

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “ 포스트 유전체 프로젝트: 극지 유용자원 발굴을 위한 기능유전체 연구”
과제의 위탁연구 “극지 어류 가치창출을 위한 당독소 표적 항노화/항퇴행성신경질환 생리활성
물질검증 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자 : 김 진 형

위탁연구기관명 : 가천대학교 약학대학

위탁연구책임자 : 김 선 여

위탁참여연구원 : 고 은 지 홍 성 민

“ : 김 선 혁 박 민 정

“ : 이 혜 란 박 진 호

“ : 여 주 홍 Sharma Abhishek

보고서 초록

위탁연구과제명	극지 어류 가치창출을 위한 당독소 표적 항노화/항퇴행성신경질환 생리활성 물질 검증 연구				
위탁연구책임자	김 선 여	해당단계 참여연구원수	6	해당단계 연구비	150 (백만원)
연구기관명 및 소속부서명	가천대학교 약학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 상대국연구기관명 :				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	66
- 본 연구 과제는 극지 어류 유래 소재를 기반으로 당독소(Glycotoxin)의 일종인 메틸글리옥살(Methylglyoxal, MGO)을 표적으로 하는 항노화 및 퇴행성 뇌질환 제어 후보소재를 도출하고자 단계적으로 수행됨. 1차년도에는 극지 어류 유래 다양한 부위 추출물을 대상으로 MGO 소거능 및 최종당화산물(Advanced Glycation End-products, AGEs) 형성 억제능을 평가하였으며, 그 결과 [남극빙어(<i>Champscephalus gunnari</i>, CG)] 피부(Skin) 30% 에탄올(Ethanol) 추출물이 항당독소 효능이 우수한 소재로 선정됨. 2차년도에는 선정된 CG 껍질 30% 에탄올 추출물을 중심으로 세포 기반 당독소 유도 모델에서 신경독성, 신경염증 및 노화 관련 지표를 평가하였으며, 안정적인 효능과 재현성이 확인됨에 따라 최종 핵심 소재로 확정됨. 또한 해당 추출물로부터 타우린(Taurine), 마이오-이노시톨(Myoinositol), 베타인(Betaine), N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 등 주요 대사체 구조를 동정함. 3차년도에는 확정된 소재 및 후보 대사체를 대상으로 뇌 조직 유래 세포 및 동물 모델에서 행동, 혈중 지표, 뇌 및 장 조직 수준의 효능을 종합적으로 검증하였고, 우울 및 인지 관련 행동 지표 개선, 당독소·신경염증 관련 단백질 발현 조절 효과를 확인함. - 이상의 결과를 통해 본 연구는 연차별 목표를 단계적으로 달성하였으며, 극지 어류 유래 항당독소 기반 퇴행성 뇌질환 제어 후보소재를 성공적으로 도출함.					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	극지 어류, 남극빙어, 당독소, 항노화, 퇴행성 신경질환, 메틸글리옥살, 최종당화산물, 신경보호			
	영 어	Polar fish, <i>Champscephalus gunnari</i> , Glycotoxin, Anti-aging, Neurodegenerative disease, Methylglyoxal (MGO), Advanced glycation end products (AGEs), Neuroprotection			

요 약 문

I. 제목

극지 어류 가치창출을 위한 당독소 표적 항노화/항퇴행성신경질환 생리활성 물질 검증 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

초고령화 사회 진입에 따라 노화 및 퇴행성 신경질환의 유병률이 급격히 증가하고 있으나, 현재까지 명확한 병리 표적 부재로 인해 근본적 치료제 개발에는 한계가 존재함. 최근 메틸글리옥살(MGO) 및 최종당화산물(AGEs)로 대표되는 당독소물질 (Glycotoxin)이 노화 및 신경퇴행성 질환의 핵심 병리 인자로 제시되고 있음.

