

## 별불가사리로부터 분리된 Asterosaponin P<sub>1</sub>의 항노화 효능

진 무 현 · 이 소 영 · 여 혜 린 · 김 호 진 · 장 운 희<sup>†</sup>

LG 생활건강 기술연구원  
(2018년 9월 3일 접수, 2018년 9월 19일 수정, 2018년 10월 16일 채택)

### Anti-aging Effect of Asterosaponin P<sub>1</sub> Isolated from *Asterina pectinifera*

Mu Hyun Jin<sup>†</sup>, So Young Lee<sup>†</sup>, Hyerin Yeo, Hyo Jin Kim, and Yun Hee Chang

Skin Research Center, R&D Park, LG Household & Health Care, Ltd., 175, Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34114, Korea  
(Received September 3, 2018; Revised September 19, 2018; Accepted October 16; 2018)

**요약:** 별불가사리(*Asterina pectinifera* Muller and Troschel)는 우리나라 전국 연안에서 흔히 볼 수 있는 토속종으로, 패류 양식장에 피해를 주는 불가사리류 중의 하나이다. 별불가사리 퇴치를 위해 대부분 건조하여 비료로 활용하고 있으며, 고부가가치 창출을 위한 다양한 연구가 진행되었으나 실제 활용은 미미한 실정이다. 따라서, 별불가사리로부터 피부 유용성분을 밝혀 새로운 활용 방안을 모색하고자 하였다. 성분연구를 통해 별불가사리로부터 2종의 polyhydroxysteroid와 1종의 saponin을 분리하였으며, 이의 구조를 각각 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8,15 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,26-heptol, 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8,15 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-octol 및 asterosaponin P<sub>1</sub>으로 동정하였다. 이 물질들의 피부 효능을 확인한 결과 asterosaponin P<sub>1</sub>이 표피 줄기세포의 증식을 촉진시키고, 각질형성세포에서 히알루론산을 합성하는 효소인 hyaluronan synthase-2와 hyaluronan synthase-3 유전자의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 또한, asterosaponin P<sub>1</sub>은 섬유아세포에서 진피의 주요 콜라겐인 type 1 콜라겐의 생합성을 촉진하는 효능을 보였다. 이상의 결과들로부터, 별불가사리로부터 분리한 asterosaponin P<sub>1</sub>은 노화에 동반되는 피부 증상을 개선하는 항노화 화장품 소재로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

**Abstract:** The starfish, *Asterina pectinifera* Muller and Troschel (Asterinidae) is an indigenous species commonly found in all coasts of Korea causes damages to shellfish farms. In order to exterminate *A. pectinifera*, they are dried and used as fertilizer. Although various studies have been conducted to create high added value from the retrieved *A. pectinifera*, their actual utilization is relatively low. Accordingly, this study aimed to find new practical uses of starfish by identifying useful ingredients for skin anti-aging. Two polyhydroxysteroids and one asterosaponin were isolated from the *A. pectinifera*. The structures of these compounds were identified as 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8,15 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,26-heptol, 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8,15 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-octol, and asterosaponin P<sub>1</sub> on the basis of chemical and spectroscopic analysis. Among these compounds, we have found that asterosaponin P<sub>1</sub> increased epidermal stem cell proliferation and the expression of hyaluronan synthase-2 and hyaluronan synthase-3 gene, which are enzymes that synthesize water-binding matrix hyaluronic acids in keratinocytes. In addition, asterosaponin P<sub>1</sub> increased synthesis of pro-collagen type I, a major dermal collagen in fibroblasts. As a result, asterosaponin P<sub>1</sub> isolated from *A. pectinifera* could be used as a useful cosmetic ingredient that improves skin symptoms accompanying skin aging.

**Keywords:** *A. pectinifera*, anti-aging, starfish, asterosaponin P<sub>1</sub>, polyhydroxysteroid

## 1. 서 론

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: yunizzang@lghnh.com)  
call: 042)860-8189

표피는 피부 최외각에 존재하는 방어막으로, 체내

수분을 보존하고 미생물 감염이나 물리적 자극과 같은 외부의 유해환경으로부터 신체를 보호하는 역할을 수행한다. 표피는 표피와 진피의 경계인 기저막에 위치한 표피 줄기세포로부터 transit amplifying (TA)세포가 만들어지고, 이러한 TA세포가 각질형성세포로 분화되면서 표피 상층으로 이동하게 되고, 최종적으로 각질을 형성하게 된다[1-4]. 표피 줄기세포는 정상상태에서는 TA세포와 표피 줄기세포를 하나씩 만드는 이중 세포 분열을 간헐적으로 진행하고, 피부 손상 시에는 표피 재건에 필요한 TA세포와 각질 세포를 집중적으로 만들어낸다[5]. 그러나, 노화됨에 따라 표피 줄기세포가 감소하고 각질세포의 공급이 원활하지 않게 되고 이로 인해 피부 노화 현상이 초래된다고 알려져 있다[6].

한편, 표피 줄기세포로부터 유래한 사람의 각질형성 세포는 히알루론산(hyaluronic acid)이라고 하는 표피층에서 수분을 잡아두는 중요 기질을 생성한다. 히알루론산의 양은 노화와 함께 감소한다고 알려져 있는데 [7,8], 나이에 따른 피부 내 히알루론산 양의 감소는 피부에서의 주름 발생과 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨지고 있다. 지금까지 알려진 히알루론산 합성효소는 hyaluronan synthase-1 (HAS-1), hyaluronan synthase-2 (HAS-2), hyaluronan synthase-3 (HAS-3)의 세 가지 형태가 보고되었다[9-11].

