

그라비올라 잎(*Annona muricata* L.) 조다당 분획분의 멜라닌 생성 저해 효과

김이은¹ · 변의홍^{1,2,*}

¹공주대학교 식품공학과, ²공주대학교 식품과학연구소

Inhibitory effects of crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. on melanogenesis

Yi-Eun Kim¹ and Eui-Hong Byun^{1,2,*}

¹Department of Food Science and Technology, Kongju National University

²Food Science Research Institute, Kongju National University

Abstract The objective of this study was to evaluate the anti-melanogenic effects of crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. (ALP) in 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) stimulating hormone-induced mouse B16F10 melanoma cells. The inhibitory effect of ALP on tyrosinase activity was approximately 33.88±0.79% at 5 mg/mL. Additionally, the B16F10 cellular tyrosinase and melanin synthesis inhibition activities by ALP were 54.21±4.76 and 56.74±6.97% at 250 µg/mL, respectively. Similarly, whitening-related protein tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) and TRP-2, and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) were reduced by ALP treatment. These results indicated that ALP could be used as a functional cosmetic ingredient after confirming its whitening activity related to melanin content.

Keywords: *Annona muricata* L., tyrosinase, melanin synthesis, whitening activity, microphthalmia-associated transcription factor (MITF)

서 론

피부는 피하 조직, 진피, 표피로 3층 구조로 이루어져 있는 외부를 덮고 있는 가장 바깥 부분이다. 복잡한 구조와 물리화학적 특징으로 신체의 항상성 유지를 돕고 체온 조절, 신체 보호, 항원의 유입을 막아 면역방어 역할을 하는 등 여러 대사과정에 관여한다(Boguniewicz과 Leung, 2011). 인간은 세월에 따라 서서히 노화과정을 겪게 되는 내인성 노화 외에 온도, 습도, 기계적인 자극, 담배연기 등과 같은 다양한 외인성 노화 요인 인자로 인해 노화가 이루어지며, 그중 자외선은 피부 노화에 가장 큰 영향을 미치는 대표적인 인자이다(Yoo 등, 2015). 자외선은 멜라닌 색소 형성에 직접적으로 관련이 된다. 멜라닌 색소는 자외선 파장을 일부 흡수하게 되는데 과도한 자외선의 자극으로부터 피부 세포와 조직을 보호하며 이때 발생하는 활성산소를 제거하여 세포의 손상을 줄이는 역할을 한다(Kang 등, 2014). 멜라닌은 동식물계에 널리 분포하는 갈색 혹은 흑색의 천연 색소이다. 멜라닌 색소는 멜라닌세포라는 소기관에서 합성되며, 합성된 멜라닌 색소는 멜라닌세포의 수직상돌기를 통하여 인접세포인 각질세포로 전달되어 전달된 멜라닌 색소는 각질세포를 통하여 피부 내 여러 부위에 분포하게 된다(Zahra 등, 2016). 멜라닌 색소가 형성되

는 과정에서 관여하는 효소로는 tyrosinase, 5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid oxidase인 tyrosinase related protein 1 (TRP-1), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) chrome tautomerase로 불리는 tyrosinase related protein 2 (TRP-2)가 있으며, 이중 가장 주된 효소는 tyrosinase로 알려져 있다(Ando 등, 2012; Chan 등, 2011; Jang 등, 2015). 멜라닌은 tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA로 전환되고, 다시 tyrosinase에 의해 DOPA quinone으로 전환되어 멜라닌을 생성하게 된다(Jimenez-Cervantes 등, 1994; No 등, 1999). 따라서 tyrosinase의 활성 억제는 피부 내 멜라닌 중합체 생합성 저해의 검증법으로 이루어지고 있다.

최근 피부 착색에 대한 관심이 높아짐에 따라 멜라닌 생성을 억제시키기 위한 다양한 연구가 이루어져 있다. 현재 대표적인 미백물질로는 ascorbic acid, arbutin, kojic acid 등이 있으며, 이 물질들은 tyrosinase 저해제로서 미백 효과를 일으켜 식품산업, 화장품 및 의약품분야에 상업적으로 널리 이용되고 있으나, 알레르기 유발, 백반증, 염증, 색소침착 등의 부작용을 일으켜 인체에 안전성의 문제가 있어 보다 안전하고 독성이 없는 천연소재 물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다(Faria 등, 2011; Hibasami 등, 1998).

