

아보카도 추출물의 Apoptosis 유도과 항산화 활성

이성규¹ · 유미희^{1,2} · 이삼빈^{1,2} · 이인선^{1,2*}

¹계명대학교 식품가공학 전공

²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR) 센터

Antioxidant Activities and Induction of Apoptosis by Methanol Extracts from Avocado

Sung Gyu Lee¹, Mi Hee Yu^{1,2}, Sam Pin Lee^{1,2}, and In-Seon Lee^{1,2*}

¹Dept. of Food Science and Technology, and

²The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

The avocado is a widely grown and consumed fruit that is high in nutrients and low in calories, sodium, and fats. In this study, antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from sarcocarp, seed and peel of avocado were investigated *in vitro*. Contents of total polyphenols in methanol extracts from sarcocarp, seed and peel were 13.89, 137.12 and 223.45 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectively. Radical-scavenging activities of the methanol extracts were examined by using α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radicals and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay. The methanol extracts from the peel of avocado showed higher scavenging activities against DPPH, ABTS than those from sarcocarp and seed. Apoptosis in MDA-MB-231 cells mediated by the methanol extracts of avocado was associated with the increase of activation of caspase-3 and caspase-3 target protein, PARP. Therefore, with more researches on identification and action mechanism of active compounds, the methanol extracts from peel and seed of avocado is expected to be a natural source for the developments of functional food and medical agents to prevent human breast cancer.

Key words: avocado, peel, seed, antioxidant, apoptosis

서 론

암과 심장병을 포함하는 만성적인 질환들은 세포에 산화적 손상을 수반하는 것으로 알려져 있다. DNA에 손상을 유발할 수 있는 프리라디칼은 발암, 심장병 그리고 노화에 관계된 많은 건강상의 문제를 유발하고 있다(1-3). 이러한 프리라디칼은 자외선, 전리방사선, 화학반응 그리고 신진대사 과정에서 생성된다(4). 프리라디칼에는 superoxide radical anion(O_2^-), hydroxyl radicals(OH^\cdot), singlet oxygen($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2)가 있고, 이들 가운데 hydroxyl radicals(OH^\cdot)의 손상 반응이 가장 강하게 작용하는 것으로 알려져 있다(5). 생체에서는 이러한 프리라디칼에 방어하는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), catalase(CAT), methionine reductase, ascorbate peroxidase, glutathione-S-transferase 등의 항산화효소를 가지고 있어 산소 상해에 대한 방어기능을 하고 있지만(6), 과도한 스트레스에 노출되어 있는 현대인의 복잡한 생활 속에서 더욱 효과적이고 안전한 식이성 항산화제의 필요가 절실해지고 있다. 따라서 활성산소를 방어하는 항산화 물질이 이러

한 질병 치료의 가능성 때문에 주목받고 있으며, 그 중 천연물에서 추출한 자연 항산화제에 관한 연구가 활발하다. 식물체도 자외선에 의한 산화나 자동산화로부터 자신을 보호하기 위하여 polyphenol류의 항산화 물질을 세포내에 함유하고 있다. 특히 각종 과채류에 다량으로 존재하는 천연물질 flavonoid류와 산성 페놀화합물들이 항산화성, 항알러지성, 항암성 등 다양한 생리활성 기능을 갖고 있는 것으로 밝혀져 이에 대한 검색이 활발히 진행되고 있다(7-9).

이러한 활성산소를 비롯하여 스트레스, 공해, 화학약품 등 여러 환경적 요인들에 의해 발생되고 있는 암은 전 세계적으로 인간의 생명과 복지를 위협하는 가장 중요한 요인으로 지목되고 있다. 특히 고도로 산업화가 이루어진 많은 국가에서는 각종 암이 사망 원인의 수위를 차지하고 있으며 이를 제어하기 위한 꾸준한 연구와 투자에도 불구하고 아직도 암 치료율은 약 40% 정도에 불과하다. 2005년에 보고된 보건복지부의 암 발생 통계 발표(10)에 따르면 유방암은 우리나라 전체 여성에서 위암에 이어 2위를 차지하고, 35~64세의 여성에서는 1위로 가장 높게 나타났다(11). 이러한 유방암은 초기에 발견되면 치료가 가능하지만 암세포가 혈관이나 림

