

아보카도 과육, 과피 및 씨 추출물이 조골세포 분화 및 파골세포 형성에 미치는 영향

김미진¹ · 임남경¹ · 유미희¹ · 김현정² · 이인선^{1,2*}

¹계명대학교 식품가공학과

²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터

Effects of Extracts from Sarcocarp, Peels, and Seeds of Avocado on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation

Mi-Jin Kim¹, Nam-Kyung Im¹, Mi-Hee Yu¹, Hyun-Jeong Kim², 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

Avocado (*Persea americana* Mill., Family Lauraceae) is an important subtropical crop in the Americas where it has been cultivated for several thousand years. To investigate the bioactivities of avocado, which acts on bone formation, we prepared methanol extracts from the sarcocarp, peels, and seeds of avocado. The methanol extracts of peels and seeds showed higher bone-forming activity than avocado sarcocarp extracts accompanied by MC3T3-E1 osteoblast proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity. Additionally, the extracts of sarcocarp and peel from avocado also decreased tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity against differentiation of osteoclasts, derived from mouse bone marrow macrophages. The hexane fraction from avocado peels showed strong bone-forming activity accompanied by osteoblast proliferation and ALP activity (170.7 ± 8.4%), and the ethyl acetate fraction from avocado peel decreased TRAP activity (5.2 ± 0.3%) and differentiated osteoclasts at 50 µg/mL. Therefore, avocado is expected to be a natural source for developing medicinal agents to prevent bone-related diseases, such as osteoporosis, by increasing osteoblast differentiation and reducing osteoclast activity.

Key words: alkaline phosphatase (ALP), avocado, osteoblast, osteoclast, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)

서 론

골다공증(osteoporosis)은 유전적 요인이나 식이, 생활방식과 같은 환경적 요인에 의해 영향을 받는 복합적인 질병이다. 2008년 질병관리본부의 국민건강 영양조사 결과 발표에 따르면 우리나라 50세 이상의 골다공증 유병률은 전체 인구의 19.3%, 남자가 4.9%, 여자가 32.6%로 나타났으며, 특히 여성이 남성보다 6배 높은 유병률을 보였다(1). 이처럼 급속한 노령화로 인한 골다공증은 사회적, 의학적 관심에서 사회문제로까지 부상하고 있다(2).

골다공증은 골 형성(bone formation)과 골 흡수(bone resorption)의 불균형으로 골의 화학적 조성에는 변화가 없으나 단위용적내의 골량(bony quantity)을 감소시켜 척추, 요골 및 대퇴부의 골절을 쉽게 일으키는 질환이다. 골의 항상성은 새로운 골 기질을 형성하는 조골세포와 오래된 골 기질을 흡수하는 파골세포의 적절한 균형에 의해 유지되어 인체

하중의 지탱, 기관보호, 조혈작용의 역할을 수행하며 정상 성인의 약 10%가 매년 재형성된다. 골 대사가 항상성(homeostasis)을 이루었을 때 정상적인 골대사가 이루어지고, 각종 질병이나 노화, 흡연, 스트레스와 폐경기 여성들의 급격한 에스트로겐 저하 등의 여러 인자로 인하여 균형이 깨어지게 되면 뼈의 생성보다 흡수가 증가하게 되어, 결국 골 소실(bone loss)이 일어나게 된다(3-6). 특히 노화와 관련한 골 질환이나 폐경으로 인한 골다공증은 골의 형성에 관여하는 조골세포보다 파골세포에 의한 골 흡수가 과도하여 골 항상성이 깨어질 때 발생한다(7).

골 질환 발생 시 손실된 뼈를 원상태로 재생하는 것은 사실상 어려우며, 일반적으로는 뼈의 소실이 더 이상 진행되지 않게 치료하는 방법을 많이 사용하고 있다(8). 임상에서는 골 흡수 억제제로 에스트로겐, 칼시토닌, 비스포스포네이트 제제가 많이 사용되고 있다(9). 하지만 비스포스포네이트의 경우 사용상의 번거로움과 다소 낮은 치료효과 및 부작용의

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

사례가 나타났고, 또한 에스트로겐 처방도 골량 유지에는 효과적이거나 60세 이상의 고령층에서는 골량 감소 억제효과가 폐경 초기에 비하여 낮으며, 불규칙한 자궁 출혈이나 유방암 등의 합병증에 대한 위험이 있는 것으로 보고되었다(10,11).

최근 비교적 부작용이 적은 장점으로 인해 천연물질을 이용한 신약개발과 질병의 치료가 보편화 되면서, 골다공증의 치료에 이를 응용하려는 연구 또한 활발하다. 녹용, 노각나무, 삼백초, 작약, 우슬 등이 Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand(RANKL)로 유도된 파골세포 분화 및 골 손실을 억제하고(12-16), 또한 식물 유래의 폴리페놀화합물인 quercetin과 녹차의 카테킨 성분중 하나인 EGCG가 파골세포의 골 흡수억제 효과를 가지며(17), 대두 및 콩류가 조골세포의 활성을 증가시킨다고 보고(18)되기도 하였다.

한편 아보카도(*Persea americana* Mill.)는 멕시코와 중앙아메리카 일대에서 유래(19)되었다고 알려진 과일로서, 전 세계적으로 널리 소비되고 있다. 아보카도는 20여종의 필수 영양소와 다양한 phytochemical을 함유하고 있다(20). 즉 식용되는 부분의 지질함량이 25% 정도로서 단일불포화지방산이 많이 함유되어 있고, carotenoids, vitamin B, vitamin C, vitamin E, terpenoids, sitosterol, persenone A, persenone B, phenol 등이 함유되어 있다(21-23). 또한 아보카도는 항산화 작용, acetyl CoA carboxylase 저해, 항균활성 등이 보고(22,24,25)되었다. 특히 아보카도의 과육보다 씨 및 껍질에서 폴리페놀 함량이 10~20배 정도 많이 존재하여 높은 항산화능을 가지며(26,27), 또한 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 대해 caspase-3 발현을 유도하여 apoptosis에 영향을 준다고 보고(26)되었다. 일반적으로 과일의 씨나 껍질은 대중적인 관심이 낮고 상업적인 응용 면에서도 관심이 부족한 편이다. 그러나 과일주스와 같은 과일 가공공정에서 발생하는 부산물의 높은 비율을 고려하면 이를 활용하는 방안 모색도 의의가 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 아보카도로부터 새로운 생리기능성을 확인하고자, 아보카도의 과육, 과피 및 씨로부터 각각의 추출물을 제조하여 조골세포 및 파골세포에 미치는 영향을 검토하였다. 특히 조골 및 파골세포에 대해 우수 활성을 가진 과피의 경우, 용매분획을 하여 과피 분획물의 조골세포의 증식 및 파골세포의 분화 억제능을 검토하여, 새로운 골기능 개선 소재로의 이용가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

