

*Symphoricarpos albus*의 항산화능과 Zebrafish 배아 독성 및 재생 효능 평가

이찬우*^{1,2} · 히혜연*⁴ · 김면수⁶ · 장영표³ · 김보애^{5,†}

¹(주)미그림

²경희대학교 약학대학, 대학원생

³경희대학교 약학대학, 교수

⁴목원대학교 화학과 화장품전공, 대학원생

⁵목원대학교 화장품공학과, 교수

⁶(주)ICBIO

(2023년 12월 27일 접수: 2023년 4월 11일 수정: 2024년 4월 15일 채택)

Evaluation of antioxidant activity, zebrafish embryo toxicity, and regenerative efficacy of *Symphoricarpos albus*

Chanwoo Lee*^{1,2} · HyeYeon Heo*⁴ · Myunsoo Kim⁶ · YoungPyo Jang³ · Bo Ae Kim^{5,†}

*These authors equally contributed to this work.

¹Miglim Co., Ltd, A-1309, 30, Songdomirae-ro, Yeonsu-gu, Incheon, 21990, South Korea

^{2,3}College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul, 02447, South Korea

^{4,5}Dept. of Cosmetics Engineering, College of Technology Sciences, Mokwon University,
Daejeon, 35349, South Korea.

⁶Future Technology Research Center, ICBIO Co, Ltd

(Received December 27, 2023; Revised April 11, 2024; Accepted April 15, 2024)

요약 : 본 연구는 *Symphoricarpos albus*(*S. albus*) 추출물과 발효 추출물을 대상으로 zebrafish 배아를 이용하여 천연 화장품 소재로서의 유효성 평가 및 꼬리지느러미 재생력을 비교 평가하였다. 이를 위한 *S. albus* 추출물의 항산화 활성은 10-200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 DPPH radical scavenging, FRAP activity, ABTS⁺ radical scavenging을 진행하였으며, 모두 농도 의존적인 radical 소거 활성을 보이고, *S. albus* 잎 추출물에서 가장 높은 항산화 활성을 나타냈다. Zebrafish는 현재 각광받고 있는 실험 대체 동물로서 수많은 화장품 연구에 활용되고 있으며, 본 연구는 zebrafish 배아를 채취하여 응고율, 부화율, 심장 독성을 평가하였다. 그 결과 발효 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 재생 효능을 평가하기 위해 zebrafish 꼬리지느러미를 절단하였고, 3일 동안 상처 회복력을 관찰하였다. 그 결과 72 시간 부터 *S. albus* 잎 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군 대비 17%의 재생 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 *S. albus*가 피부 개선용 항산화 및 재생을 위한 천연소재로서 활용 가능한 것으로 사료된다.

[†]Corresponding author

(E-mail: kba@mokwon.ac.kr)

주제어 : *Symphoricarpos albus*, 항산화, 제브라피쉬, 배아, 독성, 재생

Abstract : This study compared and evaluated the antioxidant activities of *Symphoricarpos albus*(*S. albus*) extract and fermented extract. Antioxidant activity was measured by DPPH radical scavenging, FRAP, and ABTS. Concentrations were measured at 200, 100, 50, and 10 $\mu\text{g/mL}$, and antioxidant activity increased in a concentration-dependent manner. *S. albus* leaves fermented extracts had the highest antioxidant activity. And this study evaluated the safety and tail regeneration of *S. albus* extract using zebrafish model embryos. Zebrafish are in the spotlight as an alternative animal and can be used for cosmetic research. Zebrafish embryos were collected and evaluated for coagulation rate, hatching rate, and cardiotoxicity. As a result, it was toxic at concentrations above 100 $\mu\text{g/ml}$. The tail was cut and the regenerative effect was observed for 3 days. As a result, from 72 hours, *S. albus* 200 $\mu\text{g/ml}$ leaf extract showed a 17% regenerative effect compared to the control group. These results suggest that *S. albus* can be used as a natural material for antioxidant and regeneration for skin improvement.

Keywords : *Symphoricarpos albus*, Antioxidant, Zebrafish, Embryo, Toxicity, Regeneration

1. 서론

피부는 신체의 표면을 덮고 있는 가장 넓은 장기로서 외부 환경 변화에 대응하여 인체 내부의 항상성을 유지하는 장벽기능을 수행한다[1]. 이러한 장벽기능은 피부의 주된 구성 세포인 각질형성세포에 의해 생성 유지되며, 각질형성세포는 표피의 95% 이상을 차지하는 피부의 가장 최외각층에 존재함으로써 자외선과 같은 유해물질로부터 신체를 보호하고 몸의 수분 손실을 방지한다. 그러나 각질형성세포의 분화과정은 *loricrin*, *filaggrin*과 같은 피부 장벽 단백질 분화를 촉진시키는 등 표피층과 진피층의 기능 및 구조에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있으며, 이는 피부 장벽기능 이상으로 이어져 피부 건조를 일으키고 많은 수의 피부 질환을 불러일으키는 중요한 병인으로 작용한다[2].

피부는 항시 산소와 접촉하고 있으며 자외선 조사 및 유해인자에 지속적으로 노출되기 때문에 산화적 스트레스에 의한 피부장벽이 쉽게 손상될 수 있다. 자외선에 장시간 노출 시 세포 내 DNA를 직접적으로 손상시키고 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 유발한다[3, 4]. 활성산소종은 피부 손상의 중요 인자인 Superoxide(O_2^-), Hydroxyl Radical(OH^\cdot) 등과 같은 free radical 상태로 산소 독성을 불러일으켜 단백질의 산화, 항산화 효소 활성 저해, 멜라닌 생성 반응 촉

진, 콜라겐 및 엘라스틴 분자와 같은 결합조직 세포의 교차결합 파괴로 탄력 감소, 주름 생성을 주도한다. 또한, 생체 내 활성산소종의 과다 발생은 산화 물질과 항산화 물질 사이의 불균형으로 인한 산화적 스트레스로 인하여 세포 성분들의 손상을 야기함에 있어 결과적으로 외형적으로 나타나는 피부 노화 가속의 원인으로 작용한다[5-7]. 따라서 활성산소종으로부터의 노화 억제 및 산화적 손상 예방을 위한 free radical 소거 활성을 갖는 항산화 방어망을 구축하고 있으며, 특히 합성 항산화제로 사용되어지는 Butylated Hydroxy-anisole(BHA)와 Butylated Hydroxy-toluene(BHT)의 독성 및 *in vivo*계에서의 문제점이 대두되면서 기존의 항산화제가 갖는 한계점을 해결하고 안전성 및 안정성이 확보되는 천연 항산화제로서의 개발과 응용을 시도하고 있다.

Zebrafish는 척추동물로서 인간의 유전자와 약 80% 이상의 염기서열 유사성을 가지며 동시에 신경계 및 각종 기관형성과정이 인간과 매우 유사하여 세계적으로 수많은 연구가 이루어지고 있는 대체실험동물 모델이다. Zebrafish 연구가 각광받고 있는 이유 중 한 가지는 화장품법상 금지되어 있는 동물실험에 관계하여 3R 원칙(Replacement, Reduction, Refinement)에 근거한 포유류 대체 모델로 시각독성평가(Contrast-optomotor, C-OMR)를 활용한 독성의 메커니즘이 이미 밝혀진 바 있으며, 규제에서 벗어나 화장품 원료의

독성 및 각종 효능평가 적용 또한 우수하기 때문이다[8, 9].