그라비올라(*Annona muricata*)는 목련목 포포나무과(Magnoliales: Annonaceae)에 속하고, 멕시코, 쿠바, 중앙아메리카, 카리브제도에 주로 자생하며 껍질, 씨앗, 잎 및 등을 전통약재로 응용해 왔다(Moghadamtousi 등, 2015a). 전통적으로 방광염, 당뇨병, 두통, 고혈압, 불면증, 간 질환, 염증, 경련, 피부질환 개선, 설사와 이질을 지혈하는 면역기능 개선보조 및 면역 체계강화를 위해 사용하였다(Carbajal 등, 1991; Nouemo 등, 1997; Yuan 등, 2003). 그라비올라 flavonoid, terpenoid, tannin, stearic acid, rutin, hyperoside 등 다양한 생리활성 물질을 다량 함유하고 있으며, 항당뇨, 항산

*Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Republic of Korea

Tel.: +82-41-330-1481

Fax: +82-41-330-1489

E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr

Received October 17, 2018; revised November 29, 2018;

accepted December 17, 2018

화, 면역활성, 항암, 항균, 항종양 등의 활성을 나타낸다고 보고 되어있다(Adewole과 Ojewole, 2008; Florence 등, 2013; Moghadamtousi 등, 2015b). 그러나 기존의 연구들은 유기용매를 사용하여 추출한 분획물에 관한 연구들이며, 그라비올라 잎 조다당 추출물의 연구는 미비한 실정이다. 유기용매 추출물과 조다당 분획물의 비교한 연구에서 조다당 분획물의 효능이 높은 것으로 나타났으며(Joo 등, 2017; Kim 등, 2017) 그라비올라 잎 에탄올 추출물에서 melanogenesis 저해를 통한 미백 효능이 보고되었다.

최근 식물에서 분리된 다당류가 넓은 범위의 생물의학적 분야에서 낮은 독성으로 인해 주목을 받고 있으며, 보체 및 큰포식세포 등의 활성을 통해 면역증진, 항암 효과를 높게 증가시키는 것으로 보고되어지며, 항산화 및 미백활성 등 다양한 활성이 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 그라비올라 잎 조다당 분획물의 미백 효능을 알아보기 위하여 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)를 처리한 mouse B16F10 melanoma cell에서 tyrosinase 활성 및 멜라닌 저해 효과, TRP-1, TRP2, tyrosinase, MITF, CREB 등과 같은 melanogenesis 관련 유전자 발현의 변화를 통해 미백 효과를 검증하고 미백화장품의 소재로서의 가능성을 관찰하였다.

재료 및 방법

그라비올라 조다당 분획물(ALP)의 제조

본 연구에서 사용된 그라비올라 잎은 (주)토담에서 제공받아 사용하였다. 건조된 그라비올라 잎을 실험실용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여, 그라비올라 잎 분말 50 g에 400 mL의 Distilled Water (DW)를 가하여 100°C에서 2시간 동안 열수추출 하였다. 추출물을 거름종이(No. 4, Whatman, Kent, UK)로 여과 후, 여과액에 70% 에탄올을 가하여 4°C에서 12시간 동안 방치한 후, 원심분리(3,200 rpm, 20분)하여 침지된 조다당(ALP)을 분리하고, 이를 냉동건조하여 실험에 사용하였다.

Tyrosinase inhibition assay

Tyrosinase 억제 활성은 tyrosinase와 L-DOPA의 작용결과 생성되는 DOPA quinone을 비색법을 이용하여 정량하는 방법으로 측정하였다(Flurkey, 1991). Mushroom tyrosinase (100 unit/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.2 mL와 기질로서 L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Sigma-Aldrich Co.) 0.4 mL, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 0.2 mL의 혼합액에 농도별(0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL) 그라비올라 조다당 분획물을 각각 0.2 mL를 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시켜 475 nm에서 흡광도를 측정 하고, 생성된 DOPA quinone의 색을 저해능으로 환산하였다. Tyrosinase 저해능은 다음의 환산식에 의하여 계산되었다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank1}}}{A_{\text{blind}} - A_{\text{blank2}}}\right) \times 100$$

여기서 A_{sample} 은 sample과 시료와 효소 흡광도를 의미하며, A_{blank1} 은 시료와 완충액 흡광도를 나타내고, A_{blind} 는 공시료와 효소 흡광도를 나타내며, A_{blank2} 는 공시료와 완충액 흡광도를 나타낸다.

