(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0069368
(43) 공개일자 2012년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/54 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0130884
(22) 출원일자 2010년12월20일
심사청구일자 2010년12월20일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김현정
대구광역시 수성구 교학로11길 46, 만촌우방1차 103동 1602호 (만촌동)
임남경
대전광역시 대덕구 중리동 중리시영2차 12동 103호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김승진, 양부현

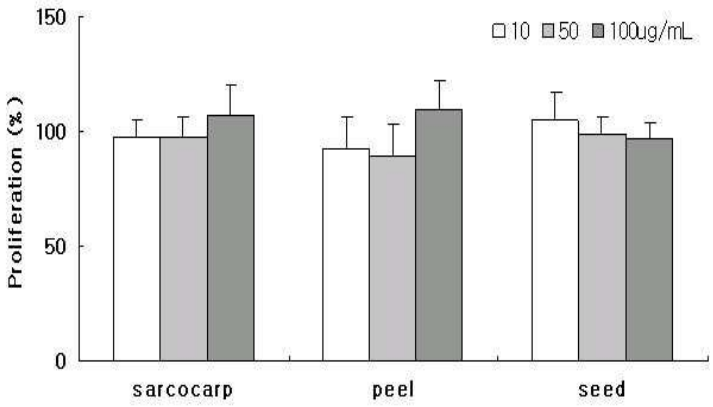
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **아보카도 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 아보카도 추출물은 조골세포(osteoblast)의 증식 및 ALP(alkaline phosphatase)의 활성을 크게 증가시켜 골형성을 촉진하며, 파골세포(osteoclast)의 분화과정을 저해함으로써 골흡수를 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 아보카도 추출물은 파골세포와 조골세포의 활성, 증식 및 분화의 균형이 깨어짐으로써 발생되는 질환, 예컨대 골다공증과 같은 골대사성 질환의 예방 또는 치료용 약물로 개발될 수 있으며, 골형성 촉진용 기능성식품으로도 개발될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김미진

대구광역시 서구 북비산로75길 5-1 (비산동)

김혁일

대구광역시 달서구 선원남로 181, 성서5주공 503동 902호 (용산동)

이인선

대구광역시 수성구 청수로 261, 롯데화성캐슬골드파크 1416동 1803호 (황금동)

특허청구의 범위

청구항 1

아보카도(Persea americana Mill.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증(osteoporosis) 또는 골감소질환(osteopenia)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 아보카도 추출물은 아보카도의 과피, 과육 또는 씨로부터 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 아보카도 추출물은 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름, 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 아보카도 추출물은 총 조성물 중량에 대해 0.001 - 10중량%의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

아보카도(Persea americana Mill.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골형성 촉진용 기능성 식품 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 아보카도 추출물은 아보카도의 과피, 과육 또는 씨로부터 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 아보카도 추출물은 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름, 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아보카도 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골다공증(osteoporosis)은 유전적 요인이나 식이나 생활방식과 같은 환경적 요인에 의해 영향을 받는 복합적인 질병이다. 2008년 질병관리본부의 국민건강 영양조사 결과 발표에 따르면 우리나라 50세 이상의 골다공증 유병률은 전체인구의 19.3%, 남자가 4.9%, 여자가 32.6%로 나타났으며, 특히 여성이 남성보다 6배 높은 유병률을 보였다[5]. 이처럼 급속한 노령화로 인한 골다공증은 사회적, 의학적 관심에서 사회문제로까지 부상하고 있다[30].

[0003] 골다공증은 골형성(bone formation)과 골흡수(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[11,16,18,39]. 특히 노화와 관련한 골 질환이나, 폐경으로 인한 골다공증은 골의 형성에 관여하는 조골세포 보다 파골세포에 의한 골흡수가 과도하여 골 항상성이 깨어질 때 발생한다[7].

[0004] 골 질환 발생 시 손실된 뼈를 원상태로 재생하는 것은 사실상 어려우며, 일반적으로는 뼈의 소실이 더 이상 진행되지 않게 치료하는 방법을 많이 사용하고 있다[30]. 임상에서는 골 흡수 억제제로 에스트로겐, 칼시토닌, 비스포스포네이트 제제가 많이 사용되고 있다[34]. 하지만 비스포스포네이트의 경우 사용상의 번거로움과 다소 낮은 치료효과 및 부작용의 사례가 나타났고, 또한 에스트로겐 처방도 골량 유지에는 효과적이나 60세 이상의 고령층에서는 골량 감소 억제효과가 폐경 초기에 비하여 낮으며, 불규칙한 자궁 출혈이나 유방암 등의 합병증에 대한 위험이 있는 것으로 보고되었다[1, 2].

[0005] 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 RANKL로 유도된 파골세포 분화 및 골 손실을 억제하고[12,20,22,32,41], 또한 식물 유래의 폴리페놀화합물인 퀴세르틴(quercetin)과 녹차의 카테킨 성분중 하나인 EGCG가 파골세포의 골 흡수억제 효과를 가지며[45], 대두 및 콩류가 조골세포 활성을 증가함이 보고되기도 하였다[27].

[0006] 한편, 아보카도(Persea americana Mill.)는 멕시코와 중앙아메리카 일대에서 유래되었다[14]고 알려진 과일로서, 전 세계적으로 널리 소비되고 있다. 아보카도는 20 여종의 필수 영양소와 다양한 피토케미칼(phytochemical)을 함유하고 있다[8]. 즉 식용되는 부분의 지질함량이 25% 정도로서 단일불포화지방산이 많이 함유되어 있고, 카르테노이드(carotenoids), 비타민(vitamin) B, 비타민 C, 비타민 E, 테르페노이드(terpenoids), 시토스테롤(sitosterol), 페르세논(persenone) A, 페르세논 B, 페놀(phenol) 등이 함유되어 있다[9,21,44]. 또한 아보카도는 항산화 작용, 아세틸 CoA 카르복실라아제 저해, 항균활성 등이 보고[13,21,35]되었다. 특히 아보카도의 과육보다 씨 및 껍질에서 폴리페놀 함량이 10~20배 정도 많이 존재하고 높은 항산화능을 가지며[25,37], 또한 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 대해 케스페이즈-3 (caspase-3) 발현을 유도하여 아포토시스(apoptosis, 세포사멸)에 영향을 준다고 보고[25]되었다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 천연물로부터 골다공증과 같은 골대사성 질환의 치료제 및 예방제를 개발하기 위해 예의 연구노력하였다. 그 결과, 아보카도(*Persea americana* Mill.)로부터 얻은 추출물이 조골세포의 증식을 촉진하며 파골세포의 분화를 억제함으로써 골대사성 질환의 치료 및 예방뿐 만 아니라, 골 기능 개선용 기능성 식품 소재로 개발될 가능성이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 아보카도 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 또는 골감소질환의 치료 또는

예방용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 아보카도 추출물을 유효성분으로 포함하는 골형성 촉진용 기능성 식품 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0011] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 아보카도(Persea americana Mill.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증(osteoporosis) 또는 골감소질환(osteopenia)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에서 아보카도 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 아보카도 추출물은 아보카도의 모든 부분으로부터의 추출물을 포함하는 의미이나, 바람직하게는 아보카도의 과피, 과육 또는 씨로부터 추출한 추출물이다.

[0015] 본 발명의 아보카도 추출물을 추출하기 위한 추출 용매로는 천연물 추출공정에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매를 사용할 수 있으며, 둘 이상의 서로 다른 용매를 순차적으로 사용하여 추출할 수도 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 아보카도 추출물은 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름, 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매 추출물이며, 보다 바람직하게는 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올 추출물이고, 가장 바람직하게는 메탄올 추출물이다.

