

Positive Effect of *Musa paradisiaca* Peel Ethanolic Extract on Antioxidant Activity and Melanin Synthesis

JaeRyeon Kim¹ and Moon-Moo Kim^{2*}

¹Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

²Department of Applied Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received February 23, 2018 / Revised April 19, 2018 / Accepted April 24, 2018

Aging is accompanied by changes in the body, such as graying hair, wrinkles, and black spots composed of lipid peroxides and proteins. Melanin is a polymer substance produced by an oxidation polymerization reaction from tyrosine, and it determines the color of hair and skin. It has been reported that melanin is synthesized by melanocyte, and its excessive production by reactive oxygen species is associated with aging. The purpose of this study was to determine the direct effects of *Musa paradisiaca* peel ethanolic extract (MPEE) on antioxidative activity and melanin synthesis. It was observed that the antioxidant activity of MPEE was similar to that of vitamin C, a positive control, in both DPPH radical scavenging assay and reducing power assay. In order to examine cytotoxicity prior to cell experimentation, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed for B16F1 cells. MPEE was not cytotoxic at 32 µg/ml or less. In addition, MPEE increased melanin synthesis in live cells in addition to tyrosinase activity and melanin synthesis in dihydroxyphenylalanine (DOPA)-oxidation assay *in vitro*. Moreover, MPEE increased melanin synthesis in cells aged by pretreatment with H₂O₂. The expression levels of tyrosinase-related protein (TRP)-1, TRP-2, and superoxide dismutase (SOD)-2 by western blot analysis were increased in the presence of MPEE. These results suggest that MPEE could promote the melanin synthesis as an antioxidative substance.

Key words : DOPA, *Musaparadisiaca* peel, melanin, SOD, tyrosinase

서 론

고대 중국의 진시황은 불로장생을 꿈꾸며 불로초를 찾기 위해 부단한 시도를 했다고 알려져 있으며, 현재까지도 사람들은 늙지 않고 건강하게 사는 것에 가장 많은 관심을 가지며 살아가고 있다. 노화는 나이가 들면서 생기는 몸의 변화로 검은 머리가 희게 변하는 백발화, 과산화지질과 단백질이 결합되어 생기는 노폐물 덩어리인 검버섯, 주름 등의 표현형으로 알 수 있다[32]. 인체 내에 존재하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 superoxide, hydroxyl radical, hydrogen peroxide (H₂O₂) 그리고 singlet oxygen이 있다[37]. 과량으로 생성되는 ROS는 세포에도 산화적 손상을 입혀 성분 및 구조를 변화시켜[5], 암과 같은 질병의 원인이 된다[24]. ROS를 제거함으로써 산화적 손상도 줄일 수 있는 대표적인 항산화 비타민은 beta-carotin, vitamin C (Vit. C)와 vitamin E (Vit. E) 등이 있다[36]. 특히, 머리카락 색과 관련된 melanin과 검버섯에 관

련된 lipofuscin은 빛과 ROS에 의해 생성되고 축적된다고 알려져 있다[19]. 피부의 기저층에 존재하는 melanocyte에서 생성되는 melanin은 모발의 색과 피부색을 결정하는 색소이며 [20], 세포질 내의 과립이라 불리는 melanosome을 가지고 있다[17]. Melanin을 가지고 있는 melanosome은 melanocytes에서 keratinocytes로 이동되어 UV에 의한 피부 손상을 막고 피부 색소 침착을 억제한다[29]. 멜라닌은 다양한 효소를 포함하는 여러 단계의 복잡한 과정을 통해 생성된다[35]. 주로 체내 melanin은 tyrosinase가 관여하는 산화반응에 의해 tyrosine이 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA)와 DOPA quinone으로 생성된다[18]. 뿐만 아니라 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)는 DOPA quinone에서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 산화시키며, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)은 DHICA를 5,6-indolequinone carboxylic acid (IQCA)로 산화시켜 eumelanin을 생성시킨다[16]. 또한, TRP-1은 melanogenesis의 중심 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)에 의해 활성을 나타낸다[2]. MITF는 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호 경로에 의해 활성화를 조절한다[15]. Melanin 자극 호르몬인 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH)는 피부 색소 침착의 중요한 조절 인자로, melanocortin 1 receptor (MC1R)과 결합하여 활성화된다[11]. 최근 연구에 의하면, α-MSH는 UV에 의한 DNA 손상으로부터 사람의 멜라닌 세포를 구한다고

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1511, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : mmkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

알려져 있다[28]. 또한, AKT 신호 전달을 활성화시키는 역할을 한다[6]. α -MSH 이외에도 tyrosine kinase inhibitor인 imatinib [3]과 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)도 melanin 합성을 촉진시킨다는 연구가 보고되었다[1, 33].

Tannins, flavonoids, quinones, phenols, steroids 그리고 phytosteroids를 포함하는 바나나 껍질은 항산화 활성이 우수한 천연물이며[31], 항염증 효과도 가지고 있다[26]. 뿐만 아니라 바나나 껍질(*Musaparadisiaca peel*)에 존재하는 black sigatoka는 식물의 잎에서 자낭균(*mycomosphaerella fijiensis*)에 의해 생성되는 질환으로 검은 잎 줄무늬로 알려져 있으며 melanin을 생성한다는 연구가 보고 된 바 있다[4]. 이를 바탕으로 본 연구의 목적은 바나나 에탄올 추출물(MPEE)이 항산화 활성과 백발화와 관련된 melanin 합성 촉진 효과를 규명하고자 하는 것이다.