B16F10 melanoma cell 배양

B16F10 melanoma 세포는 100 unit/mL penicillin 및 100 unit/mL streptomycin과 10% Fetal bovine serum (FBS)를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technology,

Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator (Thermo, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

세포독성 평가

B16F10 melanoma 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cell/well의 농도로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고 ALP와 IBMX를 Phosphate buffered saline (PBS, WelGene, Dalseogu, Daegu, Korea)에 용해하여 각각 (31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL), (25, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 µM)의 농도로 처리하여 72시간 동안 방치하였다. 세포 생존을 평가를 위하여 well당 30 µL의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT; Sigma-Aldrich Co.) 용액(5 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT시약의 첨가로 생성된 formazan을 녹이기 위해서 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co.)를 100 µL 씩 첨가하고 1시간 후 microplate reader (Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조군 (medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

B16F10 melanoma cell의 tyrosinase 활성 측정

B16F10 melanoma 세포를 6-well plate (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에 1×10⁶ cells/mL로 분주하고 24시간이 지난 후 ALP를 농도별(125 및 250 µg/mL)로 처리하였다. 2시간 후 melanin 생성을 촉진하기 위하여 IBMX (200 µM)을 처리하여 melanin 생성 반응을 촉진시켰다. 48시간 배양 후 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.)와 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)을 함유한 lysis buffer를 200 µL 가하고 20분간 4°C에서 반응시켜 세포들을 용해 시킨 후 원심분리 하여 상층액을 수집하였다. 수집한 단백질을 정량한 후 상층액 100 mL과 L-dihydroxy-phenylalanine (L-DOPA, 10 mM) 100 mL을 첨가한 뒤, 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

B16F10 melanoma cell의 Melanin 생성 억제능

B16F10 melanoma 세포를 이용한 melanin 합성 생성 억제능을 평가하기 위하여 phenol red가 없는 DMEM 배지를 사용하여 6-well plate (SPL)에 1×10⁶ cells/mL로 분주하고 24시간이 지난 후 ALP를 농도별(125 및 250 µg/mL)로 처리하였다. 2시간 후 melanin 생성을 촉진하기 위하여 200 µM IBMX을 처리하여 melanin 생성 반응을 촉진시켰다. 48시간 배양 후 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.)을 함유한 10 mM phosphate buffer (pH 6.8)를 100 µL 가하고 5분간 교반한 후 원심분리하여 cell pellet을 멜라닌 정량에 사용하였다. 분리된 pellet에 1 N NaOH 100 µL와 증류수 200 µL를 가하고 60°C에서 1시간 반응하여 완전히 녹인 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

B16F10 melanoma cell을 6-well plate (SPL Life Science)에 1×10⁶ cells/mL로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고 ALP를 125 및 250 µg/mL의 농도로 분주하고 2시간이 지난 후 IBMX 200 µM를 처리하였다. 48시간 후 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 후 NP40 Cell lysis buffer (Biosource, Gangnam-gu, Seoul, Korea)를 첨가한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 cell lysate를 분리하였다. 분리된 cell lysate는 BCA protein detection kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질 정량을 실시하였고, well당 20 µg의 cell lysate를 10%

polyacrylamide gel에 각각 넣어 SDS-PAGE로 변성분리하였다. 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 처리하였고, membrane은 antibody의 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution (skim milk 5%) 20 mL에서 1시간 방치하였다. 이후 TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며, TRP-1, TRP-2, MITF 및 Tyrosine의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체(Cell signaling, Danvers, MN, USA)를 1:2,000으로 희석하여 4시간 동안 반응시키고, TBST로 5분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항체(goat-anti rabbit IgG, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 1:5,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, 현상을 위하여 enhanced chemiluminescence reagent (ECL, Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Germany)를 사용하여 인화하였다.