[0017] 본 발명의 아보카도 추출물은 상기 용매에 의한 추출한 추출물을 추가적으로 정제하여 분리한 분획물도 포함하는 의미이다. 상기 추가적 분리는 바람직하게는 컬럼 크로마토그래피를 행하여 수행하며, 보다 바람직하게는 액체 컬럼 크로마토그래피를 이용한 크기배제(size-exclusion) 크로마토그래피, 이온교환(ion-exchange) 크로마토그래피, 분배 크로마토그래피, 친화(affinity) 크로마토그래피 또는 이들 크로마토그래피의 조합을 이용하여 분리 정제할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 다른 바람직한 일 구현예에 의하면, 아보카도 분획물은 상기 아보카도 추출물을 n-헥산, 에틸아세테이트, 또는 부탄올 용매로 추가 분획하여 얻은 분획물이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 의하면, 상기 아보카도 추출물은 총 조성물 중량에 대해 0.001 - 10 중량%의 농도로 포함되어 있다.

[0020] 하기 실시예에서 입증되는 바와 같이, 본 발명의 아보카도 추출물은 조골세포(osteoblast)의 증식과 ALP(alkaline phosphatase)의 활성을 크게 증가시키며, 파골세포(osteoclast)의 분화과정을 크게 억제한다.

[0021] 따라서, 본 발명의 조성물은 골다공증(osteoporosis) 및 관련된 골감소질환(osteopenia)의 치료 및 예방에 유용하다.

[0022] 본 발명의 조성물에 의해 치료, 예방 또는 개선 가능한 질환은 골다공증 및 골감소질환을 포함하며, 구체적으로, 폐경전후기간에 관련되는 골다공증, 페이젯병 (Paget's disease), 뼈종양(bone neoplasms)과 관련된 고칼슘혈증(hypercalcemia)을 포함하며, 다음과 같은 상이한 타입의 골다공성 질환 및 관련 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 갱년기 골다공증(involutional osteoporosis), 타입 I 또는 폐경후 골다공증, 타입 II 또는 노년성 골다공증(senile osteoporosis), 소아 골다공증(juvenile osteoporosis), 특발성 골다공증(idiopathic osteoporosis), 내분비 이상(endocrine abnormality), 갑상샘과다증(hyperthyroidism), 성선기능저하증(hypogonadism), 난소무발생증(ovarian agensis) 또는 터너 증후군(Turner's syndrome), 부신피질항진증(hyperadrenocorticism) 또는 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 부갑상샘항진증(hyperparathyroidism), 골수이상증(bone marrow abnormalities), 다발성 골수종(multiple myeloma) 및 관련 질환, 전신성 비만세포증(systemic mastocytosis), 파종 암종(disseminated carcinoma), 고세병(Gaucher's disease), 결합조직 이상증(connective tissue abnormalities), 골형성 부전증(osteogenesis imperfecta), 호모시스틴뇨증(homocystinuria), 엘러스-단로스 증후군(Ehlers-Danlos syndrome), 마르팡 증후군(Marfan's syndrome), 멘케

스 증후군(Menke's syndrome), 고정화(immobilization) 또는 무중력증(weightlessness), 수데크 위축증(Sudeck's atrophy), 만성폐쇄폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 만성 헤파린 투여(chronic heparin administration) 및 만성 항경련제 복용(chronic ingestion of anticonvulsant drugs).

[0023] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 이러한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0024] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.

[0025] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 아보카도(Persea americana Mill.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골형성 촉진용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0029] 상술한 바와 같이, 본 발명의 아보카도 추출물은 조골세포의 증식과 ALP(alkaline phosphatase)의 활성을 크게 증가시키며, 파골세포의 분화과정을 현저히 억제함으로써, 골형성을 촉진할 수 있다.

[0030] 본 바람직한 일 구현예에 의하면, 상기 아보카도 추출물은 아보카도의 과피, 과육 또는 씨로부터 추출한 추출물이다.

[0031] 본 발명의 다른 바람직한 일 구현예에 의하면, 아보카도 추출물은 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름, 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매 추출물이며, 보다 바람직하게는 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올 추출물이고, 가장 바람직하게는 메탄올 추출물이다.

[0032] 본 발명의 또 다른 바람직한 일 구현예에 의하면, 아보카도 분획물은 상기 아보카도 추출물을 n-헥산, 에틸아세테이트, 또는 부탄올 용매로 추가 분획하여 얻은 분획물이다.

[0033] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분으로서의 아보카도 추출물 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)을 이용할 수 있다.

발명의 효과

[0034] 이상에서 상세히 설명된 바와 같이, 본 발명의 아보카도 추출물은 조골세포(osteoblast)의 증식 및 ALP(alkaline phosphatase)의 활성을 크게 증가시켜 골형성을 촉진하며, 파골세포(osteoclast)의 분화과정을

저해함으로써 골흡수를 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 아보카도 추출물은 파골세포와 조골세포의 활성, 증식 및 분화의 균형이 깨어짐으로써 발생되는 질환, 예컨대 골다공증, 골감소질환과 같은 골대사성 질환의 예방 또는 치료용 약물로 개발될 수 있으며, 골형성 촉진용 기능성식품으로도 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 MTT 분석법에 의해 측정한 아보카도 과육, 과피 및 씨의 메탄올 추출물의 MC3T3-E1 세포 증식에 대한 영향을 측정한 결과이다. MC3T3-E1 세포를 10, 50, 100 ㎍/mL의 다양한 농도의 아보카도 추출물과 함께 배양하였다. 데이터는 대조군에 대한 백분율(%)으로 표시하였다.

도 2는 아보카도 과육, 과피 및 씨의 메탄올 추출물의 MC3T3-E1 조골세포의 분화과정 동안 ALP(alkaline phosphatase) 활성에 대한 영향을 측정한 결과이다. 세포를 아보카도 추출물, 50 ㎍/mL 비타민 C 및 10 mM의 β-글리세롤 포스페이트와 함께 72 시간 동안 96-웰 플레이트내에서 배양하였다. 3일간 추가 배양한 후, 세포들을 고정하고 ALP(alkaline phosphatase) 활성을 측정하였다.

도 3은 아보카도의 과육, 과피 및 씨의 메탄올 추출물의 마우스 골수 파골세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 분석법으로 측정한 결과이다. 마우스 골수 파골세포는 10-100 ㎍/mL의 아보카도 추출물과 함께 48시간 동안 배양하였다. 데이터는 대조군에 대비한 백분율(%)으로 표시하였다. 대조군과 대비한 $p<0.05$.

도 4는 아보카도 과육, 과피 및 씨의 메탄올 추출물의 마우스 골수 파골세포의 분화과정 동안 TRAP 활성에 대한 영향을 측정한 결과이다. 세포들을 96-웰 플레이트에서 RANKL(100 ng/mL) 및 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor) (100 ng/mL)의 존재 하에서 72 시간 동안 배양하였다.

도 5는 아보카도 과피의 메탄올 추출물(패널 A)과 헥산 분획(패널 B)의 MC3T3-E1 조골세포의 ALP(alkaline phosphatase) 활성에 대한 영향을 분화 과정 동안 측정한 결과이다. 세포를 아보카도 추출물, 50 ㎍/mL 비타민 C 및 10 mM의 β-글리세롤 포스페이트(glycerol phosphate)와 함께 72 시간동안 96-웰 플레이트내에서 배양하였다. 세포의 ALP (alkaline phosphatase) 활성은 각각 3, 6, 9 및 12일에 측정하였다.

도 6은 아보카도의 과피의 헥산 분획의 MC3T3-E1 조골세포의 ALP(alkaline phosphatase) 활성에 대한 영향을 측정한 결과이다. MC3T3-E1 세포들을 아보카도 과피 헥산 분획(10 ㎍/mL), 50 ㎍/mL 비타민 C 및 10 mM의 β-글리세롤 포스페이트(glycerol phosphate)의 존재 하에 96-웰 플레이트내에서 배양하였다. 세포를 3 일간 배양한 후, 세포를 고정시키고, ALP 염색을 행한 후, ALP(alkaline phosphatase) 활성을 특정하였다. ALP 염색후 위상차 현미경사진(X 20)을 찍어 관찰하였다.

도 7은 아보카도 과피 메탄올 추출물의 마우스 골수에서 M-CSF와 RANKL로 유도된 파골세포 형성에 대한 영향을 측정한 결과이다. 마우스 골수를 아보카도 과피 추출물의 존재 또는 부존재하에서 M-CSF (100 ng/mL) 및 RANKL (100 ng/mL)과 함께 배양하였다. 3일간 배양한 후, 세포 생존능 및 TRAP 활성을 측정하였다. 세포들을 고정하고, TRAP으로 염색하였다. 파골세포의 수는 적어도 3개의 핵을 갖는 다핵세포, TRAP 포지티브의 수를 측정하여 결정하였다. 결과는 평균±S.D.으로 표현하였다($n>3$).