재료 및 방법

실험 재료

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin (10,000 U/ml) / streptomycin (10,000 μ g/ml) / amphotericin (2,500 μ g/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)로 부터 구입하였다. B16F1 cell line은 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하였다. α -MSH, Imatinib mesylate (IMAT), IBMX, MTT reagent와 기타시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 로부터 구입하였다.

시료의 제조

바나나껍질 에탄올 추출물은 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 먼저, 필리핀에서 수입한 바나나를 부산 가야동에서 구입한 후 껍질 6 kg을 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 완전히 자연 건조시켰다. 세척·건조된 바나나껍질을 믹서기로 분쇄하여 분말로 제조 후 60 l 에탄올에 3일간 추출하고 여과하였다. 각 여과된 여액을 감압 농축하고 동결 건조하여 300 g의 분말 형태의 바나나껍질 에탄올 추출물(*Musa paradisiaca peel ethanolic extract*, MPEE)을 획득하였다. 바나나 껍질 에탄올 추출물의 수득률은 5%로 나타났다. 제조된 분말형태의 시료들을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 시험 농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

시료 내 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu 방법[34]을 변형하여 Gallic acid를 이용해 표준 물질로 사용하였다. 분광광도계의 측정 가능한 범위 안에서 시료를 희석하여 사용하였다. 시료 희석액 0.1 ml에 1N Folin-Ciocalteu 1.0 ml 첨가하고

잘 혼합하여 3분간 방치한 후 20% Na_2CO_3 2 ml 가하였다. 암실에서 45분 동안 실온 방치한 후 1,600 \times g에서 8분 동안 원심분리 하였다. 회수한 상등액은 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 표준 곡선을 이용하여 μ g/ml 값으로 환산하였다.

DPPH radical scavenging assay

Brand-Williams [10] 실험방법을 변형하여 MPEE의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능력을 측정하였다. 각 시료를 시험농도로 처리하고 10초 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

Reducing power Assay

Oyaizu [14]의 방법에 따라 측정하였다. MPEE 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충용액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반 한 후 50 $^{\circ}$ C의 수욕상에서 20 분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액 1 ml를 가하여 13,500 \times g에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml를 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 vitamin C 100 μ l를 사용하였다. 시료의 환원력은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

Tyrosinase 활성 측정

시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 220 μ l와 시료액 20 μ l 그리고 mushroom tyrosinase (1,500 U/ml)액 20 μ l를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM tyrosine 액 40 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 10~15분 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 ELISA reader (ELISA processor II, Behring, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 tyrosinase 활성도는 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

L-DOPA 산화에 의한 melanin 생성 측정

시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 480 μ l와 3 mM L-DOPA 20 μ l를 첨가한 다음 시험농도 되게 MPEE 5 μ l를 넣고, 마지막으로 2,000 U/ml mushroom tyrosinase 40 μ l를 첨가한다. 이 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨다. 그리고 ELISA reader (ELISA processor II, Behring, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 L-DOPA 산화에 의한 melanin 생성력을 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

세포배양

B16F1 세포는 5% CO_2 및 37 $^{\circ}$ C에서 95% 이상의 습도를 유지

한 배양기에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine과 100 µg/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 배양하였다.

MTT assay

Hansen [9]의 방법에 따라 MPEE의 세포독성을 측정하였다. 세포독성평가는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약을 사용하여 실험을 진행하였다. 독성평가에는 melanoma cell인 B16F1을 사용하였으며, 7.5×10^5 cells/well 만큼의 세포를 96-well plate에 주입한 후 하루 동안 배양하였다. 하루 뒤 배지를 제거하고 적당 농도로 시료를 총 200 µl만큼 투여하고 CO₂ 배양기에서 다시 한 번 24시간 동안 배양한다. 24시간 후 처리한 시료를 제거하고, MTT 용액을 200 µg/ml의 농도로 하여 96-well plate에 첨가하고 빛을 차단한 채 37°C에서 3시간 배양한다. 3시간 뒤 PBS buffer로 세척한 뒤 DMSO를 각 well에 200 µl 만큼 주입하고 20분 후 microplate reader로 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

DCF fluorescence assay

DMEM 배지에 DCFH-DA를 20 µM 농도로 제조하여 B16F1세포에 처리한 후 37°C에서 20분 방치하여 DCFH-DA를 세포 내로 침투시킨다. 여기에 음성대조군인 vitamin C 1000 µl와 MPEE를 시험농도로 1 시간 동안 처리하였다. PBS로 4번 세척 후 과산화수소를 250 µM 농도를 함유한 HBSS 완충용액 100 µl를 세포에 처리하였다. 세포 내에서 과산화수소는 DCFH-DA와 반응하여 형광을 띄는 DCF를 생성한다. 이를 multi-detection microplate reader (SynergyHtx)를 이용하여 excitation: 488 nm, emission: 530 nm 조건에서 형광정도를 측정하였다.

과산화수소 존재 유무에 따른 B16F1에서 Melanin 생성 측정

6-well plate에 3×10^5 cells/well로 세포를 분주하여 과산화수소의 존재 유무에 따라 실험을 진행하였다. 과산화수소 처리군은 250 µM 과산화수소를 처리한 후 24시간 방치 후 시료를 처리하고 1시간 후에 L-DOPA로 melanin 생성을 자극 후 48시간 동안 세포를 배양 하였다. 시료를 처리하고 1시간 후에 L-DOPA로 melanin 생성을 자극 후 48시간 동안 세포를 배양 하였다. 세포를 수집하여 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 ml homogenization buffer (50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1N NaOH (10% DMSO) 200 µl를 첨가하고 vortex 후 405 nm에서 흡광도를 측정 하였다. melanin 표준품(Sigma, USA)으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을