통계 분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 one-way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

ALP의 Tyrosinase 저해 능력 평가

멜라닌은 고등식물, 박테리아, 균류 등을 포함하여 모든 살아 있는 유기체에서 발견되는 흑갈색 또는 적갈색을 띠는 천연 색소이다. 멜라닌 색소는 과도한 자외선의 자극으로부터 피부 세포와 조직을 보호하는 과정 중에 생성이 되며, 멜라닌 생성세포가 합성하는 멜라닌의 양과 종류에 따라 피부색이 결정된다(Berneburg 등, 2000). 멜라닌 생합성 초기 단계에서 tyrosine이 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)으로 변환되고, DOPA를 산화시켜 DOPA quinone으로 변환시킨 후, 붉은 계열의 eumelanin과 갈색 계열의 pheomelanin을 합성시켜 멜라닌이 형성되는데, tyrosinase는 이들 반응의 속도조절에 관여해 멜라닌 생합성에서 가장 중요한 역할을 수행한다.

본 연구에서는 그라비올라 잎 조다당 분획물의 미백 활성에 관하여 알아보기 위하여 ALP의 tyrosinase 저해능에 관하여 평가하였다(Fig. 1). 양성대조군은 kojic acid를 사용하였다. ALP를 농도 별(0.25, 0.5, 1, 2.5 및 5 mg/mL)로 처리하여 tyrosinase의 억제

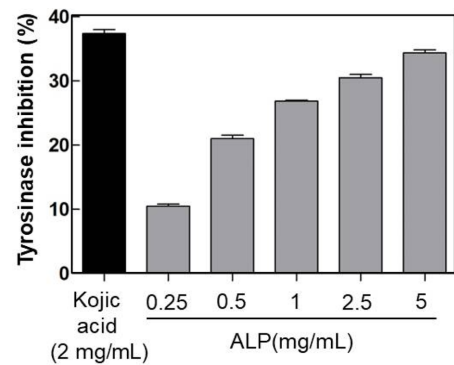


Fig. 1. Tyrosinase inhibition activity of crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. (ALP). Each experiment was conducted in triplicates, and the results are expressed as mean±SD.

활성에 관하여 평가한 결과, 10.2 ± 0.89 , 20.56 ± 0.70 , 27 ± 1.50 , 30 ± 0.78 및 $33.88 \pm 0.79\%$ 의 저해능이 나타났다. ALP의 처리 농도가 증가함에 따라 유의적으로 tyrosinase를 억제시키는 것으로 관찰되었다. 따라서 ALP의 처리는 melanin 형성에 관여하는 tyrosinase 효소 활성을 억제함으로써 멜라닌 생합성 저해에 기여하는 것으로 생각된다.

ALP의 B16F10 melanoma cell의 생존율 측정

그라비올라 잎 조다당 분획물의 멜라닌 생성 저해효과를 알아보기 이전에 ALP의 세포독성에 의한 멜라닌 생성량 감소가 아닌지 확인하기 위하여, ALP의 세포독성을 평가를 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 세포생존율의 측정은 세포의 대사 과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소와 MTT tetrazolium이 반응하면 MTT formazan이 형성되고 이를 다시 DMSO로 세포막을 터뜨려, 보라색의 흡광도를 측정하였다. 본 연구에서 B16F10 세포에 ALP (31.25, 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g/mL}$)와 IBMX (25, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800 및 1000 μM)로 처리하였을 때 나타나는 세포생존율의 변화에 관하여 알아본 결과 ALP (500 $\mu\text{g/mL}$), IBMX (300 μM) 이상의 처리 농도에서는 세포독성이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 B16F10 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 생성 억제에 관한 실험에서 ALP와 IBMX의 최적 처리 농도는 250 $\mu\text{g/mL}$ 및 200 μM 이하라고 생각되어 후후 실험에서 최적 농도에서 세포 실험을 진행하였다.