Symphoricarpos albus(*S. albus*)는 스노우베리로 불리며 인동과 낙엽 활엽 관목으로 약 15종만이 존재하는 심포리카르포스 속 식물이다. *S. albus*는 풍부한 사포닌 성분이 함유되어있는 것으로 알려져 있으나, 현재 이에 관한 국내 기존 연구로 “스노우베리 추출물을 함유하는 조성물” 및 “스노우베리 추출물을 함유하는 주름 개선용 화장품 조성물”의 특허 2건만이 출원·등록되어 있는 상태로서 자생지별 *S. albus* 추출물의 콜라겐 생성 촉진 및 멜라닌 생성 저해 효과 등의 효능만이 밝혀진바, *S. albus*를 활용한 항산화 활성 및 *In vivo*에서의 독성, 재생 평가와 관련한 연구 실태는 미미한 실정이다.

이에 본 연구는 *S. albus*를 열매, 잎, 줄기, 뿌리 4 부위로 나누어 추출물을 제조하고, 이를 발효 추출하여 각 부위별 *S. albus* 추출물(UFSA) 4종과 발효 *S. albus* 추출물(FSA) 4종을 수득하였다. 각 부위 별 UFSA, FSA의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH radical scavenging activity, Ferric reducing/antioxidant power activity, ABTS⁺ radical scavenging activity를 수행하고, *In vivo*에서 zebrafish embryo, larvae의 독성 시험을 진행하였으며, Zebrafish larvae 꼬리 재생을 통해 지느러미의 상처 복구 및 조직 재생력을 확인하였다. 본 연구 결과는 항산화 및 피부 재생 유효성분으로서 *S. albus* 추출물(UFSA)과 *S. albus* 발효 추출물(FSA)의 천연 화장품 소재로의 활용 가능성을 검증하였다.

2. 실험

2.1. 시료 추출

S. albus 추출은 *S. albus*를 4 부위 열매, 잎, 줄기, 뿌리로 나누어 진행하였다. 각각의 원물은 10배수의 70% Ethanol을 가한 뒤 2시간 동안 초음파 추출하였으며 이후, Overnight 정지 추출을 진행하였다. 2차 추출에서는 10배수의 50% Ethanol을 첨가하였고, 2시간 동안 초음파 추출하였으며 추출 후 Overnight 정지 추출을 진행하였다. 뿌리의 경우 1, 2차 모두 원물에 대한 용매의 비율을 20배수로 첨가 추출하였다. 수득된 Ethanol 추출물은 No. 2 filter paper로 여과하였으며, 열매, 줄기, 뿌리는 Rotary Evaporator

(Eyela, Japan)을 이용하여 감압농축 후 동결건조하였다. 남은 농축 후 Hexane과 1:1 비율로 혼합하여 2회 분획을 실행한 뒤 Chlorophyll을 제거하고 동결건조를 진행해 *S. albus* 추출물 8종을 최종 수득하였다.

2.2. 시약 및 기기

유효성 평가를 위해 사용된 시약은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine), Potassium persulfate, ABTS⁺ (2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Ascorbic acid는 Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA)에서 구매하였고, HCl(Hydrochloric acid), Methanol, Acetic acid, Etanol, DMSO (Dimethyl sulfoxide), FeCl₃(Kanto, Japan), Sodium acetate(Shinyo, Korea)는 Ducksan (Ducksan General Science, Insan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 분석을 위해 사용한 기기는 Micro plate reader (BioTek, USA), Leica microscope (Wetzlar, Germany), Image J(Image J 1.5.1j8, Wayne Rasband NIH, USA)등을 사용하였다.

2.3. DPPH radical scavenging activity

본 연구에서는 DPPH radical scavenging activity를 Blois의 방법을 일부 변형하여 측정하였다[10]. UFSA, FSA를 각각 10, 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 용해하여 각각의 시료를 96-well plate에 50 μ L로 분주하고 0.2mM DPPH solution을 150 μ L 처리하여 28°C에서 30분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 Ascorbic acid(VC)를 사용하였다.

2.4. Ferric reducing/antioxidant power activity

본 연구에서는 Ferrous-tripyridyltriazine (Fe³⁺-TPTZ)에서 Ferrous-tripyridyltriazine으로 환원되는 Benzie의 방법을 변형하여 환원력을 측정하였다[11]. Frap working solution은 300mM acetate buffer solution (pH 3.60), 40mM HCl을 이용하여 제조한 10mM TPTZ 및 20mM FeCl₃을 각각 10:1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 제조하였다. 각각의 시료를 96-well plate에 50 μ L를 분주하고 FRAP working solution을 150 μ L 처리하여 37°C에서 10분간 반응시킨 뒤 595nm

에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 Ascorbic acid(VC)를 사용하였다.

2.5. ABTS⁺ radical scavenging activity

본 연구에서는 Müller의 방법을 변형하여 ABTS⁺ radical scavenging activity를 측정하였다[12]. ABTS⁺ working solution은 7mM ABTS와 2.45mM potassium persulfate를 1:1(v/v)의 비율로 혼합한 뒤 상온에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 ABTS radical을 형성시킨 뒤 Ethanol에 희석하여 734nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.02 가 되도록 제조하였다. 각각의 시료를 96-well plate에 50 μ L를 분주하고 ABTS⁺ working solution을 150 μ L 처리하여 상온에서 20분간 반응시킨 뒤 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 Ascorbic acid(VC)를 사용하였다.

2.6. Zebrafish 사육 및 embryo 생산

Zebrafish adult는 낮 14시간 밤 10시간의 생체 주기로 closed circulation filtration system을 통해 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 수온을 유지하며 사육하였다. Zebrafish embryo의 경우 mating cage set에 암컷과 수컷의 비율을 2 : 3 비율로 한 뒤 다음 날 아침 광 자극을 가하여 30분간 산란을 유도하였다. 채취한 embryo는 전용 media(sea salt solution)를 이용하여 충분히 세척한 뒤 건강한 embryo만을 획득하여 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ incubator에서 배양하였다. Media는 24시간 주기로 교체하여 실험을 진행하였다.

2.7. Zebrafish embryo 독성 평가

6 hpf (Hours-Post-Fertilization) Zebrafish embryo를 24-well plate에 10개씩 분주한 뒤 10, 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 제조된 각각의 UFS A, FSA 시료를 embryo media에 용해하여 2mL씩 처리하였다. 대조군으로 embryo media를 사용하였으며, 24시간 주기로 시료를 교체하여 72시간 동안 embryo의 응고율(coagulation rate, %) 및 부화율(hatching rate, %)을 측정하였다.

2.8. Zebrafish larvae 심장 독성 평가

Embryo 독성평가 진행에 사용된 72 hpf Zebrafish larvae를 embryo media로 세척하여 24-well plate에 5마리씩 분주하였다. 각각의 larvae에 tricaine을 처리하여 마취시킨 뒤 Leica microscope를 이용해 1분간 심장박동수를 측정하

였다[13].

