

적송잎 추출물이 항산화 활성 및 파골세포의 증식에 미치는 영향

전민희¹ · 박미라¹ · 박용수¹ · 황현정¹ · 김성구² · 이상현³ · 김미향^{1*}

¹신라대학교 식품영양학과

²주바이오포트코리아

³신라대학교 생명공학과

Effect of Pine (*Pinus densiflora*) Needle Extracts on Antioxidant Activity and Proliferation of Osteoclastic RAW 264.7 Cells

Min Hee Jeon¹, Mi-Ra Park¹, Yong Soo Park¹, Hyun Jung Hwang¹,
Sung Gu Kim², Sang-Hyeon Lee³, and Mihyang Kim^{1*}

¹Dept. Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-738, Korea

²Bioport Korea Co., Busan 619-912, Korea

³Dept. of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-738, Korea

Abstract

Pine needles have long been used as a traditional health-promoting medicinal food in Korea. This study was carried out to investigate the effects of pine needle extracts on the antioxidant activity, and proliferation of osteoclastic RAW 264.7 cells. Pine needle extracts were examined using hot water, ethanol, hexane, hot water-ethanol, and hot water-hexane. The effects of the pine needle extracts were examined by comparing the results with that of a commercial agents, proanthocyanidin. Analysis of each extract indicated that hot water-ethanol and ethanol extracts contained the highest total polyphenol concentrations. The hot water-ethanol and ethanol extracts also showed relatively the highest SOD-like activity. The proliferation of osteoclastic RAW 264.7 cells treated with pine needle extracts was decreased by lower than 70%. In addition, the hot water and ethanol extracts of pine needle significantly reduced the number of tartrate-resistant acid phosphatase-positive (TRAP⁺) multinucleated cells from osteoclastic RAW 264.7 cells. These results indicate that pine needle extracts had an anabolic effect on bone through the promotion of osteoclast differentiation, suggesting that they could be used for the treatment of common metabolic bone diseases.

Key words: pine (*Pinus densiflora*) needle, antioxidant activity, RAW 264.7 cell, MTT assay, TRAP

서 론

우리나라는 이미 고령화 사회에 접어들었고, 65세 고령인구가 14%를 넘어서게 되는 고령사회를 눈앞에 두고 있다. 고령인구가 증가함에 따라 노화, 암, 뇌혈관질환, 심혈관계 질환 등이 발생되는데, 이들 질환은 free radical의 생성과 관련이 있다는 사실이 밝혀져 항산화 효과를 가지는 식품에 관심이 집중되고 있다(1). 체내에서 생성된 활성 산소종(hydrogen peroxide species, ROS)은 산소의 환원 대사산물로서 정상세포 내 대사과정이나 세포질 내 효소 작용에 의해 내부로부터 형성되거나 다양한 외부 요소에 의해 형성되는데, 이들은 체내의 지질, 단백질 등을 손상시켜 세포의 기능을 억제시킨다(2,3). 뿐만 아니라 ROS 발생이 세포의 항산화 능력을 초과하는 경우 산화적 스트레스에 노출되어 항상성의 불균형을 초래한다.

항산화 물질은 세포내의 산화적 손상을 억제시키거나 지연시키는 물질로, 효소계로는 superoxide dismutase(SOD), glutathione-peroxidase(GSH-Px), catalase 등이 있다(4). 이러한 항산화 효소는 체내에서 발생하는 산화적 손상을 완벽히 복구하고 예방할 수 없기 때문에(5) 식품을 통해 섭취되는 항산화 물질들은 체내 산화적 손상을 복구하는 데 도움이 된다(6,7). 흔히 천연물 유래의 항산화제인 vitamin E, vitamin C, carotene, glutathione, uric acid, metal-binding proteins 등과 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene)가 알려져 있다(8). 합성 항산화제는 값이 싸고 효과가 좋아 폭넓게 사용되고 있으나 심각한 독성작용과 발암을 일으키는 것으로 보고되고 있으며(9), 천연물 유래의 항산화제는 안전하나 단독으로는 산화연쇄반응 저지 능력이 낮고 값이 비싸다는 단점이 있다(10). 따라서 안전한 천연물로부터 뛰어난 항산화 효과

*Corresponding author. E-mail: mihkim@silla.ac.kr
Phone: 82-51-999-5620, Fax: 82-51-999-5457

를 기대하는 많은 연구가 진행되고 있다.