시료조제

본 실험에 사용된 아보카도는 약 200 g 정도의 중과를 대형마트에서 구입하여 깨끗이 수세하여 과육, 과피 및 씨로 분리한 후 분쇄기로 각각 분쇄하여 80% methanol로 3회 반복 추출하였고, 추출액은 여과지(No.3 filter paper, Whatman,

Maidstone, UK)를 사용하여 여과하고 rotary evaporator (NVC-2000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하여 동결 건조하여 사용하였다. 이때 각 추출물의 수율은 과육 4%, 씨 11%, 과피 7.5%이었다. 그리고 아보카도 과피 메탄을 추출물은 일정량의 물을 첨가하여 혼합한 후 분액여두를 이용하여 극성이 다른 추출용매인 n-hexane, ethylacetate, butanol을 차례로 넣어 분획을 추출하였다. 이들 추출물 및 분획물은 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

세포배양

Mouse calvaria osteoblastic cell인 MC3T3-E1 cell은 ATCC(CRL-2593, Rockville, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였다. α -MEM(Gibco BRL, NY, USA) 배지에 10% FBS(Gibco BRL)와 1% antibiotics(Gibco BRL)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2~3일마다 계대배양 하고, 분화 유도를 위해 10 mM β -glycerol phosphate(Sigma, St. Louis, MO, USA)와 50 μ g/mL의 vitamin C(Sigma)를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다(28).

골수세포의 분리 및 파골세포 분화

4~5주령 된 ICR 마우스의 경골(tibia)을 적출하여, 양끝을 절단하고 α -MEM을 통과시켜 골수세포를 수집하고, 50 ng/mL macrophage-colony stimulation factor(M-CSF)를 처리하여 24시간 배양하였다. 미부착 세포를 α -MEM으로 세척한 후 96 well에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 50 ng/mL의 M-CSF가 첨가된 α -MEM 배지에 3일간 배양하였다. 그 후 50 ng/mL의 M-CSF와 100 ng/mL의 RANKL을 함께 처리하고, 시료를 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다.

세포 생존율 측정

시료의 세포독성을 측정하기 위해 Green(29) 등의 방법에 의한 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT) assay로 측정하였다. 배양한 cell을 0.4% trypan blue 염색법으로 세포수를 측정한 후 1×10^4 cells/well의 농도로 96-well plate에 200 μ L씩 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 α -MEM 배지 180 μ L를 첨가한 후 각각의 농도별 시료를 각 well에 20 μ L씩 넣는다. 시료 첨가 후 48시간 배양한 다음 MTT(5 mg/mL) 용액 10 μ L를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 well에 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

조골세포의 ALP(alkaline phosphatase) 활성

배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10^4 cells/well로 조정하여 96-well plate에 분주하고 24시간 배양한 후 분화유도배지로

교환하여 24시간 배양한 다음 시료처리를 하였다. 시료 추출물을 각 농도별로 처리하여 세포를 배양한 후 3일 뒤 PBS로 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20 µL씩 첨가하여 37°C, 30분간 lysis하였다. Lysis된 cell의 상등액 5 µL는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상등액에 20 µL의 0.1 N glycine 과 10 µL의 100 mM p-nitrophenylphosphate(p-NPP)를 첨가한 후 다시 37°C, 30분간 반응시켰다. 반응 후 200 µL의 0.1 N NaOH로 반응을 중지하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 p-NPP로부터 생성된 p-nitrophenol (p-NP)을 측정하여 p-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 대조군과의 상대비교를 통해 도출하였다(28).

파골세포의 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 활성

파골분화 정도를 Hotokezaka 등(30)의 방법에 따라 TRAP 활성 측정과 TRAP 염색으로 확인하였다. 96-well에 5×10^4 cells/well이 되게 cell을 접종하고 분화인자와 시료를 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% formaldehyde로 고정한 cell에 기질 용액(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer pH 4.6)을 100 µL씩 분주하여 37°C, 30분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 plate에 옮기고 0.1 N-NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

파골세포의 TRAP 염색

TRAP 염색은 먼저 50 mM tartrate acid를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer 10 mL에 1 mg/mL naphthol AS-MX phosphate와 N,N-dimethylformamide 100 µL를 첨가하여 염색액을 제조한 후 10% formaldehyde로 고정한 cell에 염색액을 45 µL씩 분주하고 항온기에서 30분 동안 방치하여 현미경으로 관찰하였다.

통계처리

실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 군간의 유의성 검정은 SAS program을 이용하여 5% 수준에서 Duncan's multiple range test 및 대조군과 추출물 처리군의 Student's t-test로 비교하였다. 통계처리 후 p값이 0.05 미만일 경우와 p값이 0.01 미만일 경우, p값이 0.001 미만일 경우 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

아보카도 추출물의 조골세포 증식 및 ALP 활성에 미치는 영향

MC3T3-E1세포는 mouse calvaria로부터 유래한 osteoblastic cell로 생체 내에서 일어나는 조골세포의 증식, 분화, 석회화 등의 유사한 대사적 특징을 가지고 있으며, 특히 세

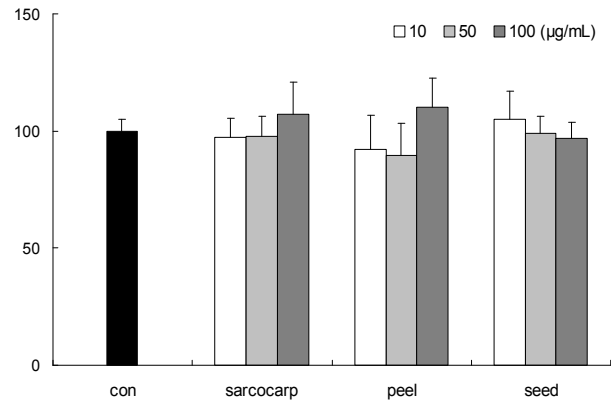


Fig. 1. Effect of methanol extracts from sarcocarp, peel and seed of avocado on the proliferation of MC3T3-E1 cells by the MTT assay. The MC3T3-E1 cells were cultured with 10~100 µg/mL of avocado extracts for 48 hr. Results were presented as means±SD (n≥3).