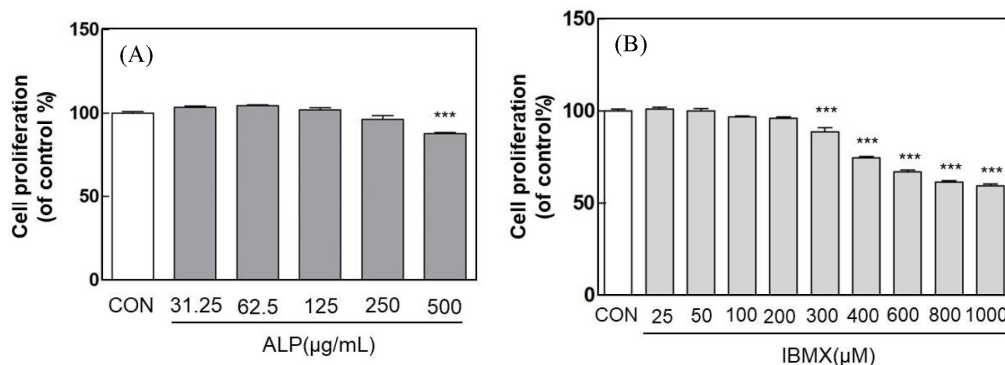


Fig. 2. Cell viability of B16F10 melanoma cells after treating crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. (ALP) and IBMX. Each experiment was conducted in triplicates, and the results are expressed as mean±SD. Statistical significance (***) $p < 0.001$ is indicated for treatments versus control (CON).

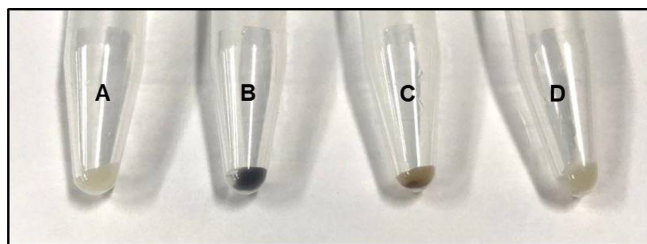


Fig. 3. The difference of melanin contents in B16F10 mouse melanoma cells treated with various solvent fractions of crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. (ALP). (A) control, (B) IBMX; 200 μM, (C) IBMX+125 μg/mL ALP, (D) IBMX+250 μg/mL ALP.

ALP의 B16F10 melanoma cell 멜라닌 색소침착 억제 육안적 관찰

B16F10 melanoma 세포 멜라닌 색소 생성에 그라비올라 잎 조다당 분획물이 미치는 영향을 관찰하기 위해 B16F10 세포에 ALP (125 및 250 μg/mL)를 처리하고, 멜라닌 유도를 위해 IBMX (200 μM)를 함께 처리하였다. 처리 후 세포의 pellet을 육안적으로 관찰하였을 때 IBMX를 처리하지 않은 군에 비하여 IBMX를 처리한 군에서 짙은 검은색으로 변화하는 것을 관찰할 수 있었으며, IBMX와 ALP를 함께 처리하였을 경우 농도 의존적으로 색이 옅어짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 ALP가 IBMX에 의해 유도된 B16F10 melanoma 세포의 멜라닌 생성을 효과적으로 저해하는 것으로 생각된다.

ALP의 B16F10 melanoma cell의 Tyrosinase 및 멜라닌 생합성 저해 활성

멜라닌 색소는 피부에서 자외선을 흡수, 산란시키는 기능을 가지고 자외선 방어에 있어 중요한 역할을 한다. 멜라닌 합성은 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)에 의해 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 공동합체인 멜라닌을 생성하게 된다(Ferguson과 Kidson, 1997; Hearing과 Tsukamoto, 1991). 이중 tyrosinase는 속도제한 효소로서 멜라닌의 생합성과정에서 주요한 조절 단계에 참여하는 효사이므로 이 효소의 활성 억제 정도를 확인함으로써 멜라닌 생성 억제의 효능을 확인할 수 있다. 본 연구에서는 IBMX에 의

해 유도된 멜라닌 생성 조건에서 그라비올라 잎 조다당 분획물의 억제효과를 확인하기 위하여 B16F10 세포에 IBMX와 ALP를 함께 처리하여 세포내 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 tyrosinase 활성에서 IBMX만 처리한 군에서는 tyrosinase 활성이 대조군에 비하여 87.32±4.34% 증가한 것을 확인할 수 있었으며, ALP 동시 처리군에서는 tyrosinase 활성이 농도 의존적으로 (52.67±0.27% 및 56.74±6.97%) 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 또한 멜라닌 함량을 측정한 결과에서도 유사한 양상을 보였다(Fig. 4B). 먼저 음성대조군인 대조군과 IBMX 단독 처리군의 멜라닌 형성을 비교하여 볼 때 IBMX 단독처리군에서 멜라닌의 형성이 59.67±4.34%로 증가된 것으로 보아 IBMX에 의하여 melanogenesis가 유도되었음을 나타내고, ALP를 처리한 군에서 멜라닌의 함량이 농도 의존적(44.22±4.08% 및 54.21±4.76%)으로 감소된 것으로 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 ALP의 처리는 tyrosinase의 억제뿐만 아니라 melanocyte에서 IBMX로 유도하는 melanogenesis를 효과적으로 억제하는 것으로 생각된다.