진피에 존재하는 섬유아세포에서 합성되는 콜라겐은 피부 탄력의 주요 인자이나, 자외선 등의 유해 인자에 의해 증가되는 matrix metalloproteinase (MMP)가 콜라겐을 분해하여 그 양이 감소되어, 피부 노화가 촉진된다고 알려져 있다[12,13].

불가사리는 극피 동물문에 속하는 해양 저서생물로 전 세계에 1,700여 종이 보고되어 있으며 우리나라 근해의 경우 약 200여 종이 서식하고 있다. 외래종인 아무르불가사리(*A. amurensis*), 토속종인 별불가사리(*A. pectinifera*), 거미불가사리(*O. japonicus*) 등이 다수 분포하고 있다고 알려져 있다[14]. 우리나라 패류 양식장에 피해를 주는 불가사리류는 아무르불가사리와 별불가사리로 이들은 번식력과 재생력이 강하며 개체수가 많아 양식장뿐만 아니라 연안 생태계에도 위협의 대상이 되고 있다[15]. 이러한 불가사리의 산업적인 이용방안을 마련함으로써, 불가사리에 의한 피해를 줄이고 경제적 부가가치를 창출하고자, 고부가가치 식·의약품 소재로의 이용 가능성을 검토하는 연구들이 진행된

바 있다. 불가사리 체벽 내부를 이루는 골판(skeletal plate)의 주성분은 탄산칼슘으로 이를 이용한 칼슘보충제를 개발하는 기술이 보고된 바 있다[16,17]. 또한 불가사리의 체벽을 이루는 단백질의 약 60%는 콜라겐으로 불가사리 콜라겐의 피부 효능을 평가하여 향장 소재로서의 활용 가능성에 대해서도 연구된 바 있다 [18,19]. 이 외에도 의약품으로의 적용 가능성에 대한 연구들이 진행되어 혈전 치료제, 항 알레르기제, 면역증강제 등의 소재로 연구 개발되고 있는 실정이다 [20-22]. 이와 같은 다양한 효능 소재로의 개발 가능성에 대해 연구되었으나, 현재 활용되고 있는 기술은 불가사리 유래의 칼슘제, 액체 비료 등에 한정되어 있다.

별불가사리는 북태평양에 널리 분포하며, 한국, 일본, 러시아 연해주 지역 등에 분포한다고 알려져 있다. 알려진 성분으로는 polyhydroxysteroid, saponin, ganglioside, cerebroside 등이 분리 보고된 바 있으며, 20종 이상의 polyhydroxysteroid와 saponin이 *Asterina* 속에서 분리되었다[23-27]. 이러한 성분들의 항암, 항바이러스, 항염, 용혈작용 및 항박테리아 효능에 대해서도 보고된 바 있다[27-30].

본 연구에서는 충남 보령 무창포 해수욕장에서 채집한 별불가사리로부터 2종의 polyhydroxysteroid와 1종의 saponin을 분리하였다. 분리된 성분들은 항암, 항바이러스 등에 대한 효능 연구만이 진행된 바 있다. 따라서 각 성분에 대한 표피 줄기세포 활성화 효능과 각질형성 세포에서 HAS의 발현에 대한 영향을 평가하였다. 또한, 콜라겐 생합성능을 측정하여 항노화를 위한 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 성분 분리 시약 및 기기

본 실험에 사용한 별불가사리는 2014년 10월 충남 보령시 웅천읍 관당리 인근 바닷가에서 채집하여 사용하였다. NMR은 Avance III 600 (600 MHz) spectrometer (Bruker, USA)를 사용하여 측정하였으며, EI-MS는 Clarus 600 GC/MS (PerkinElmer, USA)를 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60 (no. 9385, Merck, Germany)을, preparative liquid chromatography (Prep-LC)는 Agilent 1260 infinity preparative scale purification system (Agilent, USA)을 사용하였으며, 컬럼

은 Eclipse XDB-C18 (Agilent, USA)을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck, Germany) 또는 RP-18<sub>254S</sub> precoated plate (Merck, Germany)를 사용하였다.

## 2.2. 화합물의 분리

별불가사리를 1일간 자연건조 후 세절하였다. 세절한 별불가사리 4 kg을 methanol (MeOH) 15 L를 가하여 상온에서 2일간 냉침하여 2회 추출하였다. 이를 여과해 얻은 추출액을 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 이를 증류수로 현탁시켜 동량의 dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)을 가하여 진탕 방치하여 분획하고, 순차적으로 ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH)을 가하여 진탕 방치하여 각각의 분획물을 얻었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획 (51.8 g)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (10 : 1 ~ 0 : 100, gradient)의 조성으로 silica gel column chromatography를 실시하여 10개의 소분획으로 나누었다. 소분획 Fr. 3을 MeOH/H<sub>2</sub>O (7 : 3)의 용출용매로 prep-LC를 실시하여 화합물 **1**과 **2**를 얻었다. 소분획 Fr. 4를 EtOAc/MeOH (5 : 1)의 용출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 화합물 **3**을 얻었다.