최근 들어 산화스트레스와 골다공증의 연관성에 대한 관심이 고조되고 있다. 한 임상연구에서는 산화스트레스의 증가와 골밀도 간에는 유의한 음의 상관관계가 있는 것으로 보고되어 있다(11). 한편, 골다공증 여성의 경우 혈중 항산화제의 농도가 감소되어 있으며(12), 항산화 비타민 섭취로 인하여 골밀도가 증가하였다는 결과도 나타나 있다(13). 골다공증은 고령화 사회에서 대두되고 있는 문제로 골의 화학적 조성에는 큰 변화 없이 단위용적 내의 골량이 감소하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환이다(14). 파골세포는 조골세포가 분비하는 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)에 의해 분화되어 활성화된다. 활성화된 파골세포는 세포막과 골기질 사이에 fibrous-actin 배열로 이루어진 actin ring을 형성하여 단백질 분해효소와 proton을 분비하며, 이를 통해 골 기질을 흡수하여 뼈의 골 밀도를 감소시킨다(15). 현재 골 흡수를 억제하기 위해 파골전구세포에서 파골세포로의 분화를 차단하는 분화 과정 초기단계를 저해하거나, 분화된 파골세포의 사멸을 유도하여 골 흡수 과정을 저해하는 기작에 대한 연구가 진행되고 있다(16,17).

소나무는 국내 어느 지형에서나 잘 자라는 사철 푸른 나무로 우리나라 이외에도 중국, 일본 등 아시아지역에서 널리 자생하고 있다(18). 예로부터 솔잎을 약술 형태나 차의 형태로 복용하였으며, 맛이 쓰고 따뜻하여 산화환원과정의 촉진 작용과 소염작용에 관여한다. 또한 약용식품으로 이용되었으며 동의보감에 의하면 중풍, 고혈압, 팔다리 저림, 불면증, 중풍, 신경쇠약, 탈모 등에 효과가 있다고 기록되어 있다(19). 솔잎은 quercetin, kaempferol 등의 flavonoid 류, α -pinene, β -pinene, camphene 등의 정유 성분 및 당류, carotene, vitamin C 등이 함유되어 있으며(20), flavonoid류 중 proanthocyanidin은 항산화 활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다(21). 솔잎에 대한 선행연구로는 혈행 및 지질개선 효과(22), 항돌연변이 활성(23,24), 항암활성(25,26), 조골세포의 성장 및 콜라겐 합성능(27)에 대하여 보고된 바 있다. 하지만 항산화 활성에 따른 파골세포의 증식 및 분화에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 적송잎의 항산화 활성을 검토하기 위해 적송잎 추출물의 polyphenol 성 물질 함량과 *in vitro*에서 용매별 분획물의 항산화 효능을 검토하였다. 또한 RAW 264.7 세포를 이용하여 파골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

본 실험에 사용한 적송잎은 2007년 7월경 지리산에서 채취하여 물로 세척하고 60°C에서 열풍 건조한 후 믹서로 분말화하여 추출하였다. 적송잎 추출물은 추출 용매에 따라 열수