본 연구는 극한 환경에 적응한 극지 어류 유래 생물소재에 주목하여, 당독소를 표적으로 하는 항노화 및 퇴행성 신경질환 제어 가능성을 검증하고자 하였음. 이를 통해 기존 항산화 중심 접근을 넘어, 새로운 치료 표적 및 소재 기반을 확보할 필요성이 있음.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 극지 어류 유래 생물소재를 대상으로 항당독소 활성을 단계적으로 검증하는 것을 내용 및 범위로 설정함.

1차년도에는 극지 어류 조직 추출물을 확보하고, MGO 소거능 및 AGEs 형성 억제 활성을 기반으로 후보소재를 발굴함.

2차년도에는 세포 기반 MGO 유도 신경독성 및 노화 모델을 활용하여 후보소재의 생물학적 유효성을 검증하고, 주요 대사체를 동정함.

3차년도에는 동물모델을 활용한 행동 분석 및 조직 수준 평가를 통해 후보소재의 생체 적용 가능성을 종합적으로 검증함.

IV. 연구개발 결과

본 연구 과제는 극지 어류 유래 생물소재를 기반으로 당독소의 일종인 MGO를 표적으로 하는 항노화 및 퇴행성 뇌질환 제어 후보소재를 도출하고자 수행됨.

1차년도에는 극지 어류 유래 다양한 추출물을 대상으로 MGO 소거능 및 최종당화산물(AGEs) 형성 억제능을 비교 평가하였으며, 그 결과 가장 우수한 활성을 보인 남극빙어(CG) 피부(Skin) 30% 에탄올 추출물을 최적 소재로 선정함.

2차년도에는 선정된 소재의 신경독성 완화 및 항염증 효능을 세포 모델에서 검증하였으며, 성분 분석을 통해 타우린(Taurine), 마이오-이노시톨(Myoinositol), 베타인(Betaine) 및 N-아세틸-L-아스파르트산(NAA)을 주요 유효 대사체로 규명함. 특히 NAA의 신경세포 보호 효능을 확인하여 핵심 지표 물질로 확립함.

3차년도에는 동물모델(MGO 유도)을 이용하여 소재 및 핵심 물질(NAA)의 효능을 검증한 결과, 기억력 감퇴 및 우울 행동 지표가 유의적으로 개선되었으며, 뇌 내 염증성 사이토카인 억제 및 당독소 축적 감소 기전을 분자적 수준에서 확인함.

결론적으로 본 연구는 극지 어류(남극빙어) 유래 소재가 당독소 기인 노화 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료를 위한 새로운 기능성 후보 물질로서의 산업적 가치가 높음을 제시함.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과는 당독소를 표적으로 하는 항노화 및 퇴행성 신경질환 치료 전략의 과학적 근거로 활용 가능함. 극지 어류 유래 생물소재 및 핵심 대사체는 향후 신약 후보물질 탐색, 기능성 소재 개발, 바이오마커 기반 연구 등 다양한 후속 연구로 확장될 수 있음. 또한 지식재산권 확보 및 기술 이전을 통한 바이오·제약 산업화 기반 마련에 기여할 것으로 기대됨.



S U M M A R Y

I. Title

Elucidation of anti-glycotoxic component with anti-aging/anti-neurodegenerative activity for the value creation of Antarctic fish

II. Purpose and Necessity of R&D

With rapid global aging, the prevalence of aging-related and neurodegenerative diseases is increasing. However, disease-modifying therapies remain limited due to the lack of clearly defined pathological targets. Recently, glycotoxins, specifically methylglyoxal (MGO) and advanced glycation end-products (AGEs), have been identified as key contributors to aging and neurodegenerative pathology. This study aimed to explore polar fish-derived bioresources adapted to extreme environments as novel materials for glycotxin-targeted anti-aging and neurodegenerative disease control, providing new therapeutic targets beyond conventional antioxidant approaches.

III. Contents and Extent of R&D

This study involved a stepwise evaluation of glycotxin-modulating activities of polar fish-derived bioresources.

In the first year, tissue extracts were prepared, and their MGO scavenging and AGE formation inhibitory activities were comparatively evaluated to select the optimal candidate.

In the second year, biological efficacy was validated using cell-based MGO-induced neurotoxicity and aging models, and key active metabolites were identified.