화합물 **1** (5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8,15 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,26-heptol) - 백색 무정형 파우더; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 0.93 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.95 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27), 1.02 (3H, s, H-19), 1.14 (3H, s, H-18), 3.44 (1H, dd, *J* = 10.5, 6 Hz, H-26), 3.51 (1H, m, H-3), 3.78 (2H, overlapped, H-6, 7), 4.01 (1H, dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz, H-16), 4.15 (1H, dd, *J* = 11.1, 1.8 Hz, H-15); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 14.0 (C-19), 17.0 (C-18), 17.5 (C-27), 18.4 (C-21), 19.4 (C-11), 25.0 (C-23), 30.7 (C-20), 31.6 (C-2), 32.4 (C-4), 35.1 (C-24), 37.2 (C-22), 37.2 (C-25), 37.9 (C-10), 39.5 (C-1), 43.2 (C-12), 44.6 (C-5), 45.6 (C-13), 51.3 (C-9), 59.8 (C-14), 61.5 (C-17), 68.6 (C-26), 69.0 (C-6), 72.4 (C-3), 76.5 (C-7), 77.8 (C-8), 79.9 (C-15), 82.7 (C-16); EIMS *m/z* (rel. int., %): 484 [M]<sup>+</sup> (1.1), 466 [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (7.6).

화합물 **2** (5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8,15 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-octol) - 백색 무정형 파우더; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 0.93 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27), 0.97 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 1.18 (3H, s, H-19), 1.26 (3H, s, H-18), 3.45 (1H, dd, *J* = 10.2, 5.4 Hz, H-26), 3.47 (1H, m, H-3), 3.96 (1H, d, *J* = 3 Hz, H-7), 4.21 (1H, m, H-4),

4.24 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-16), 4.30 (1H, dd, *J* = 11.7, 3 Hz, H-6), 4.50 (1H, t-like, *J* = 5.4 Hz, H-15); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 17.0 (C-19), 17.5 (C-27), 17.9 (C-18), 18.6 (C-21), 18.8 (C-11), 25.0 (C-23), 26.4 (C-2), 31.1 (C-20), 35.1 (C-24), 37.2 (C-25), 37.9 (C-10), 39.8 (C-1), 43.2 (C-12), 44.5 (C-13), 47.9 (C-5), 51.4 (C-9), 55.4 (C-14), 63.2 (C-17), 66.8 (C-6), 68.6 (C-26), 69.7 (C-4), 71.2 (C-15), 72.9 (C-16), 73.9 (C-3), 77.2 (C-7), 79.2 (C-8); EIMS *m/z* (rel. int., %): 500 [M]<sup>+</sup> (0.8), 482 [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (6.9).

화합물 **3** (asterosaponin P<sub>1</sub>) - 백색 무정형 파우더; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 0.90 (9H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21, 26, 27), 0.97 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.39 (1H, dd, *J* = 13.5, 3.6 Hz, H-7), 3.44 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.49 (1H, m, H-3), 3.58 (1H, m, H-3'), 3.63 (1H, m, H-6), 4.04 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 4.19 (1H, overlapped, H-4'), 4.21 (1H, overlapped, H-15), 4.94 (1H, s, H-1'); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 14.4 (C-19), 15.6 (C-18), 18.3 (C-27), 18.6 (C-26), 19.1 (C-21), 19.8 (C-11), 28.9 (C-23), 31.6 (C-25), 32.0 (C-22), 32.5 (C-2), 33.2 (C-4), 36.5 (C-20), 38.0 (C-10), 39.7 (C-1), 41.9 (C-16), 43.0 (C-12), 45.6 (C-13), 50.4 (C-7), 53.7 (C-5), 56.2 (C-17), 57.4 (C-9), 58.6 (OCH<sub>3</sub>), 67.1 (C-6), 67.8 (C-14), 69.0 (C-5'), 70.0 (C-15), 72.3 (C-3), 76.1 (C-8), 81.8 (C-2'), 81.9 (C-4'), 84.7 (C-24), 89.5 (C-3'), 109.7 (C-1'); (-)FABMS *m/z*: 677 [M - Na].

## 2.3. 세포 배양

줄기세포 활성화 실험에서 사용된 사람 피부유래 표피 줄기세포(human epidermal stem cells)는 CellnTEC (Switzerland)에서 구입하고, 소 뇌하수체 추출물(bovine pituitary extract) 10%와 penicillin (50 U/ml)/streptomycin (50  $\mu$ g/ml) (Invitrogen, USA) 1%를 첨가한 표피 줄기세포 전용 배양액인 CnT-57 medium (Switzerland)을 증식 배지(growth medium)로 사용하였으며, 세포가 배양용 플라스크에 약 80% 찼을 때 accutase (CellnTEC, Switzerland)를 이용하여 계대하여 사용하였다.

HAS-2와 HAS-3 발현 평가에 사용된 사람 각질형성 세포(HaCaT)는 CLS Cell Lines Service (Germany)에서 구입하였으며, 콜라겐 생합성 평가에서 사용된 사람 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast)는 Lonza

(Switzerland)에서 구입하였다. 각질형성세포와 진피 섬유아세포는 10% FBS (Invitrogen, USA)와 1% penicillin (50 U/ml)/streptomycin (50  $\mu$ g/ml)이 추가된 DMEM (Invitrogen, USA)을 이용하여 배양하였으며, 세포가 배양용 플라스크에 약 80% 찼을 때, 0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, USA)를 이용하여 계대하여 사용하였다. HAS-2와 HAS-3 발현 평가의 양성대조군으로는 retinoic acid (Sigma, USA)  $10^{-7}$  M이 포함된 배지를 사용하였고, 콜라겐 생합성 평가의 양성대조군으로는 TGF- $\beta$  (Pepton, Korea) 10 ng/mL이 포함된 배지를 사용하였다. 모든 세포는 37  $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  조건의 세포 배양기(ThermoFisher, USA)에서 배양하였다.