도 8은 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획의 마우스 골수에서 M-CSF와 RANKL로 유도된 파골세포 형성에 대한 영향을 측정한 결과이다. 마우스 골수를 아보카도 과피 분획물의 존재 또는 부존재하에서 M-CSF (100 ng/mL) 및 RANKL (100 ng/mL)과 함께 배양하였다. 3 일간 배양한 후, 세포 생존능 및 TRAP 활성을 측정하였다. 세포들을 고정하고, TRAP으로 염색하였다. 파골세포의 수는 적어도 3개의 핵을 갖는 다핵세포, TRAP 포지티브의 수를 측정하여 결정하였다. 결과는 평균±S.D.으로 표현하였다($n>3$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0037] **실시예**

[0038] *재료 및 방법*

[0039] **1. 시료제조**

[0040] 본 실험에 사용된 아보카도는 대형마트에서 구입하여 깨끗이 수세한 후, 과육, 과피 및 씨를 분리하여 분쇄기로 각각 분쇄하고, 80% 메탄올로 3회 반복 추출하였다. 얻은 추출액은 여과지(No.3 filter paper, Whatman, Maidstone, UK)를 사용하여 여과하고, 로터리 증발기(rotary evaporator)(EYELA NVC-2000, Tokyo, Japan)로 농축하여 동결 건조하여 사용하였다. 한편, 아보카도 과피의 메탄올 추출물은 일정량의 물을 첨가하여 혼합한 후 분액여두를 이용하여 극성이 다른 추출용매인 n-헥산(n-hexane), 에틸아세테이트(ethylacetate), 부탄올(butanol)을 차례로 넣어 분획을 추출하였다. 이때 분리한 추출물 및 분획물은 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

[0041] **2. 세포배양**

[0042] 마우스 두개골 조골세포(Mouse calvaria osteoblast cell)인 MC3T3-E1 세포는 ATCC(CRL-2593, USA)로부터 분양받아 사용하였다. α-MEM (Gibco BRL, NY, USA)배지에 10% FBS (Gibco BRL, NY, USA)와 1%의 항생제(Gibco BRL, NY, USA)를 첨가하여 37℃의 5% CO_2 배양기에서 2-3일 마다 계대배양하고, 분화유도를 위해 5 mM β-글리세롤 포스페이트(glycerol phosphate)(Sigma, St. Louis, Mo, USA)와 50 mg/mL의 비타민 C(Sigma, St. Louis, Mo, USA)를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 3일 마다 배지를 교환하였다(23).

[0043] **3. 골수세포의 분리 및 파골세포 분화**

[0044] 4-5 주령 된 ICR 마우스의 경골(tibia)을 적출하여, 양끝을 절단하고 a-MEM 필수배지(essential medium)를 통과시켜 골수세포를 수집하고, 100 ng/mL M-CSF (macrophage-colony stimulation facto)을 처리하여 24시간 배양하였다. 미부착 세포를 a-MEM으로 세척한 후 96웰(well)에 5 X 10^4 세포/웰이 되도록 분주하고, 50 ng/mL의 M-CSF가 첨가된 a-MEM 배지에 3일간 배양하였다. 그 후 100 ng/mL의 M-CSF와 100 ng/mL의 RANKL(Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand)을 함께 처리하고, 시료를 농도별로 처리하여 4 일간 배양하였다.

[0045] **4. 세포 생존율 측정**

[0046] 시료의 세포독성을 측정하기 위해 Green[10] 등의 방법에 의한 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] 분석법을 사용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 배양한 세포를 0.4% 트리판 블루(trypan blue) 염색법으로 세포수를 측정한 후, 1 X 10^4 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 200 ㎕씩 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 α-MEM 배지 180 ㎕를 첨가한 후 각각의 농도별 시료를 각 웰에 20 ㎕씩 넣었다. 시료 첨가 후 48 시간 배양한 다음 MTT(5 mg/mL) 용액 10 ㎕를 각 웰에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 웰에 100 ㎕의 DMSO를 첨가하여 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0047] **5. 조골세포의 ALP(alkaline phosphatase) 활성과 염색**

[0048] 배양된 MC3T3-E1 세포를 1X10^4 세포/웰로 조정하여 96-웰 플레이트에 분주하고, 24시간 배양한 후 분화유도배지로 교환하여 24 시간 배양한 다음 시료처리를 하였다. 시료추출물을 각 농도별로 처리하여 세포를 배양한 후 3일 뒤 PBS로 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20 ㎕씩 첨가하여 37℃에서 30분간 용해시켰다. 용해된 세포의 상등액 5 ㎕는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상등액에 20 ㎕의 0.1 N 글리신(glycine)과 10 ㎕의 100 mM ρ-NPP(ρ-nitrophenylphosphate)를 첨가한 후 다시 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 200 ㎕의 0.1 N NaOH로 반응을 중지하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 ρ-NPP로부터 생성된 p-NP(ρ-nitrophenol)를 측정하여 ρ-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 대조군과의 상대비교를 통해 도출하였다[26].

[0049] ALP(Alkaline phosphatase) 효소의 염색 정도를 측정하기 위해 96 웰에 1X 10^5 세포/mL로 처리한 후 시간경과에 따른 효소활성 정도를 Alkaline Phosphatase Kit(Sigma, St. Louis, Mo,USA)를 사용하여 염색하여 측정하였다. 즉 배지를 제거하고 고정액(citrate-acetone-formaldehyde)을 첨가하여 약 30초간 실온에 보관하였다가, 45초간 증류수로 세척하였다. 준비된 디아조니움 용액(diazonium solution)(sodium nitrite: FRV-alakline:naphthol AS-BI alkaline solution = 1:1:1)을 첨가하여 약 15 분간 실온에서 방치한 뒤 2분간 증류수로 세척하고, 헤마톡실린 용액(hematoxylin solution)으로 2 분간 다시 염색한 뒤 흐르는 물로 염색액을 제거한 다음 현미경으로 관찰하였다[6].

[0050] **6. 파골세포의 TRAP(Tartarate resistant acid phosphatase) 활성과 염색**

[0051] 파골세포의 분화 정도를 Hotokezaka(15)등의 방법에 따라 TRAP(Tartarate resistant acid phosphatase)활성 측정과 TRAP 염색으로 확인하였다. 96-웰에 5 X 10^4 세포/웰이 되게 세포를 접종하고 분화인자와 시료를 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% 포름알데히드(formaldehyde)로 고정한 세포에 기질 용액(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer pH 4.6)을 100 ㎕씩 분주하여 37℃에서 30 분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 플레이트에 옮기고 0.1 N-NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

[0052] TRAP 염색은 먼저 50 mM tartrate acid를 포함하는 50 mM 소디엄 아세테이트 완충액 10 mL에 1 mg/mL naphtol AS-MX phosphate와 N,N-디메틸포르마이드 100 ㎕를 첨가하여 염색액을 제조한 후, 10% 포름알데히드로 고정한 세포에 염색액을 45 ㎕씩 분주하고 항온기에서 30분 동안 방치하여 현미경으로 관찰하였다.

[0053] ***실험결과***

[0054] **1. 아보카도 추출물의 조골세포 증식 및 ALP 활성에 미치는 영향**

[0055] MC3T3-E1 세포는 마우스의 두개골(calvaria)로부터 유래한 조골세포(osteoblastic cell)로 생체내에서 일어나는 조골세포의 증식, 분화, 석회화 등의 유사한 대사적 특징을 가지고 있으며, 특히 세포막에 당단백질인 ALP(alkaline phosphotase)를 가지고 있어 골 형성과 관련된 연구에서 유용하게 사용된다[4, 28, 33].

[0056] 아보카도의 과육, 과피 및 씨 추출물의 MC3T3-E1 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 이들 추출물 모두 10-100 μg/mL의 농도에서 90% 이상의 높은 세포 생존율을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다(도 1 참조). 특히 100 μg/mL의 아보카도의 과피 추출물 처리에서 110%의 가장 높은 세포 생존율을 보였다.