2.9. Zebrafish larvae 꼬리 재생 효능 평가

Zebrafish larvae의 재생력 평가를 위해 수정 후 72 hpf zebrafish의 larvae를 60mm petri dish에 10마리씩 분주하였다. 다음으로 0.40 mM의 tricaine으로 마취한 larvae의 꼬리지느러미를 needle로 절단하여 embryo media로 세척한 후, 96-well plate에 한 마리씩 배치하였다[14]. 100, 200 μ g/mL 농도의 *S. albus* 추출물을 각 well에 2 mL씩 처리하였으며 대조군으로는 embryo media를 사용하였다. 시료 처리된 zebrafish larvae는 항온조($28 \pm 0.5^\circ\text{C}$)에 배양하였으며, 24시간 주기로 3일간 재생 면적을 Leica microscope로 관찰하고 Image J(Image J 1.51j8, Wayne Rasband NIH, USA) 프로그램을 사용하여 수치화하였다.

2.10. 통계처리

본 연구는 각 3회 반복 시행하여 평균값 및 표준오차로 결과를 나타내었으며, 각 항목에 따라 Student's t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH radical scavenging activity

S. albus Unfermented extracts(UFSA), Fermented extracts(FSA)의 각 부위 별 DPPH 라디칼 소거 활성 결과 UFSA, FSA 모두 농도 의존적으로 높은 활성을 보였다. 최고 농도인 200 μ g/mL에서는 UFSA의 경우 잎(59.51%), 줄기(53.73%), 열매(38.29%), 뿌리(39.04%) FSA의 경우 잎(38.00%), 뿌리(33.34%), 줄기(27.58%), 열매(26.21%) 순으로 4 부위 중 잎에서 가장 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 대체적으로 FSA군에 비해 UFSA군에서 더 강한 활성을 보였으며, FRAP 활성 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 결과와 비교하였을 때 가장 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. DPPH 라디칼 소거 활성은 실제로 식물 추출물의 항산화 활성과 연관성이 매우 높은 것으로 보고되고 있다. 항산화 활성이 뛰어난 것으로 알려진 편백나무 중 잎 추출물이 200 μ g/mL 농도에서 61.5%의 DPPH radical을 소거능을 나타낸 것과 비교하였을 때 *S. albus* 잎 추출물(UFSA)이 이와 유사한 활성도를 가

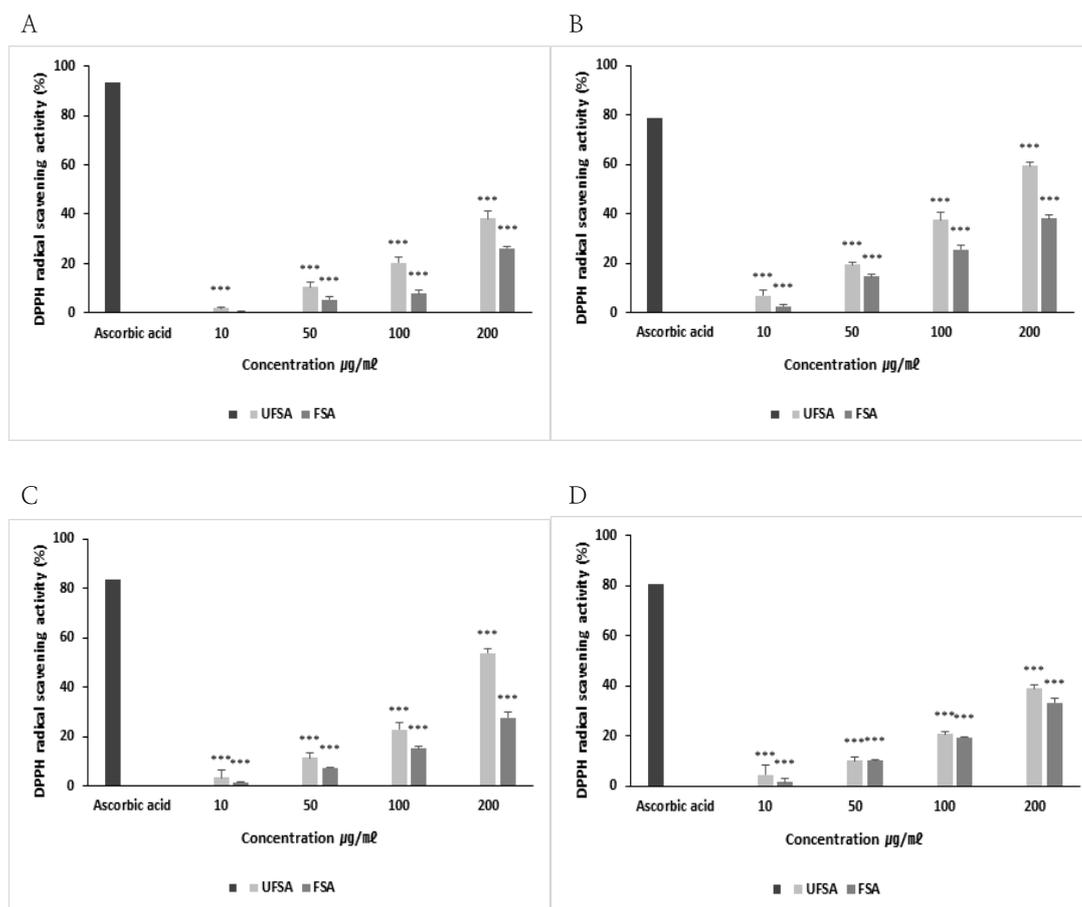


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (%) of Unfermented *S. albus* extracts(UFSA) and Fermented *S. albus* extracts(FSA). Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (Ascorbic acid : 50 μ g/mL , *** : p < 0.005). (A : Fruits, B : Leaves, C : Stems, D : Roots)

짐으로써 항산화 활성 효능을 입증하고 천연 항산화제로서의 활용 가능성을 확인하였다[15]. 또한 야생 베리류의 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA) 수행 결과 *S. albus*는 많은 양의 페놀산, 플라보노이드를 함유하는 것으로 나타났으며, 그중 강한 항산화 작용을 나타내는 플라보노이드계 퀘르세틴(146.27mg/100g) 및 캄페롤(247.31mg/100g)이 다량 검출된 것을 확인한 바 있다[16]. 이와 더불어 Kim 등 (2020)의 연구에 따르면 베리류인 아로니아의 부위별 주요 성분을 정량한 결과 70% 에탄올 추출물에서 잎(31,241.03 \pm 88.82 RUE μ g/g), 줄기(23,241.03 \pm 235.00 RUE μ g/g), 열매(3,580.51 \pm 23.50 RUE μ

g/g) 순으로 플라보노이드 함량이 많은 것을 확인할 수 있었다[17]. 일반적으로 총 플라보노이드의 함량이 DPPH 라디칼 소거능과 밀접한 관계가 있다는 점을 고려하였을 때, *S. albus* 잎 추출물은 *S. albus* 열매, 줄기, 뿌리 추출물에 비해 비교적 높은 함량의 플라보노이드를 함유한 것으로 판단되고 이로써 가장 우수한 항산화능을 나타내는 것으로 사료된다.