In the third year, *in vivo* behavioral and tissue-level analyses were conducted to comprehensively verify physiological applicability and mechanisms of action.

IV. R&D Results

The 30% ethanol extract of *Champsocephalus gunnari* (CG) skin was selected as a lead candidate material, exhibiting the most superior anti-glycotoxic activity among the screened resources. Cell-based assays demonstrated protective effects against MGO-induced neurotoxicity and aging-related markers. Through metabolite profiling, N-acetyl-L-aspartic acid (NAA) was identified as a key bioactive compound due to its potent neuroprotective effects. *In vivo* studies confirmed that both the candidate extract and NAA significantly ameliorated MGO-induced depressive-like behavior and cognitive impairment to levels comparable to the normal group. These behavioral improvements were accompanied by the down-regulation of glycotoxic and neuroinflammatory markers, confirming consistent efficacy from cellular to organismal levels.

V. Application Plans of R&D Results

The findings provide a scientific basis for glycotoxin-targeted therapeutic strategies for aging-related and neurodegenerative diseases. The identified polar fish-derived bioresources and metabolites may be further developed for drug discovery, functional material development, and biomarker-based research. These results will support future intellectual property acquisition and technology transfer to the bio-pharmaceutical industry.



목 차

제 1 장 연구개발 최종 목표

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

1. 국내외 기술개발 동향
2. 극지 어류 생물소재 관련 기술개발 현황
3. 본 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 1차년도 : 극지 어류 및 그 유래 물질의 당독소 소거능/분해능 평가를 통한 우수소재 발굴
2. 2차년도 : 극지 어류 유래 항노화 소재로부터 생리활성물질 효능 검증 및 구조 구명
3. 3차년도 : 뇌 조직 유래 세포 및 동물모델에서 최적 소재의 유효성 평가실험 설계 및 분석 방법

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 연구개발목표 설정 및 추진 전략
2. 연차별 연구개발 목표 및 달성도
3. 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발 최종 목표

 극지어류 유래 당독소물질(glycotoxins) 저감화 소재 기반 노화 제어 선도물질 도출 및 senolytics/senostatics 개발		
1차년도	2차년도	3차년도
극지어류 및 유래물질의 당독소물질류 저감화 소재 도출	노화 모델에서 극지어류 및 유래물질의 항노화 효능평가 및 제어 기전 구명	퇴행성 뇌질환 모델에서 후보소재의 유효성 평가 및 제어 기전 구명
 - 극지어류 유래 소재의 당독소물질류 소거능/분해능 평가 - 대상시료의 항산화능 및 AGEs 신호체계 억제능 평가	 노화 유도 세포/동물 모델에서 극지어류 유래 생리활성 물질 분리/구조구명/항노화 효능 평가	 - 고용량 MGO를 처리한 동물모델에서 후보소재의 생리활성 평가 - 뇌 조직 등에서의 MGO저감화 정량분석 및 항당독소 관련 기전 연구
극지어류 유래 senolytics/senostatics를 활용한 독창적인 노화관련 신경계 질환 (치매/파킨슨) 제어용 식의약품 소재 개발		
▶ 최종 연구목표는 다음과 같으며 이를 수행하기 위해 연차별 목표를 세부적으로 구성하였음. 극지 어류 생물소재 기반 혁신적인 융합기술을 통하여 획기적인 항노화 조절용 선도물질을 도출하고, 이를 토대로 노화 관련 신경계 질환(치매/파킨슨) 제어용 혁신 신약 (<i>first-in-class</i>) 신의약품 개발용 후보소재를 도출하기 위한 기반 연구를 수행하고자 함. 1차년도: 극지 어류 생물소재 대상 당독소 저감화 효능연구를 통해서 항당독소 효능이 우수한 극지 어류 생물소재 선별 2차년도: 항당독소능이 우수한 극지 어류 생물소재로부터 생리활성물질 도출하고, 이의 생리적 기능을 <i>in vitro</i> 모델에서 구명 3차년도: 노화관련 신경계질환 모델에서 선별된 소재 및 생리활성물질의 약리효능 검증 및 관련 작용기전 연구 ▶ 이에 따른 목표 연구성과는 다음과 같음 1차년도: 당독소 저감화 극지 어류 소재 선별 및 기능 평가와 관련된 SCI(E)논문 1편 게재 2차년도: 항노화 효능을 갖는 극지 어류 소재 선별 및 당독소표적 항노화 신규 물질 구조구명과 관련된 SCI(E) 논문 1편 게재 3차년도: 노화관련 신경계 질환 제어용 극지 어류 유래 생리활성물질 도출		

