섭취는 체중증가량에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며 식이효율은 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이소플라본 섭취에 의한 혈장 TG 농도는 대조군에 비해 이소플라본을 첨가한 식이를 섭취한 군에서 감소하는 추세를 보였다. 총 콜레스테롤 수준은 모든 실험군에서 증가하는 경향을 보였으나 8주 후의 농도 변화는 대조군에 비해 이소플라본을 첨가한 식이를 섭취한 군에서 감소하는 추세를 보였다. 세포부착물질인 MCP-1과 지질과산화물인 TBARS의 생성량은 이소플라본의 첨가량이 높을수록 현저하게 감소되는 결과를 보여 농도 의존적인 효과를 보였다. 간의 TG와 총 콜레스테롤 농도는 이소플라본의 첨가량이 높을수록 감소하는 것으로 나타났으며(p<0.05), 간의 항산화 영양소인 glutathione 함량은 이

소플라본을 100 mg 제공한 IF-100에서 유의적으로($p < 0.05$) 높은 수준을 보였다. 간의 항산화 효소계 활성은 대조군에 비해 이소플라본을 첨가한 식이를 섭취한 군에서 대체로 높게 나타났으며 특히 이소플라본 100 mg을 첨가한 식이를 섭취한 IF-100에서 현저하게 높은 수준을 보였다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 이소플라본의 섭취가 혈장의 중성지방을 저하하고 항염증, 항산화효과를 보여 동맥경화예방에 효과가 있는 물질로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 우수여성과학자도약연구사업비(R04-2003-000-10035-0) 지원으로 이루어진 결과이며 이에 감사드립니다.

문헌

- Maskarinec G, Singh S, Meng L, Franke AA. 1998. Dietary soy intake and urinary isoflavone excretion among women from a multiethnic population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 613-619.
- Schwandt P. 2003. The importance of reaching lipid targets: statins and the prevention of atherosclerosis. *Int J Clin Pract* 57: 396-404.
- Anthony MS, Clarkson TB, Willims JK. 1998. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 68: 1390-1393.
- Anthony MS, Clarkson TB, Hughes Jr CL. 1996. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 126: 43-50.
- Park HS. 2000. Pharmacological treatment of hypertriglyceridemia. *J Korean Acad Fam Med* 21: 1331-1339.
- Lee YM, Jung MH, Lee YS, Song JH. 2005. Effect of genistein and soy protein on lipid metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 38: 267-278.
- Lee YS, Jang SY, Kim KO. 2005. Effect of soy isoflavone intake on nitrite content and antioxidant enzyme activities in male rats fed high fat diet. *Korean J Nutr* 38: 89-95.
- Bibbigham SA, Atkinson C, Liggins J. 1998. Phytoestrogen: where are we now? *British J Nutr* 79: 393-406.
- Ruiz Larrea MB, Mohan AR, Paganga G. 1997. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res* 26: 63-70.
- Wei HC, Wei LH, Frenkel K. 1993. Inhibition of tumor promoter induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr Cancer* 20: 1-12.
- Sekizaki H, Yokosawa R, Chinen C, Adachi H, Yamane Y. 1993. Synthesis of isoflavones and their attracting activity to *Aphanomyces euteiches* zoospore. *Biol Pharm Bull* 16: 698-701.
- Kapotiis S, Hermann M, Held I. 1997. Genistein, the dietary derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2868-2874.
- Kirk EA, Sutherland P, Wang SA. 1998. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor deficient mice. *J Nutr* 128: 954-959.
- Picard F, Deshaies Y, Lalonde J. 2000. Effects of the estrogen antagonist EM 652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 830-840.
- Roberts CK, Chen AK, Barnard RJ. Effect of a short term diet and exercise intervention in youth on atherosclerotic risk factors. *Atherosclerosis* 2006 Oct 18 [Epub ahead of print]
- Ito T, Ikeda U. 2003. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2: 257-265.
- Bratus VV, Talaieva TV, Radalovska NV. 1999. The role of a systemic inflammatory process in the atherogenic modification of lipoproteins and the development of hypercholesterolemia. *Fiziol Zh* 45: 40-49.
- Kanters E, Pasparakis M, Gijbels M. 2003. Inhibition of NF- κ B activation in macrophages increase atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *J Clin Invest* 112: 1176-1185.
- Kunsch C, Luchoomun J, Grey JY. 2004. Selective inhibition of endothelial and monocyte redox sensitive genes by AGI 1067: a novel, antioxidant and anti-inflammatory agent. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 820-829.
- Lee YS, Cheu X, Anderson J. 2001. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast like cells. *Nutr Res* 21: 1287-1298.
- Rodrdanz E, Ohler S, Tran Thi QH, Kahl R. 2002. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. *J Nutr* 132: 370-375.
- Jang HR. 2002. The effects of soy isoflavone on the factors relating to vascular disease in ovariectomized and hyperlipidemic rats. *MS Thesis*. Seoul National University, Seoul.
- Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland JR, Sanders T. 2000. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2 isoprostane concentrations and increase resistance of low density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 72: 395-400.
- Jenkins DJ, Kendall CW, Jackson CJ, Connelly PW, Parker T, Faulkner D, Vidgen E, Cunnane SC, Leiter LA, Josse RG. 2002. Effects of high and low isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr* 76: 365-372.
- Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Lusic AJ. 1993. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 91: 2572-2579.
- Friedewald WT. 1972. Estimation of the concentration of LDL cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
- Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*. Fleischer S, Packer L, eds. Academic press, New York, USA. Vol 52, p 302-306.
- Folch I, Lees M, Sranley GHS. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biochem* 223: 497-509.
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in antioxidant of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 150: 121-126.
- Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 29: 502-506.