추출물, 80% 에탄올 추출물, 95% 헥산 추출물과 열수 추출 후 남은 잔여물을 80% 에탄올로 추출한 열수에탄올 추출물(hot water-ethanol, HWE), 열수 추출 후 남은 잔여물을 95% 헥산으로 추출한 열수헥산 추출물(hot water-hexane, HWH)을 준비하였다. 열수, 에탄올, 헥산 추출물들은 건조시킨 적송잎 분말 100 g에 각각 물, 에탄올, 헥산 2 L를 첨가하여 80°C에서 12시간 동안 정치하여 추출하는 과정을 총 2번 반복하였다. 열수에탄올 및 열수헥산 추출물은 적송잎 분말 100 g을 물 2 L를 첨가하여 80°C에서 12시간 동안 추출한 뒤 남은 잔여물을 수거해 건조시킨 후 열수에탄올 추출물은 에탄올을 2 L 첨가하여 80°C에서 12시간 동안 추출하였고, 열수헥산은 헥산을 2 L 첨가하여 80°C에서 12시간 추출하였다. 모든 추출물은 여과한 후 농축 및 동결 건조하여 제조하였다. Proanthocyanidine은 포도씨 추출물을 Sephadex LH-20 column chromatography법에 의해 정제하여 얻어진 95% 순도의 것을 (주)바이오포트코리아(Busan, Korea)로부터 제공받아 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Chandler과 Dodds(28)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 1 mL에 95% ethanol 1 mL, 정제수 5 mL 및 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) 0.5 mL를 혼합하여 5분간 방치한 후, 5% Na_2CO_3 1 mL를 첨가하여 교반시켜 1시간 동안 암소에 둔 후 catechin을 표준시약으로 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법(29)에 따라 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 시료를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하여, 시료 10 μL 에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl] amino-methane, 10 mM EDTA, pH 8.5) 150 μL 와 7.2 mM pyrogallol(Sigma) 10 μL 를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 50 μL 를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 ELISA reader를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성(}\%) = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가구의 흡광도

B: 시료 무첨가구의 흡광도

세포 배양

한국세포주은행에서 분양받은 RAW 264.7 세포는 DMEM 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS(Gibco)와 1% antibiotics(Gibco)를 첨가하면서 37°C, 5%의 CO_2 incubator에서 2~3일마다 계대 배양하면서 실험에 사

용하였다. 분화유도를 위해 10 μ M PD98059(CAYMAN Chem. Co., Ann Arbor, MI, USA)와 50 mg/mL의 RANKL (PreproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA)를 첨가하여 분화유도 배지로 사용하였다.

세포 성장 억제 효과

시료의 농도별 처리에 따른 파골세포의 세포 성장 억제 효과는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma) 시약의 환원 정도를 측정하는 MTT assay 방법을 사용하여 측정하였다. 배양한 RAW 264.7 세포를 0.4% trypan blue 염색법을 이용하여 세포수를 1×10^5 cell/mL로 조정하여 96 well plate에 plating 한 후, 농도별(1, 10, 100 μ g/mL)로 준비된 적송잎 추출물을 20 μ L씩 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 이때 대조군으로는 적송잎 추출물 대신 ethanol을 20 μ L 첨가하여 동일하게 배양하였다. 48시간 배양 후 MTT (5 mg/mL) 시약을 10 μ L씩 각각의 well에 첨가하고 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 4시간 더 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 100 μ L씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 증식률은 적송잎 추출물의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

TRAP 활성 측정

배양된 RAW 264.7 세포를 5×10^4 cell/mL로 조정하여 96 well plate에 plating 한 후, 농도별(1, 10, 100 μ g/mL)로 준비된 적송잎 추출물을 20 μ L씩 첨가한 후 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 4일간 배양하였다. 4일 배양 후 PBS로 세척하고 10% formaldehyde로 세포를 고정하였다. 기질용액으로는 1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt와 10 mM tartrate를 포함하는 50 mM citrate buffer(pH 4.6)을 제조하였고, 고정한 세포에 기질 용액을 100 μ L씩 분주하여 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 plate에 옮기고 0.1 N NaOH로 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 적송잎 추출물의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

통계처리

연구결과 얻어진 자료를 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 하위그룹 각각의 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였다. 분산분석(ANOVA) 후 Duncan의 다중범위 유의성 검증을 실시하였고 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

적송잎 추출물별 총 폴리페놀 함량

폴리페놀성 물질은 에스트로겐 유사 활성이 있는 것으로

Table 1. Total polyphenol concentration in pine needle extracts (mg/g)

Extracts	Total polyphenol concentration
Hot water	112.09 \pm 0.58 ³⁾
Ethanol	125.29 \pm 3.54
Hexane	77.6 \pm 0.32
HWE ¹⁾	140.54 \pm 6.34
HWH ²⁾	77.77 \pm 1.84

¹⁾HWE: hot water-ethanol. ²⁾HWH: hot water-hexane.