*Corresponding author. E-mail: inseon@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5538, Fax: 82-53-580-5538

프란을 통해 다른 부위나 장기로 확산되면, 성공적인 치료가 어렵다. 최근 암을 억제하는 기작으로 apoptosis에 관한 연구가 많이 보고되어 있는데, apoptosis는 세포 내부에 프로그램화된 신호를 따라 여러 유전자의 발현 및 단백질들의 활성이 조절되어 일어나는 능동적인 세포사이며, 그 과정을 통해 생성된 apoptotic body들은 주변의 세포들이나 대식세포 등의 식세포 작용에 의해 제거됨으로써 염증을 유발하지 않는다(12,13).

한편 아보카도(*Persea americana* Mill.)는 식물학적으로 Lauraceae과에 속하는 과수로서, 멕시코와 중앙 아메리카일대에서 유래되었다고 알려져 있다. 아보카도의 품종은 약 50여개로 알려져 있으며, 모두가 *Persea americana* Mill. Syn. *P. gratissima* Gaertn에 속한다(14-16).

아보카도는 유질(油質)의 과일이며(17), 이 중 식용되는 부분의 지질함량이 25%정도이며(18), 아보카도의 지질 중 가장 우수한 지방산은 단일불포화지방산이다(19). 이와 같은 단일불포화지방산은 혈청지질을 포함한 심혈관 질환에 이익을 주기 위해 연구되고 있다(20-22). 아보카도는 단일불포화지방산을 많이 함유하고 있으며, carotenoids(23), Vit. B, Vit. C, Vit. E(24), terpenoids(25), D-manno-heptulose(26), β -sitosterol(27), persenone A, persenone B(28), phenol(29) 등의 생물체에 작용하는 화학물질이 들어있는데, 아보카도 과일 그리고 추출물 혹은 각각의 성분 안에 이러한 화학 물질들은 항산화(30), acetyl CoA carboxylase 저해(31), 항균활성(32)을 가지고 있다. 또한 아보카도는 저칼로리, 저염, 그리고 저지방을 제공하는 과일로서 현대인의 식생활에 건강 식이로 기대되고 있는 식품이다.

따라서 본 연구에서는 아보카도의 기능성 소재로서의 이용가능성을 알아보기 위해 아보카도의 과육, 씨, 껍질을 각각 분리한 후 추출물을 제조하여 이들 각각의 항산화 효과를 연구하였고, 인간유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포주를 사용하여 항암활성을 살펴보았다.

재료 및 방법

시료제조

본 실험에서 사용한 아보카도는 일반 대형마트에서 구매한 것으로 깨끗이 수세하여 과육과 씨, 껍질로 각각 분리한 후 분쇄기로 각각 분쇄하여 80% 메탄올로 3회 반복 추출하였고 추출액은 여과지(Whatman No.3, England)를 사용하여 여과하고 rotary vacuum evaporator(BUCHI Rotavapor R-205, Switzerland)로 감압농축한 후 동결 건조하여 apoptosis 유도 및 항산화 활성검정에 사용하였다. 이 때 각 추출물의 수율은 과육 4%, 씨 11%, 껍질 7.49%로 나타났다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(33)을 응용하였다. 각

메탄올 추출물 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석한 Folin 시약 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 10% Na_2CO_3 2 mL을 넣고 1시간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron, Italy)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이 때 tannic acid를 이용한 표준곡선은 tannic acid의 최종농도가 5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

총 플라보노이드 함량

시료중의 총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(34)의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 시료 추출물 0.1 mL와 80% ethanol 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate 0.1 mL 그리고 80% ethanol 4.3 mL을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 total flavonoid 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

α - α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) radical소거활성

시료의 free radical 소거활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정된 것으로 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800 μL 와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 200 μL 를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 BHA와 ascorbic acid를 사용하였다.

ABTS radical 소거활성

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+ \cdot cation decolorization assay방법(35)에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Chemical Co., USA)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+ \cdot 을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 $0.70(\pm 0.02)$ 이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 990 μL 에 sample 10 μL 를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였으며 모든 실험은 3회 반복 측정하였다.