[0057] 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[38]. 아보카도 추출물이 조골세포의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 ALP를 측정한 결과, 아보카도 과피 및 씨 추출물에서는 처리농도가 증가할수록 ALP 활성이 증가되었으나, 아보카도 과육 추출물의 경우 처리농도가 증가할수록 ALP 활성은 감소하였다. 특히 100 μg/mL의 아보카도 과피 추출물의 처리시 ALP 활성이 35% 이상으로 증가하였으며, 아보카도 씨 추출물에서도 20% 이상의 ALP 활성이 증가하였다(도 2 참조). 이는 자두의 폴리페놀화합물이 조골세포의 활성을 증가시키고[3], 녹차의 EGCG (epigallocatechin-3-gallate)도 조골세포 분화의 초기 마커인 ALP 활성을 증가시켜 골 형성에 관여한다는 보고[43]처럼 아보카도의 과피 및 씨 추출물은 과육 추출물 보다 폴리페놀 함량이 10-20 배 정도 많이 존재[25]하여 조골세포 증식 및 ALP 활성이 더 우수한 것으로 보여진다. 따라서 아보카도 과피 및 씨 추출물은 조골세포 증식 및 ALP 활성을 높이는 활성을 갖는 것으로 확인하였다.

[0058] **2. 아보카도 추출물의 파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향**

[0059] 파골세포는 조혈모세포(hematopoietic precursor)에서 유래하여 단핵 대식세포로 부터 분화되며, 일반적으로 M-CSF(macrophage colony stimulating factor)와 tumor necrosis factor(TNF)-related activation-induced cytokine (TRANCE, RANKL or ODF)의 두 가지 사이토카인(cytokine)에 의하여 조절된다[40]. 따라서 본 실험에서는 마우스의 골수세포를 분리하여 M-CSF와 RANKL을 이용하여 파골세포 분화를 유도하였다. 마우스 골수

세포를 이용하여 아보카도 추출물의 세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 100 μg/mL의 아보카도 과육 추출물에서 50% 이하의 생존율을 보였으나, 10-50 μg/mL의 과육추출물에서는 파골세포의 증식은 저해하지 않았고, 아보카도 과피 추출물의 경우에는 처리 농도별 차이 없이 파골세포 생존율의 저해는 보이지 않았다(도 3 참조). 그러나 아보카도 씨 추출물의 경우 10 μg/mL의 처리시 63% 정도의 생존율을 보였으며, 처리농도가 증가할수록 파골세포의 생존율이 크게 감소하여 세포 독성이 있음을 알 수 있었다(도 3 참조).

[0060] 파골세포는 분화가 진행되면서 단핵의 전파골세포를 형성하지만 세포가 융합되면 다핵의 성숙 파골세포를 형성하게 되고, 이는 골 표면에 부착하여, 골을 흡수하는 작용을 한다[4, 29]. 또한 파골세포는 TRAP(tatarate-resistant acid phosphase)과 칼시토닌 수용체를 가지며, 산 생성이 활발한 특징을 가져 TRAP은 파골세포의 표지인자로 널리 사용되고 있다[19, 29, 42].

[0061] 파골세포의 분화 형태를 측정하고자 TRAP 효소활성을 측정한 결과, 아보카도 과피 추출물은 세포독성 없이 10 μg/mL 농도에서 TRAP 활성이 53.7±4.6%이었으나, 50, 100 μg/mL의 농도에서는 각각 15.3±5.7%, 4.7±0.6%의 TRAP 활성을 보여 파골세포의 분화가 크게 억제됨을 확인하였다. 그리고 아보카도 과육 추출물에서도 세포 독성을 보이지 않은 10-50 μg/mL의 농도에서는 각각 30-65% 정도의 TRAP 활성이 억제됨을 확인하였다. 그러나 아보카도 씨 추출물의 경우 처리 농도와 관계없이 90-97% 정도의 높은 TRAP 활성 억제를 보였으나, 큰 세포 독성을 보였다. 이는 아보카도 씨 추출물이 가진 세포에 대한 독성으로 인해 배양기간 동안 골수 세포의 세포사멸을 유도하여 파골세포의 형성이 감소되어 나타난 결과로 보인다. 따라서 아보카도 씨 추출물의 경우 조골세포에 대해서는 ALP 활성을 증가시켰으나 파골세포에 대해서는 세포 독성을 가지는 것을 확인하였다.

[0062] 생약제인 우슬, 현호색 추출물의 경우 10 μg/mL 농도에서 세포독성 없이 TRAP 활성이 24-28% 정도로 보고된 결과[24]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 생각되었다.

[0063] **3. 아보카도 과피 분획물의 조골세포의 증식 및 활성에 미치는 영향**

[0064] 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, 아보카도 과피의 핵산 분획 100 μg/mL의 처리농도에서만 54% 세포 증식능을 보여 세포독성이 있었으나, 다른 분획물에서는 시료 농도에 관계없이 90% 이상의 세포증식능을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다(표 1 참조). 특히 50 μg/mL의 아보카도 과피 부탄올 분획과 10 μg/mL의 아보카도 과피 물 분획 처리에서는 25% 정도의 높은 세포 증식능을 보였다. 아보카도 과피의 분획물 중 헥산 분획에서 ALP 활성이 가장 크게 증가하였고, 특히 50 μg/mL의 핵산 분획 처리에서 70% 이상의 ALP 활성이 증가함을 확인하였다. 그리고 10 μg/mL의 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획에서도 29% 정도의 ALP 활성을 확인하였으나, 다른 분획물에서는 ALP 활성이 보이지 않았다(표 1 참조). 따라서 아보카도 과피의 핵산 분획에서는 ALP 활성이 가장 높게 유도되었고, 아보카도 과피의 부탄올 분획에서는 조골세포의 증식을 높이는 것을 확인하였다.

표 1

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
Peel	Hexane fr.	10	91.67±2.52	125.41±9.24	23.04±0.90	4.02±0.07
		50	90.83±4.10	170.68±8.40	22.77±0.59	4.15±0.06
		100	54.10±5.30	163.81±2.73	25.56±2.82	4.24±0.14
	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

Each value is expressed as Mean ± SD (n=3).

[0065]

[0066] 또한, 아보카도 과피의 헥산 분획 및 추출물을 조골세포에 처리하여 3, 6, 9, 12일 동안 배양하면서 ALP 활성도를 조사한 결과는 도 5에 나타내었다. 이때 시료처리 농도는 조골세포의 증식을 저해하지 않는 10, 50 μg/mL으로 결정하여 처리하였다. 그 결과, 아보카도 과피 추출물은 처리농도에 관계없이 배양시간이 증가할수록 ALP 활성이 증가하였고, 배양 9일 째까지 50 μg/mL의 처리시에 10 μg/mL 처리시보다 ALP 활성이 조금 높다가, 12일 째에는 과피 추출물 10 μg/mL 처리에서 더 큰 ALP 활성을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그리고 아보카도 과피 헥산 분획의 경우에도 처리농도에 관계없이 배양시간이 증가할수록 ALP 활성이 증가하였고, 배양 3일째에 50 μg/mL의 처리에서 10 μg/mL 처리보다 큰 ALP 활성을 보이다가, 배양시간이 증가할수록 헥산 분획 10 μg/mL 처리에서 ALP 활성이 증가하여 배양 12일째에는 ALP 활성이 최고로 증가하였다. 그리고 아보카도 과피 헥산 분획은 배양 기간이 증가할수록 과피 메탄올 추출물보다도 더 큰 ALP 활성을 나타내었다. 머위 추출물을 MC3T3-E1 조골세포에 처리하면 14일째까지는 ALP 활성이 증가하다가 그 이후 감소한다는 보고[17]와 유사하게, 아보카도 추출물 및 헥산 분획의 처리 시에도 배양 12일째 ALP 활성이 증가한 것으로 보인다.