## 2.4. 표피 줄기세포 활성 실험

표피 줄기세포의 세포활성 실험은 CCK-8 (cell counting kit-8) assay (Dojindo, USA)를 이용하여 진행하였다. 세포배양용 96-well plate에 well당  $3 \times 10^3$ 개의 세포를 배양액 조건에서 분주하여 12 h 뒤, 소 뇌하수체 추출물이 포함되지 않은 basal medium 조건에서 일정 농도의 시료를 72 h 동안 처리하였다. 배양액의 1/10 비율로 CCK-8 용액을 처리하여 배양기 안에서 2 h 동안 반응시킨 후, microplate spectrophotometer (BioTek, USA) 기기를 이용하여 450 nm 파장대의 수치를 측정하여 줄기세포 활성 결과를 측정하였다.

## 2.5. 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 통한 유전자 발현 평가

인간의 각질형성세포(HaCaT)를 6-well cell culture plate에 well당  $2 \times 10^5$ 씩 분주하여 24 h 동안 10% FBS DMEM으로 배양하였다. 그 후 FBS free-DMEM (high glucose, no glutamine, no calcium)으로 교체한 후 시료를 배지에 희석하여 24 h 처리하였다. 세포를 회수하여 PBS로 세척한 후, RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 전체 RNA를 추출했다. 정량 후 2.5  $\mu$ g의 RNA를 cDNA Synthesis Kit (PhileKorea, Seoul, Korea)를 이용하여 역전사하였다(Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 합성된 cDNA는 반응당 100 ng을 사용하였고, TaqMan Universal Master Mix II (ThermoFisher, USA)를 사용하였다. 프라이머는 TaqMan Gene Expression Assays (ThermoFisher, USA) HAS-2와 HAS-3로 구매하

였으며, 실시간 중합효소 연쇄반응(quantitative real time PCR)을 Step One Plus Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였다. qRT-PCR을 통해 얻은 실험 결과는 housekeeping gene 인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 기준으로  $\Delta\Delta$ Ct 방법으로 계산하여 나타내었다. 또한, 음성 대조군의 mRNA 발현량을 약 1.0으로 기준하여 시료 처리군의 mRNA 발현량을 상대적으로 수치화하였다.

## 2.6. 콜라겐 합성 촉진 효능 평가

사람 진피 섬유아세포를 24-well cell culture plate에 well당  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 분주하여 24 h 동안 10% FBS DMEM으로 배양하였다. 그 후 FBS free-media로 교체한 후 희석한 시료를 세포에 처리하여 24 h 배양 후, 상층액을 회수하여 procollagen Type I C-Peptide PIP EIA kit (Takara, Japan)를 이용해 collagen 합성량을 측정하였다. 각 well의 상층액 20  $\mu$ L를 취하여 상온에서 녹인 antibody-POD conjugate solution 100  $\mu$ L와 혼합해 3 h 반응시켰다. 그 후 phosphate-buffered saline (Lonza, Switzerland) 500  $\mu$ L로 3회 세척한 후 발색 시약을 100  $\mu$ L씩 처리하였다. 15 min 반응 후 1 N sulfuric acid (Sigma, USA)를 동량 넣어 반응시킨 후 microplate reader (BioTek, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.7. 통계 분석

본 연구에서 시행된 실험은 총 3회 이상 반복하였으며, 실험 군에 따른 데이터 사이의 통계적 유의성 검정은 Paired samples *t*-tests (SPSS ver. 20, IBM, USA)로 시행하였다. 결과 값들을 mean  $\pm$  SD로 나타내었다. *P* 값이 0.05 이하일 경우\*, 0.01 이하일 경우\*\*로 통계적 유의성을 표시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 화합물의 분리 및 정제

별불가사리의 MeOH 추출물로부터 유효 성분을 분리하기 위하여 추출물을 CH $_2$ Cl $_2$ , EtOAc, BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물에 대하여 TLC를 실시하여 가장 다양한 성분이 함유된 것으로 추정되는

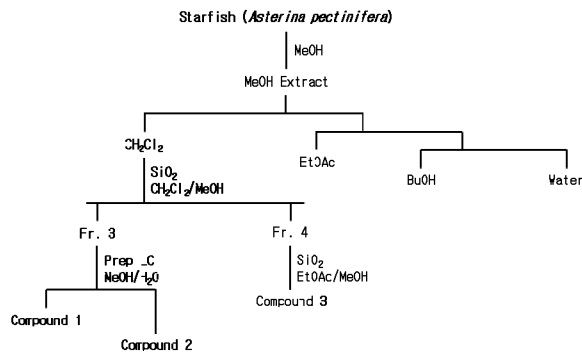


Figure 1. Isolation scheme of *A. pectinifera*.