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

1절. 국내외 기술개발 동향

1. 노화조절제 개발 현황

초고령화 사회 진입에 따라 노화 조절제(Senolytics/Senostatics) 개발 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있음. 그러나 현재까지 명확한 노화 표적 인자가 확립되지 않아 근본적인 노화 극복에는 한계가 존재함. 노화 조절제는 비특이적 작용 중심의 1세대와, 선택적 작용기전을 갖는 천연물·화합물 기반의 2세대로 구분되나, 현재까지 노화 질환 적응증으로 승인된 의약품은 없는 상황임. 이는 새로운 노화 표적 분자 (Novel Aging Target)의 발굴 필요성을 시사함.

2. 당독소 (Glycotoxins) 관련 기술개발 현황

최근 당독소물질은 노화 및 대사질환의 핵심 병인으로 주목받고 있음. 특히 고혈당 환경에서 생성되는 반응성 카보닐 화합물(Reactive Carbonyl Species, RCS)과 그 유래 당독소물질은 단순 부산물이 아닌 질환 유발 인자로 인식되고 있음.

가. 메틸글라이옥살 (MGO)의 중요성

메틸글라이옥살(MGO)은 생체 내 반응성이 매우 높은 디카로보닐(Dicarbonyl) 화합물로, 단백질 비정상적 접힘 (Misfolding) 유발, 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 생성 증가, 세포독성 및 최종당화산물(Advanced Glycation End-products, AGEs) 형성을 통해 노화 및 대사 이상을 촉진함. 이에 따라 MGO를 표적으로 하는 제어 전략의 중요성이 부각되고 있음.

나. 기술적 한계

당독소 연구는 구조 규명 부족, 소거제(Scavenger) 중심의 연구 편중, 그리고 선택적 제어 물질의 부족이라는 한계를 지니고 있음. 특히 이미 형성된 당독소를 분해하는 분해제(breaker) 연구는 매우 제한적인 실정임.

3. 퇴행성 신경질환과 당독소의 상관성

당뇨병과 치매, 파킨슨병 등 퇴행성 신경질환 간의 상관성이 보고됨에 따라, 내인성 당독소물질과 AGEs의 병리적 역할이 중요하게 대두되고 있음. 당독소는 퇴행성 뇌질환의 바이오마커(Biomarker) 및 신규 치료 표적으로 제시되고 있으나, 현재까지 근본적 치료제는 부재한 상황임.

2절. 극지 어류 생물소재 관련 기술개발 현황

1. 극지 어류의 특수성

극지 어류는 극한 환경 적응을 위해 높은 항산화 관련 유전자 발현과 특이적인 생리활성 물질을 보유하고 있음. 일부 극지 어류는 대사 이상 및 노화 관련 질환과 유사한 표현형을 나타내는 것으로 보고됨.

2. 기술개발의 공백

극지 어류 유래 소재의 생리활성 검증 및 조절물질 탐색 연구는 접근성 및 연구 인프라 한계로 인해 제한적으로 수행되어 왔음. 이에 따라 극지 어류가 보유한 고유 활성 물질에 대한 체계적인 탐색과 검증 연구가 요구됨.

3절. 본 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

본 연구는 극지 어류 생물소재를 활용하여 당독소를 표적으로 하는 항노화 및 항퇴행성 신경질환 연구를 수행한 선도적 사례로서 다음과 같은 차별성을 가짐.