산출하였다. 멜라닌은 단위세포(10^4 cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

Western blot analyses

B16F1 세포에 용출 완충용액(50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30분 동안 처리하였다. 10 µg의 세포 용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-tyrosinase, anti-TRP -1, anti-TRP -2, anti-SOD -3, anti-catalase, anti-beta-actin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA))를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000 @image analyzer (Fuji film Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's *t* test 한 후 $p < 0.05$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

MPEE의 총 폴리페놀 함량 및 항산화 효능

바나나껍질 에탄올 추출물(MPEE)로부터 항산화 효능을 나타내는 MPEE의 총 폴리페놀함량을 측정하였다. Fig. 1A는 gallic acid를 이용한 표준 곡선을 보여주었다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이 공시험군에 비해 MPEE의 최고 농도인 64 mg/ml에서 1,266.19 µg/ml의 폴리페놀이 함유되어 있다. MPEE의 항산화 효능을 검증하기 위해 DPPH radical 소거능과 환원력에 대한 실험을 수행하였다. DPPH radical 소거법은 항산화 물질에 의한 DPPH radical의 흡광도 변화의 정도를 통해 산화억제 정도를 예측할 수 있다. Fig. 1C에서 보는 바와 같이 MPEE는 DPPH radical에 대하여 소거효과가 있는 것으로 나타났다. 양성 대조군으로 사용한 0.01% vitamin C는 공시험군과 비교하였을 때 87%의 소거활성을 나타내었다. MPEE의 최고 농도인 64 µg/ml에서는 76%의 소거능이 나타났다. Potassium ferricyanide와 ferric chloride를 이용하여 MPEE의 환원력을 조사하였다. Fig. 1D에서 보는 바와 같이 양성 대조군으로 사용된 0.01%의 농도의 vitamin C는 약 318.47%의 환원력

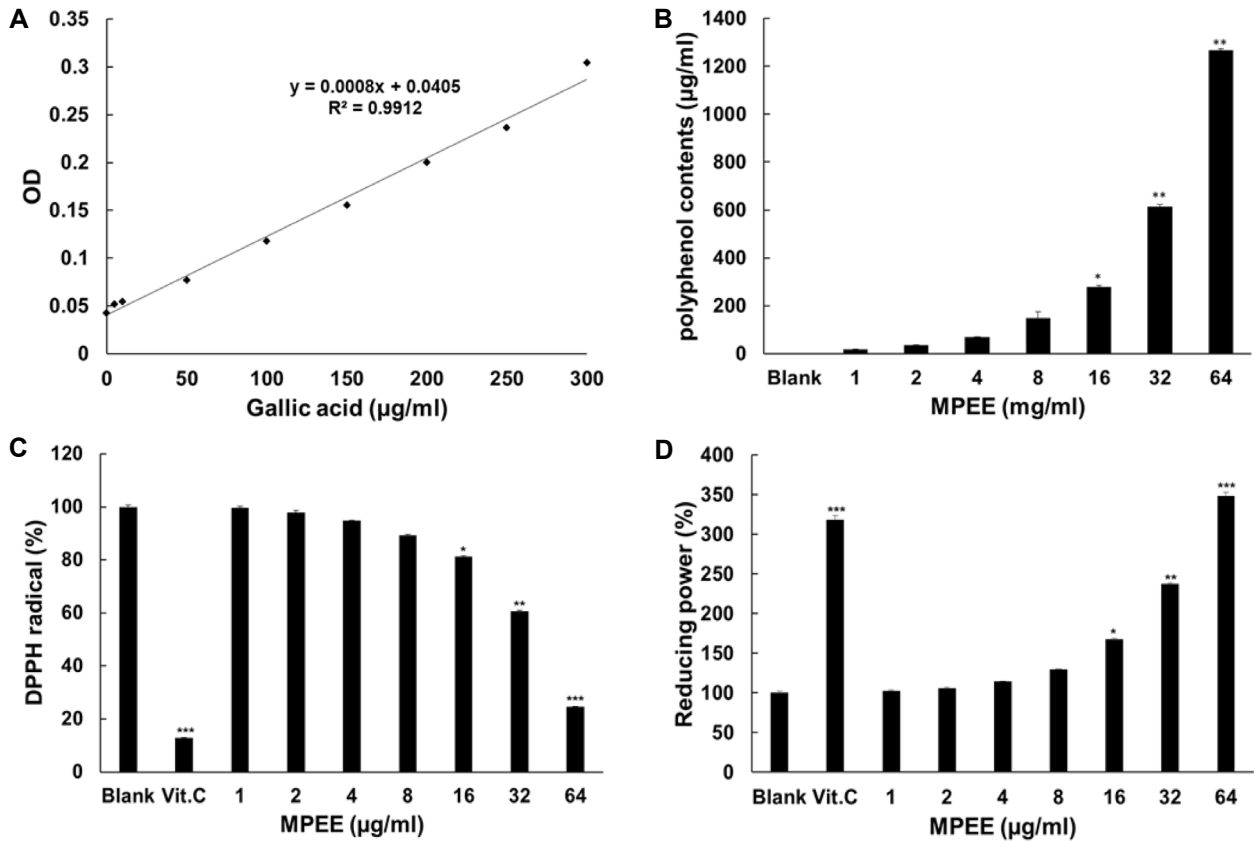


Fig. 1. Standard curve and total polyphenol content of MPEE and effect of antioxidation. (A) Standard curve was plotted using gallic acid as a standard. (B) Total polyphenols of MPEE at 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 mg/ml were measured. (C) DPPH Radical scavenging of MPEE. 0.01% Vitamin C (Vit. C) was used as a positive control. (D) Reducing power of MPEE. Vitamin C (Vit. C) at 10 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test.