[0067] 또한, 조골세포내의 ALP효소 활성을 확인하기 위해 AZO 색소법으로 염색하였다. 나프톨 AS-BI 포스페이트(Naphthol AS-BI phosphate)는 기질로 작용하여 조직 내의 ALP 효소에 의해 가수분해 되어 오르토포스페이트(orthophosphate)와 나프톨(naphthol)로 유리되고, 유리된 나프톨(naphthol)은 반응액에 함유된 디아조니움염(diazonium salt)와 결합하여 AZO dye를 형성하여 효소활성이 나타난 부분이 붉게 염색되게 된다[8]. 조골세포를 배양한 후 아보카도 과피 헥산 분획을 처리하여 세포내의 ALP 효소의 염색정도를 확인한 결과는 도 6에 나타내었다. 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 과피 추출물 및 헥산 분획을 처리한 경우 붉은색 반점이 확연히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 해조류의 알칼리 이온수인 ENA-A를 처리하여 ALP 효소 활성이 증가하고 염색시에도 붉은 색 반점이 증가하였다는 보고[23]와 일치하는 경향이었다. 또한 천문동 추출물[26], 황금 추출물[6]의 경우에도 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰다는 보고와 유사한 경향을 보였다. 따라서 아보카도 과피 헥산 분획은 MC3T3-E1 조골세포의 증식과 활성에 효과가 있음을 확인하였다.

[0068] **4. 아보카도 과피 분획물의 파골세포의 증식 및 활성에 미치는 영향**

[0069] 아보카도 과피 분획물에 대한 파골세포 증식 및 TRAP 활성을 검토한 결과는 표 1에 나타내었다. 표 1의 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 아보카도 과피 헥산 분획을 제외한 다른 분획물에서는 파골세포에 대한 세포독성이 없음을 확인하였다. 헥산 분획은 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 분획물의 경우 시료처리 농도가 증가할수록 TRAP 활성이 농도 의존적으로 감소하였고, 특히 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획은 가장 낮은 농도에서도 TRAP 활성이 12.11±3.25%이었으며, 50-100 μg/mL의 농도에서는 각각 5.16±0.26%, 4.32±0.24%의 TRAP 활성을 보여 파골세포의 분화가 가장 크게 억제되었다. 그리고 아보카도 과피 부탄올 분획 100 μg/mL의 처리농도에서 4.76±0.23%의 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 대한 TRAP 활성을 저해하였으며, 특히 에틸아세테이트 분획은 파골세포에 대한 TRAP 활성을 가장 크게 저해함을 확인하였다.

[0070] 이에 파골세포에 대한 저해활성이 우수한 아보카도 과피 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 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 도 7에 도시된 결과에서 알 수 있는 바와 같이 세포 독성은 관찰되지 않았으며, 대조군과 비교하여 아보카도 과피 추출물 25 μg/mL 처리시 약 65% 이상 TRAP 활성이 억제되었다. 또한, 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획물에서는 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가 되었으며, 50 μg/mL 농도에서는 대조군에 비하여 약 2 배 이상의 세포 증식을 높이는 것으로 확인되었다. 한편, 대조군과 비교하여 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획물 10 μg/mL 처리시에도 약 60% 이상의 유의적인 TRAP 활성 억제를 보였고, 25-50 μg/mL 처리시에도 유의적인 TRAP 활성이 저해됨을 확인하였다(도 8 참조). 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획물은 높은 파골세포의 증식에도 불구하고 파골세포 분화를 효과적으로 억제하였다. 즉, 파골 분화 단계에서의 세포 생존률을 높이면서도 TRAP 활성은 억제하는 것으로 보아, 아보카도 과피 에틸아세테이트 분획물은 파골세포로의 분화는 저해하지만, 대식세포(macrophage)의 생존률은 높여 면역기능을 향상시킬[46]것 이라고 생각된다.

[0071] 또한, 아보카도 과피 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 처리한 후 TRAP 염색을 통하여 파골세포를 염색하고 핵의 수를 계수한 결과, 이들 시료의 처리 후 핵의 수가 농도 의존적으로 감소하였으며, 50 μg/mL 처리시에는 다핵의 파골세포를 거의 관찰할 수가 없었다(도 7 및 도 8 참조). 그리고 아보카도 과피 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 처리에 의한 큰 차이도 보이지 않았다. 따라서 아보카도 과피 추출물의 경우 조골세포의 증식과 파골세포의 억제에 관여할 수 있는 우수한 소재로 향후 골다공증의 치료제로서의 개발 가능성을 가진 천연물 소재로 생각된다.

[0072] **5. 실험결과의 정리**

[0073] 아보카도는 널리 재배되어 소비되는 과일로서, 아보카도의 골 형성에 미치는 영향을 검토하고자, 아보카도 과육, 과피 및 씨로 나누어 각각 메탄올 추출물을 제조하였다. 아보카도 추출물의 조골 및 파골세포에 미치는 영향은 조골세포 MC3T3-E1 세포를 이용하여 골 형성능과 마우스 골수 세포로부터 유래된 파골세포를 이용하여 골 흡수능을 측정하였다. 아보카도 과육 추출물을 제외한 아보카도 과피 및 씨 추출물은 조골세포 증식 및 ALP 활성을 증가시켰으며, 파골세포에 대해서는 아보카도 과육 및 과피 추출물에서 세포독성 없이 TRAP 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 아보카도 과피 추출물의 헥산분획은 조골세포에 대한 증식 및 ALP 활성을 크게 증가시켰으며, 에틸아세테이트 분획은 파골세포 분화에 대한 TRAP 활성을 크게 억제하였다. 따라서 아보카도는 조골세포의 기능을 향상시키는 동시에 파골세포의 기능을 억제하여 골흡수와 관련된 질환과 함께 골질환 예방에 효과가 있을 것 이다.

[0074] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0075] **참고문헌**

[0076] 1. Aldercreutz, H., and W. Mazur. 1996. Phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. Proc. Nutr. Soc., 55, 399-417.

[0077] 2. Boonen, A., P. Broos, and J. Deqeker. 1997. The prevention of treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy (rhIGF-I or rhRGF-β) : a perspective, J. intl. med 242, 285-290.

[0078] 3. Bu, S. Y., T. S. Hunt, and B. J. Smith. 2009. Dried plum polyphenol attenuae the deetrmental effects of TNF-a on osteoblast function coincident with up-regulation of Runx2, osterix and IGF-I. J Nutritional Biochem., 20, 35-44.

[0079] 4. Centrella, M., T. L. McCartht. and E. Canalis. 1987. Transforming growth Factor B is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fatal rat bone, J. Biol. Chem., 262, 286-2874.

[0080] 5. Cho, G. J., H. T. Park, J. H. Shin, T. Kim, J. Y. Hur, Y. T. Kim, K. W. Lee, and S. H. Kim. 2009. The relationship between reproductive factors and metabolic syndrome in Korean postmenopausal women. Menopause 16, 998-1003.

[0081] 6. Choi, J. Y., B. H. Lee, K. B. Song, R. W. Park, I. S. Kim, and K. Y. Sohn. 1996. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. J. Cellular Biochemistry 61, 609-618.

[0082] 7. Del, Fattpre., A. A. Teti, and N. Rucci. 2008. Osteoclast receptors and signaling. Arch Biochem Biophys 473, 147-160.

[0083] 8. Ding, H., Y. W. Chin, A. D. Kinghorn, and S. M. D Ambrosio. 2007. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. Seminars in Cancer Biology 17, 386-394 .

[0084] 9. Duester, K. C. 2001. Avocado fruit is a rich source of beta-sitosterol. J Am Diet Assoc., 101, 404-405.

[0085] 10. Green, L. M,. J. L. Reade, and C. F. Ware. 1984. Rapid colometric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lympokines, J. Immunal. Meth., 70, 257-261.

[0086] 11. Grigoriades, A. E., Z. Q. Wang, M. G. Cecchini, W. Hofstetter, R. Felix, H. A. Fleisch, and E. F. Wagner. 1994. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling, Science 266, 443-448.

[0087] 12. Han, K. Y,. D. Yang, E. J. Chang, Y. Lee, H. Hao, S. H. Sung, Z. H. Lee, Y. C. Kim, and H. H. Kim. 2007. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone. Biochem Pharmacology 74, 911-923.