ALP의 B16F10 melanoma cell의 멜라닌 생성 관련 단백질 발현 저해효과

멜라닌 생합성 신호전달 체계에는 다양한 신호전달물질이 관여하고 있으며 주요한 세포 내 신호전달 경로는 cyclic monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) 경로로서, cAMP는 PKA, cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)을 경유하여 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 촉진하고, 활성화된 MITF는 멜라닌 생성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 활성화 시킨다고 알려져 있다(Han 등, 2010; Park 등, 2013). 본 연구에서는 그라비올라 잎 조다당 분획이 멜라닌 합성에 관련된 단백질 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해 TRP-1, TRP-2, tyrosinase, MITF 및 p-CREB의 발현양을 측정하였다(Fig. 5). IBMX 단독 처리군에서는 TRP-1, TRP-2, tyrosinase, MITF 및 p-CREB의 발현양이 증가하였으며, ALP 동시 처리군에서는 농도 의존적으로 모든 단백질의 발현양이 감소하는 것을 알 수 있었다. 위의 결과를 보아 그라비올라 잎 조다당 분획물이 cAMP/PKA 경로에서 멜라닌 생성 관련 인자인 TRP-1, TRP-2, tyrosinase, MITF 및 p-CREB 단백질의 발현을 효과적으로 저해하여 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 생각된다. 따라서 그라비올라 잎 조다당 분획물은 멜라닌 저해제로서 기능성 미백 소재 개발에 응용할 수 있는 소재가 될 것으로 생각된다.

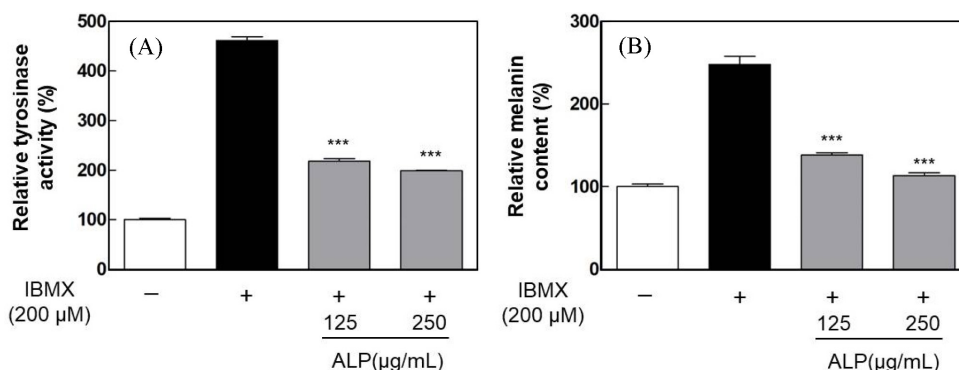


Fig. 4. Effect of crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. (ALP) on tyrosinase and melanin synthesis in B16F10 mouse melanoma cells treated with 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; 200 μM). Each experiment was conducted in triplicates, and the results are expressed as mean±SD. Statistical significance (*)*p*<0.001 is indicated for treatments versus only IBMX-treated group.**