을 나타내었고, MPEE 처리군은 최고 농도인 64 µg/ml에서 양성 대조군보다 30% 큰 환원력을 나타내었다.

Tyrosinase활성 및 DOPA oxidation에 대한 MPEE의 효과

Tyrosinase는 모발의 멜라닌을 형성하는 효소로, 멜라닌 합성 과정에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여한다. MPEE의 tyrosinase의 활성 효능을 조사하기 위해 tyrosinase activity 실험을 수행하였다. 먼저 실험의 정확성을 평가하기 위하여 음성 대조군으로 0.01% vitamin C와 0.02% arbutin을 사용하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 음성 대조군은 tyrosinase 활성을 억제한 반면에 MPEE는 공시험군에 비해 농도 8 µg/ml에서 13%의 tyrosinase 효소 활성을 촉진하였다. MPEE는 8 µg/ml 이상의 농도에서 시료 농도에 비례하여 tyrosinase 활성이 촉진되는 것으로 나타났다. Melanin은 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)가 tyrosinase 효소의 존재 하에 DOPA quinone로 합성된다. 이 실험은 *in vitro*에서 DOPA 산화에 관련된 melanin 생성에 미치는 MPEE의 영향을 조사

하였다. 먼저 melanin 생성 증가를 평가하기 위해 음성 대조군으로 0.01% vitamin C를 사용하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 음성 대조군은 tyrosinase 활성을 억제한 반면에 MPEE는 32 µg/ml 농도에서는 공시험군에 비하여 25% 효소 활성 촉진효과를 나타내었다. 최고 농도 64 µg/ml에서는 약 45% 효소 활성 촉진 효과를 나타내었다.

세포독성 및 세포내 H₂O₂ 생성에 대한 MPEE의 효과

B16F1 세포가 생존에 미치는 MPEE의 농도를 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 대조군과 비교하였을 때 MPEE는 최고 농도인 64 µg/ml에서 10%의 독성 효과가 있었고, 90% 이상의 세포가 생존하였다. MPEE가 세포 내의 H₂O₂ 소거능력을 측정하기 위하여 DCFH-DA가 H₂O₂와 반응하게 되면 DCF를 생성하며 형광을 띄게 얼마나 소거하는지를 확인하는 DCFH-DA 실험을 수행하였다. Fig. 3B에서 공시험군과 비교하였을 때, H₂O₂만 첨가한 대조군은 DCFH-DA 형광이 12% 증가하였다. 그러나 MPEE를 처리한 세포는 대조군에 비하여 64 µg/ml 농도에서 세포

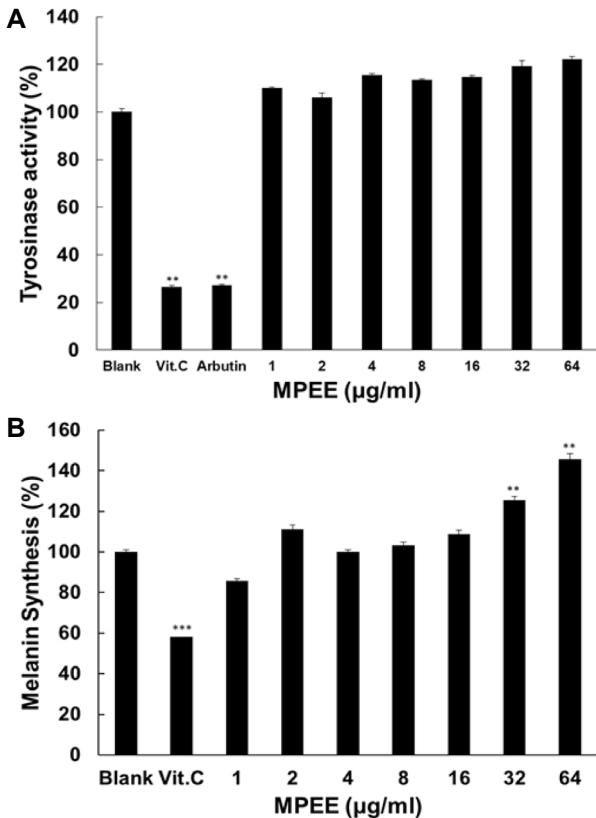


Fig. 2. Effect of MPEE on tyrosinase activity and DOPA oxidation. (A) Arbutin at 2,000 μg/ml was used as a negative control. (B) Vitamin C (Vit. C) at 1,000 μg/ml was used as a negative control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test.

내 H₂O₂를 25% 소거 능력을 나타내었다.

H₂O₂를 처리한 B16F1에서의 melanin 생성 조절에 대한 MPEE의 효과

B16F1 세포를 이용하여 tyrosinase의 존재 하에 DOPA를 자극시켜 melanin 합량을 측정 하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 음성대조군인 0.1% vitamin C는 공시험군에 비해 30% 이상 억제 시켰다. 공시험군에 비해 MPEE의 최고 농도인 64 μg/ml에서는 9%의 melanin 생성 촉진 효과를 나타내었다. Fig. 4B에서 보는 바와 같이 250 μM H₂O₂를 처리한 공시험군에 비하여 H₂O₂를 24시간 처리 후 MPEE를 처리한 군에서는 melanin 생성 촉진 효과가 있는 것으로 나타났다. 공시험군에 비해 MPEE의 최고 농도인 64 μg/ml에서는 16%의 melanin 생성 촉진 효과를 나타내었다.