³⁾Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

알려져 있으며, 폴리페놀은 활성 free radical(reactive free radical)에 수소원자를 제공하여 안정한 비radical(non-radical)을 만들어 줌으로써 항산화 효과를 나타낸다(30).

적송잎의 용매별 추출물에 대한 총 폴리페놀성 성분의 함량을 측정된 결과(Table 1), 열수에탄올 추출물이 140.54 mg/g으로 적송잎 추출물 중 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. 그 다음으로는 에탄올, 열수, 열수hexan, hexan 순으로 나타났다. 열수, 에탄올, 열수에탄올 추출물 모두 100 mg/g이 넘는 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. 따라서 적송잎의 폴리페놀 성분은 hexan과 같은 비극성 용매보다는 극성 용매 추출물에 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

적송잎 추출물의 SOD 유사활성

항산화 효소 중의 하나인 SOD는 산소를 소비하는 모든 생물에 존재하며 대표적인 활성산소 저해제로 반응성이 매우 강한 superoxide radical과 반응하여 hydrogen peroxide (H₂O₂) 생성을 촉매하는 효소이다. 가장 독성이 강한 hydroxyl radical의 생성을 예방하는 작용을 하여 현재 항염증 소제나 피부 노화방지를 위한 미용소제로 화장품 등의 첨가제로서 사용되고 있다(31,32). 따라서 본 연구에서 superoxide와 반응하여 갈변현상을 나타내는 pyrogallol의 자동산화 반응 억제능을 측정하는 원리(29)를 이용하여, 적송잎 추출물별 SOD 유사활성을 측정하였다(Fig. 1). 각 용매별 추출물 중에 열수, 에탄올 및 열수에탄올 추출물의 경우 적송잎의

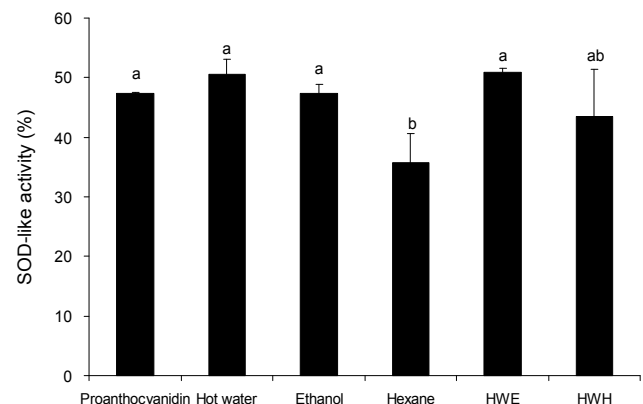


Fig. 1. SOD-like activity of proanthocyanidin and pine needle extracts. HWE: hot water-ethanol, HWH: hot water-hexane. Values with different letters were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

대표적인 항산화제로 알려져 있는 proanthocyanidin 47.31%보다 높은 SOD 유사활성을 보였다. 또한 핵산 추출물은 35.68%로 가장 낮은 SOD 유사활성을 나타내었다. 이러한 결과로부터 총 폴리페놀성 성분의 함량이 높은 열수, 에탄올 및 열수에탄올 추출물이 상대적으로 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

적송잎 추출물이 파골세포의 생성에 미치는 영향

인체의 뼈는 파골세포와 조골세포에 의해서 지속적인 생성이 일어난다(33). 파골세포는 단핵구/대식세포 계통의 세포로 뼈 조직에서 유일하게 뼈의 파괴를 담당하는데, 여러 조직에 존재하는 단핵구 대신 전구세포로부터 시험관내에서 파골세포의 생성이 가능하다(34). MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 이용한 검사법은 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험방법 중 하나로 살아있는 세포수에 비례해서 흡광도를 나타낸다. 적송잎 추출물이 파골세포 전구 세포인 RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 세포 생존율은 배양액만 처리한 대조군에 대한 백분율로 나타내었으며 그 결과는 Fig. 2와 같다.