포막에 당단백질인 ALP를 가지고 있어 골 형성과 관련된 연구에서 유용하게 사용된다(9,31,32).

아보카도 과육, 과피 및 씨 추출물의 MC3T3-E1세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 이들 추출물 모두 10~100 µg/mL의 농도에서 90% 이상의 높은 세포 생존율을 보여 세포독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1). 특히 100 µg/mL의 아보카도 과피 추출물 처리에서 110.2±12.1%의 가장 높은 세포 생존율을 보였다. 이는 아보카도의 항산화 활성 보고(26)에 따르면 아보카도 과피에는 주요 항산화 성분인 폴리페놀 함량이 223.5±19.2 µg/mg이고, 그 외 과육 13.9±4.9 µg/mg, 씨 137.2±9.7 µg/mg으로 측정되어 과피의 항산화 활성이 가장 우수하였다. 따라서 아보카도 과피에서 조골세포의 성장이 가장 증가한 것으로 보인다.

한편 조골세포의 세포막에 존재하는 ALP는 세포의 외막과 석회화 조직에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자 역할을 하며 조골세포 활성의 표지인자로 널리 알려져 있다(33).

아보카도 추출물이 조골세포의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 ALP 활성을 측정한 결과, 아보카도 과피 및 씨 추출물에서는 처리 농도가 증가할수록 ALP 활성이 증가하였으나, 아보카도 과육 추출물의 경우 처리 농도가 증가할수록 ALP 활성은 감소하였다(Fig. 2). 그리고 아보카도 씨 추출물에서는 121.1±12.6% 이상의 ALP 활성이 증가하였지만 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았고, 50~100 µg/mL의 아보카도 과피 추출물의 처리 시에는 대조군에 비해 ALP 활성이 유의적으로 증가(p<0.05)하였다. 특히 100 µg/mL의 아보카도 과피 추출물의 처리 시 ALP 활성이 대조군에 비해 135.3±13.2% 이상으로 가장 크게 증가함을 알 수 있었다. 이는 자두의 폴리페놀화합물이 조골세포의 활성을 증가시키고(34), 녹차의 epigallocatechin-3-gallate(EGCG)도 조골세포 분화의 초기 마커인 ALP 활성을 증가시켜 골 형성에 관여한다는 보고(35)처럼, 아보카도의 과피 및 씨 추

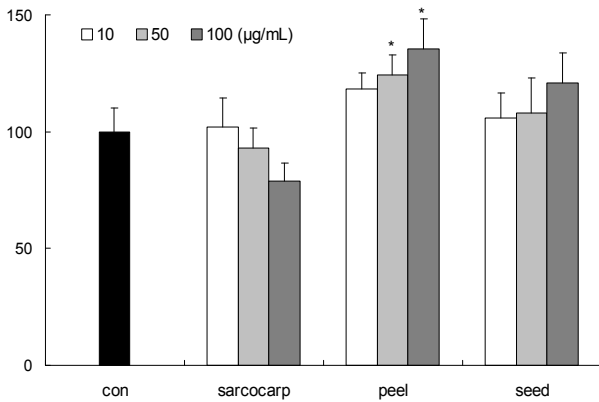


Fig. 2. Effect of methanol extracts from sarcocarp, peel and seed of avocado on the alkaline phosphatase activities of the MC3T3-E1 osteoblastic cells during the differentiation. Cells were cultured with avocado extracts (10~100 µg/mL), 50 µg/mL vitamin C and 10 mM β-glycerol phosphate for 72 hr in 96-well plates. After cultured for 3 days, cells were measured alkaline phosphatase (ALP) activities. Results were presented as means ± SD (n≥3). *p<0.05.

출물은 과육 추출물보다 폴리페놀 함량이 10~20배 정도 많이 존재(26)하여 조골세포 증식 및 ALP 활성이 더 우수한 것으로 생각되었다. 또한 천문동 추출물(28), 황금 추출물(36)에서 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰다는 보고와 유사하게 아보카도 추출물도 ALP 활성을 가짐을 확인하였다.

따라서 아보카도 과피 및 씨 추출물은 조골세포 증식 및 ALP 활성을 높이는 소재로 생각되었다.

아보카도 추출물의 파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향

파골세포는 조혈모세포(hematopoietic precursor)에서 유래하여 단핵 대식세포로부터 분화되며, 일반적으로 macrophage stimulating factor(M-CSF)와 tumor necrosis factor(TNF)-related activation-induced cytokine(TRANCE, RANKL or ODF) 두 가지 cytokine에 의하여 조절된다(37). 따라서 본 연구에서는 마우스의 골수세포를 분리하여 M-CSF와 RANKL을 이용하여 파골세포 분화를 유도하였다.

마우스 골수세포를 이용하여 아보카도 추출물의 세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과(Fig. 3), 100 µg/mL의 아보카도 과육 추출물에서 대조군에 비해 50% 이하의 낮은 세포 생존율을 보였으나, 10~50 µg/mL의 과육 추출물에서는 세포독성이 나타나지 않았다. 반면 아보카도 과피 추출물의 경우에는 처리 농도별 차이 없이 대조군에 비해 높은 세포 생존율을 보여 파골세포에 대한 독성이 없음을 알 수 있었다. 그러나 아보카도 씨 추출물의 경우 가장 낮은 농도인 10 µg/mL의 처리 시에도 62.75±11.31% 정도의 생존율을 보였으며, 처리 농도를 50~100 µg/mL로 증가할수록 파골세포의 생존율이 크게 감소하여 세포 독성이 있음을 알 수 있었다.