세포주 배양

이 실험에 사용된 MDA-MB-231 cell은 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다. MDA-MB-231 cell은 RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640과 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic가 첨가된 배지에서 37°C의 5% CO_2 배양기에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

Apoptosis 유도 효과

MDA-MB-231 세포주를 6-well plate에 1×10^6 cells/5 mL로 분주하고 아보카도 추출물을 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 $120 \times g$ 에서 1분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 다음 그 침전물에 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.16 μ M PMSF) 50 μ L를 첨가하여 ice 상에서 lysis 시켰다. 4°C에서 $16,609 \times g$ 로 10분간 원심 분리하여 그 상등액으로 BCA kit를 사용하여 단백질을 정량하여 western blotting법을 이용하여 apoptosis 유도 효과를 관찰하였다.

DNA fragmentation assay

아보카도 추출물에 의해 apoptotic DNA fragmentation이 일어나는지 알아보기 위해 Herrmann 등(36)의 방법에 따라 MDA-MB-231 세포주를 6-well plate에 1×10^6 cells/5 mL로 분주하고 아보카도 추출물을 처리한 후 24시간 배양하였다. 그리고 세포를 수확한 다음 차가운 PBS를 넣고 원심 분리하여 배지를 제거한 후 침전된 세포를 25 mM EDTA, 0.5% SDS가 첨가된 100 mM Tris-HCl(pH 8.0)를 이용하여 resuspension 한 후 65°C에서 5분 동안 방치시켰다. Phenol/chloroform(1:1)과 chloroform/isoamyl alcohol(1:2:4)을 이용하여 DNA를 추출하였고, 이에 95% ethanol을 첨가하고 원심 분리하여 DNA를 침전시키고 상층액을 제거한 후 RNase를 첨가하여 10분 동안 반응시킨 후 RNA를 완전히 가수분해시키고 2% agarose gel에 DNA를 전기 영동하여 DNA ladder를 확인하였다.

결과 및 고찰

폴리페놀 및 플라보노이드 함량

아보카도의 과육과 씨 및 껍질의 메탄올 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 tannic acid, quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다(Table 1). 그 결과, 아보카도 과육 추출물의 총 폴리페놀 함량은 13.89 μ g/mg, 씨 추출물은 137.2 μ g/mg, 껍질 추출물은 223.45 μ g/mg으로 나타나, 아보카도 과육에 비해 씨와 껍질에서 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 총 플라보노이드 함량은 아보카도 과육과

Table 1. Contents of total polyphenols and flavonoids in methanol extracts from sarcocarp, seed and peel of avocado

Plant	Part used	Total polyphenols ¹⁾ (μ g/mg)	Total flavonoids ²⁾ (μ g/mg)
Avocado	Sarcocarp	13.89 \pm 4.98 ³⁾	4.03 \pm 1.80
	Seed	137.2 \pm 9.72	5.69 \pm 1.20
	Peel	223.45 \pm 19.20	13.60 \pm 0.37

¹⁾Micrograms of total polyphenol content/mg of plants based on tannic acid as standard.

²⁾Micrograms of total flavonoid content/mg of plants based on quercetin as standard.

³⁾Each value is mean \pm SD (n \geq 3).

씨, 껍질 추출물에서 각각 4.03, 5.69, 13.6 μ g/mg으로 아보카도 껍질 추출물에서 가장 높은 함량을 보였다. 그러나 플라보노이드 함량은 폴리페놀 함량에 비해 매우 낮은 함량이었다.

국내산 식품 중 대추의 폴리페놀 함량을 살펴보면 대추과육 추출물은 98.83 μ g/mg, 대추씨 추출물은 138.99 μ g/mg으로 대추과육보다는 대추씨에서 비교적 많은 폴리페놀 함량을 보였고(37), 홍화씨, 순 및 꽃이 각각 12.34, 5.10, 8.05%를 함유하여 씨에서 높은 폴리페놀 함량을 보여(38) 아보카도와 유사한 경향이였다. 대추나 홍화와 같이 아보카도 추출물 또한 과육, 씨, 껍질 추출물 중에서 씨와 껍질 추출물이 과육에 비해 상당히 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 폴리페놀 화합물이나 플라보노이드류는 여러 가지 식품에 분포되어 있으며 천연항산화제로 작용한다는 보고가 많이 알려져 있다(39,40). 특히 플라보노이드류는 암세포의 DNA, RNA, protein의 합성을 억제 또는 cAMP의 농도를 증가시킴으로써 종양세포의 분열을 억제하거나 apoptosis를 유도하는 등의 다각적 기전을 통해 항암효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다(41,42).