[0088] 13. Hashimura, H., C. Ueda, J. Kawabata, and T. Kasai. 2001. Acetyl-CoA carboxylase inhibitors from avocado (Persea americana Mill.) fruits. Biosci Biotechnical Biochem 65, 1656-1658.

[0089] 14. Hierro, M. T., and M. C. Tomas. 1992. Fermandez-martin F, Santa-Maria G. 18. Determination of the triglyceride composition of avocado oil by high-performance liquid chromatography using a light-scattering detector. J Chromatogr., 607, 329-338.

[0090] 15. Hotokezaka, H., E. Sakai, K. Kanaoka, K. Saito, K. I. Matsuo, H. Kitaura, N. Yoshida, and K. Nakayama. 2002. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW 264.7 cells into Osteoclast-like cells. J. Biol. Chem., 277, 47366-47372.

[0091] 16. Hwang, K. K., N. K. Huh, and J. H. Lee. 2000. Studies on the signaling molecules in RANK, an osteoclast differentiation receptor. Oral Biol. Res., 24, 245-254.

[0092] 17. Ji, S. H., D. H. Ahn, and M. R. Jun. 2010. Effects of petasites japonicus and Momordica charantia L. extracts on MC3T3-E1 osteoblast cells. J Korean Soc Food Sci Nutr., 39, 203-209.

[0093] 18. Kalervo, V., Z. Haibo, M. Mika, and M. H. Jussi. 2000. The cell biology of osteoclast function. J Cell Sci .,113, 377-381.

[0094] 19. Karst, M., G. Gorny, R. J. Galvin, and M. J. Oursler. 2004. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-β regulation of osteoclast differentiation. cell Physiol., 200, 99-106.

[0095] 20. Kim, J. H., J. Y. Ki, J. Y. Ann, H. J. Park, H. J. Kim, H. B. Kwak, J. M. Oh, and Y. K. Kim. 2010. Inhibitory effects of Achyranthis bidenatae Radix on osteoclast differentiation and bone resorption. Kor J Herbology., 25, 65-74 .

[0096] 21. Kim, O. K., A. Murakami, Y. Nakamura, N. Takeda, H. Yoshizumi, and H. Ohigashi. 2001. Novel nutric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. J Agric Food Chem., 48, 1557-1563.

[0097] 22. Kwak, H. B., J. H. Kim, D. J. Kim, Y. M. Kwon, J. M. Oh, and Y. K. Kim. 2008. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. Korean J. Oriental Physiology Pathology 22, 891-895.

[0098] 23. Lee, J. W., S. K. Jeon, H. J. Kim, and I. S. Lee. 2006. Effects of ENA(ENA actimineral resource A) Ion water on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. Journal of life science 16, 925-931.

[0099] 24. Lee, J. W. 2009. Inhibitory activity of medicinal plants against differentiation of osteoclasts. Kor J Pharmacogn., 40, 83-88.

[0100] 25. Lee, S. K., M. H. Yu, S. P. Lee, and I. S. Lee. 2008. Antioxidant activities and induction of apotosis by methanol extratcs from avocado. J Korean Soc Food Sci Nutr., 37, 269-275.

[0101] 26. Lee, S. Y., S. N. Kin, and J. K. Kim. 2008. Effects of Asparagus cochinchinensis(Lour.) Merr. on the stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclst generation. J Kor Soc Food Sci Nutri., 37, 16-19.

[0102] 27. Lee, Y. S. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoclast-like cells. Korea Soybean Digest., 18, 35-42.

[0103] 28. Letton R. W. 1990. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3metabolism in cultures of osteoblastic cells. J. Bone Miner. Res., 5, 815-820.

[0104] 29. Mok, S. K., and I. I. S. Shin. 1996. The effects of prostagladine and dibutyryl cAMP in osteoclastic cell activity and osteoclast generation. J Wonkwang Dental Res. Int., 6, 43-62.

[0105] 30. Oh, H. J. 2005. Therapy of osteoporosis in climacteric. J. Korea Acad. Fam. Med., 21, 20-27.

[0106] 31. Parfit, A. M. 1988. Bone remodeling: relationship to the amount and structure of bone the pathogenesis and prevention of fractures. in: Riggs LB. : L.J Melton eds. Osteoporosis, cetiology, diagnosis and management. pp. 45-93, Reven press, New York.

[0107] 32. Park, C. K., H. J. Kim, A. K. Kw, H. B, T. H. Lee, M. H. Bang, C. M. Kim, Y. Lee, D. K. Chung, N. I. Baek, J .Kim, Z. H. Lee, and H. H. Kim. 2007. Inhibitory effects of Stewartia koreana on osteoclast differentiation and bone resorption. International Immunopharm 7, 1507-1516 .

[0108] 33. Pfeilschifter, J., and O. Wolf. 1990. Chemotactic response of osteoblastic cells to Transforming growth factor B. J. Bone. Miner. Res., 5, 815-823.

[0109] 34. Pole, H. A. P., D. Felsenberg, D. A. Hanley, J. Stenpan, M. Munoz-Torres, T. J. Wolkins, G. Qui-sheng, M. Galich, K. Vandormael, and A. J. Yates. 1999. Mulrinational. placebo-controlled, randomised trial of the effects of Alendronate on Bone density and fracture risk in postmenopausal women with law

bone mass: Results of the FOSIT. Osteoporosis Int., 9, 461-468.

[0110] 35. Pursky, D., I. Kobiler, Y. Fishman, J. J. Sims, S. L. Midland, and N. T. Keen. 1991. Identification of an antifungal compound in unripe avocado fruits and its possible involvement in the quiescent infections of Collectotrichum gloeosporides. J Phytophanthol ., 132, 319-327.

[0111] 36. Shin, J. M., C. K. Park, E. J. Shin, T. H. Jo, and I. K. Hwang. 2008. Effects of Scutellaria radix extract on osteoblast differentiation and osteoclast formation, Korean J. Food Sci. Technol., 40, 674-679.

[0112] 37. Soong, Y. Y., and P. J. Barlow. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. Food Chem., 88, 411-417.

[0113] 38. Stein, G. S., J. B. Lian, and T. A. Owen. 1990. Relationship of cell growth to the regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J., 4, 3111-3123.

[0114] 39. Suda, T., J. Nakamura, B. Jimi, and N. Takahashi. 1997. Regulation of osteoclast function. J Bone Mineral Res., 12, 869-879.

[0115] 40. Teitelbaum, S. L. 2000. Bone resorption by osteoclast, Science 289, 1504-1508.

[0116] 41. Tsai, H. Y., H. Y. Lin, Y. C. Fong, J. B. Wu, Y. F. Chen, and C. H. Tang. 2008. Paeonol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by inhibiting ERK, p38 and NF-kB pathway. European J Pharma., 588, 124-133.

[0117] 42. Vaananen, H. K., and M. Horton. 1995. The osteoclast clear zone is a specialialized cell extracellular matrix adhesion structure. J cell Sci., 108, 2729-2732.

[0118] 43. Vali, B., L. G. Rao, and A. El-Sohemy. 2007. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. J Nutritional Biochem., 18, 341-347.

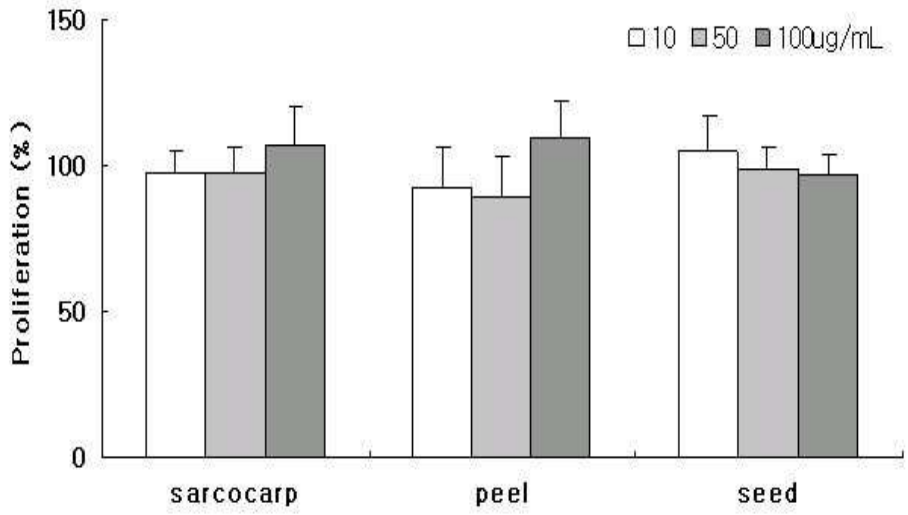
[0119] 44. Vinson, J. A., X. Su, L. Zubik, and P. Bose. 2000. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. J Agric Food Chem., 49, 5315-5321 .