파골세포는 분화가 진행되면서 단핵의 전파골세포를 형성하지만 세포가 융합되면 다핵의 성숙 파골세포를 형성하게 되고 이는 골 표면에 부착하여, 골을 흡수하는 작용을

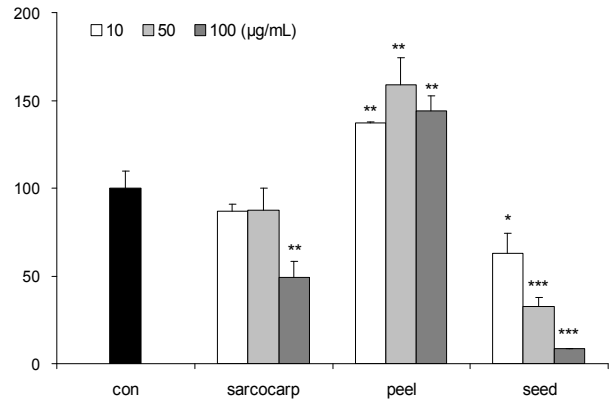


Fig. 3. Effect of methanol extracts from sarcocarp, peel and seed of avocado on the proliferation of mouse bone marrow osteoclastic cells by the MTT assay. The mouse bone marrow osteoclastic cells were cultured with 10~100 µg/mL of avocado extracts for 48 hr. Results were presented as means ± SD (n≥3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

한다(31,38). 또한 파골세포는 TRAP와 칼시토닌 수용체를 가지며, 산 생성이 활발한 특징을 가져 TRAP는 파골세포의 표지인자로 널리 사용되고 있다(38-40).

파골세포의 분화 형태를 측정하고자 TRAP 효소 활성을 측정한 결과, 아보카도 과육 추출물에서는 세포 독성을 보이지 않은 10~50 µg/mL의 농도에서는 30~65% 정도의 유의적으로 감소된(p<0.01) TRAP 활성을 보여 파골세포 분화가 억제됨을 보였다(Fig. 4). 또한 아보카도 과피 추출물은 세포독성이 없는 10 µg/mL 농도에서 TRAP 활성이 53.7±4.6%이었고, 50, 100 µg/mL의 농도에서는 각각 15.3±5.7%, 4.7±0.6%의 TRAP 활성을 보여 파골세포의 분화가 유의적으로 크게 억제됨(p<0.01)을 확인하였다. 아보카도 씨 추출물의 경우 처리 농도와 관계없이 90~97% 정도의 유의적으로 높은(p<0.01) TRAP 활성 억제를 보였으나, 이는 아보카도 씨 추출물의 파골세포에 대한 독성으로 인해 배양기간 동

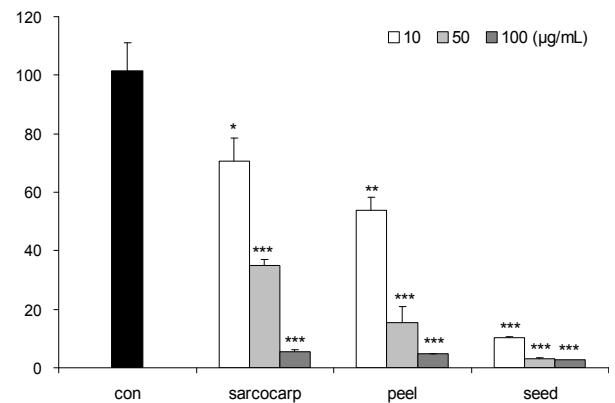


Fig. 4. Effect of methanol extracts from sarcocarp, peel and seed of avocado on the TRAP activities of the mouse bone marrow osteoclastic cells during the differentiation. Cells were cultured with avocado extracts (10~100 µg/mL), RANKL (100 ng/mL) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, 100 ng/mL) for 72 hr in 96-well plates. Results were presented as means ± SD (n≥3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

안 골수세포의 세포사멸을 유도하여 파골세포의 형성이 감소되어 상대적으로 높은 TRAP 활성 억제 효과가 나타난 것으로 생각된다. 따라서 아보카도 씨 추출물의 경우 조골세포에 대해서는 ALP 활성을 증가시켰으나 파골세포에 대해서는 세포 독성이 있음을 확인하였다.

생약제인 우슬, 현호색 추출물의 경우 10 µg/mL 농도에서 세포독성 없이 TRAP 활성이 24~28% 정도로 보고된 결과 (41)와 비교해서, 아보카도 과피 추출물은 100 µg/mL 농도에서도 세포독성 없이 TRAP 활성을 4.7±0.6%로 낮추어 파골세포의 분화를 크게 억제하는 우수 소재로 생각된다.

아보카도 과피 분획물의 조골세포의 증식 및 활성에 미치는 영향

아보카도 과피 추출물은 조골 및 파골세포에 대해 독성이 없으면서 우수한 활성을 보여 이를 순차 분획하여 분획물을 제조하였다.

먼저 아보카도 과피 분획물의 조골세포 증식에 미치는 영향을 살펴보면 Table 1과 같이, 아보카도 과피의 핵산 분획 100 µg/mL의 처리 농도에서만 54.1±5.3%의 세포 증식능을 보여 세포독성이 있었으나, 다른 분획물에서는 시료 농도에 관계없이 90% 이상의 세포 증식능을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다. 특히 아보카도 과피 부탄올 분획 50 µg/mL와 아보카도 과피 물 분획 10 µg/mL 처리에서는 125% 정도의 높은 세포 증식능을 보였다.

또한 아보카도 과피의 분획물 중 핵산 분획에서 ALP 활성이 가장 크게 증가하였고, 특히 조골세포에 대해 독성이 없는 50 µg/mL의 핵산 분획 처리에서 170.7±8.4%의 ALP 활성이 유의적으로(p<0.001) 크게 증가함을 확인하였다. 그리고 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획 10 µg/mL에서도 128.9±12.0%의 유의적인(p<0.05) ALP 활성을 확인하였으나, 다른 분획물에서는 ALP 활성을 보이지 않았다. 따라서

아보카도 과피의 핵산 분획은 ALP 활성을 가장 높게 유도하였고, 아보카도 과피의 부탄올 분획은 조골세포의 증식을 높이는 것을 확인하였다.