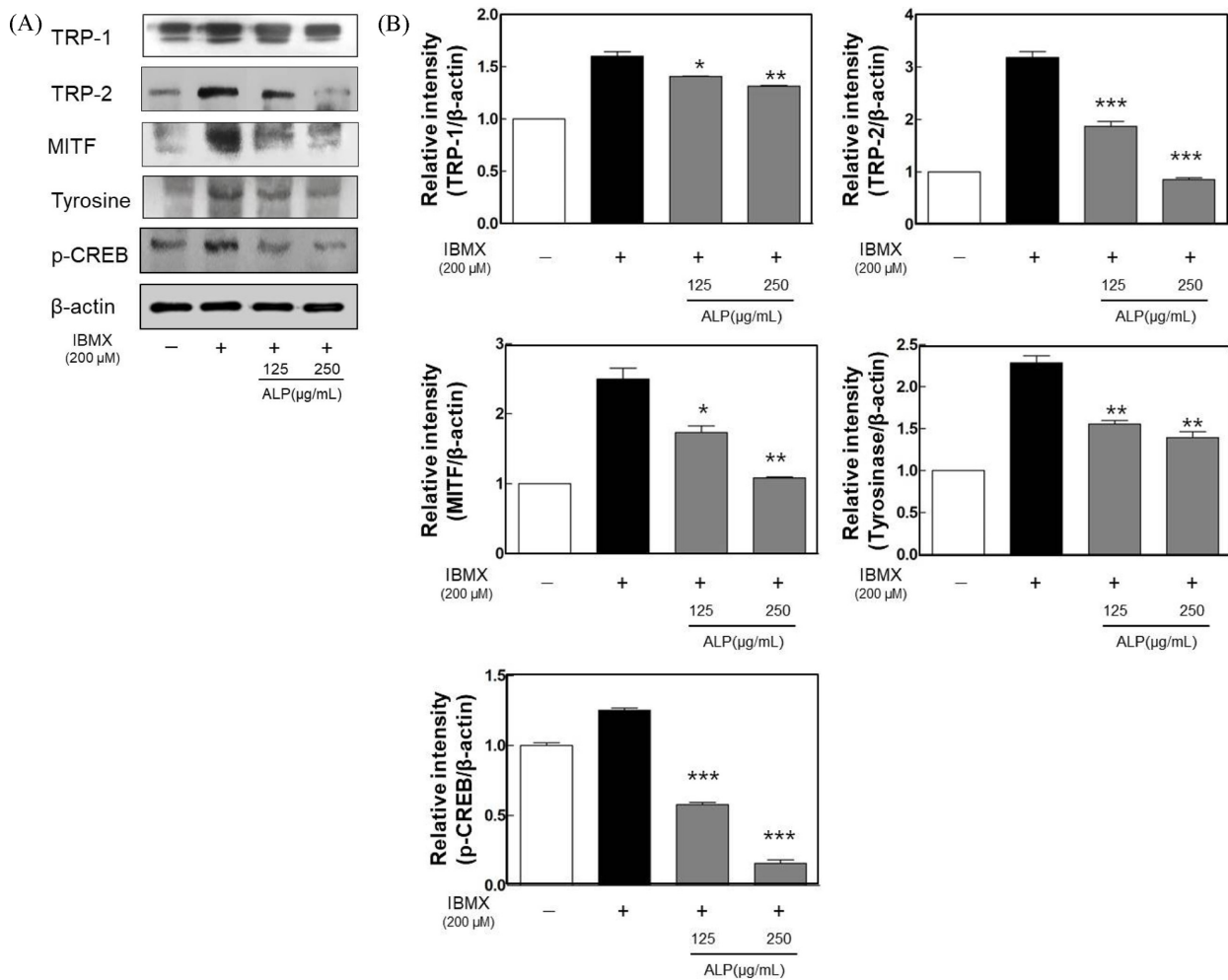


Fig. 5. Effects crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. (ALP) on the levels of protein expression of TRP-1, TRP-2, MITF, Tyrosinase, p-CREB in B16F10 mouse melanoma cells. Cell were treated with 200 μM IBMX in the presence or absence of ALP (125 and 250 μg/mL). Results are expressed as the mean±SD (n=3). Statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$) is indicated for treatments versus only IBMX-treated group.

요약

본 연구는 그라비올라 잎 조다당 분획물(ALP)의 멜라닌 저해 활성에 관하여 알아보기 위하여 B16F10 melanoma 세포의 세포 생존율, tyrosinase 저해활성, 멜라닌 함량, 멜라닌 생합성에 관여하는 단백질(TRP-1, TRP-2, tyrosinase, MITF 및 p-CREB)의 발현을 관찰하였다. ALP의 tyrosinase 활성 저해능을 측정하였을 때, 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 B16F10 세포에 ALP를 처리하여 멜라닌 활성 저해능에 관하여 알아봤을 때, tyrosinase, 멜라닌 함량이 농도 의존적으로 줄어드는 것을 확인하였다. 또한 ALP가 미백과 관련된 TRP-1, TRP-2, tyrosinase, MITF 및 p-CREB의 단백질 발현양이 농도 의존적으로 감소되는 것으로 관찰되었다. 따라서 ALP는 멜라닌 저해 활성을 효과적으로 나타낸 것으로 보아 기능성 미백 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