3.2. Ferric reducing/antioxidant power activity

FRAP은 Fe^{3+} -TPTZ가 항산화제와 상호작용하여 강력한 푸른색의 Fe^{2+} -TPTZ로 복합체를 형성

하여 측정된다[18]. 10–200 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 *S. albus* Unfermented extract(UFSA), Fermented extract(FSA)의 각 부위 별 FRAP 활성 결과 UFSA, FSA 모두 농도 의존적으로 높은 활성을 보였다. 최고 농도인 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 UFSA의 경우 잎(49.01%), 뿌리(34.74%), 줄기(32.03%), 열매(21.87%), FSA의 경우 잎(35.85%), 뿌리(31.72%), 줄기(25.87%), 열매(18.22%) 순으로 DPPH radical 소거 활성 결과와 비교하였을 때와 마찬가지로 잎에서 가장 높은 활성을 나타냄과 동시에 FSA군에 비하여 UFSA군이 더 강한 환원력을 나타내는 것으로 확인하였다.

3.4. ABTS⁺ radical scavenging activity

ABTS⁺ radical scavenging activity는 potassiu

m persulfate와의 반응으로 생성된 ABTS free radical이 시료의 항산화 물질에 의해 제거되어 청록색이 탈색되는 원리를 이용한 실험법으로, 친수성 시료 및 소수성 시료의 radical 소거 활성을 모두 평가할 수 있다[19, 20]. 10–200 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 *S. albus* Unfermented extract(UFSA), Fermented extract(FSA)의 각 부위 별 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 결과 UFSA, FSA 모두 농도 의존적으로 높은 활성을 보였다. 최고 농도인 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 UFSA의 경우 뿌리(29.70%), 잎(29.54%), 줄기(28.52%), 열매(19.76%), FSA의 경우 잎(30.23%), 줄기(27.63%), 뿌리(27.63%), 열매(13.70%) 순으로 UFSA군의 경우 뿌리 추출물에서의 radical 소거능이 더 높게 측정되었으나, 잎 추출물과의 편차가 0.16%로 그 차이는 미미한

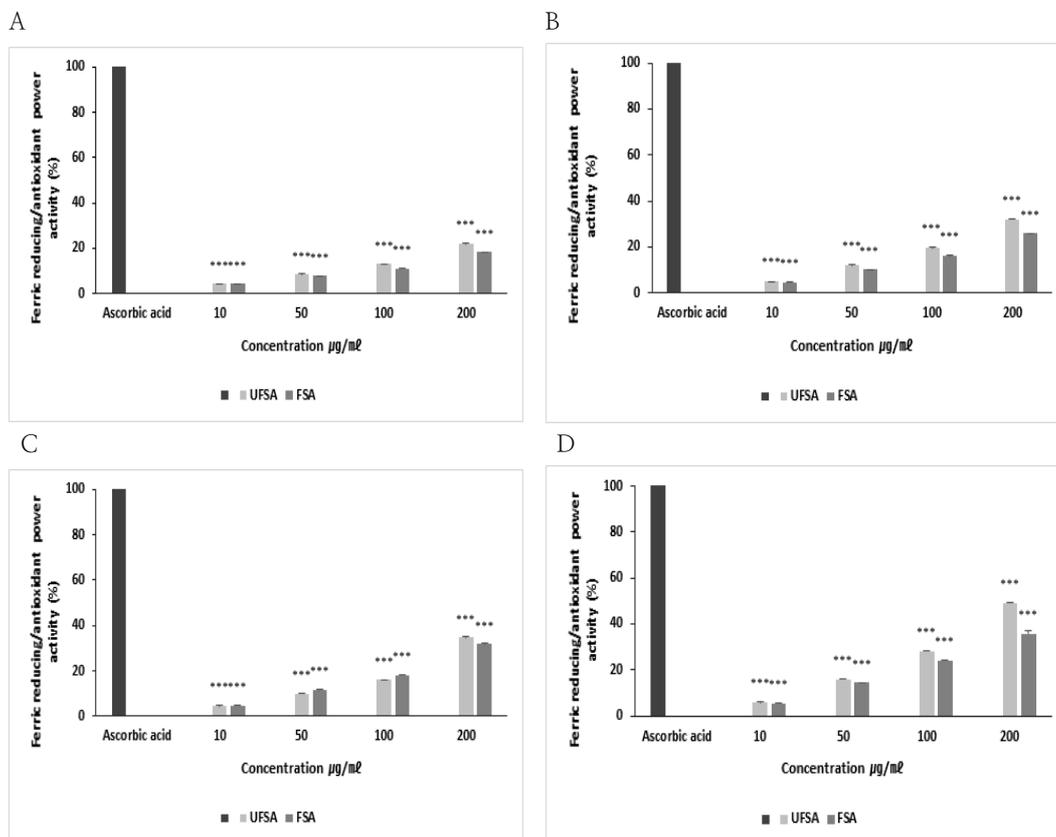


Fig. 2. Ferric reducing/antioxidant power activity (%) of Unfermented *S. albus* extracts(UFSA) and Fermented *S. albus* extracts(FSA). Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (Ascorbic acid : 50 $\mu\text{g/mL}$, *** : $p < 0.005$). (A : Fruits, B : Leaves, C : Stems, D : Roots)

것으로 판단되어 4 부위 중 잎에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있다. DPPH radical 소거 활성 및 FRAP 활성 결과와 유사하게 대체적으로 FSA군에 비하여 UFSA군에서 더 강한 활성을 나타내는 것을 확인하였다. ABTS⁺ radical 소거능은 DPPH radical 소거능과의 원리가 동일하게 작용하지만, 두 실험결과를 비교하였을 때 ABTS 라디칼 저해 활성이 더 낮게 나온 경향을 확인할 수 있다. 이는 DPPH는 free radical을, ABTS는 cation radical을 측정한다는 차이가 있어 서로 기질과 반응물질의 결합 정도 추이가 달라 추출물에 따른 라디칼 소거능 측정 결과 값이 상이하게 나타날 수 있는 것으로 보고된바 상기 결과와 같은 차이가 보여지는 것으로 판단된다

[21].