DPPH free radical 소거활성

시료의 free radical 소거활성 측정은 stable radical인 DPPH를 소거하는 항산화물질 활성을 측정하는 것으로 DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화물질을 검색하는데 이용되고 있다.

아보카도 과육과 씨 및 껍질의 메탄올 추출물과 인공·천연 항산화제로 알려진 BHA, ascorbic acid의 DPPH 소거활성을 농도별로 측정된 결과는 Table 2와 같다. 10 μ g/mL의 농도에서 아보카도 씨가 70%, 5 μ g/mL에서 껍질이 60% 정도의 소거능을 보였고, BHA와 ascorbic acid(10 μ g/mL)에서 96% 정도의 항산화능을 보였다. 그리고 아보카도 씨와 껍질 추출물의 RC₅₀ 값이 각각 7.78, 3.83 μ g/mL로 나타나 합성 항산화제인 BHA의 RC₅₀ 값(3.11 μ g/mL)과 유사한 값을 보였다. 특히 아보카도 껍질 추출물의 RC₅₀ 값은 단일물질인 BHA와 ascorbic acid의 RC₅₀ 값과 거의 일치하므로 이를 분리·정제하여 유용 물질을 찾아낸다면 더욱 우수한 항산화능을 보일 것으로 생각된다. Yang 등(43)은 단삼 메탄올 추출물의 RC₅₀ 값을 18.71 μ g/mL로, Jung 등(44)은 오미자 종자의 메탄올 추출물의 RC₅₀ 값을 33.2 μ g/mL로 보고하였다. 이들의 결과와 비교하여 보았을 때 아보카도 씨와 껍질 추출물의 DPPH 소거활성능이 비교적 높은 것으로 확인되었다.

ABTS free radical 소거활성

ABTS+[•] 소거활성은 2-azino-bis의 색을 띠는 양이온 라디칼의 감소에 근거하여 항산화력을 검사하고자하는 시료와 표준물질인 trolox의 값과 비교하여 항산화능을 측정하는 방법으로 추출물의 항산화력에 의해 ABTS+[•]이 소거되어

Table 2. Scavenging effects of butylated hydroxyanisole (BHA), ascorbic acid and methanol extracts from sarcocarp, seed and peel of avocado on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radicals (DPPH \cdot)

Plant	Part used	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Scavenging effect (%)	RC ₅₀ ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)
Avocado	Sarcocarp	100	21.39 \pm 1.58 ²⁾	179.92 \pm 14.73
		200	58.62 \pm 3.60	
	Seed	5	30.42 \pm 5.04	7.78 \pm 0.81
		10	70.10 \pm 8.07	
Peel	1	15.04 \pm 1.42	3.83 \pm 0.76	
	5	60.42 \pm 0.12		
BHA		1	25.45 \pm 8.21	3.11 \pm 1.15
		10	96.34 \pm 0.29	
Ascorbic acid		1	14.27 \pm 1.26	2.09 \pm 1.03
		10	96.52 \pm 1.3	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH \cdot at 30 min after starting the reaction.

²⁾Each value is mean \pm SD (n \geq 3).

청록색으로 탈색된 free radical의 제거 정도를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS \cdot^+ 의 소거활성능을 측정할 수 있고 탈색 반응이 1분 안에 종료되어 단시간에 측정 가능하다.

본 실험에서는 아보카도 과육과 씨 및 껍질의 메탄올 추출물과 trolox, BHA, ascorbic acid의 ABTS \cdot^+ 소거활성능을 비교 측정하였다(Table 3). ABTS \cdot^+ 소거활성능에서 표준물질로 사용되는 trolox는 15 μM 에서 63% 정도의 소거활성능을 보였고, BHA와 ascorbic acid는 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 99% 이상의 우수한 소거활성능을 보였다. 아보카도 추출물에서는 씨가 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 67%, 껍질이 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 60%의 ABTS \cdot^+ 의 소거활성능을 보였다. 이는 DPPH 라디칼의 소거활성에 비해 그 활성능은 떨어지지만, DPPH 라디칼의 소거활성과 마찬가지로 껍질에서 더 우수하게 나타났다.