[0120] 45. Wattel, A., S. Kamel, R. Mentaverri, F. Lorget, C. Prouilet, J. P. Petit, P. Fardelonne, and M. Brazier. 2002. Potent inhibitory effect of naturally occurring cell death, Biochem. Biophys. Res. Commun., 292, 94-101.

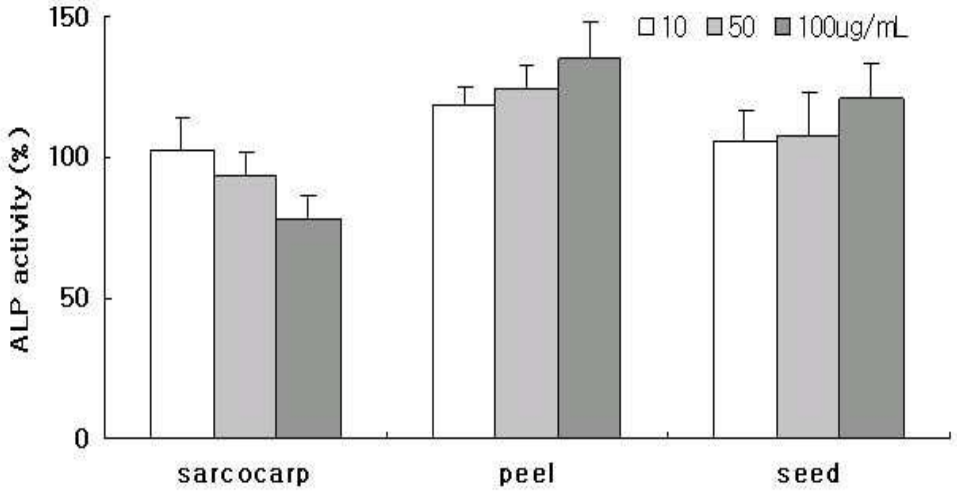
[0121] 46. Auffray C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annual Rev. Immunology 27, 669-692.