B16F1세포에서의 항산화와 멜라닌 생합성 기전에 관련된 단백질의 발현에 대한 MPEE의 효과

Melanin 생성 신호 전달 기전과 관련된 tyrosinase related

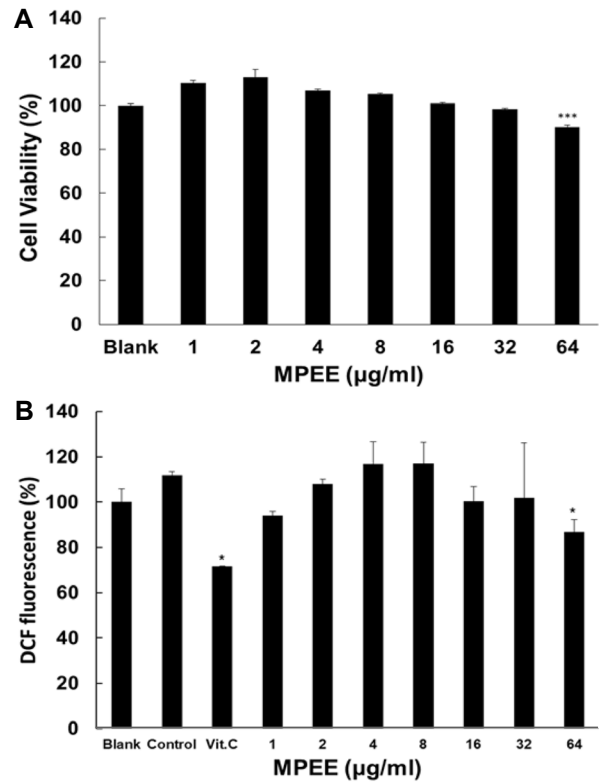


Fig. 3. The Effect of MPEE on viability of B16F1 cells and scavenging effect of MPEE on intracellular H₂O₂. (A) The cells were treated with MPEE at 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 μg/ml. (B) B16F1 cells were loaded with 20 μM DCFH-DA for 20 minutes. The cells were pre-treated with MPEE at concentrations indicated for 1 hr, and were exposed to H₂O₂ in HBSS buffer for 1 hr. The fluorescence intensities were measured with 488 nm and 530 nm of excitation and emission frequencies, respectively. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test.

protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)와 항산화 효소인 catalase와 superoxide dismutase (SOD)-2, SOD-3의 단백질 발현을 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 양성 대조군으로 사용된 α-MSH는 TRP-1과 TRP-2의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 양성 대조군으로 사용된 IBMX도 TRP-2의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. MPEE는 TRP-2의 발현을 과산화수소(H₂O₂)를 처리한 대조군에 비하여 농도 32 μg/ml에서 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, TRP-1의 단백질 발현은 8 μg/ml의 농도에서 증가되는 것으로 나타났다. 몸 속 H₂O₂를 제거시키는 catalase의 발현을 조사한 결과 대조군과 같은 발현수준을 나타내었다. Superoxide (O₂⁻)를 제거시켜 과산화수소로 변화시키는 SOD-2의 발현을 조사한 결과 농도 16 μg/ml에서 대조군과 양성 대조군인 IBMX와 비슷한 단백질 발현을 나타내었다.

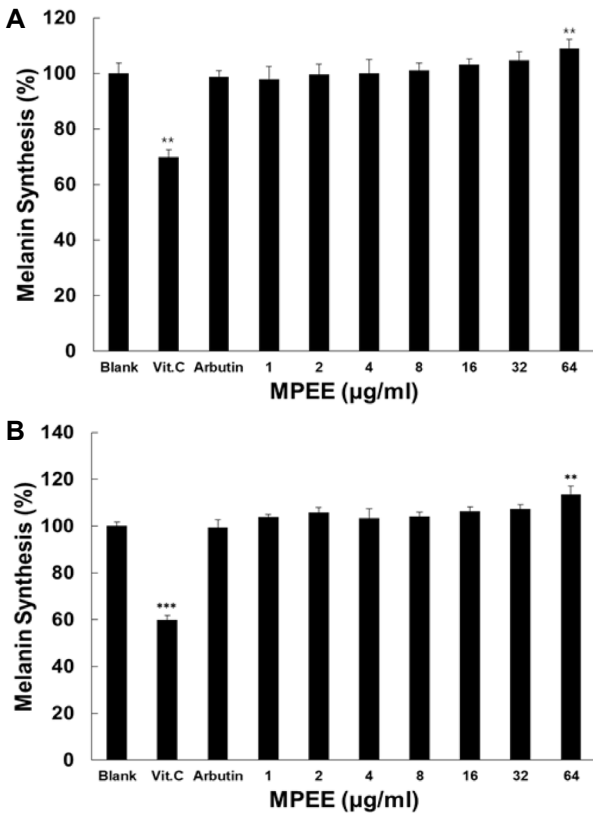


Fig. 4. Effect of MPEE on melanin production in B16F1 treated without or with 250 μ M H_2O_2 . (A) The amount of intracellular melanin were analyzed in B16F1 cells treated with MPEE. (B) The amount of intracellular melanin were analyzed in B16F1 cells treated with MPEE after H_2O_2 stimulation. Vit. C at 1,000 μ g/ml was used as a positive control. In these experiments Data are given as means of values \pm S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) using Student's t test.