아보카도 추출물이 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향

세포들은 외부의 여러 자극들의 변화에 의해 민감하게 반응하며, 자극의 종류나 강도에 따라 필요시 매우 정밀한 세

Table 3. Scavenging effects of trolox and methanol extracts from sarcocarp, seed and peel of avocado on 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radicals (ABTS \cdot^+)

Plant	Part used	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Scavenging effect (%)
Trolox		15 μM	63.24 \pm 0.94 ¹⁾
Avocado	Sarcocarp	200	38.44 \pm 2.27
		300	51.30 \pm 3.26
	Seed	10	36.98 \pm 2.51
		20	67.76 \pm 5.18
	Peel	1	6.68 \pm 0.79
		10	60.41 \pm 2.64
BHA		1	19.04 \pm 3.10
		10	99.38 \pm 0.81
Ascorbic acid		1	25.57 \pm 0.27
		10	99.86 \pm 0.17

¹⁾Each value is mean \pm SD (n \geq 3).

포사멸 신호 전달 과정을 작동하게 된다. 수십 년간의 연구를 통하여 세포사멸 과정을 유도하거나, 조절할 수 있는 여러 세포 인자들이 밝혀졌다. 세포사멸 기전은 caspase라고 하는 단백질 분해효소에 의해 세포 내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는 과정으로 여러 종류의 caspase들이 세포사멸에 관여하며 caspase의 활성을 통해 세포사멸의 정도를 파악할 수 있다(45). 최종적으로 활성화된 caspase-3는 바로 PARP를 활성화시키기도 하고 caspase-7을 활성화시킨 후 활성화된 caspase-7이 PARP를 활성화시키기도 한다. 이렇게 활성화된 PARP는 DNA 분절화 현상과 핵의 응축을 유도하면서 세포사멸을 일으키는 것으로 보고되고 있다(46).

아보카도 과육, 씨, 껍질 추출물이 apoptosis를 유도하는지 관찰하기 위하여 western blot법을 시행하였다. 먼저 아보카도 과육 추출물을 처리한 결과 caspase 단백질에 아무런 영향을 미치지 않았으며(data not shown), 아보카도 씨 추출물을 처리한 실험군에서 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 caspase-3, -7의 단백질의 발현이 증가되는 것을 보였고, 아울러 세포사멸 기전의 최종 단계인 PARP 단백질의 발현을 관찰한 결과, caspase 결과와 유사하게 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 cleaved PARP가 증가되는 경향을 보였다(Fig. 1). 아보카도 껍질 추출물 처리군에서는 caspase-3 단백질의 발현이 나타났지만, caspase-7에는 아무런 영향을 미치지 않았으며, caspase-3가 직접적으로 PARP를 활성화시킨 것으로 보인다(Fig. 2).

DNA 분절화에 미치는 영향

Apoptosis의 유도에 따라 핵은 endogeneous nuclease의 활성에 의해 DNA 변성이 시작되어 응축이 일어나고 대부분의 세포에서 DNA가 변성되면 oligonucleosome 정도의 크기로 분절된 DNA를 볼 수 있는데 DNA는 세포사가 일어나기 전 180~200 bp 길이로 단편화된다고 한다. 이 DNA 단편의 역할은 아직 명확하게 규명되지는 않았지만 DNA 단편화가 apoptosis 현상 규명에 이용되고 있다(47).

아보카도 과육, 씨, 껍질 추출물에 의한 apoptosis를 확인

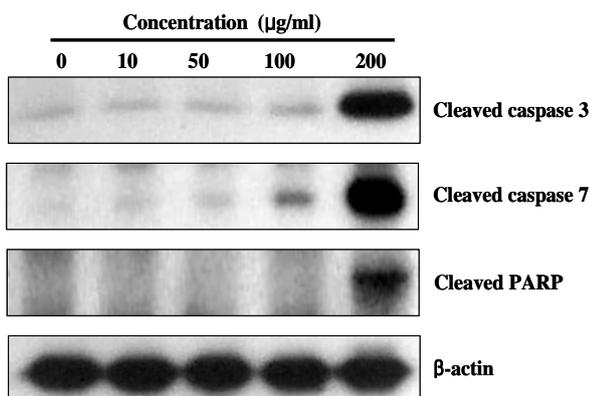


Fig. 1. Effect of methanol extracts from seed of avocado on protein levels of caspase-3 and -7 and PARP in MDA-MB-231 cell.