도면

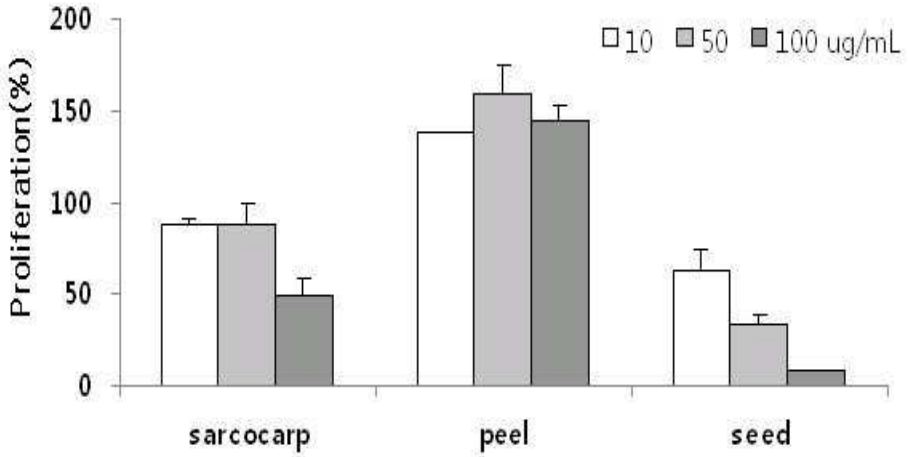
도면1


150
100
50
0
Proliferation (%)
10
50
100ug/mL
sarcocarp
peel
seed

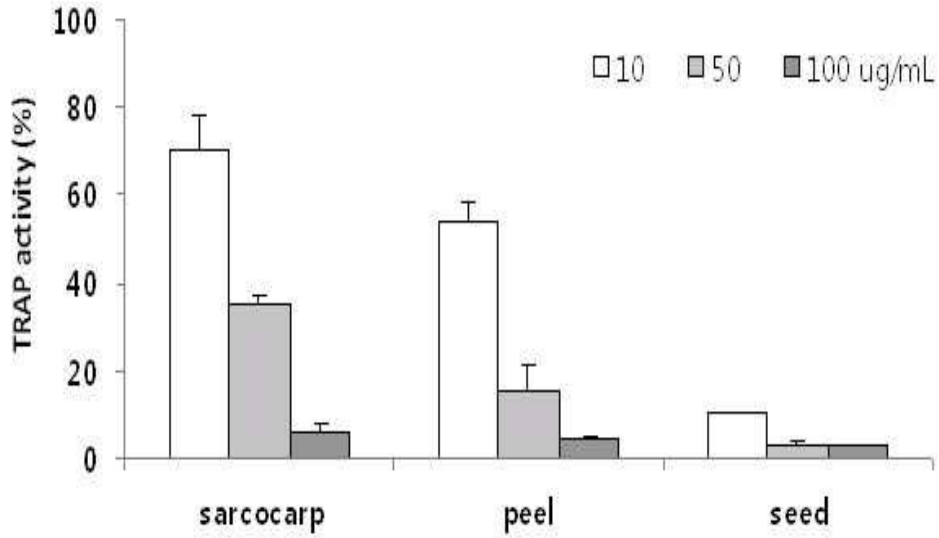
도면2


150
100
50
0
ALP activity (%)
10
50
100ug/mL
sarcocarp
peel
seed

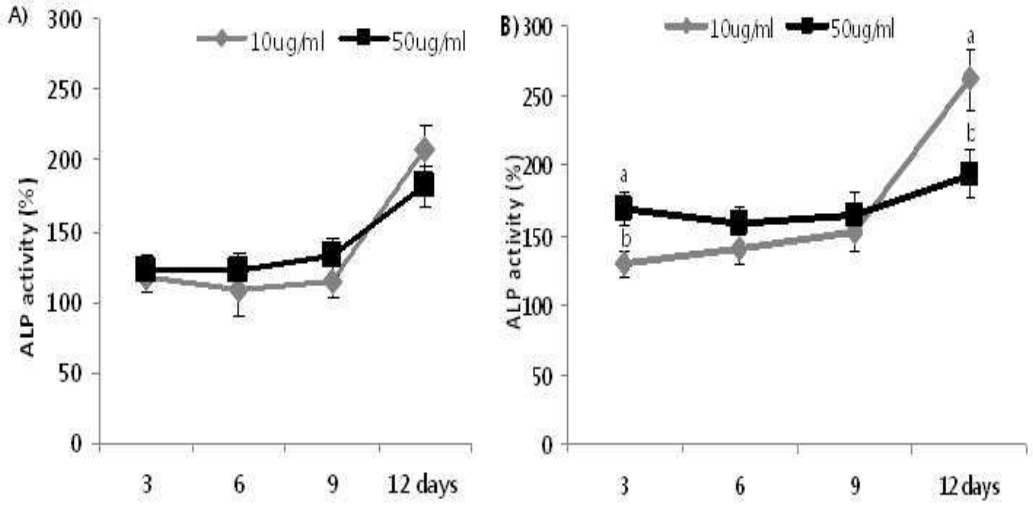
도면3


Proliferation(%)
200
150
100
50
0
10
50
100 ug/mL
sarcocarp
peel
seed

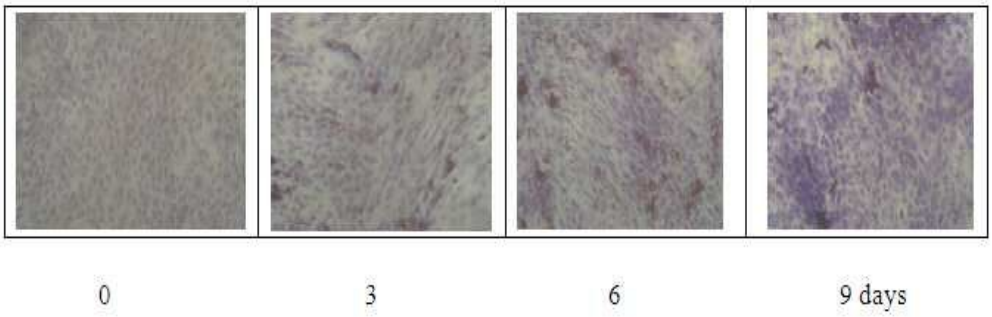
도면4


TRAP activity (%)
100
80
60
40
20
0
10
50
100 ug/mL
sarcocarp
peel
seed

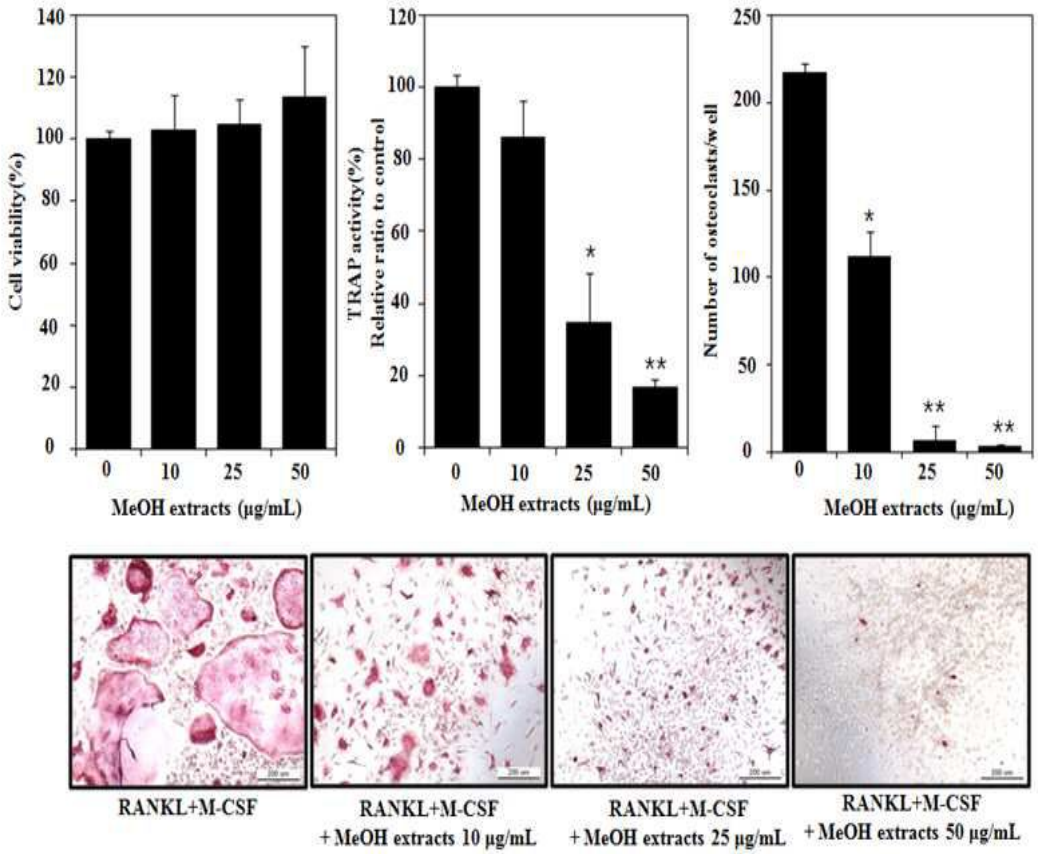
도면5


A)
B)
ALP activity (%)
300
250
200
150
100
50
0
10ug/ml
50ug/ml
a
b
3
6
9
12 days

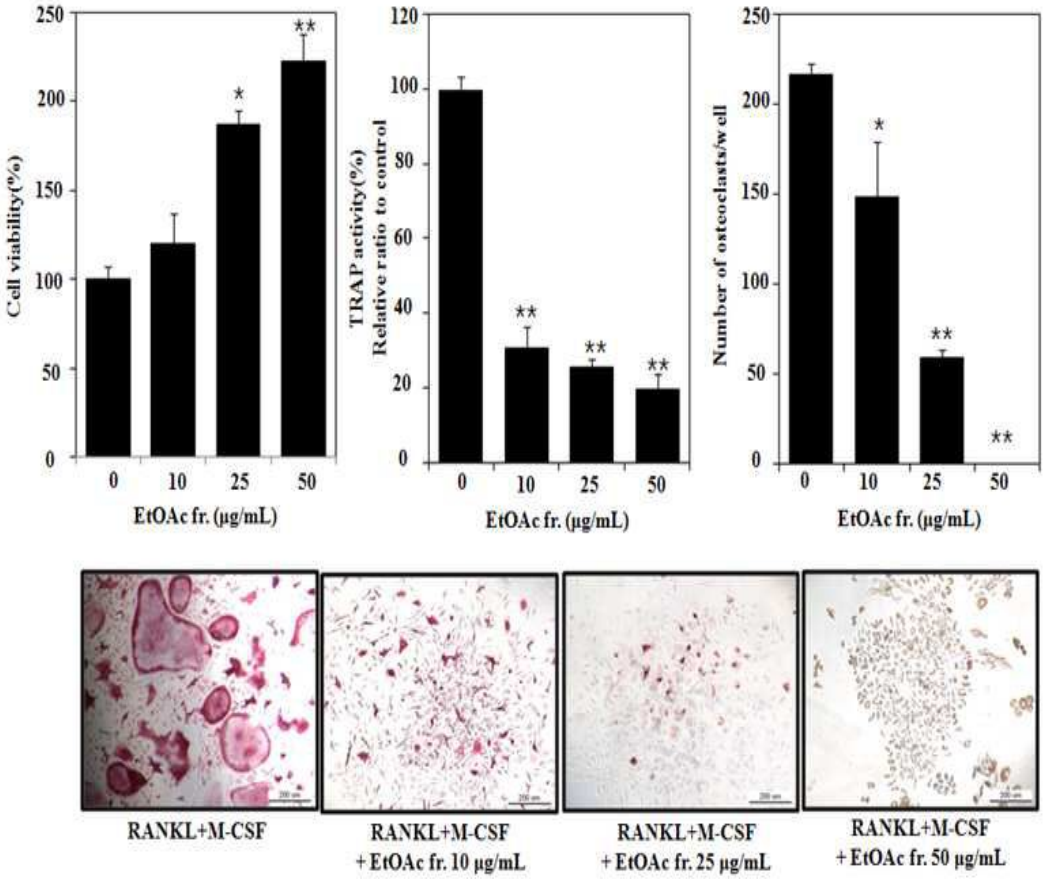
도면6


0
3
6
9 days

도면7


Cell viability(%)
MeOH extracts (μg/mL)
TRAP activity(%)
Relative ratio to control
MeOH extracts (μg/mL)
Number of osteoclasts/well
MeOH extracts (μg/mL)
RANKL+M-CSF
RANKL+M-CSF
+MeOH extracts 10 μg/mL
RANKL+M-CSF
+MeOH extracts 25 μg/mL
RANKL+M-CSF
+MeOH extracts 50 μg/mL

도면8


Cell viability(%)
250
200
150
100
50
0
0
10
25
50
EtOAc fr. (μg/mL)
TRAP activity(%)
Relative ratio to control
120
100
80
60
40
20
0
EtOAc fr. (μg/mL)
Number of osteoclasts/well
EtOAc fr. (μg/mL)
RANKL+M-CSF
RANKL+M-CSF
+EtOAc fr. 10 μg/mL
RANKL+M-CSF
+EtOAc fr. 25 μg/mL
RANKL+M-CSF
+EtOAc fr. 50 μg/mL