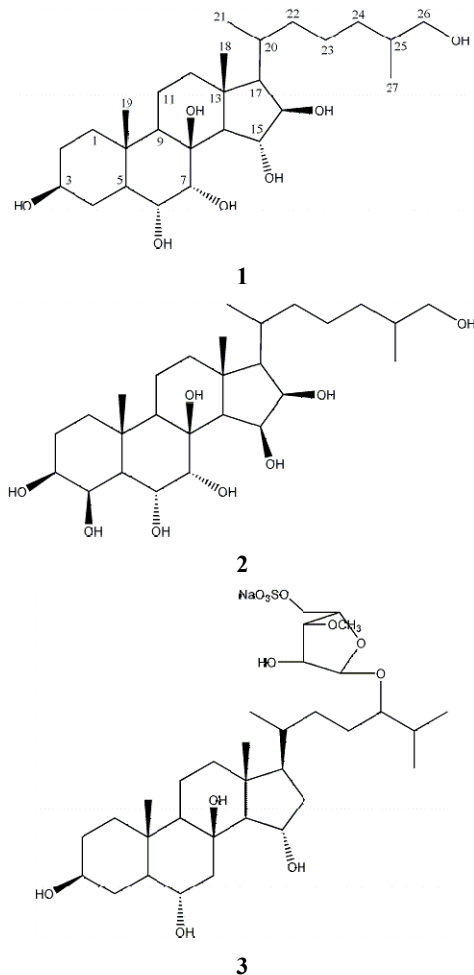
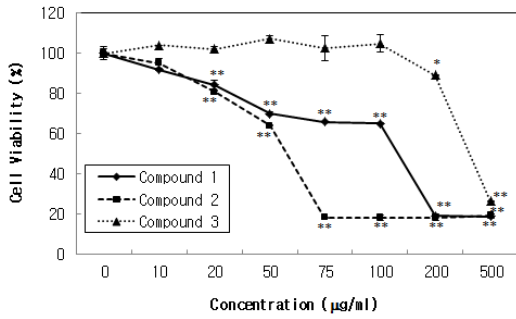


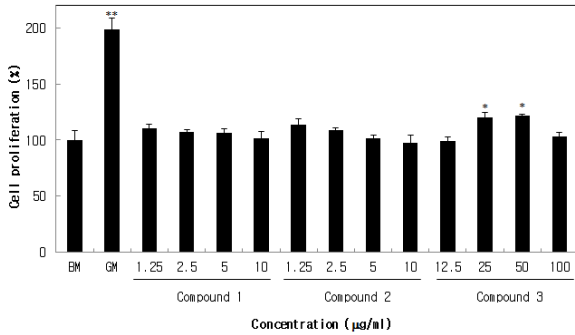
Figure 2. Chemical structure of compound 1, 2, and 3.

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획으로 실험을 실시하였다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획을 silica gel column chromatography 및 prep-LC를 실시하여 Figure 1과 같이 화합물 1 ~ 3을 분리 정제하였다. 분리된 성분들은 불가사리에서 분리 보고된 바 있는

성분들로 각 화합물의 구조는 NMR 및 MS spectrum을 통해 확인하였다. 화합물 1의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 1.02 및 1.14 (3H each, s)에서 2개의 angular methyl signal, δ 0.93 (1H, d, *J* = 6.6 Hz) 및 0.95 (1H, d, *J* = 6.6 Hz)에서 2개의 secondary methyl signal이 나타났다. δ 3.51 (1H, m), 3.78 (2H, overlapped), 4.01 (1H, dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz), 4.15 (1H, dd, *J* = 11.1, 1.8 Hz) 및 δ 3.44 (1H, dd, *J* = 10.5, 6 Hz)에서 oxygenated proton signal들을 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 27개의 carbon signal들이 나타났으며, 7개의 oxygenated carbon signal들을 확인하여 전형적인 polyhydroxylated sterol의 spectrum을 나타내었다. 이와 같은 spectral data를 종합하여 기존에 알려진 문헌[31]과 비교해 화합물 1을 5α-cholestane-3β,6α,7α,8,15α,16β,26-heptol (1)로 동정하였다. 화합물 1은 1982년 인도양에 서식하는 불가사리류의 하나인 *Protoreaster nodosus*로부터 처음으로 분리, 보고되었다[31]. 이후 별불가사리에서도 분리 보고되었으며[27], L1210 및 KB cell에서의 항암 활성에 대해 보고된 바 있다[23]. 화합물 2의 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 화합물 1의 그것과 매우 유사하게 나타났으나, 8개의 oxygenated carbon signal들을 확인할 수 있었으며, EI-MS spectrum의 *m/z* 500에서 분자이온 peak를 확인하여, 화합물 1에 하나의 산소가 도입된 화합물로 추정하였다. 이와 같은 결과를 종합하여 기존에 보고된 문헌치와 비교해 화합물 2를 5α-cholestane-3β,4β,6α,7α,8,15β,16β,26-octol (2)로 동정하였다. 화합물 2는 별불가사리로부터 2013년 처음으로 분리, 보고되었으며, HepG2 cell에서의 세포독성 및 HL-60 cell에서의 세포 증식 억제 효능이 보고되었다[24,27]. 화합물 3의 경우, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 0.97 및 1.02 (3H each, s)에서 2개의 angular methyl signal, δ 0.90 (9H, d, *J* = 6.6 Hz)에서 3개의 secondary methyl signal이 나타났다. δ 3.44 (s)에서 methoxyl에 기인하는 것으로 추정되는 signal이 나타났으며, δ<sub>H</sub> 4.94 (1H, s) 및 δ<sub>C</sub> 109.7에서 anomeric proton 및 carbon signal을 확인하여 당이 결합한 saponin임을 추정할 수 있었다. 이와 같은 결과를 종합하여 기존에 보고된 문헌치와 비교하여 화합물 3을 asterosaponin P<sub>1</sub>으로 동정하였다. Asterosaponin P<sub>1</sub>은 1983년 별불가사리로부터 처음으로 분리, 보고되었으며[25], L1210 및 KB cell에서의 항암 활성 및 HL-60 cell에서의 세포 증식 억제 효능을 평가



**Figure 3.** Effect of compound 1, 2, and 3 on keratinocyte stem cells (KSCs) viability. After KSCs were treated with various concentrations of compound 1, 2, and 3 for 24 h, CCK-8 assay was performed. Data are shown as a percentage of control from three independent experiments in triplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the untreated control.