Cells were treated with methanol extracts from seed of avocado at different concentrations (0, 10, 50, 100, 200 µg/mL) for 24 h.

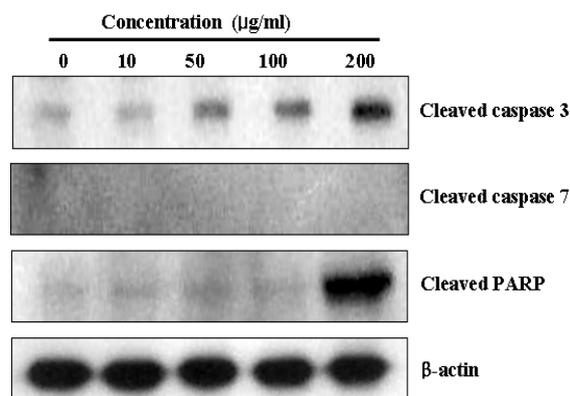


Fig. 2. Effect of methanol extracts from peel of avocado on protein levels of caspase-3 and -7 and PARP in MDA-MB-231 cell.

Cells were treated with methanol extracts from peel of avocado at different concentrations (0, 10, 50, 100, 200 µg/mL) for 24 h.

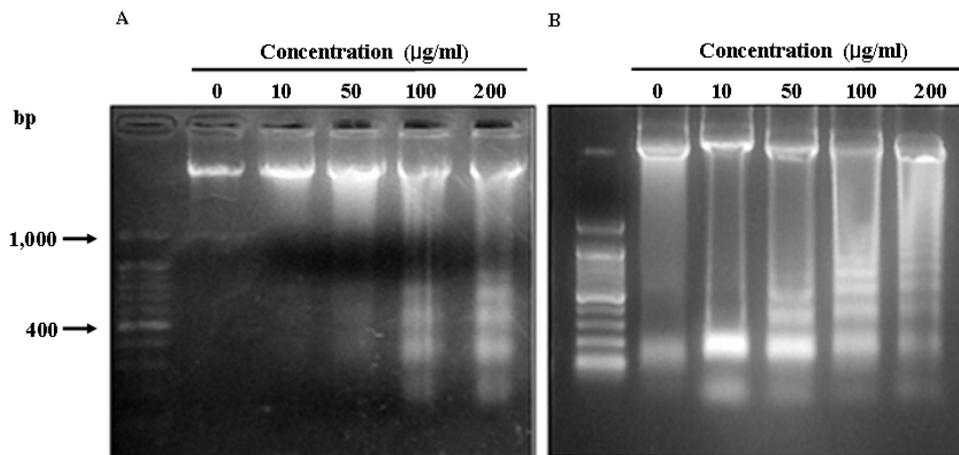


Fig. 3. Apoptotic DNA fragmentation of MDA-MB-231 cells treated with methanol extracts from seed and peel of avocado. Cells were treated with methanol extracts from seed and peel of avocado at different concentrations (0, 10, 50, 100, 200 µg/mL) for 24 h. A: methanol extracts from seed of avocado, B: methanol extracts from peel of avocado.

하기 위하여 씨와 껍질 추출물을 농도 별로 처리하고 DNA 분절 현상을 조사하였다. 그 결과 과육 추출물의 경우, DNA 분절화에 영향을 미치지 않았으며(data not shown), 씨 추출물 100, 200 µg/mL의 농도에서 DNA 분절 현상이 나타났고, 껍질 추출물에서는 10 µg/mL의 농도에서부터 농도의존적으로 DNA 분절 현상에 영향을 주는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 apoptosis 유도과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되며 Lee 등(48)은 머위로부터 U937 cell에서 apoptosis의 유도를 보고한 바 있다. 결과적으로 아보카도 씨와 껍질 추출물은 apoptosis를 유도하는 유전자인 caspase에 영향을 미치는 것으로 보이며, 순차적으로 DNA 분절을 활성화시켜 호르몬 비의존성 유방암 MDA-MB-231 세포주에 apoptosis의 유도에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 앞으로 이들 활성성분들의 규명과 동물실험을 통해 씨와 껍질에 대한 독성평가가 병행된다면 항암과 관련된 기능성 식품과 치료제