3.5. Zebrafish embryo에서의 발생 독성평가

Fig. 4와 같이 zebrafish는 발생 시기가 매우 짧아 초기 세포분열이 15분 간격으로 진행되고 발생 6시간 후 4시간 만에 gastrulation을 이루며, 수정 12시간이 지난 뒤 눈의 형태형성이 시작된다. 이러한 과정은 zebrafish 발생 배아가 투명하기 때문에 일반 현미경 하에서 쉽게 발생의 모든 과정이 관찰될 수 있다[22]. Zebrafish embryo의 정상적인 부화 시간은 수정 후(hpf) 48-72h으로 용모막에서 벗어난 직후를 부화 된 것으로 간주하며, 특정 시료 및 추출물은 부화율에 영향을 미칠 수 있고 이는 성장 지연이나 발달 지연을

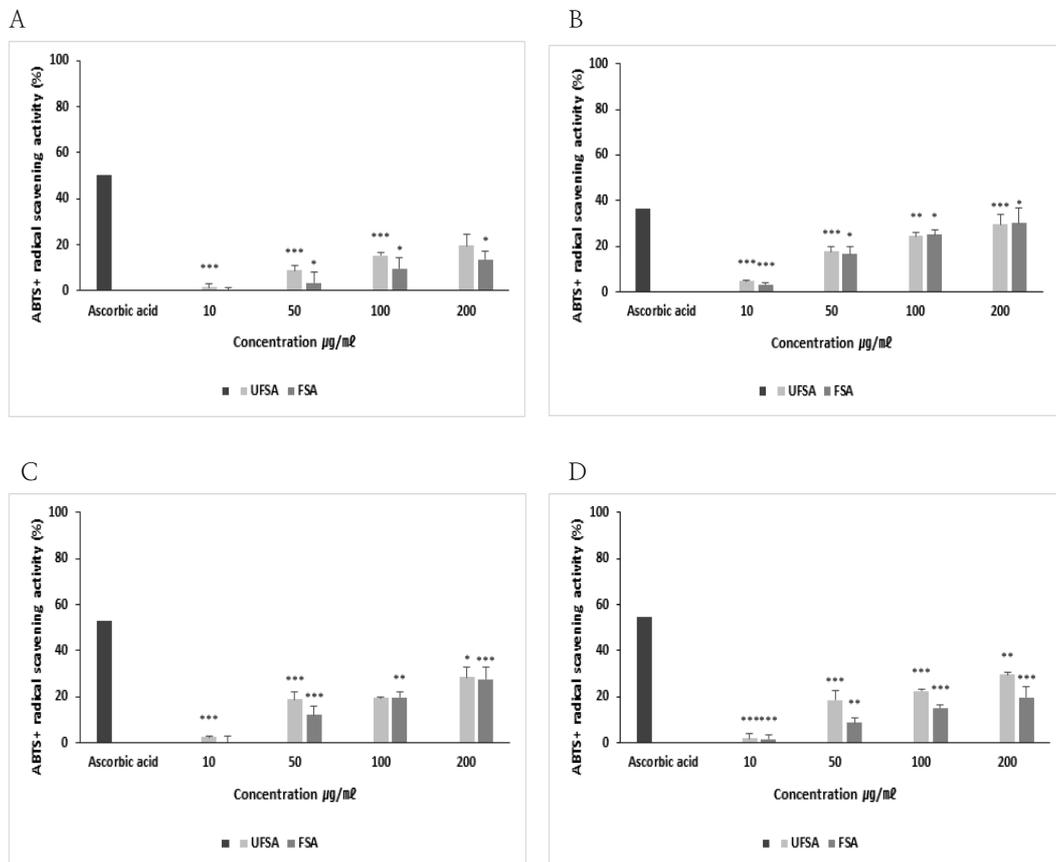


Fig. 3. ABTS⁺ radical scavenging activity (%) of Unfermented *S. albus* extracts(UFSA) and Fermented *S. albus* extracts(FSA). Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (Ascorbic acid : 50 μ g/mL, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$). (A : Fruits, B : Leaves, C : Stems, D : Roots)

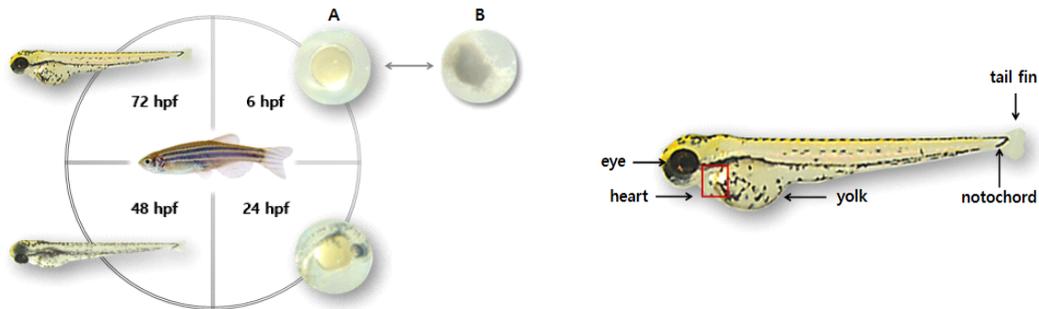


Fig. 4. Images of normal zebrafish embryo showing stages of development at different hours of post-fertilization (hpf). A. zebrafish embryo 6 hpf, B. coagulation of embryo.

블러일으켜 낮은 부화율을 발생시킬 수 있다는 것을 의미한다[23, 24]. 10–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 UFSA 추출물을 처리한 embryo에서 24h 후 4 부위 모두 20% 미만의 응고율이 관찰되었으나, 72h 경과 후에는 열매를 제외한 잎, 줄기, 뿌리 추출물에서만 응고율은 20% 미만, 부화율은 80% 이상을 나타내었다. 열매 추출물(UFSA)의 경우 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 48h 후 20% 이상의 응고율을 보였으나, 72h 경과 후 각 농도별로 70.0, 90.0, 100, 100%의 부화율에 도달하는 것으로 나타났다. FSA 추출물을 처리한 embryo에서 72h 경과 후 모든 농도에서, 줄기 및 뿌리는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서만 70% 이상의 부화율을 나타내었다. 열매 추출물의 경우 72h 경과 후 각 농도별로 4.0, 5.0, 0.0, 0.0%의 가장 낮은 부화율을 나타내었고, 24h 후 100–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 배아의 투명도가 감소함에 따라 독성이 있는 것으로 판단하였다.

3.6. Zebrafish larvae 심장 독성평가

Zebrafish는 기존 화장품법상 기존 동물실험규정에 해당하지 않으며 발달 생물학, 분자 유전학 및 독성학 연구가 활발히 진행되고 있는 차세대 동물실험 대체 모델이다. 인간과 약 70% 정도의 유사한 유전체를 지닌 zebrafish는 척추동물의 심장 발달 및 인간 심혈관 질환에 따른 분자 조절 메커니즘이 작용하는 것으로 많은 연구 결과가 입증되고 있다[25, 26]. Zebrafish larvae의 독성 평가는 larvae의 심장박동에 UFSA, FSA의 추출물이 미치는 영향을 확인하기 위하여 embryo 발

생 독성평가가 진행된 72 hpf zebrafish larvae의 부정맥을 1분간 측정하였다. 그 결과 UFSA의 경우 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 열매 124.8회/1 min, 잎 150.4회/1 min, 줄기 136.0회/1 min, 뿌리 129.9회/1 min로 측정되었으며 대조군(embryo media : 162.3회/1 min)과 비교하였다. FSA의 경우 72 hpf에서 50% 이상의 부화율을 나타낸 농도에 한하여 심장 독성을 평가하였다. 잎은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 110.8회/1 min, 줄기 및 뿌리는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 113.0, 109.5 회/1 min, 열매는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 121.7회/1 min로 측정되었으며, 대조군(embryo media : 120.2회/1 min)과 비교하였다(Fig. 5). 일반적으로 대조군의 경우 1분당 140–150회 사이의 심장 박동수를 나타내는데 본 실험에서는 발효 추출물 실험시 120.2회의 낮은 심박수를 나타내었다. 이는 정상범위에서 벗어나는 수치로 추후 반복 실험을 통해 재검증을 할 필요가 있다.