파골세포의 생존율을 측정한 결과, 모든 적송잎 추출물에서 파골세포의 성장을 억제시켰다. 첨가농도가 1 µg/mL와 같은 낮은 농도에서 에탄올 추출물의 경우, 파골세포 생존율을 54.04%로 가장 억제시켰으며, 그 다음은 열수 추출물, 핵산 추출물 순으로 나타났다. 첨가농도 10 µg/mL의 경우 모든 추출물에서 파골세포의 성장억제 효과가 나타났으나 추출물간의 차이는 나타나지 않은 반면, 100 µg/mL의 고농도 첨가군에서는 오히려 핵산 추출물이 파골세포 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 열수 및 에탄올 추출물의 경우 낮은 농도에서도 파골세포의 성장을 억제시킬 수 있는 것을 확인하였다. 또한 각 추출물 중의 SOD 유사활성 결과에서 열수, 에탄올 및 열수에탄올 추출물의 활성이 높았고(Fig. 1) 파골세포 성장 억제능에서도 이와 유사한 결과가 나타났으며(Fig. 2), 이는 현재 연구 중인 추출물 중의 proanthocyanidin 함량과도 연관성이 있는 결과임을 확인할 수 있었다. 한편 선행연구에서 적송잎 추출물이 조골세포의 증식을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타나(27), 파골세포에서의 적송잎 추출물의 성장억제 효과는 단지 세포독성에 의한 결과만은 아닌 것으로 해석되므로 이후 구체적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

적송잎 추출물이 파골세포의 TRAP 활성에 미치는 영향

파골세포는 TRAP 양성 반응을 나타내는 다핵세포(35)이며, TRAP은 파골세포의 골 흡수 시 분비가 증가되며, 다른 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지인자이다(36,37). 본 연구에서는 파골세포 전구세포를 배양하여 PD98059와 RANKL을 처리하여 분화를 유도하였다. 그 결과(Fig. 3), 모든 추출물에서 대조군보다 낮은 TRAP 활성이