고찰

Melanocyte에서 생성되는 멜라닌(melanin)은 고분자 물질로 자외선에 의해 손상되는 세포를 보호해주며 모발 및 피부색을 결정한다[8]. 그러나 유해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 멜라닌이 과도하게 생성되면 노화의 표현형인 기미, 주근깨와 검버섯 등을 야기시킨다[27]. 산화적 스트레스로 인해 DNA를 손상시켜 세포나 기관의 변형으로 인해 암, 당뇨와 같은 질병을 유발시킨다고 보고된 바 있다[7, 12]. 본 연구는 노화의 원인 중 한가지인 ROS 생성 억제효과와 melanin 합성 촉진 효과를 조사하여 바나나 껍질이 흑모 촉진제로서 적용 가능한지를 조사하였다. Melanocyte의 종류 중 하나인 B16F1 cell을 이용하여 독성이 없는 농도에서 진행되었다. 먼저, 항산화 활성에 영향을 주는 폴리 페놀의 양을 측정하였고, MPEE의 ROS 소거능을 조사한 결과 MPEE은 DPPH

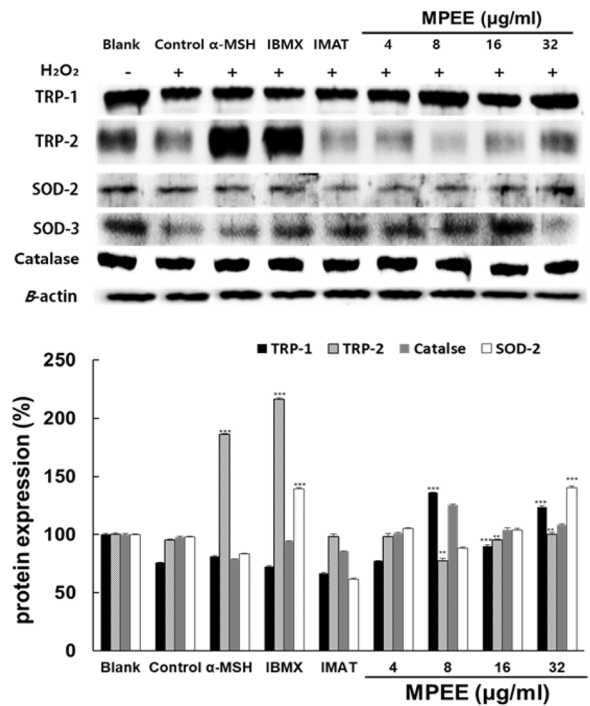


Fig. 5. Effect of MPEE on protein expressions of TRP-1, TRP-2, SOD-2, SOD-3 and Catalase in B16F1 cells. The cells were treated with MPEE at 4, 8, 16 and 32 μ g/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated. Level of significance was identified statistically (** $p < 0.01$) using Student's t test

radical assay와 reducing power test에서 양성 대조군으로 사용한 vitamin C보다 큰 항산화 효과를 나타내었다. 세포 내 과산화수소 생성을 측정할 수 있는 DCFH-DA assay에서 대조군과 비교하였을 때 MPEE가 과산화수소의 발생을 억제하는 것으로 나타났다. 이를 바탕으로 MPEE에 함유되어 있는 폴리 페놀은 *in vitro* 항산화 효과에 영향을 미치며, 세포 내에서 발생하는 ROS를 제거할 수 있다고 판단된다. 또한, 이를 통해 피부 노화 억제 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 이전 연구에서도 바나나 껍질은 산화적 스트레스에 대한 세포 손상 억제 효과를 가지고 있으며 항산화 효과가 뛰어나다고 보고하였다[22, 25]. MPEE의 흑모 생성 촉진 효과를 조사하기 위해 melanin 합성 기전에서 중요한 효소인 tyrosinase 활성을 측정 한 결과, MPEE가 체내에서 tyrosine에서 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 DOPA에서 DOPA quinone으로 전환되는 과정에서 tyrosinase 활성을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진 시키는 것으로 나타났다. 이전 연구에서도 바나나 껍질은 멜라닌 생성 합성 과정에 관여하는 tyrosine hydroxylase 효소의 활성을 촉진한다고 보고되었다[21]. 다음으로 MPEE의 멜라닌 합성 기전에 관여하는 효소 활성 증가 효과를 보다 자세히 조사하기 위해 Western blot을 이용하여 단백질 발현 수준을 조사하였다. 본 연구에서는 멜라닌 생성을 촉진시키는 양성

대조군으로 α -MSH와 IBMX가 특히 TRP-2의 발현을 증가시키는 것을 관찰하였다. 이 결과는 TRP-2가 멜라닌 생성 촉진에 중요한 역할을 한다는 것을 암시 하고 있다. 이전 멜라닌 생성에 대한 연구에서 양성 대조군으로 사용된 α -MSH와 IBMX는 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 신호 경로에 의해 TRP-2의 발현을 증가시킨다고 보고된 바 있다 [13, 23]. 본 연구에서 사용된 MPEE는 DOPA chrom에서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)가 생성되는 산화 과정에 관여하는 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 발현을 촉진시키며 양성 대조군과 유사한 효능을 나타내었다. 동시에 tyrosinase related protein-1 (TRP-1)의 단백질 발현도 증가시켜 MPEE는 멜라닌 합성 과정에서 중요한 효소의 발현 조절에 관여함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 멜라닌 세포의 색소 침착, 생존에 관여하는 MITF의 전사인자에 의해 TRP-1과 TRP-2의 발현 조절이 촉진된다는 보고와 일치한다[30]. 그러나 MPEE는 과산화수소를 제거시켜주는 항산화 효소인 catalase의 발현에 영향을 미치지 못하였으나, superoxide를 제거시켜 과산화수소로 변환시키는 SOD-2의 발현은 증가시키는 것을 발견하였다. 이러한 결과는 MPEE가 모낭 내에 축적되는 과산화수소의 생성을 감소시켜 노화를 억제시키며 멜라닌 생성을 촉진할 수 있다는 가능성을 제시한다. 결론적으로 MPEE는 TRP-1과 TRP-2의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 과산화수소의 발현을 감소시키므로 세포 내 멜라닌 생성을 촉진시키는 소재이자 항산화제로서의 활용가치가 있는 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.2017R1D1A3B06028000).