등의 개발에 있어 천연소재로서 아보카도 씨와 껍질의 유용성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 아보카도의 기능성 소재로서의 이용가능성을 알아보기 위해, 아보카도의 과육, 씨, 껍질을 각각 분리한 후 추출물을 제조하여 이들 각각의 항산화 효과를 연구하였고, 인간유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포주를 사용하여 항암활성을 살펴보았다. 아보카도 과육과 씨 및 껍질의 메탄올 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하고, 총 폴리페놀 함량은 아보카도 과육과 씨 및 껍질 추출물이 각각 13.89, 137.2, 223.45 µg/mg으로 아보카도 껍질 추출물에서 가장 높게 나타났고, 총 플라보노이드 함량에서도 각각 4.03, 5.69, 13.6 µg/mg으로 폴리페놀

함량보다는 다소 낮게 나타났지만 총 플라보노이드 함량 역시 껍질에서 가장 높게 나타났다. 각 시료의 DPPH 소거활성을 농도별로 측정한 결과, 아보카도 껍질 추출물이 5 µg/mL에서 60.4%로 껍질 추출물이 가장 우수한 항산화능을 보였다. 또한 ABTS ·⁺ 소거활성을 trolox, BHA, ascorbic acid와 비교하여 측정한 결과, 아보카도 껍질 추출물은 10 µg/mL에서 60.4%의 소거활성을 보였고, DPPH 소거활성과 동일하게 껍질 추출물에서 가장 우수한 소거활성능을 보였다. 아보카도 씨, 껍질 추출물이 apoptosis를 유도하는지를 관찰한 결과 씨, 껍질 추출물 모두 caspase-3, PARP 단백질들의 발현을 유도하였고, 이들은 모두 200 µg/mL의 농도에서 가장 높게 발현되는 것을 확인하였다. 또한 DNA 분절 현상을 관찰한 결과 씨 추출물에서는 100, 200 µg/mL 농도에서, 껍질 추출물에서 10, 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 DNA 분절화 현상이 일어난 것을 관찰하였다. 결과적으로 아보카도 씨와 껍질 추출물은 apoptosis를 유도하는 유전자인 caspase에 영향을 미치는 것으로 보이며, 순차적으로 DNA 분절을 활성화시켜 호르몬 비의존성 유방암 MDA-MB-231 세포주의 apoptosis의 유도에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 대학원 학생학술연구장학금 및 산업자원부 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