한편 아보카도 과피의 추출물 및 분획물을 조골세포에 처리하여 배양시간 증가에 의한 ALP 활성도 차이가 있는지를 조사하였다. 이때 시료처리 농도는 조골세포의 증식을 저해하지 않는 10, 50 µg/mL로 처리하였다. 그 결과, 아보카도 과피 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획의 경우에는 배양시간이 증가할수록 ALP 활성이 약간 증가하는 경향으로 활성 정도는 미미하였다(Data not shown).

그러나 아보카도 과피 추출물은 Fig. 5A와 같이 처리 농도에 관계없이 배양시간이 증가할수록 ALP 활성이 증가하였고, 배양 9일째에는 50 µg/mL 농도 처리 시 약 132.08±12.5% 활성을 보였고, 10 µg/mL 처리 시 조금 낮은 114.41±12.1%의 ALP 활성을 보였다. 그 후 12일째에는 과피 추출물 10 µg/mL 처리에서 208.52±16.4%의 가장 높은 ALP 활성을 보였고, 50 µg/mL 농도 처리에서도 182.2±14.3%의 ALP 활성을 보였으며 이들 시료 농도에 의한 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그리고 아보카도 과피 핵산 분획의 경우에도 처리 농도에 관계없이 배양시간이 증가할수록 ALP 활성이 증가하였고, 배양 3일째에 50 µg/mL의 처리에서 10 µg/mL 처리보다 유의적으로(p<0.01) ALP 활성이 증가하였다(Fig. 5B). 그러나 배양시간이 증가할수록 아보카도 핵산 분획 10 µg/mL 처리 시에 ALP 활성이 점차 증가하여 배양 12일째에는 ALP 활성이 261.9±21.8%로 가장 유의적으로(p<0.001) 높은 증가를 보였다. 또한 아보카도 과피 핵산 분획은 배양기간이 증가할수록 아보카도 과피 메탄올 추출물보다도 더 높은 ALP 활성을 나타내었다. 이는 아보카도 핵산 분획에는 지질성분이나 극성이 낮은 단일불포화 지방산 등이 많이 함유(26)하고 있고, 그중에서도 β-sitosterol이 비타민 D의 전

Table 1. Effect of avocado peel fractions on the proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activities in MC3T3-E1 osteoblastic cells and the proliferation and TRAP activities in the mouse bone marrow (BM) osteoclastic cells

Treatment	µg/mL	MC3T3-E1		BM	
		Proliferation (%)	ALP activity (%)	Proliferation (%)	TRAP activity (%)
Control	0	100.0±0.2	100.0±1.2	100.0±1.2	100.0±0.2
Hexane fr.	10	91.67±2.52	125.41±9.24**	23.04±0.90	—
	50	90.83±4.10	170.68±8.40***	22.77±0.59	—
	100	54.10±5.30	— ¹⁾	25.56±2.82	—
EtOAc fr.	10	104.22±6.34	128.86±11.95*	182.71±7.33	12.11±3.25***
	50	115.19±19.16	101.73±15.04	222.37±11.21	5.16±0.26***
	100	91.25±17.43	85.21±12.70	143.82±37.17	4.32±0.24***
BuOH fr.	10	102.62±3.44	75.52±7.09**	180.36±17.27	29.98±8.25***
	50	124.49±19.29	71.84±9.56**	234.86±30.63	12.85±2.16***
	100	114.87±3.84	65.14±5.25***	212.51±20.69	4.76±0.23***
Water fr.	10	124.39±35.11	100.57±10.20	126.79±10.24	67.59±9.96**
	50	91.74±0.51	89.62±9.50	138.01±19.93	39.53±3.63***
	100	92.48±8.39	83.78±9.93*	150.70±28.11	23.78±5.48***

¹⁾Not detected.

Each value is expressed as means±SD (n≥3).

Mean value was significantly different from that of the control (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

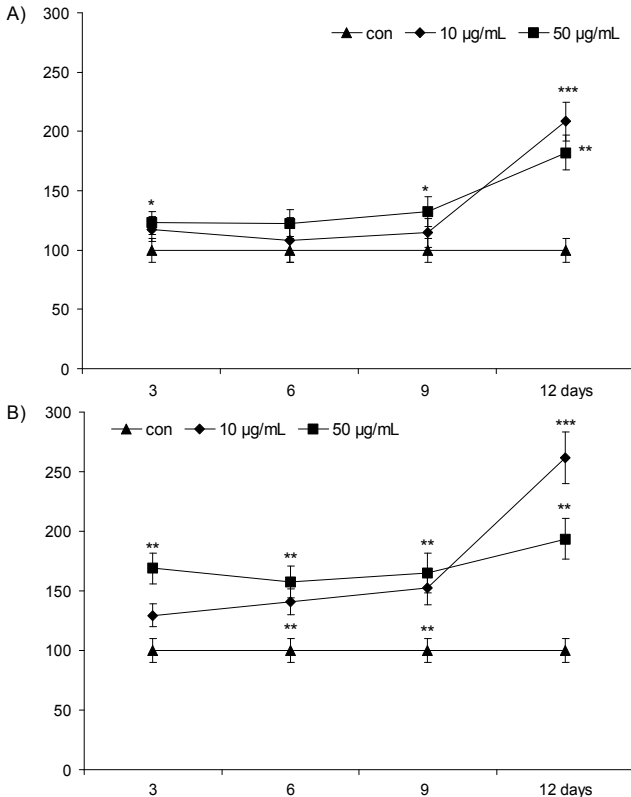


Fig. 5. Effect of methanol extracts (A) and hexane fraction (B) from avocado peel on the alkaline phosphatase activities of the MC3T3-E1 osteoblastic cells during the differentiation. Cells were cultured with sample, 50 µg/mL of vitamin C and 10 mM of β-glycerol phosphate in 96 well plates. ALP activity in cell layers was determined at 3, 6, 9 and 12 days. Mean value was significantly different from that of the control (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

구물질로서 조골세포 증식에 영향을 줄 것으로 추측된다. 그리고 머리 추출물을 MC3T3-E1 조골세포에 처리하면 14 일째까지는 ALP 활성이 증가하다가 그 이후 감소한다는 보고(42)와 유사하게 아보카도 추출물 및 핵산분획의 처리 시에도 배양 12일째 ALP 활성이 증가한 것으로 보인다. 따라서 아보카도 과피 핵산 분획은 조골세포의 증식과 활성화에 효과가 있음을 확인하였다.