**Figure 4.** Effect of compound 1, 2, and 3 on proliferation of keratinocyte stem cells (KSCs). Cells were incubated with various concentration of compound 1, 2, and 3 for 72 h. KSCs proliferation was measured using CCK-8 assay. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the untreated control (BM, basal medium). Growth medium (GM) was used as a positive control.

하였으나, 효과가 없는 것으로 보고된 바 있다[23,24].

분리된 화합물들의 경우, 항암, 항바이러스 등의 효능 연구들이 진행된 바 있으나, 피부 세포에서의 효능 연구는 진행된 바 없다. 따라서 각 성분들에 대한 피부 세포에서의 효능을 확인해보고자 하였다.

### 3.2. 불가사리 유래 화합물 3종의 표피 줄기세포 증식 촉진 효과

불가사리 유래 화합물 3종을 표피 줄기세포에 농도

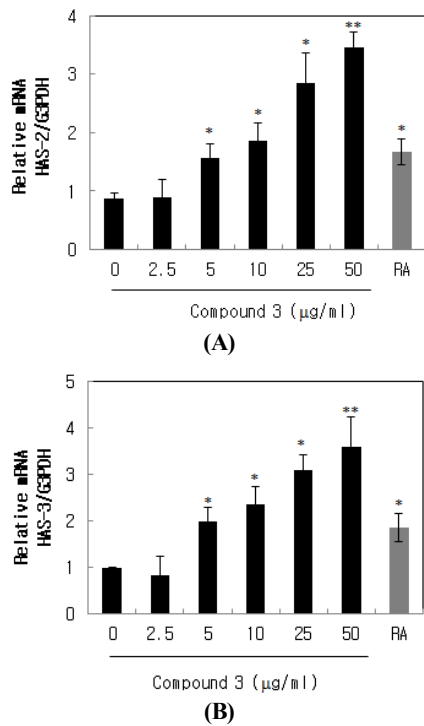
별로 24 h 처리한 후, 화합물의 세포 독성을 CCK-8 방법을 이용하여 평가하였다. 90% 이상의 세포 생존율이 나타나는 농도를 확인한 결과, 화합물 1과 2는 10  $\mu\text{g/mL}$ , 화합물 3은 100  $\mu\text{g/mL}$ 임을 확인하였다(Figure 3). 세포독성을 나타내는 농도 이하에서 화합물 3종을 농도별로 표피 줄기세포에 72 h 처리하여, 세포 활성 실험을 진행한 결과, 음성 대조군인 기본배지(basal medium) 대비 화합물 1과 2의 경우 유의차 있는 표피 줄기세포 증식 효능은 없었으나, 화합물 3의 경우 25  $\mu\text{g/mL}$ 와 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 약 19.8%와 21.6% 정도의 유의차 있는 표피 줄기세포 증식 효과를 보였다(Figure 4). 그러나, 각질형성세포인 HaCaT에서는 화합물 3가 세포 증식 효과를 보이지 않아, 화합물 3에 의한 표피 줄기세포 세포 수의 증가는 줄기세포에 특이적으로 나타나는 효능임을 확인할 수 있었다(data not shown). 양성대조군으로는 소 뇌하수체 추출물이 들어간 성장배지(growth medium)를 사용하였다.

### 3.3. 화합물 3 (Asterosaponin P<sub>1</sub>)의 각질형성세포에서 HAS-2와 HAS-3 mRNA의 발현 증가 효과

불가사리에서 분리된 3종의 화합물 중, 표피 줄기세포 증식 촉진 효과를 보였던 화합물 3 (asterosaponin P<sub>1</sub>)의 피부 보습에 대한 영향을 알아보기 위해, 각질형성세포인 HaCaT에 asterosaponin P<sub>1</sub>을 농도별로 처리한 후, quantitative real-time PCR을 수행하고,  $\Delta\Delta\text{Ct}$ 법을 이용하여 히알루론산 합성에 관여하는 HAS-2와 HAS-3의 유전자의 발현량을 계산하였다. Ca<sup>2+</sup>이 포함되지 않은 DMEM에 희석한 asterosaponin P<sub>1</sub>은 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 음성 대조군 대비, HAS-2 mRNA는 각각 1.5, 1.8, 2.4, 2.8배, HAS-3 mRNA는 각각 1.97, 2.35, 3.08, 3.58배 만큼 농도 의존적으로 유전자 발현을 증가시켰다(Figure 5). 이는 asterosaponin P<sub>1</sub>이 피부의 핵심 보습 인자 중 하나인 히알루론산의 합성을 촉진시키는 효소의 유전자 발현을 농도 의존적으로 증가시켜 피부 보습에 긍정적인 효과를 나타낼 것으로 예상할 수 있다.