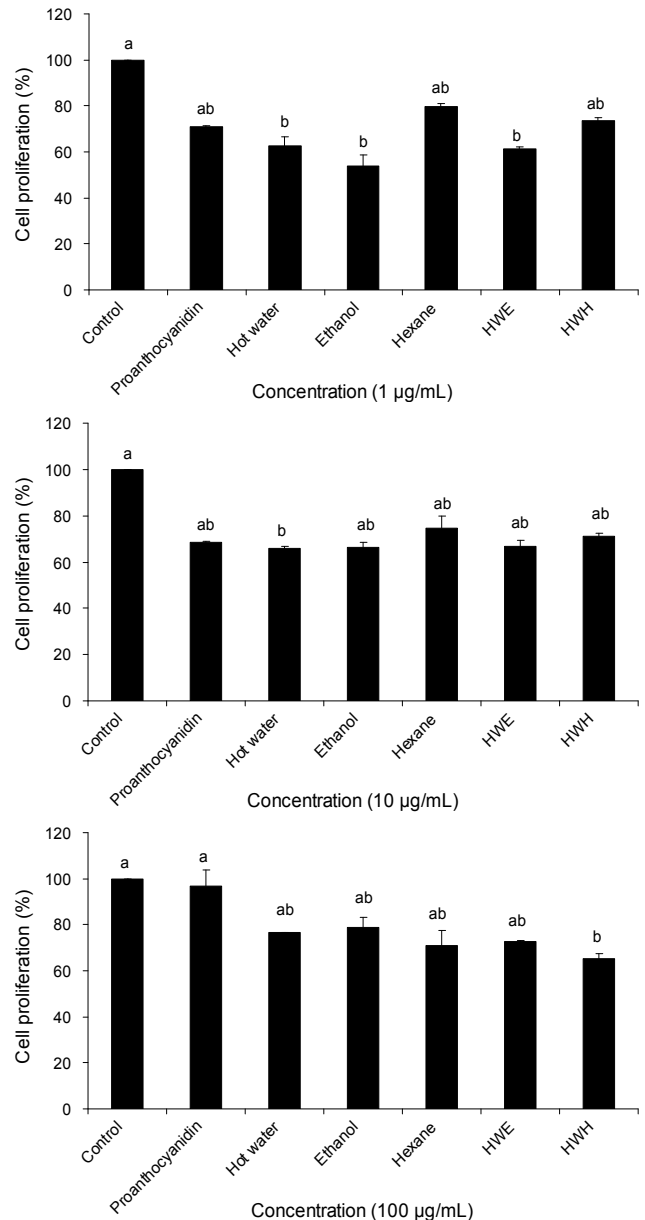


Fig. 2. Effects of proanthocyanidin and pine needle extracts on the viability of RAW 264.7 osteoclastic cell. The RAW 264.7 cells were plated at a density of 1×10^3 cells/well in 96 well plates and treated with extract for 48 hr. Cell viability was expressed with an absorbance ratio (absorbance of treated cells/absorbance of control cells $\times 100$). Values with different letters were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is expressed as mean \pm SD ($n=3$). HWE: hot water-ethanol, HWH: hot water-hexane.

나타났다. 특히 열수 및 에탄올 추출물의 경우, 1 µg/mL의 낮은 농도에서 각각 67.8 및 66.3%로 파골세포 분화를 감소시켰으나, 핵산추출물은 약 80%의 분화 감소율을 나타내었다. 100 µg/mL의 고농도 첨가군에서는 오히려 에탄올 추출물의 파골세포 분화 감소율이 낮게 나타나, 저농도에서의 효과가 우수한 것으로 나타났다. 이처럼 파골세포의 분화 억제 효과가 우수하게 나타난 적송잎은 폴리페놀 성분은 다양하게 함유하고 있으며, 이들에 대한 항염증과 항산화 작용

요 약

아시아 지역 널리 자생하고 있는 소나무는 항암, 조골세포의 콜라겐 합성 등 다양한 연구결과가 보고된 바 있으나, 항산화 활성에 따른 파골세포의 증식 및 분화에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 적송잎 추출물별 항산화 활성과 RAW 264.7 세포를 이용하여 적송잎 추출물이 파골세포의 증식과 TRAP 활성에 미치는 영향에 대해 검토하였다. 적송잎 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과, 열수에탄올 추출물이 140.54 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 다음은 에탄올 추출물, 열수 추출물, 열수hexan 추출물, hexan 추출물 순으로 나타났다. SOD 유사 활성을 검색한 결과, 열수, 에탄올 및 열수에탄올 추출물이 proanthocyanidin의 47.31%보다 높은 SOD 유사활성을 보였다. MTT assay에 의한 파골세포의 생존율을 측정된 결과, 에탄올 추출물 경우 1 µg/mL의 농도에서 54.04%로 가장 낮은 생존율을 나타내었고 적송잎 hexan 추출물 또한 70% 이하의 생존율을 나타내어, 각 추출물 간의 생존 비율에 차이는 있으나 모든 적송잎 추출물에 있어 파골세포의 성장을 억제하는 결과가 나타났다. 적송잎 추출물의 파골세포 분화 억제 효과를 알아보기 위해 TRAP staining 한 결과, 모든 추출물에서 대조군보다 낮은 TRAP 활성이 나타났다. 특히 열수 및 에탄올 추출물의 경우, 1 µg/mL의 낮은 농도에서 각각 67.8 및 66.3%로 파골세포 분화를 감소시켰으나, hexan 추출물은 약 80%의 분화 감소율을 나타내었다. 100 µg/mL의 고농도 첨가군에서는 오히려 에탄올 추출물의 파골세포 분화 감소율이 낮게 나타나, 저농도에서의 효과가 우수한 것으로 나타났다. 따라서 항산화 활성을 가지는 적송잎 추출물이 파골세포의 증식과 분화를 억제하여 골흡수 억제에 효과를 준다는 것이 확인되었으며, 구체적인 기작 연구와 *in vivo* 연구가 병행된다면 노화 및 골다공증 예방과 관련된 기능성 천연소재로 개발이 가능하리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역 혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Masadi H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. 1995. Active-oxygen scavenging activity of plant extract. *Biol Pharm Bull* 18: 162-166.
2. Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Reviews* 78: 547-581.
3. Halliwell B, Gutteridge JM. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246: 501-514.
4. Jung S, Kim HW, Yoon S. 1999. Analysis of antioxidant