- thione: applications to mammalian blood and other tissue. *Anal Biochem* 27: 502-522.
32. Lawrence RA, Burk F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* 71: 952.
 33. Inger C, Bengt M. 1985. Glutathione reductase. In *Methods in Enzymology*. Fleischer S, Packer L, eds. Academic press, New York, USA. Vol 113, p 484-490.
 34. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Ann Biochem* 72: 248-254.
 35. Zhuo XG, Melby MK, Watanabe S. 2004. Soy isoflavone intake lowers serum LDL cholesterol: a meta analysis of 8 randomized controlled trials in humans. *J Nutr* 134: 2395-2400.
 36. Yeung J, Yu TF. 2003. Effects of isoflavone (soy phytoestrogen) on serum lipid: a meta analysis of randomized controlled trials. *Nutr J* 2: 15-22.
 37. Weggemans RM, Trautwein EA. 2003. Relation between soy associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: a meta analysis. *Eur J Clin Nutr* 57: 940-946.
 38. Peluso MR, Winters TA, Shanahan MF, Banz WJ. 2000. A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone enriched fraction lowers hepatic lipids in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague Dawley rats. *J Nutr* 130: 2333-2342.
 39. Briviba K, Sies H. 1994. *Natural antioxidants in human health and disease*. Frei B, ed. Academic press, San Diego, CA, USA. p 107-128.
 40. Kameoka S, Leavitt P, Chang C. 1999. Expression of anti-oxidant properties in human intestinal Caco 2 cells treated with dietary isoflavonoids. *Cancer Letters* 146: 161-167.
 41. Yamakoshi J, Piskula MK, Izumi T, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Obata A, Kikuchi M. 2000. Isoflavone aglycon rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol fed rabbits. *J Nutr* 130: 1887-1893.
 42. Jeong MJ, Bang MH, Seol SM, Kim WK. 2002. The effects of isoflavone on lipid metabolism and immune responses in SD rats. *Korean J Nutr* 35: 635-642.
 43. Cho SY, Oh YJ, Park JY, Lee MK, Kim MJ. 2003. Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 458-463.
 44. Connye K, Barbara CP. 1991. Changes in colonic anti-oxidant status in rats during long term feeding of different high fat diet. *J Nutr* 121: 1562-1569.
 45. Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. 1996. Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver and liver morphology in rats fed high diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 374-378.
 46. Frintche K, Johnston PV. 1988. Rapid autooxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J Nutr* 118: 425-426.
 47. Geeta S, Ravindra N, Kiran DG. 1991. Effect of ethanol on Cd induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochem Pharmacol* 42: S9-S16.

(2006년 12월 28일 접수; 2007년 2월 1일 채택)