1. 연구의 독창성

극지 생물자원과 당독소 화학, 노화생물학, 신경과학을 융합한 창의적 연구 전략을 통해 미개척 연구 분야를 선점함.

2. 기술적 우위성

기존 소거제 중심 연구에서 벗어나 당독소 breaker 개념을 적용하였으며, 극지 어류 유래 천연물 기반의 선택적 당독소 제어 전략을 제시함.

3. 기대효과 및 파급력

본 연구는 노화 및 퇴행성 신경질환 치료 패러다임 전환 가능성을 제시하고, 극지 생물자원의 고부가가치 활용 기반을 마련함으로써 관련 산업 및 기술 개발에 기여할 것으로 기대됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 극지 어류 및 그 유래 물질의 당독소 소거능/분해능 평가를 통한 우수소재 발굴

1. 극지 어류 유래 추출물 라이브러리 구축

가. 극지 어류 유래 추출물 최적화

극지 어류 *Notothenia rossii* (NR) 및 *Champscephalus gunnari* (CG)에서 각각의 장기를 하기와 같이 적출한 후, 유기용매로 추출한 후 동결건조하여 각 장기유래의 시료들을 얻었음. 이러한 각각의 시료들에 대한 생리활성을 확인하였음 (그림 1 - 3).

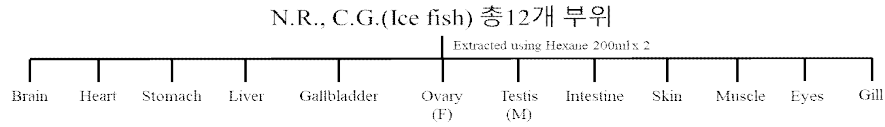
; 상기 2종류 어류 시료를 하기와 같이 각 장기를 부위별로 나누어 먼저 30% 에탄올을 g당 5 ml volume으로 30분간 sonication추출하였고, 이를 동일하게 3회 반복하여 얻은 추출물을 동결건조한 후 각각의 생리활성 검색용 시료를 확보하였음.

; 각각의 시료를 일정량씩 채취하여 에탄올 추출물을 제조함. 추가적으로 ethyl acetate를 g 당 5 ml volume으로 30분간 sonication을 시행한 후, 이를 동일하게 3회 반복하여 얻은 추출물을 동결건조한 후 각각의 생리활성 검색용 시료를 확보하였음.



(1) 적출 부위

N.R.-*Notothenia rossii*(남극대구)
C.G.-*Champscephalus gunnari*(남극빙어)



[그림 1. 남극대구 및 빙어 유래 장기 적출 및 추출물 제조]

(2) NR 추출물 정보



Notothenia rossii

학명	부위명	계량	추출	농축	동결건조	생물량(g)	생물(g)	30% 에탄올 추출 동결건조 후(g)	30% 에탄올 추출 수율(%)	Ethyl acetate 추출 동결건조 후(g)	Ethyl acetate 추출 수율(%)
Marbled rockcod. NR	Eyes					5.30					
Marbled rockcod. NR	Skin	○	○	○	○	49.41	5.15	0.6473	12.57	0.0470	0.91
Marbled rockcod. NR	Liver	○	○	○	○	6.53	3.00	0.4604	15.35	0.0411	1.37
Marbled rockcod. NR	Heart					3.67					
Marbled rockcod. NR	Testis					1.56					
Marbled rockcod. NR	Ovary	○	○	○	○	2.54	1.00	0.1095	10.95	0.0410	4.10
Marbled rockcod. NR	Intestine					5.62					
Marbled rockcod. NR	Stomach	○	○	○	○	11.03	4.01	1.2722	31.73	0.2380	5.94
Marbled rockcod. NR	Brain	○	○	○	○	1.70	0.50	0.0101	2.02	0.0523	10.46
Marbled rockcod. NR	Gill	○	○	○	○	22.02	5.01	0.4307	8.60	0.1298	2.59
Marbled rockcod. NR	Muscle	○	○	○	○	303.60	10.07	0.6387	8.33	0.0527	0.52
Marbled rockcod. NR	Head kidney					0.62					
Marbled rockcod. NR	Gall bladder					0.49					
Marbled rockcod. NR	Pyloric caeca					3.30					