아보카도 과피 분획물의 파골세포의 증식 및 활성화에 미치는 영향

아보카도 과피 분획물에 대한 파골세포 증식 및 TRAP 활성을 검토한 결과는 Table 1과 같이, 아보카도 과피 핵산 분획을 제외한 다른 분획물에서는 파골세포에 대한 세포독성이 없음을 확인하였다. 핵산 분획의 경우 조골세포에 대해 가장 높은 ALP 활성을 가진 반면 파골세포에 대해서는 시료 농도에 관계없이 25% 정도의 세포 생존율을 나타내어 강한 세포 독성을 보였다. 또한 아보카도 과피의 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획의 경우 시료처리 농도가 증가할수록 TRAP 활성이 농도 의존적으로 감소하였고, 특히 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획은 가장 낮은 농도에서도 TRAP 활성

이 12.1±3.3%로 높았으며, 50~100 µg/mL의 농도에서는 각각 5.2±0.3%, 4.3±0.2%의 TRAP 활성을 보여 파골세포의 분화가 가장 크게 억제되었다(Table 1). 그리고 아보카도 과피 부탄올 분획 100 µg/mL의 처리 농도에서 4.8±0.2%의 유의적으로(p<0.05) 높은 TRAP 활성을 보여 파골세포 분화가 크게 억제되었고, 아보카도 과피 물 분획 50~100 µg/mL의 처리에서도 20~40% 정도의 TRAP 활성을 보여 파골세포의 분화를 억제함을 알 수 있었다. 따라서 아보카도 과피의 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획은 파골세포에 대해 TRAP 활성을 저해하였으며, 특히 에틸아세테이트 분획은 파골세포에 대한 TRAP 활성을 가장 크게 저해함을 확인하였다. 즉 아보카도 과피의 에틸아세테이트 분획에는 색소류와 폴리페놀류, 카르티노이드류 등의 항산화 성분들이 많이 함유(43)되어 있어 이들 성분들이 파골세포 활성 억제에 영향을 준 것으로 사료된다.

이에 파골세포에 대한 저해활성이 우수한 아보카도 과피 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획을 파골세포에 대한 독성이 나타나지 않은 10, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리한 후, TRAP 활성과 함께 TRAP 염색법을 이용하여 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하였다.

그 결과 아보카도 과피 추출물은 Fig. 6과 같이 세포 독성은 관찰되지 않았으며, 대조군과 비교하여 아보카도 과피 추출물 25 µg/mL 처리 시 약 65% 이상 유의적으로(p<0.05) TRAP 활성이 억제되었다. 그리고 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획에서는 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가되었으며, 50 µg/mL 농도에서는 대조군에 비하여 약 2배 이상의 세포 증식을 높이는 것으로 확인되었다(Fig. 7). 또한 대조군과 비교하여 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획 10 µg/mL 처리 시에도 약 60% 이상의 유의적인(p<0.01) TRAP 활성 억제를 보였고, 25~50 µg/mL 처리 시에도 유의적인(p<0.01) TRAP 활성이 저해됨을 확인하였다(Fig. 7). 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획은 높은 파골세포의 증식에도 불구하고 파골세포 분화를 효과적으로 억제하였다. 이는 파골분화 단계에서의 세포 생존율을 높이면서도 TRAP 활성은 억제하는 것으로 보아, 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획은 파골세포로의 분화는 저해하지만 macrophage의 생존율은 높여 면역기능을 향상(44)시킬 것이라고 생각된다.

한편 아보카도 과피 추출물 및 에틸아세테이트 분획을 처리한 후 TRAP 염색을 통하여 파골세포를 염색하고 핵의 수를 계수한 결과, 이들 시료의 처리 후 핵의 수가 농도 의존적으로 감소하였으며, 50 µg/mL 처리 시에는 다핵의 파골세포를 거의 관찰할 수가 없었다(Fig. 6, 7). 그리고 아보카도 과피 추출물과 에틸아세테이트 분획의 처리에 의한 큰 차이도 보이지 않았다.

따라서 아보카도 과피는 조골세포의 증식과 파골세포의 억제에 관여할 수 있는 우수한 소재로 향후 골다공증의 치료제로서의 개발 가능성을 가진 천연물 소재로 생각된다.