3.7. Zebrafish larvae 꼬리 재생 효능 평가

Zebrafish는 척추동물로서 손상된 꼬리지느러미, 심장 및 척수 형태 기능을 복원하는 재생 능력이 높다. 따라서 zebrafish larvae의 꼬리지느러미 절제 모델을 사용하여 상처 복구 및 조직 재생에 대한 시료 효과를 확인할 수 있으며, 평가의 효능은 흉터 조직으로부터 상처 치유 과정을 가속화함에 있다[27]. 상처로 손상된 zebrafish larvae 꼬리지느러미의 *S. albus* 잎 추출물을 이용한 상처 재생 효능을 평가한 결과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 *S. albus* 발효 추출물이 대조군 대비

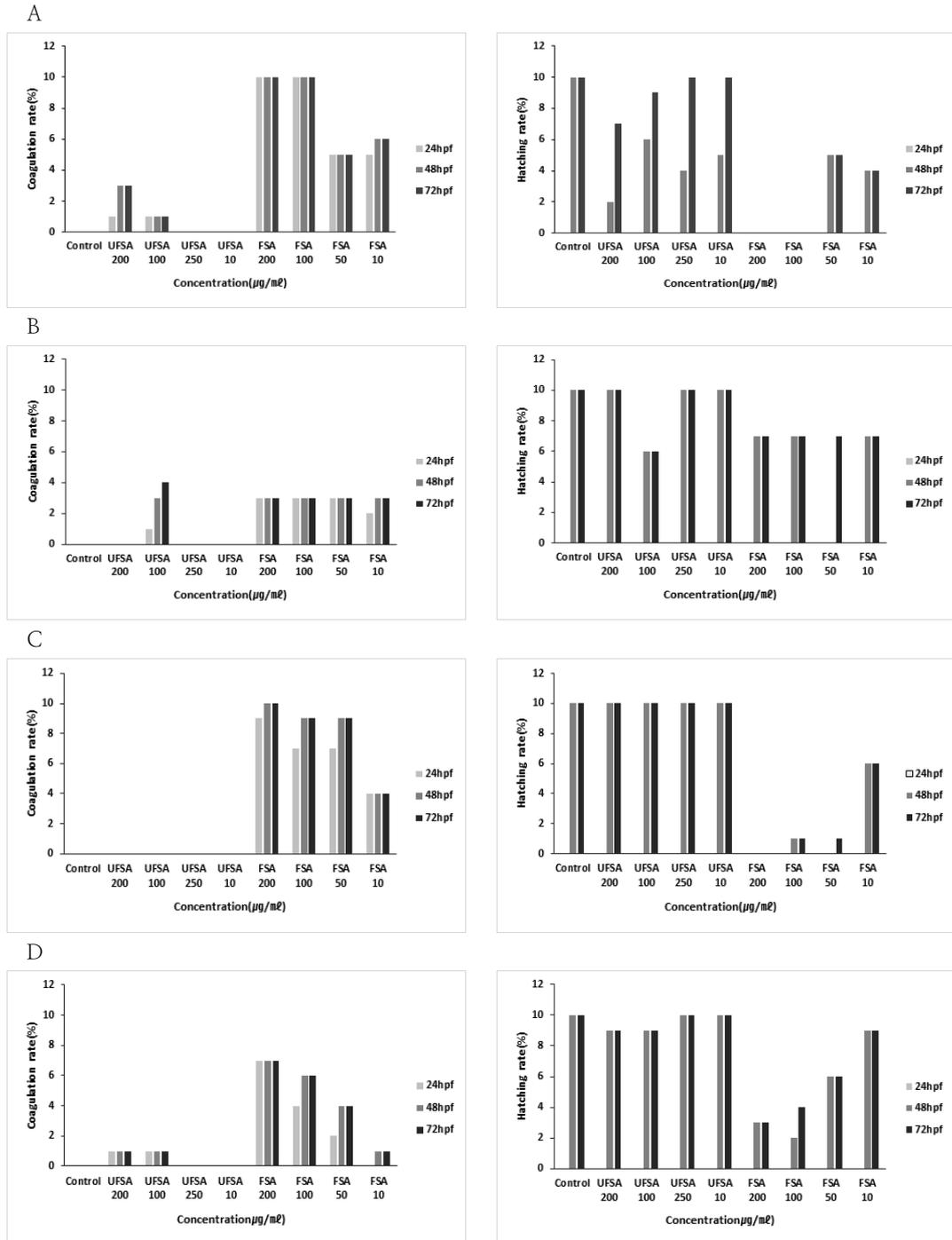


Fig. 5. Coagulation rate, Hatching rate was measured by zebrafish embryos toxicity. The Zebrafish were seeded at 10 embryos/well in 24-well plate and incubated for 72h in order to measure Unfermented *S. albus* extracts(UFSA) and Fermented *S. albus* extracts(FSA) toxicity. (A : fruits, B : Leaves, C : Stems, D : Roots)