[그림 2. *Notothenia rossii*의 조직부위별 시료]

(3) CG 추출물 정보



Champscephalus gunnari
(CG)

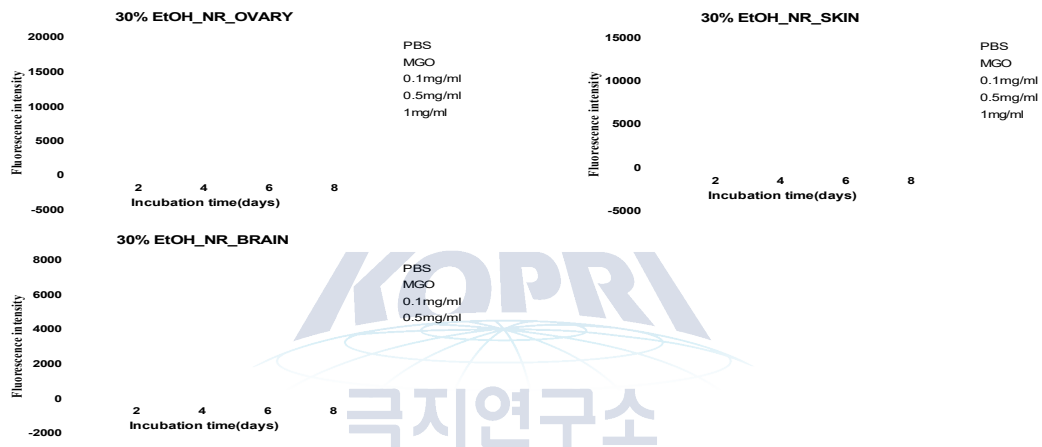
학명	부위명	계량	추출	농축	동결건조	생물량(g)	생물(g)	30% 에탄올 추출 동결건조 후(g)	30% 에탄올 추출 수율(%)	Ethyl acetate 추출 동결건조 후(g)	Ethyl acetate 추출 수율(%)
Mackerel icefish. CG	Eyes					3.56					
Mackerel icefish. CG	Skin	○	○	○	○	13.00	4.95	1.2315	24.68	0.3213	6.49
Mackerel icefish. CG	Liver	○	○	○	○	37.79	4.98	0.6774	13.60	0.0881	1.77
Mackerel icefish. CG	Heart					1.60					
Mackerel icefish. CG	Testis					4.68					
Mackerel icefish. CG	Ovary	○	○	○	○	17.38	4.99	0.5402	10.83	0.2603	5.22
Mackerel icefish. CG	Intestine					3.08					
Mackerel icefish. CG	Stomach	○	○	○	○	8.00	4.00	0.4031	10.08	0.2909	7.27
Mackerel icefish. CG	Brain	○	○	○	○	1.31	0.50	0.0144	2.88	0.0418	8.36
Mackerel icefish. CG	Gill	○	○	○	○	12.35	4.99	0.6115	12.25	0.1782	3.57
Mackerel icefish. CG	Muscle	○	○	○	○	161.80	10.11	0.9433	9.33	0.0853	0.84
Mackerel icefish. CG	Adipose tissue					9.53					
Mackerel icefish. CG	Pyloric caeca					3.07					

[그림 3. *Champscephalus gunnari*의 각 조직부위별 시료]

2. MGO 유래 당독소 효능 평가 결과

가. 후보 소재들의 처리에 따른 methylglyoxal과의 친화도 평가 (MGO affinity assay)