### 3.4. 화합물 3 (Asterosaponin P<sub>1</sub>)의 콜라겐 합성 촉진 효능

화장품 원료로서의 또 다른 활용가능성을 평가하기 위해, asterosaponin P<sub>1</sub>의 사람 진피 섬유아세포에서 콜라겐 생합성 촉진 효능을 평가하였다. 세포 독성이 없

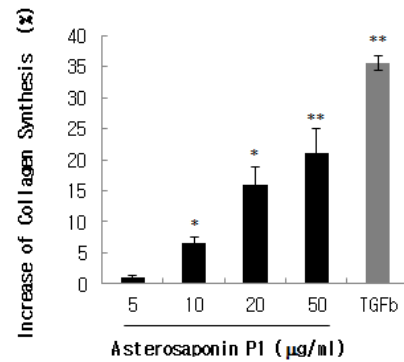


**Figure 5.** Transcriptional expression profile of HAS-2 and HAS-3 in compound 3-treated HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with compound 3 for 24h. Total RNA was extracted and quantitative real time PCR was performed for HAS-2 (A) and HAS-3 (B). G3PDH was used as an internal control. Results are the mean  $\pm$  SD. of experiments using data are shown as fold increase from the three independent experiments in triplicate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the untreated control. Retinoic acid ( $10^{-7}$  M) was used as a positive control.

는 농도에서 콜라겐 합성량을 측정했을 때, 음성 대조군에 비해 asterosaponin P<sub>1</sub>은 10  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 6.5%, 15.9%, 21.0%의 콜라겐 합성이 증가함을 확인했다(Figure 6). 양성대조군인 10 ng/mL의 TGF- $\beta$  처리군은 음성 대조군에 비하여 35.5%의 콜라겐 생합성 촉진 효능을 보였다. 따라서, asterosaponin P<sub>1</sub>의 콜라겐 생합성 촉진은 양성 대조군 TGF- $\beta$  보다는 낮은 수준이나 유의한 결과로, 노화에 의해 감소되는 진피 섬유아세포에서의 콜라겐 합성을 촉진시키는 효능을 예상할 수 있다.

#### 4. 결 론

본 연구는 개체수의 급격한 증가로 해양 생태계를



**Figure 6.** Collagen synthesis-promoting effects of compound 3. Collagen synthesis was evaluated using pro-collagen EIA assay. TGF- $\beta$  (10 ng/mL) was used as a positive control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the untreated control.

파괴해 어촌에 피해를 주고 있는 별불가사리의 산업적인 이용방안을 마련하고, 경제적 부가가치를 창출하기 위해 기능성 화장품 소재로의 가능성을 확인하고자 진행하였다. 충남 보령 무창포 해수욕장에서 별불가사리를 채집하고 이들의 성분 연구를 통해서, 2종의 polyhydroxysteroid와 1종의 saponin을 분리하였으며, 각각을 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8,15 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,26-heptol (1), 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8,15 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-octol (2) 및 asterosaponin P<sub>1</sub> (3)으로 동정하였다. 이들 성분들은 항암, 항바이러스 효능에 대해 알려져 있으나, 피부에서의 효능 연구는 진행된 바가 없다. 피부가 노화되면 표피에서는 표피 줄기세포가 감소하고, 각질세포의 공급이 원활하지 않게 되고, 수분을 잡아두는 중요 기질인 히알루론산의 양이 감소한다고 알려져 있다. 또한, 노화된 진피에서는 피부 탄력의 주요한 인자인 콜라겐이 감소되어 있으며 이것이 피부 주름을 형성한다고 알려져 있다. 따라서, 별불가사리로부터 분리된 3종의 화합물을 피부 항노화에 관여하는 인자들에 대한 평가를 통해 화장품 소재로서의 활용가능성을 확인하였다. 그 결과, asterosaponin P<sub>1</sub>이 표피 줄기세포의 증식을 촉진시키고, 각질형성세포에서 히알루론산을 합성하는 효소인 HAS-2와 HAS-3 유전자의 발현을 증가시켰음을 확인하였다. 또한, asterosaponin P<sub>1</sub>은 콜라겐의 생합성을 촉진시키는 효능을 나타내었다. 이상의 결과들로부터, 별불가사리로부터 분리한 asterosaponin P<sub>1</sub>은 피부 보습과 주름을 개선하는 항노화 화장품 소재로 활용될



수 있을 것으로 판단된다. 그러나, 분리된 성분들의 수율이 매우 낮고(약 0.001%), 생산 공정 도입 시 불가사리 특유의 비린 향취를 지니고 있어 원료로 활용하기 위해서는 향취를 제거하는 고효율 생산 방법에 대한 연구가 필요하다. 또한 향후 asterosaponin P<sub>1</sub>을 포함하는 제형으로 인체실험을 진행하여, 피부 재생 효능 및 피부 안정성 여부를 평가할 예정이다.