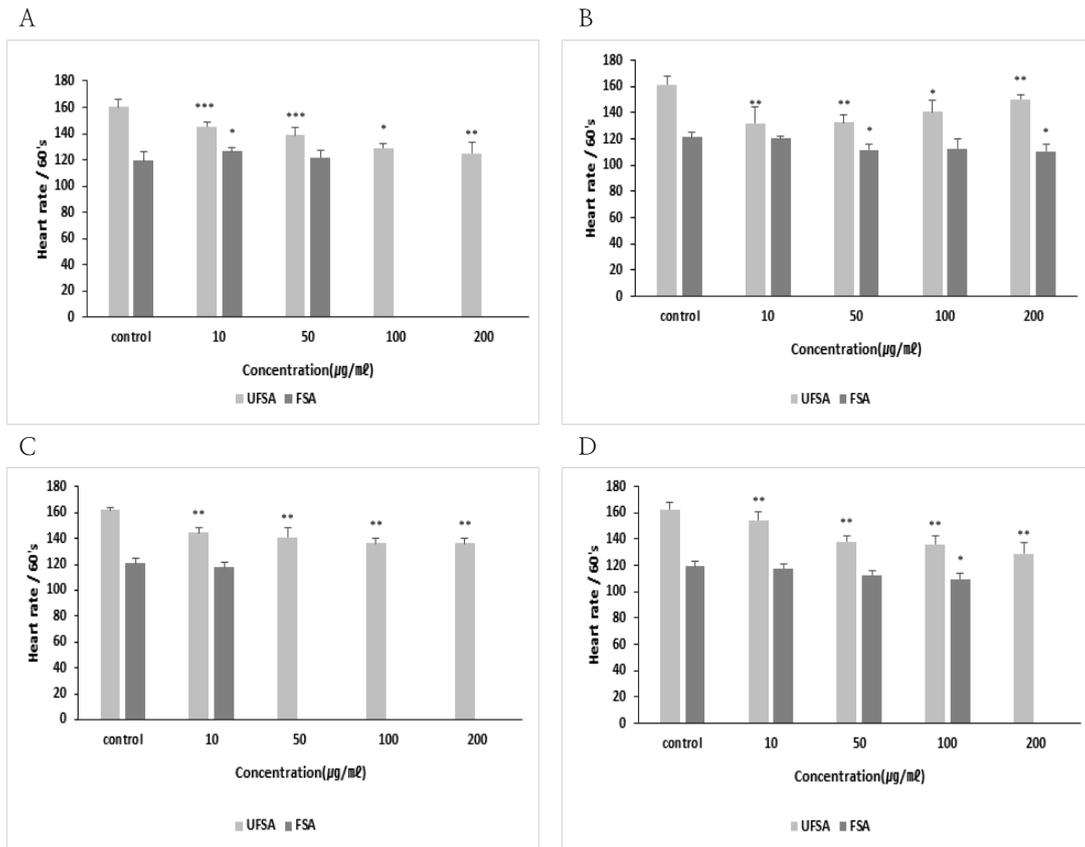


Fig. 6. Zebrafish larvae measured their heart rate for 1 minute under a microscope. As a result, it was confirmed that the Fermented *S. albus* extracts(FSA) were more toxic in a concentration-dependent manner than the Unfermented *S. albus* extracts(UFSA) (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$).

17%의 상처 회복 효과를 나타낸 것으로 확인되었다. 이러한 상처 회복 작용은 염증, 세포 증식, 산화 스트레스와 같은 세포 및 생체 분자활동으로 구성되어 활성화되며, 유효성분 내 강력한 항산화제의 함유가 재생 복원력 촉진에 기인하는 것으로 보고되고 있기에 *S. albus*의 플라보노이드 성분이 상처 효능에 관여하는 것으로 판단되어진다[28].

4. 결론

최근 사회적·지구적 차원의 친환경적인 소비의식이 강조됨에 따라 식품, 의약품, 화장품 업계의 천연소재 개발 연구가 활발하다. 본 연구는 국내

외 연구 실적이 미미한 *S. albus*의 항산화능과 대체동물실험 모델 Zebrafish를 이용한 배아 독성 및 재생 효능평가를 진행하여 유효성분으로서의 천연소재 활용 방안을 검토하였다. 실험에 사용된 *S. albus*는 열매, 잎, 줄기, 뿌리의 4 부위로 나누어 EtOH 추출을 진행하였으며(UFSA), 이를 발효 추출(FSA)하여 최종적으로 수득한 각 부위별 *S. albus* 추출물 8종을 평가에 적용하였다. UFSA, FSA를 10-200 µg/mL 농도로 처리한 DPPH radical 소거 활성, FRAP 활성, ABTS⁺ radical 소거 활성 측정 결과 최고 농도인 200 µg/mL의 경우 잎 추출물(UFSA, FSA)이 모든 영역에서 가장 우수한 radical 소거능을 나타내는 것으로 확인되었으며, *S. albus* 각 부위에 따른 UFSA 추출물과 FSA 추출물의 항산화 활성은 모

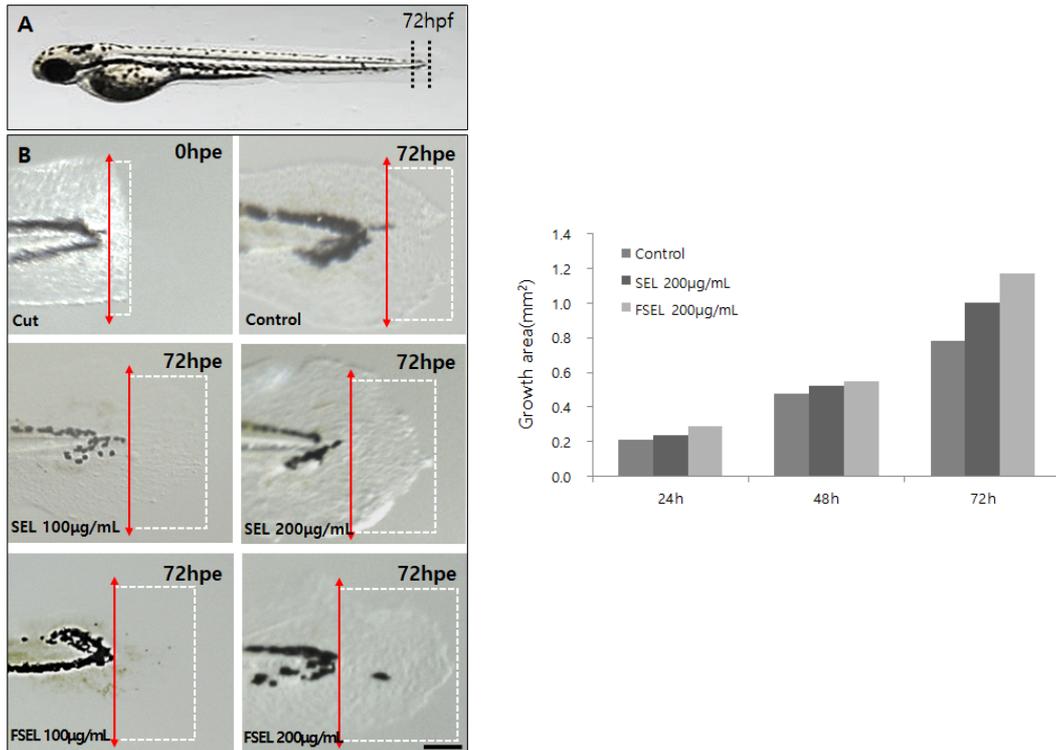


Fig. 7. The wound healing effect of *S. albus* extracts leaves (SEL) and Fermented *S. albus* extracts leaves (FSEL) in zebrafish larval tail fins. A. Procedure for tail fin resection. B. A wound is created at the tip of the notochord, by 3 days post wounding the tail fin has regenerated.

든 영역에서 FSA 추출물보다 UFSA 추출물에서 더 강한 항산화력을 지니는 것으로 나타났다. Zebrafish embryo의 발생 독성평가 결과 수정 후 72 hpf, 200 µg/mL 농도에서 UFSA 잎, 줄기 추출물에서 모든 배아의 부화율을 확인하였으며, 열매, 뿌리 추출물은 각각 70, 90%의 부화율에 도달하는 양상을 보였다. 72 hpf 경과 후 FSA 추출물은 잎의 경우 모든 농도에서 줄기, 뿌리의 경우 10 µg/mL 농도에서 70% 이상의 부화율을 나타내었으나, 열매, 줄기의 경우 100–200 µg/mL 농도에서 응고율 80% 이상, 부화율 20% 미만으로 독성이 있는 것으로 판단된다. Zebrafish larvae의 심장박동 측정결과 *S. albus* 잎 추출물 (UFSA, FSA)은 대조군과의 심박수 오차범위가 작아 zebrafish 심장박동에 영향을 미치지 않은 것으로 판단되며, 이는 낮은 심장 독성을 나타낸

것을 의미한다. Zebrafish larvae의 꼬리지느러미는 *S. albus* 발효 추출물 200 µg/mL에서 대조군 대비 17%의 상처 회복력을 나타내었다. 따라서 본 연구 결과는 각 부위별 *S. albus* 추출물이 각기 다른 항산화 및 피부 재생 효능을 나타내어 항노화 기능의 천연 화장품 소재로서의 활용 가능성을 제시하며, *S. albus* 소재가 향후 화장품 산업에 이용되기를 기대해 본다.