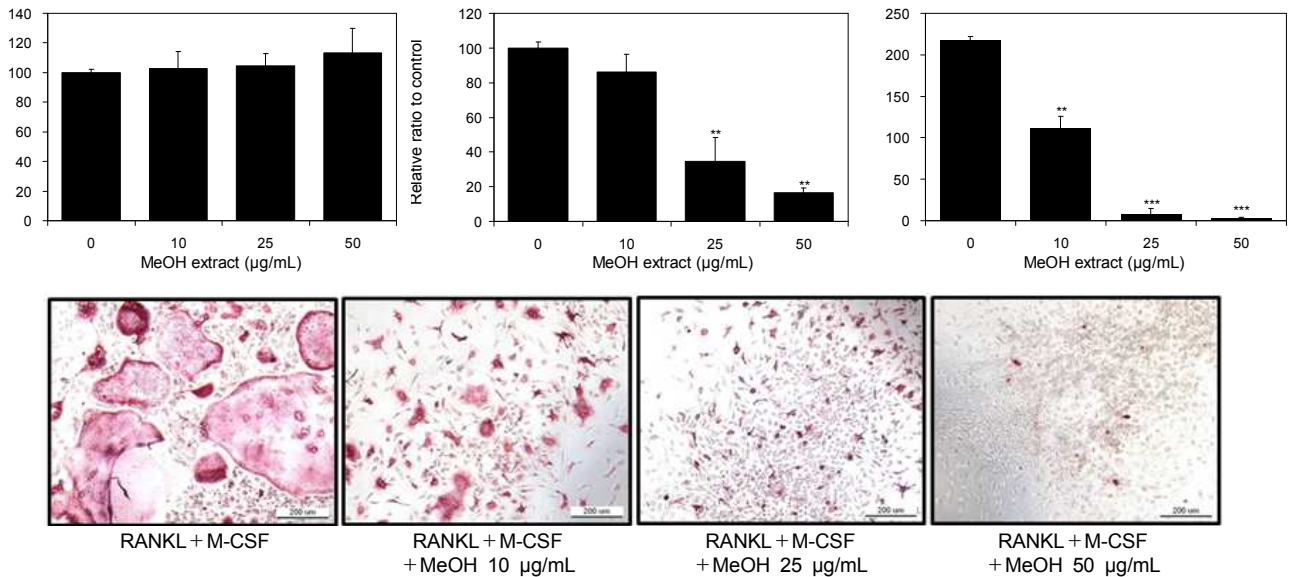


Fig. 6. Effect of methanol extracts from avocado peel on RANKL-induced osteoclast formation in mouse BMMs. Mouse BMMs were cultured with RANKL (100 ng/mL), M-CSF (100 ng/mL) and with or without avocado peel extracts. After cultured for 3 days, the cell viability and TRAP activity were determined. The cells were also fixed and stained for TRAP. The number of osteoclast was determined by number of multi-nuclei cells having at least 3 nuclei, trap positive cells. Results were presented as means \pm SD (n \geq 3). **p < 0.01, ***p < 0.001.

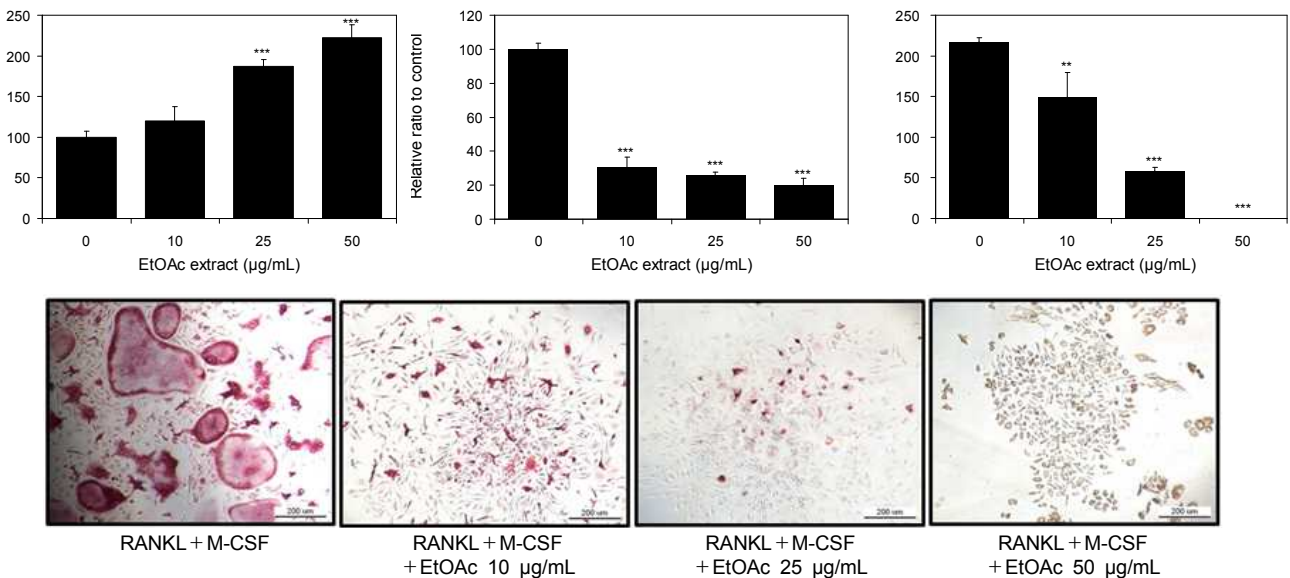


Fig. 7. Effect of ethyl acetate fr. from avocado peel on RANKL-induced osteoclast formation in mouse BMMs. Mouse BMMs were cultured with RANKL (100 ng/mL), M-CSF (100 ng/mL) and with or without avocado peel ethyl acetate fraction. After cultured for 3 days, the cell viability and TRAP activity were determined. The cells were also fixed and stained for TRAP. The number of osteoclast was determined by number of multi-nuclei cells having at least 3 nuclei, trap positive cells. Results were presented as means \pm SD (n \geq 3). **p < 0.01, ***p < 0.001.

요 약

본 연구에서는 아보카도가 골 형성에 미치는 영향을 검토하고자 아보카도 과육, 과피 및 씨로 나누어 각각 메탄올 추출물을 제조하여 osteoblastic MC3T3-E1 cells을 이용한 골 형성능과 마우스 골수 세포로부터 유래된 파골세포를 이용한 골 흡수능을 측정하였다. 아보카도 과육 추출물을 제외

한 과피 및 씨 추출물은 조골세포의 증식 및 ALP 활성을 증가시켰으며, 파골세포에 대해서는 아보카도 과육 및 과피 추출물에서 세포독성 없이 TRAP 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 또한 아보카도 과피의 핵산 분획은 조골세포의 증식 및 ALP 활성을 크게 증가시켰으며, 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획은 파골세포의 분화지표인 TRAP 활성을 크게 억제하였다. 따라서 아보카도 과피는 조골세포의

증식과 파골세포의 억제에 관여할 수 있는 우수한 소재로 향후 골다공증의 치료제로서의 개발 가능성을 가진 천연물 소재로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2011년 교육과학기술부(지역거점 연구단육성 사업/노화극복·웰빙을 위한 융합의료기술개발 사업단)로부터 지원받아 수행되었음에 감사드립니다.