## Reference

1. R. M. Lavker and T. T. Sun, Epidermal stem cells: properties, markers, and location, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(25), 13473 (2000).
2. L. Alonso and E. Fuchs, Stem cells of the skin epithelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(suppl.1), 11830 (2003).
3. C. Blanpain and E. Fuchs, Epidermal stem cells of the skin, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **22**, 339 (2006).
4. A. Webb, A. Li, and P. Kaur, Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin, *Differentiation*, **72**(8), 387 (2004).
5. J. R. Bickenbach, M. M. Stern, K. L. Grinnell, A. Manuel, and S. Chinnathambi, Epidermal stem cells have the potential to assist in healing damaged tissues, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **11**(1), 118 (2006).
6. N. Gago, V. Perez-Lopez, J. P. Sanz-Jaka, P. Cormenzana, I. Eizaguirre, A. Bernad, and A. Izeta, Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells, *Stem Cells*, **27**(5), 1164 (2009).
7. I. Ghersetich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 119 (1994).
8. W. Manuskiatti and H. I. Maibach, Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging, *Int. J. Dermatol.*, **35**, 539 (1996).
9. S. Karvinen, S. Pasonen-Seppanen, J. M. Hyttinen, J. P. Pienimaki, K. Toronen, T. A. Jokela, M. I. Tammi, and R. Tammi, Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthase 2 and 3, *J. Biol. Chem.*, **278**(49), 49495 (2003).
10. S. Kim, B. Y. Kang, S. Y. Cho, D. S. Sung, H. K. Chang, M. H. Yeom, D. H. Kim, Y. C. Sim, and Y. S. Lee, Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **316**, 348 (2004).
11. T. Sayo, Y. Sugiyama, Y. Takahashi, N. Ozawa, S. Sakai, O. Ishikawa, M. Tamura, and S. Inoue, Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes, *J. Invest Dermatol.*, **118**, 43 (2002).
12. F. Liebel, S. Kaur, E. Ruvolo, N. Kollias, and M. D. Southall, Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes, *J. Invest. Dermatol.*, **132**(7), 1901 (2012).
13. L. Rittie and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **1**(4), 705 (2002).
14. Y. S. Kim, Selective feeding on the several bivalve molluscs by starfish, *Asterias amurensis* Lutken, *Bull. Fac. Fish.*, **19**, 244 (1969).
15. K. H. Kang, J. M. Kim, and S. T. Oh, Predation of *Asterias amurensis* and *Asterina pectinifera* on valuable bivalves at different water temperature, *Korean J. Malacol.*, **16**(1-2), 17 (2000).
16. Korean Patent 0044347 (2001).
17. H. Y. Park, J. I. Lee, K. H. Nam, and M. S. Jang, Physiochemical characteristics of calcium supplement manufactured using starfish, *Korean J. Food Preserv.*, **19**(5), 727 (2012).
18. H. S. Jeong, M. C. Kwon, J. G. Han, J. H. Ha, L. Jin, J. C. Kim, H. G. Kwak, B. Y. Hwang, and H. Y. Lee, Enhancement of skin immune activation effect of collagen peptides isolated from *Asterias amurensis*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **40**(5), 522 (2008).
19. M. C. Kwon, C. H. Kim, H. S. Kim, B. Y. Hwang, and H. Y. Lee, Anti-wrinkle activity of low molecular weight peptides derived from the collagen iso-



- lated from *Asterias amurensis*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**(6), 625 (2007).
20. Korea Patent 10-2001-0030718 (2001).
  21. Korea Patent 10-2002-0004701 (2002).
  22. Korea Patent 10-2003-0090586 (2003).
  23. R. Higuchi, Y. Noguchi, T. Komori, and T. Sasaki, Biologically active glycosides from asteroidea, XVIII. <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and biological activities of polyhydroxylated steroids from the starfish *Asterina pectinifera* Muller et Troschel, *Liebigs Ann. Chem.*, **1988**(12), 1185 (1988).
  24. Z. Li, G. Chen, X. Lu, H. Wang, B. Feng, and Y. Pei, Three new steroid glycosides from the starfish *Asterina pectinifera*, *Nat. Prod. Res.*, **27**(20), 1816 (2013).
  25. A. A. Kicha, A. I. Kalinovsky, E. V. Levina, V. A. Stonik, and G. B. Elyakov, Asterosaponin P<sub>1</sub> from the starfish *Patiria pectinifera*, *Tetrahedron Lett.*, **24**(36), 3893 (1983).
  26. H. Zuo, T. Wang, Y. Qi, Q. Zhao, and Z. Li, Extraction, purification and cytotoxic activity of cerebrosides from *Asterina pectinifera*, *Adv. Mater. Res.*, **781-784**, 682 (2013).
  27. Y. Peng, J. Zheng, R. Huang, Y. Wang, T. Xu, X. Zhou, Q. Liu, F. Zeng, H. Ju, X. Yang, and Y. Liu, Polyhydroxy steroids and saponins from China sea starfish *Asterina pectinifera* and their biological activities, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**(6), 856 (2010).
  28. N. P. Thao, N. X. Cuong, B. T. T. Luyen, N. V. Thanh, N. X. Nhiem, Y. S. Koh, B. M. Ly, N. H. Nam, P. V. Kiem, C. V. Minh, and Y. H. Kim, Anti-inflammatory asterosaponins from the starfish *Astropecten monacanthus*, *J. Nat. Prod.*, **76**(9), 1764 (2013).
  29. N. V. Ivanchina, A. A. Kicha, A. I. Kalinovsky, P. S. Dmitrenok, V. A. Stonik, R. Riguera, and C. Jimenez, Hemolytic polar steroidal constituents of the starfish *Aphelasterias japonica*, *J. Nat. Prod.*, **63**(8), 1178 (2000).
  30. W. Wang, F. Li, J. Hong, C. O. Lee, H. Y. Cho, K. S. Im, and J. H. Jung, Four new saponins from the starfish *Certanardoa semiregularis*, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(4), 435 (2003).
  31. R. Riccio, A novel group of highly hydroxylated steroids from the starfish *Protoreaster nodosus*, *Tetrahedron*, **38**(24), 3615 (1982).