References

- An, Y. A., Hwang, J. Y., Lee, J. S. and Kim, Y. C. 2015. *Cornus officinalis* methanol extract upregulates melanogenesis in melan-a cells. *Toxicol. Res.* **31**, 165.
- Baek, S. H. and Lee, S. H. 2015. Sesamol decreases melanin biosynthesis in melanocyte cells and zebrafish: Possible involvement of MITF via the intracellular cAMP and p38/JNK signalling pathways. *Exp. Dermatol.* **24**, 761-766.
- Beckmann, S., Long, T., Scheld, C., Geyer, R., Caffrey, C. R. and Grevelding, C. G. 2014. Serum albumin and α -1 acid glycoprotein impede the killing of *Schistosoma mansoni* by the tyrosine kinase inhibitor Imatinib. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **4**, 287-295.
- Beltrán-García, M. J., Prado, F. M., Oliveira, M. S., Ortiz-Mendoza, D., Scalfò, A. C., Pessoa Jr, A., Medeiros, M. H., White, J. F. and Di Mascio, P. 2014. Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in black Sigatoka disease of bananas. *PLoS. One* **9**, e91616.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* **3**, 3-8.
- Cheng, L. B., Cheng, L., Bi, H. E., Zhang, Z. Q., Yao, J., Zhou, X. Z. and Jiang, Q. 2014. Alpha-melanocyte stimulating hormone protects retinal pigment epithelium cells from oxidative stress through activation of melanocortin 1 receptor - Akt - mTOR signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 447-452.
- Fajuyigbe, D. and Young, A. R. 2016. The impact of skin colour on human photobiological responses. *Pigment. Cell. Melanoma. Res.* **29**, 607-618.
- Feller, L., Masilana, A., Khammissa, R. A., Altini, M., Jadwat, Y. and Lemmer, J. 2014. Melanin: the biophysiology of oral melanocytes and physiological oral pigmentation. *Head Face Med.* **10**, 8.
- Gan, E., Haberman, H. and Menon, I. 1974. Oxidation of NADH by melanin and melanoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **370**, 62-69.
- Han, K. H., Oh, J. C. and Ryu, C. H. 2004. A study on the optimization for preparation conditions of germinated brown rice gruel. *Prev. Nutr. Food. Sci.* **33**, 1735-1741.
- Jarrett, S. G., Horrell, E. M. W., Boulanger, M. C. and D'orazio, J. A. 2015. Defining the contribution of MC1R physiological ligands to ATR phosphorylation at Ser435, a predictor of DNA repair in melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 3086-3095.
- Jeon, S., Hwang, W., Hong, Y., Kim, M., Ahn, E. and Park, S. 2016. Inhibitory effects of hericium erinaceus extracts on melanin synthesis and oxidative stress. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **14**, 427-435.
- Jin, M. L., Park, S. Y., Kim, Y. H., Park, G., Son, H. J. and Lee, S. J. 2012. Suppression of α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by cordycepin via inhibition of CREB and MITF, and activation of PI3K/Akt and ERK-dependent mechanisms. *Int. J. Mol. Med.* **29**, 119-124.
- Kim, S. R., Ahn, J. Y., Lee, H. Y. and Ha, T. Y. 2004. Various properties and phenolic acid contents of rices and rice brans with different milling fractions. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 930-936.
- Konieczkowski, D. J., Johannessen, C. M., Abudayyeh, O., Kim, J. W., Cooper, Z. A., Piris, A., Frederick, D. T., Barzily-Rokni, M., Straussman, R. and Haq, R. 2014. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.* **4**, 816-827.
- Lee, H. J., Lee, W. J., Chang, S. E. and Lee, G. Y. 2015. Hesperidin, a popular antioxidant inhibits melanogenesis via Erk1/2 mediated MITF degradation. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 18384-18395.
- Lee, T. H., Seo, J. O., Baek, S. H. and Kim, S. Y. 2014. Inhibitory effects of resveratrol on melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in Guinea pig skin. *Biomol. Ther. (Seoul)* **22**, 35.
- Malathi, M. and Thappa, D. M. 2013. Systemic skin whiten-