감사의 글

본 성과물(논문)은 농촌진흥청에서 시행한 농업 실용화기술R&D지원사업(과제번호: RS-2023-00215852)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. S. Y. Eun, J. J. Yoon, H. Y. Kim, Y. M. Ahn, B. H. Han, M. H. Hong, C. O. Son, S. W. Na, Y. J. Lee, D. G. Kang, H. S. Lee "Protective Effects of Chijabaegpi-tang on Atopic Dermatitis in TNF- α /IFN γ -induced HaCaT Cells", *The Korean Association of Oriental Medical Physiology*, Vol.32, No.4 pp. 226-231, (2018).
2. S. N. Park. "Effect of Natural Products on Skin Cells -Action and Suppression of Reactive Oxygen Species" *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.25, No.2 pp. 77-127, (1999).
3. J. W. Yang, C. S. Kwak, "Inhibitory effect of Aralia elata ethanol extract against skin damage in UVB-exposed human keratinocytes and human dermal fibroblasts", *J. Nutr Health*, Vol.49, No.6 pp. 429-436, (2016).
4. J. K. Hong, "A Study on Skin Aging Caused by Free-Radical and on Efficacy of Antioxidant Vitamins" *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, Vol.7, No.2 pp. 51-62, (2009).
5. S. M. Dang. "Development of Anti-Aging from Natural Materials by Inhibition of UV Stimulating." *Journal of the Korea Convergence Society*, Vol.12, No.1 pp 251-57, (2021).
6. S. N. Kim. "Skin aging and Antioxidants" *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.23, No.1 pp. 75-132, (1997).
7. S. W. Park, "Zebrafish as an Emerging Model for Pancreatic Study", *Korean J Pancreas Biliary Tract*, Vol.11, No.1 pp. 43-50, (2006).
8. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W and Peterson RE. "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity", *Toxicol Sci* 86, Vol. 86, No.1 pp. 6-19, (2005).
9. Cao Z, Guo C, Chen G, Liu J, Ni H, Liu F, Xiong G, Liao X, Lu H. "Shikonin Inhibits Fin Regeneration in Zebrafish Larvae" *Cells*, Vol.11, No.20, (2022).
10. Blois M. S, "Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical" *Nature*, Vol.181, No.4617 pp. 1199-1200, (1958).
11. Benzie I. F, Strain J. J, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay", *Analytical Biochemistry*, Vol. 239, No.1 pp. 70-76, (1996).
12. Miller N. J, Rice-Evans C. A, "Factors influencing the antioxidant activity- 62 -determined by the ABTS,+ radical cation assay", *Free Radical Research*, Vol.26, No.3 pp. 195-199, (1997).
13. Warren K. S. , Baker K. , Fishman M. C, "The slow mo mutation reduces pacemaker current and heart rate in adult zebrafish", *The American Journal of physiology- Heart and Circulatory Physiology*, Vol.50, No.4 pp. 1711-1719, (2001).
14. Cao Z, Guo C, Chen G, Liu J, Ni H, Liu F, Xiong G, Liao X, Lu H. "Shikonin Inhibits Fin Regeneration in Zebrafish Larvae" *Cells*, Vol.11, No.20 (2022).
15. S. E. Jo, D. H. Lee. "Antioxidant And Anti-inflammatory Activity of Leaves Extracts of Chamaecyparis Obtusa", *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, Vol.17, No.5 pp. 970-975. (2011)
16. Higbee J, Brownmiller C, Solverson P, Howard L, Carbonero F, "Polyphenolic profiles of a variety of wild berries from the Pacific Northwest region of North America" *Current Research in Food Science*, Vol. 7, (2023).
17. S. W. Gim, K. S. Chae, S. J. Lee, K. D. Kim, J. H. Moon, J. W. Kwon, "Main constituents and bioactivities of different parts of aronia (Aronia melanocarpa)", *Korean journal of food science and technology*, Vol.52, No.3 pp. 226-236, (2020).
18. G. Y. Seo, S. W. Lee, S. J. Park, S. C. Kim, I. C. Sohn, S. Y. Hwang, S. H. Ahn, "Biological Activities of Hominis Placenta Herbal Acupuncture prepared by

- Hydrochloric Acid Hydrolysis”, *Journal of Pharmacopuncture*, Vol.13, No.2 pp. 5–12, (2010).
19. M. J. Park, C. Y. Ryu, S. J. Jo, "Antioxidant activities of brown beech mushroom (*Hypsizygus marmoreus*) pileus and stipe“ *Journal of Mushrooms*, Vol.19, No.4 pp. 322–328, (2021).
 20. S. G. Jung, H. J. Kim, B. D. Park, S. H. Lee. "Skin barrier and Lipids." *The Korean Society for Skin Barrier Research*. Vol.11, No.1 pp. 13–27, (2009).
 21. C. S. Gwak, H. E. Choi. "In vitro Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Ethanol Extract and Sequential Fractions of Flowers of *Prunus persica* in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages", *The Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.44, No.10 pp.1439–1449, (2015).
 22. David C.R.S, Angeles A, Angoluan R.C, Santos J.P.E, David E.S, Dulay R.M.R. "Moringa oleifera (Malunggay) water extracts exhibit embryo-toxic and teratogenic activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryo model” *Der Pharm. Lett*, Vol.8 pp. 163–168, (2016).
 23. Wan-Mohtar WAAQI, Ilham Z, Jamaludin AA, Rowan N, "Use of Zebrafish Embryo Assay to Evaluate Toxicity and Safety of Bioreactor-Grown Exopolysaccharides and Endopolysaccharides from European *Ganoderma applanatum* Mycelium for Future Aquaculture Applications.” *Int. J. Mol. Sci*, Vol.22 No.4 pp. 1675, (2021).
 24. Chahardehi AM, Arsad H, Lim V, "Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants" *Plants*, Vol.9, No.10 pp. 1345, (2020).
 25. Sarmah S, Marrs JA, "Zebrafish as a Vertebrate Model System to Evaluate Effects of Environmental Toxicants on Cardiac Development and Function”, *Int. J. Mol. Sci*, Vol.17 No.12 pp. 1–16, (2016).
 26. S. W. Park. "Zebrafish as an Emerging Model for Pancreatic Study” *The Korean Journal of Pancreas and Biliary Tract*, Vol.11, No.1 pp. 43–50, (2006).
 27. Pont S, Blanc-Potard AB, "Zebrafish Embryo Infection Model to Investigate *Pseudomonas aeruginosa* Interaction With Innate Immunity and Validate New Therapeutics” *Front Cell Infect Microbiol*, Vol.11 pp. 745851, (2021).
 28. Chong WT, Tan CP, Cheah YK, Lai OM, "In-vitro and in-vivo evaluations of tocotrienol-rich nanoemulsified system on skin wound healing” *PLOS ONE*, Vol.17, No.5 (2022).