문헌

1. Cho GJ, Park HT, Shin JH, Kim T, Hur JY, Kim YT, Lee KW, Kim SH. 2009. The relationship between reproductive factors and metabolic syndrome in Korean postmenopausal women: Korea National Health and Nutrition Survey. *Menopause* 16: 998-1003.
2. Parfit AM. 1988. Bone remodeling: relationship to the amount and structure of bone the pathogenesis and prevention of fractures. In *Osteoporosis, Etiology, Diagnosis and management*. Reven Press, New York, NY, USA. p 45-93.
3. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. 1994. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266: 443-448.
4. Hwang KK, Huh NK, Lee JH. 2000. Studies on the signaling molecules in RANK, an osteoclast differentiation receptor. *Oral Biol Res* 24: 245-255.
5. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113: 377-381.
6. Suda TJ, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. 1997. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 12: 869-879.
7. Del Fattpre A, Teti A, Rucci N. 2008. Osteoclast receptors and signaling. *Arch Biochem Biophys* 473: 147-160.
8. Oh HJ. 2005. Therapy of osteoporosis in climacteric. *J Korea Acad Fam Med* 21: 20-27.
9. Pols HA, Felsenberg D, Hanley DA, Stenpan J, Munoz-Torres M, Wilkin TJ, Qin-sheng G, Galich AM, Vandormael K, Yates AJ, Stych B. 1999. Multinational, placebo-controlled, randomized trial of the effects of alendronate on bone density and fracture risk in postmenopausal women with low bone mass: results of the FOSIT study. Fosamax International Trial Study Group. *Osteoporos Int* 9: 461-468.
10. Cassidy A. 1996. Physiological effects of phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc Nutr Soc* 55: 399-417.
11. Boonen S, Broos P, Dequeker J, Bouillon R. 1997. The prevention or treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy (rhIGF-I or rhTGF beta): a perspective. *J Intern Med* 242: 285-290.
12. Han KY, Yang D, Chang EJ, Lee Y, Huang H, Sung SH, Lee ZH, Kim YC, Kim HH. 2007. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone. *Biochem Pharmacol* 74: 911-923.
13. Kim JH, Ki JY, Ann JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. 2010. Inhibitory effects of *Achyranthis bidentatae* Radix on osteoclast differentiation and bone resorption. *Kor J Herbology* 25: 65-74.
14. Kwak HB, Kim JH, Kim DJ, Kwon YM, Oh JM, Kim YK. 2008. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. *Kor J Ori Med Physiol Pathol* 22: 891-895.
15. Park CK, Kim HJ, Kwak HB, Lee TH, Bang MH, Kim CM, Lee Y, Chung DK, Baek NI, Kim J, Lee ZH, Kim HH. 2007. Inhibitory effects of *Stewartia koreana* on osteoclast differentiation and bone resorption. *Int Immunopharmacol* 7: 1507-1516.
16. Tsai HY, Lin HY, Fong YC, Wu JB, Chen YF, Tsuzuki M, Tang CH. 2008. Paeonol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by inhibiting ERK, p38 and NF-kB pathway. *Eur J Pharmacol* 588: 124-133.
17. Wattel A, Kamel S, Mentaverri R, Lorget F, Prouillet C, Petit JP, Fardelonne P, Brazier M. 2003. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochem Pharmacol* 65: 35-42.
18. Lee YS. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Korea Soybean Digest* 18: 35-42.
19. 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.
20. Ding H, Chin YW, Kinghorn AD, D'Ambrosio SM. 2007. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Semin Cancer Biol* 17: 386-394.
21. Duester KC. 2001. Avocado fruit is a rich source of beta-sitosterol. *J Am Diet Assoc* 101: 404-405.
22. Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Takeda N, Yoshizumi H, Ohgashi H. 2001. Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. *J Agric Food Chem* 48: 1557-1563.
23. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 49: 5315-5321.
24. 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.
25. Pursky 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 *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Phytopathol* 132: 319-327.
26. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. 2008. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 269-275.
27. Soong YY, Barlow PJ. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem* 88: 411-417.
28. Kim JW, Lee HJ, Kang J, Ohk SH, Choi BK, Yoo YJ, Cho KS, Choi SH. 2000. The effect of cyclosporin A on osteoblast *in vitro*. *J Korean Acad Periodontol* 30: 747-757.
29. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods* 70: 257-268.
30. Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. 2002. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem* 277: 47366-47372.
31. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. 1987. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication

- and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262: 2869-2874.
32. Letton RW, Fanti P, Malluche HH. 1990. Regulation of 25-hydroxy vitamin D₃ metabolism in cultures of osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 5: 815-823.
 33. Stein GS, Lian JB, Owen TA. 1990. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4: 3111-3123.
 34. Bu SY, Hunt TS, Smith BJ. 2009. Dried plum polyphenols attenuate the detrimental effects of TNF- α on osteoblast function coincident with up-regulation of Runx2, Osterix and IGF-I. *J Nutr Biochem* 20: 35-44.
 35. Vali B, Rao LG, El-Sohemy A. 2007. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem* 18: 341-347.
 36. Shin JM, Park CK, Shin E, Jo TH, Hwang IK. 2008. Effects of *Scutellaria radix* extract on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J Food Sci Technol* 40: 674-679.
 37. Teitelbaum SL. 2000. Bone resorption by osteoclast. *Science* 289: 1504-1508.
 38. Mok SK, Shin IIS. 1996. The effects of prostaglandin and dibutyryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoblast generation. *J Wonkwang Dental Res Int* 6: 43-62.
 39. Karst M, Gorny G, Galvin RJ, Oursler MJ. 2004. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF- β regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol* 200: 99-106.
 40. Vaananen HK, Horton M. 1995. The osteoclast clear zone is a specialized cell extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 108: 2729-2732.
 41. Lee JW. 2009. Inhibitory activity of medicinal plants against differentiation of osteoclasts. *Kor J Pharmacogn* 40: 83-88.
 42. Ji SH, Ahn DH, Jun MR. 2010. Effects of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* L. extracts on MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 203-209.
 43. Woo WS. 2001. *Methods for natural products chemistry*. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p 1-29.
 44. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Rev Immunol* 27: 669-692.

(2011년 3월 14일 접수; 2011년 6월 27일 채택)