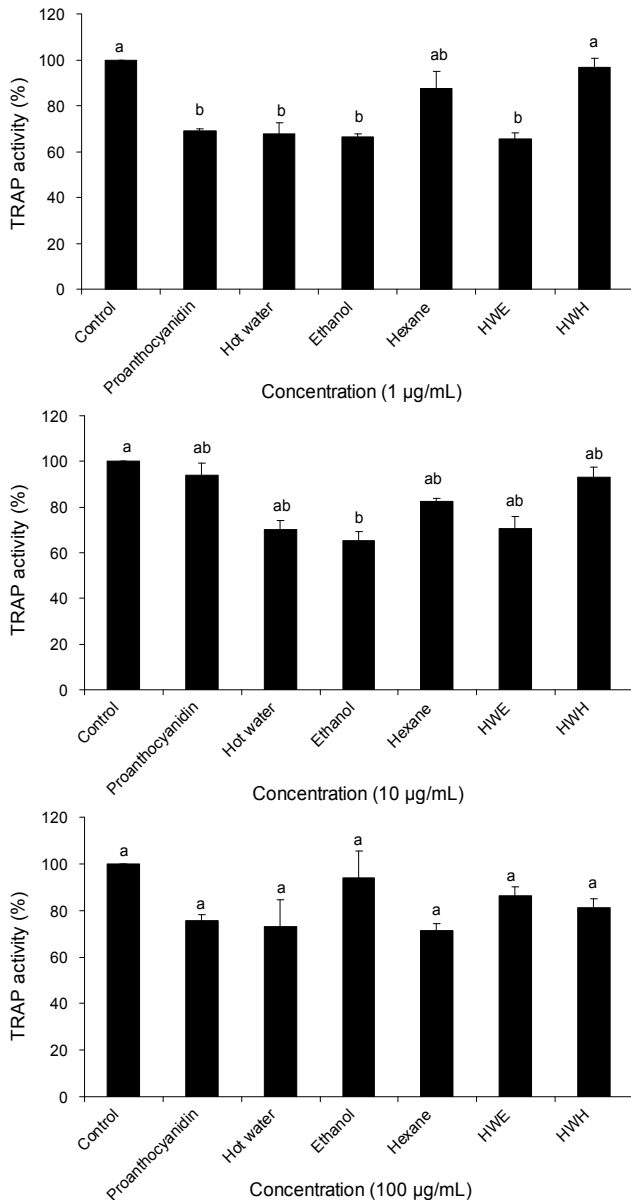


Fig. 3. TRAP activity of proanthocyanidin and pine needle extracts on osteoclast differentiation of RAW 264.7 osteoclastic cell. The RAW 264.7 cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well in 96 well plates and cultured for 4 days in the presence of various extract concentrations. Values with different letters were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). HWE: hot water-ethanol, HWH: hot water-hexane.

에 대한 여러 보고들이 있다(21,25,27). 특히 에탄올 및 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량이 hexan 추출물보다 약 2배 정도 높은 것으로 나타나(Table 1), 적송잎의 폴리페놀 물질이 파골세포의 분화억제 효과를 보이는 것으로 유추할 수 있다. 적송잎의 항산화 물질로 알려져 있는 proanthocyanidin 또한 저농도에서 높은 TRAP 활성을 나타내어, 적송잎 추출물 중 폴리페놀계통의 화합물에 대한 파골세포 분화 억제에 관한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