References

Adewole SO, Ojewole JA. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles

- and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Tradit. Complem.* 6: 30-41 (2008)
- Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake and dispersion. *J. Invest. Dermatol.* 132: 1222-1229 (2012)
- Boguniewicz M, Leung YM. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunology Review.* 242: 233 (2011)
- Berneburg M, Plettenger H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 16: 239 (2000)
- Carbajal D, Casaco A, Arruzazabala L, Gonzalez R, Fuentes V. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine. *J. Ethnopharmacol.* 33: 21-24 (1991)
- Chan YY, Kim KH, Cheah SH. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *J. Ethnopharmacol.* 137: 1183-1188 (2011)
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Couraud PO, Romero I, Weksler B, de Freitas V, Mateus N, Calhau C. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food Funct.* 2: 39-44 (2011)
- Ferguson CA, Kidson SH. The regulation of tyrosinase gene transcription. *Pigment Cell Res.* 10: 127 (1997)
- Florence NT, Benoit MZ, Jonas K, Alexandra T, Dsir DD, Pierre K, Thophile D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced dia-

- betic rats. *J. Ethnopharmacol.* 151: 784-790 (2013)
- Flurkey WH. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J. Food Sci.* 56: 93-95 (1991)
- Han GS, Kim DS, Woo WH, Mun YJ. Inhibitory effect of *Fructus ligustri lucidi* on tyrosinase and MITF expressions. *Kor. J. Ori. Physiol. Pathol.* 24: 296-301 (2010)
- Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5: 2902 (1991)
- Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K, Kojima T, Nakanishi K, Akashi K, Hara Y. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep.* 5: 527-529 (1998)
- Jang JY, Kim HN, Kim YR, Kim BW, Choi YH, Choi BT. Studies of Inhibitory Mechanism on Melanogenesis by Partially Purified *Asiasari radix* in α -MSH Stimulated B16F10 Melanoma Cells. *J. Life Sci.* 20: 1617-1624 (2015)
- Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano JA, Garcia-Borron JC. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* 269: 17993 - 18000 (1994)
- Joo D, Jeong S, Lee HK, Shin SH, Choi SJ, Kim K, An IS, Kim KY, Ku JE, Jeong SH, Cha HJ. *Annona muricata* L. extracts decrease melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Bio-medical Dermatology.* 1: 10-16 (2017)
- Kang MK, Lee YE, Woo WH, Mun YJ. *Commelina communis* Ledeb inhibits melanin synthesis in alpha-MSH-stimulated B16F10 cells. *J. Physiol. Pathol. Korean Med.* 28: 506-511 (2014)
- Kim YE, Lee JH, Sung NY, Ahn DH, Byun EH. A comparative study of the immuno-modulatory activities of ethanol extracts and crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. *Korean J. Food Sci. Technol.* 4: 453-458 (2017)
- Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Hajrezaie M, Karimian H, Abdulla MA, Kadir HA. *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. *Int. J. Surg.* 18: 110-117 (2015a)
- Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Karimian H, Fadaeinasab M, Firoozinia M, Ameen Abdulla M, Abdul Kadir H. The chemopotentia effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of acetogenin annomuricin E in HT-29 cells: a bioassay-guided approach. *PLoS One* 10: 10-14 (2015b)
- No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *J. Life. Sci.* 65: 241-246 (1999)
- Nouemo P, Koudogbo B, Tchivounda H, Nguema C, Etoua M. Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol- induced convulsive seizures in mice, *Phytother. Res.* 11: 243-245 (1997)
- Park SH, Kim AH, Park BJ, Kim JJ. Whitening effect of Biochanin A. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.* 39: 289-294 (2013)
- Yoo DH, Joo DH, Lee SY, Lee JY. Antioxidant effect of *Nelumbo nucifera* G. leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line. *J. Life Sci.* 25: 1115-1123 (2015)
- Yuan SS, Chang HL, Chen HW, Yeh YT, Kao YH, Lin KH, Wu YC, Su JH. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax-and caspase-3-related pathway. *Life Sci.* 72: 2853-2861 (2003)
- Zahra TH, Akaberi M, Vatani M, Emami SA. Evaluation of antioxidant and anti-melanogenic activities of different extracts from aerial parts of *Nepeta binaludensis* Jamzad in murine melanoma B16F10 cells, Iran. *J. Basic Med. Sci.* 19: 662-669 (2016)