- ing/lightening agents: What is the evidence? *Indian. J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **79**, 842.
19. McElnea, E. M., Hughes, E., McGoldrick, A., McCann, A., Quill, B., Docherty, N., Irnaten, M., Farrell, M., Clark, A. F. and O'Brien, C. J. 2014. Lipofuscin accumulation and autophagy in glaucomatous human lamina cribrosa cells. *BMC Ophthalmol.* **14**, 153.
 20. Murase, D., Hachiya, A., Takano, K., Hicks, R., Visscher, M. O., Kitahara, T., Hase, T., Takema, Y. and Yoshimori, T. 2013. Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2416-2424.
 21. Muthukumaran, P. and Rajalakshmi, N. 2014. Modulation of Banana Polyphenol Oxidase (PPO) activity by naturally occurring compounds. *Int. J. Pharmaceut. Res. Allied. Sci.* **3**, 41-44.
 22. Oboh, G., Akinsanmi, O. A., Adefegha, S. A. and Akinyemi, A. J. 2015. Interaction of plantain (*Musa paradisiaca*) peel extracts (unripe, ripe and over ripe) with key enzymes linked to hypertension (angiotensin-i converting enzyme) and their antioxidant activities (*in vitro*): a nutraceutical approach. *AFS* **37**, 1-9.
 23. Park, S. Y., Jin, M. L., Kim, Y. H., Kim, Y. and Lee, S. J. 2011. Aromatic-turmerone inhibits α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. *Arch. Dermatol. Res.* **303**, 737-744.
 24. Sabharwal, S. S. and Schumacker, P. T. 2014. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **14**, 709.
 25. Shawa, I. T., Mponda, J., Msefula, C., Manda, H., Gondwe, M. and Maliwichi-Nyirenda, C. 2015. Brine shrimp lethality and phytochemical determination of aqueous extracts of *Senna singueana*, *Musa paradisiaca*, and *Ziziphus mucronata* in Malawi. *J. Basic Appl. Res.* **1**, 82-88.
 26. Silva, A. A., Morais, S. M., Falcão, M. J., Vieira, I. G., Ribeiro, L. M., Viana, S. M., Teixeira, M. J., Barreto, F. S., Carvalho, C. A., Cardoso, R. P. and Andrade-Junior, H. F. 2014. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum* chagasi. *Phytomedicine* **21**, 1419-1423.
 27. Skoczyńska, A., Budzisz, E., Trznadel-Grodzka, E. and Rotsztejn, H. 2017. Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging. *Postepy. Dermatol. Alergol.* **34**, 97.
 28. Swope, V., Alexander, C., Starnes, R., Schwemberger, S., Babcock, G. and Abdel Malek, Z. A. 2014. Significance of the melanocortin 1 receptor in the DNA damage response of human melanocytes to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 601-610.
 29. Tarafder, A. K., Bolasco, G., Correia, M. S., Pereira, F. J., Iannone, L., Hume, A. N., Kirkpatrick, N., Picardo, M., Torrisi, M. R. and Rodrigues, I. P. 2014. Rab11b mediates melanin transfer between donor melanocytes and acceptor keratinocytes via coupled exo/endocytosis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1056-1066.
 30. Tuerxuntayi, A., Liu, Y. Q., Tulake, A., Kabas, M., Eblimit, A. and Aisa, H. A. 2014. Kaliziri extract upregulates tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in murine B16 melanoma cells. *BMC. Complement. Altern. Med.* **14**, 166.
 31. Vijayakumar, S., Vaseeharan, B., Malaikozhundan, B., Gopi, N., Ekambaram, P., Pachiappan, R., Velusamy, P., Murgan, K., Benelli, G. and Kumar, R. S. 2017. Therapeutic effects of gold nanoparticles synthesized using *Musa paradisiaca* peel extract against multiple antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* biofilms and human lung cancer cells (A549). *Microb. Pathog.* **102**, 173-183.
 32. Vogt, G. 2015. Cell Biology Research on Stem Cells, Aging, Cancer Resistance, and Epigenetics in Marbled Crayfish and Relatives. *Freshw. Crayfish. : A Global Overview*, 115.
 33. Wang, Y., Zhao, Y., Liu, L., Zhang, L., Xiao, H., Wu, K., Xu, Y., Hu, Y., Fu, H. and Cao, W. 2014. Inhibitory effects of imatinib mesylate on human epidermal melanocytes. *Clin. Exp. Dermatol.* **39**, 202-208.
 34. Waterman, P. G. and Mole, S. 1994 *Analysis. of. phenolic. plant. metabolites.* : Blackwell Scientific.
 35. Yamaguchi, Y. and Hearing, V. J. 2009. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* **35**, 193-199.
 36. Ye, Y., Li, J. and Yuan, Z. 2013. Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* **8**, e56803.
 37. Zorov, D. B., Juhaszova, M. and Sollott, S. J. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* **94**, 909-950.

초록 : 바나나 껍질 에탄올 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향

김재련¹ · 김문무^{2*}

(¹동의대학교 화학과, ²동의대학교 응용화학)

노화란 나이가 들면서 생기는 몸의 변화로 검은 머리가 흰 머리로 변하는 백발화, 과산화 지질과 단백질로 구성되어 생성되는 검버섯, 주름 등으로 나타난다. 멜라닌은 tyrosine에서 DOPA를 거쳐 산화 중합반응에 의해 생성되는 고분자 물질로 인체 내에 존재하는 머리카락 및 피부 색을 결정한다. 이러한 멜라닌은 melanocyte에서 합성되며, 활성산소에 의해 과도하게 생성되면 노화를 일으킨다는 연구가 보고되고 있다. 본 연구의 목적은 항산화 효과 및 멜라닌 합성에 대한 바나나 껍질 추출물(MPEE)의 직접적인 효과를 밝히는 것이다. MPEE는 DPPH radical scavenging assay와 reducing power assay를 수행한 결과, 두 실험 모두 양성대조군인 vitamin C와 비슷한 항산화 활성을 나타내었다. 세포 실험에 앞서 세포 독성을 알아보기 위해 B16F1 세포에서 MTT assay를 수행하였다. MPEE는 32 µg/ml 이하의 농도에서 세포독성이 없는 것으로 나타났다. 또한, MPEE는 invitro에서 tyrosinase 활성과 DOPA-oxidation 뿐만 아니라 살아있는 세포에서 멜라닌 합성을 증가시켰다. 더욱이, H₂O₂로 세포를 노화시켜 L-DOPA 실험을 수행한 결과, MPEE는 멜라닌 합성을 증가시켰다. 단백질 수준의 발현을 위한 Western blot 분석을 수행한 결과, TRP-1, TPR-2와 SOD-2의 발현 수준은 MPEE의 존재 하에서 증가되었다. 이상의 결과는 MPEE가 항산화 소재로 멜라닌 합성을 촉진시킨다는 것을 암시하고 있다.