- nutrients in green yellow vegetable juice. *J Food Sci Biotech* 31: 880-886.
5. Simic MG. 1988. Mechanisms of inhibition of free radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 202: 386-399.
 6. Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, Sawada H. 2003. Antioxidative effects of lactic and bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J Agric Food Chem* 51: 4456-4460.
 7. Lin MY, Yen CL. 1999. Inhibition of lipid peroxidation by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum*. *J Agric Food Chem* 47: 3661-3664.
 8. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
 9. Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63.
 10. Cort WM. 1984. Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *J Am Oil Chem Soc* 51: 321-325.
 11. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. 2001. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 275-279.
 12. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori C, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. 2003. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: Results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1523-1527.
 13. Morton D, Barrett-Conner EL, Schneider DL. 2001. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 16: 135-140.
 14. Lee JW, Lee IS. 2004. Effects of *Rubus coreanus* Miquel extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J Life Science* 14: 967-974.
 15. Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W, Rattan A, Scully S, Fletcher F, Juan T, Kelley M, Burgess TL, Boyle WJ, Polverino AJ. 2000. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival *in vitro* and *in vivo*. *J Am Pathol* 157: 435-448.
 16. Kwak HB, Lee SW, Li YJ, Kim YA, Han SY, Jhon GJ, Kim HH, Lee JH. 2004. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by a novel lysophosphatidylcholine derivative, SCOH. *Biochem Pharmacol* 67: 1239-1248.
 17. Nakagawa H, Wachi M, Woo JT, Kato M, Kasai S, Takahashi F, Lee IS, Nagai K. 2002. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem Biophysical Res Commun* 292: 94-101.
 18. Park GY, Lee HS, Hwang ID, Jung HS. 2006. The functional effects of fermented pine needle extract. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21: 376-383.
 19. Lee HJ. 2004. Studies on biological activities of the pine-needle distilled water extract. *MS thesis*. Kagnwon National University, Gangwon, Korea.
 20. Lee OH, Kim KY, Jang MK, You KH, Kim SG, Kim MH, Lee SH. 2008. Evaluation of proanthocyanidin contents in total polyphenolic compounds of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts and their antioxidative activities. *J Life Science* 18: 213-219.
 21. Hsu T, Sheu S, Liaw E, Wang T, Lin C. 2005. Anti-oxidant activity and effect of *Pinus morrissonicola* Hay. on the survival of leukemia cell line U937. *Phytomedicine* 12: 663-669.
 22. Kang SR, Kim YK, Kim SG, Lee SH, Kim MH. 2009. The effect of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts on blood flow and serum lipid improvement. *J Life Science* 19: 508-513.
 23. Kim EJ, Choi KP, Ham SS, Kang HY. 1998. Inhibitory effect of pine needle extracts on the chemical induces mutagenicity. *Korean J Food Sci Technol* 30: 450-455.
 24. Lee YH, Choi YS, Lee SY. 1996. The cholesterol-lowering effects of the extract from *Pinus strobes* in chickens. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 188-192.
 25. Choi EJ, Lee C, Rhim TJ, Cha BC, Park HJ. 1997. Antimicrobial activities of pine needle (*Pinus densiflora*) extract. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 2: 293-297.
 26. Chung YJ, Bae MW, Chung MI, Lee JS, Chung MS. 2002. Cytotoxic effect of the distilled pine-needle extracts on several cancer cell lines *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 2-13.
 27. Jeon MH, Kim YK, Park YS, Hwang HJ, Kim SG, Lee SH, Choi IS, Kim MH. 2010. Effect of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts on synthesis of collagen in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Life Science* 20: 607-613.
 28. Chandler SF, Dodds JH. 1983. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolins and solasidine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell Rep* 2: 105-108.
 29. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 468-474.
 30. Choi KH. 2006. The effects of mulberry fruits on the biological activity in ovariectomized rats. *MS Thesis*. Silla University, Busan, Korea.
 31. Bryan DM, Murnaghan J, Jones KS, Bowley SR. 2000. Iron superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increase winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol* 122: 1427-1438.
 32. Grasbon T, Grasbon-Frodl EM, Juliusson B, Epstein C, Brundin P, Kampik A, Ehinger B. 1999. CuZn superoxide dismutase transgenic retinal transplants. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237: 336-341.
 33. Shin JM, Park CK, Shin EJ, Jo TH, Hwang IK. 2008. Effects of *Scutellaria radix* extracts on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J Food Sci Technol* 40: 674-679.
 34. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20: 345-357.
 35. Martin PM, Horwitz KB, Ryan KS, Mcguire WL. 1978. Phytoestrogens interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 103: 1860-1867.
 36. Le Bail JC, Varnat F, Nicolas JC, Habrioux G. 1998. Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett* 130: 209-216.
 37. Mok SK, Shin HS. 1996. The effects of prostaglandin and dibutyryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoclast generation. *J Wonkwang Dental Res Ins* 6: 43-62.

(2011년 3월 9일 접수; 2011년 4월 8일 채택)