- Cadenas E, Davies KJA. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biol Med* 29: 222-230.
- Marnett L. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370.
- Uchida K. 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biol Med* 28: 1685-1696.
- Visioli F, Kearey JF, Halliwell B. 2000. Antioxidant and cardiovascular diseases: panaceas or tonics for tired sheep. *Cardiovasc Res* 47: 409.
- Liu F, Ng TB. 2000. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci* 66: 725-735.
- Aischer RG, Hess JL. 1993. *Antioxidants in higher plants*. CRC Press, Boca Raton, USA. p 1-17.
- Ames BN, Saul RL. 1987. Oxidative DNA damage, cancer and aging. Oxygen and human disease. *Ann Inter Med* 107: 536-539.
- Kim JH. 1998. Antioxidative activity and pharmac-constituents of *Houttuynia herba*. *MS Thesis*. Sookmyung Woman's University.
- Shin UY. 1998. Studies on biological activities of *Sparganium erectum*. *PhD Dissertation*. Dongduk Woman's University.
- Ministry of Health & Welfare. 2005. *Cancer Incidence in Korea (1999~2001)*. Korea.
- Go BJ, Kim MH, Chang SH, Paik SI. 1998. A clinical review of breast cancer. *J Kor Surg Soc* 55: 959-972.
- Clarke PG, Clarke S. 1995. Historic apoptosis. *Nature* 378: 230.
- Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. 1991. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 138: 447-453.
- Brucher H. 1977. *Tropische Nutzpflanzen*. Springer, Berlin, Germany. p 348-351.
- Lahav E, Kadman A. 1980. *Avocado Fertilisation*. IPI-Bulletin No. 6, Bern.
- Rehm S, Espig G. 1984. *Die Kulturpflanzen der Tropen und Subtropen*. Ulmer, Stuttgart, Germany. p 159-182.
- Lewis CE, Morris R, O'Brien K. 1978. The oil content of avocado mesocarp. *J Sci Food Agric* 29: 943-949.
- Hierro MT, Tomas MC, Fernandez-Martin F, Santa-Maria G. 1992. Determination of the triglyceride composition of avocado oil by high-performance liquid chromatography using a light-scattering detector. *J Chromatogr* 607: 329-338.
- Swhisher HE. 1988. Avocado oil from food use to skin care. *J Am Oil Chem Soc* 65: 1704-1706.
- Alvizouri-Munoz M, Carracza-Madrigal J, Herrera-Abarca JE, Chavez-Carbajal F, Amezcua-Gastelum JL. 1992. Effects of avocado as a source of monounsaturated fatty acids on plasma lipid levels. *Arch Med Res* 23: 163-167.
- Carranza J, Alvarez M, Alvarado MR, Chavez F, Gomez M, Herrera JE. 1995. Effects of avocado on the level of blood lipids in patients with phenotype II and IV dyslipidemias. *Arch Inst Cardiol Mex* 65: 342-348.
- Colquhoun DM, Moores D, Somerset SM, Humphries JA. 1992. Comparison of the effects on lipoproteins and apolipoproteins of a diet high in monounsaturated fatty acids, enriched with avocado, and a high carbohydrate diet. *Am J Clin Nutr* 56: 671-677.
- Lassen D, Bacon K, Sutherland J. 1994. Chromatographic investigation of the carotenoid pigments of the avocado. *Food Res* 9: 427-433.
- Slater GG, Shankman S, Shepherd JS, Alfin-Slater RB. 1975. Seasonal variation in the composition of California avocados. *J Agric Food Chem* 23: 468-474.
- Moreno AO, Dorantes L, Galindez J, Guzman RI. 2003. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. *J Agric Food Chem* 51: 2216-2221.
- Shaw PE, Wilson III CW, Knight JR. 1980. High-performance liquid chromatographic analysis of D-manno-heptulose, perseitol, glucose, and fructose in avocado cultivars. *J Agric Food Chem* 28: 379-462.
- Duester KC. 2001. Avocado fruit is a rich source of beta-sitosterol. *J Am Diet Assoc* 101: 404-405.
- Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Takeda N, Yoshizumi H, Ohigashi H. 2001. Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. *J Agric Food Chem* 48: 1557-1563.
- Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. 2000. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 49: 5315-5321.
- Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. 1998. Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. *Cancer Lett* 125: 199-207.

31. Hashimura H, Ueda C, Kawabata J, Kasai T. 2001. Acetyl-CoA carboxylase inhibitors from avocado (*Persea americana* Mill.) fruits. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 1656-1658.
32. Prusky D, Kobiler I, Fishman Y, Sims JJ, Midland SL, Keen NT. 1991. Identification of an antifungal compound in unripe avocado fruits and its possible involvement in the quiescent infections of *Collectotrichum gloeosporioides*. *J Phytopathol* 132: 319-327.
33. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-249.
34. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
35. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
36. Herrmann M, Larenz HM, Grunke R, Voll M, Woith W, Kalden JR. 1994. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 22: 5506-5507.
37. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YG, Lee IS. 2006. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* rehder. *Korea J Food Sci Technol* 38: 128-134.
38. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. 2000. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1127-1132.
39. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem* 44: 37-41.
40. Bors W, Saran M. 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Rad Res Comm* 2: 289-294.
41. Suolinna EM, Buchsbaum RN, Racker E. 1975. The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Res* 35: 1865-1872.
42. Gerriten ME. 1995. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 147: 278-292.
43. Yang SA, Im NK, Lee IS. 2007. Effect of methanolic extract from *Salvia multiorrhiza* Bunge on in vitro antithrombotic and antioxidative activities. *Korea J Food Sci Technol* 39: 83-87.
44. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
45. Alnemri ES. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 64: 33-42.
46. Soldani C, Scovassi AI. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 7: 321-328.
47. White E. 1993. Death-defying acts: A meeting review on apoptosis. *Genes Cells* 7: 2277-2284.
48. Lee CH, Chung MC, Lee HJ, Kho YH. 2000. An apoptosis regulator isolated from *Petasites japonicum*. *J Food Sci Technol* 32: 448-453.

(2008년 1월 10일 접수; 2008년 2월 19일 채택)