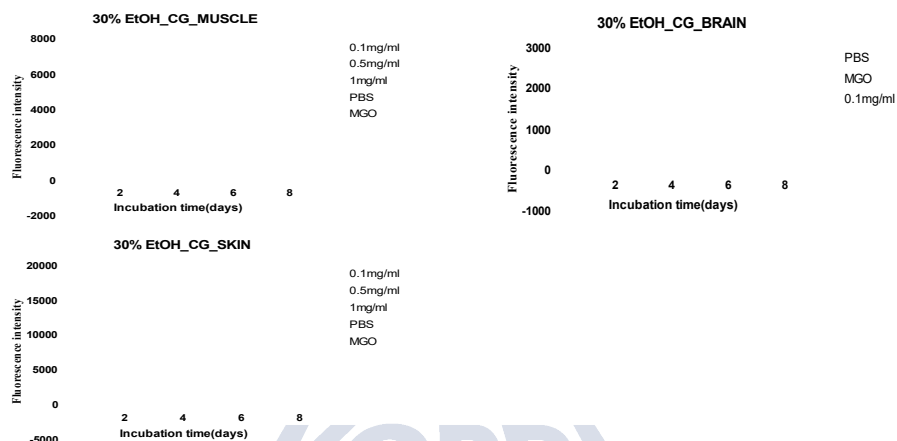
(1) 30% EtOH추출물에 대한 MGO affinity assay



[그림 4. NR 유래 각 조직들의 30% EtOH추출물에 대한 MGO affinity assay]

(a) Liver, (b) Gill, (c) Stomach, (d) Muscle, (e) Ovary, (f) Skin, (g) Brain

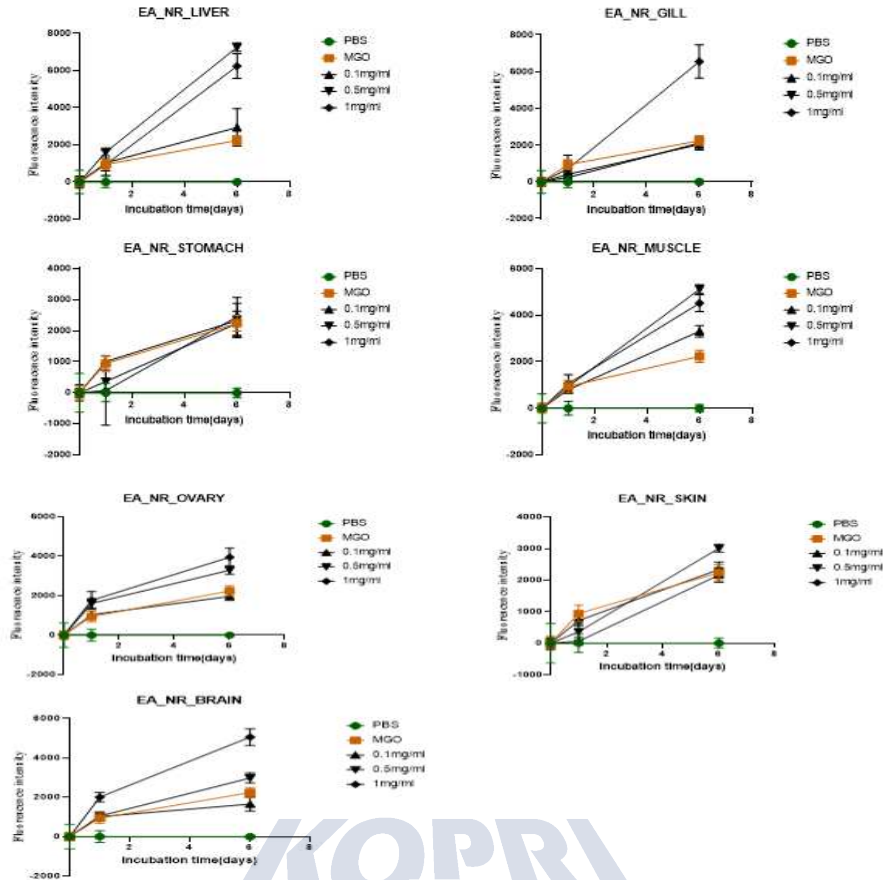
NR 어류의 30% 에탄올 추출물 (30% EtOH) 중 간(Liver), 위(Stomach), 난소(Ovary), 근육(Muscle), 피부(skin)의 추출물이 MGO와의 반응성이 우수하였음. 그 중에서 간(Liver), 난소(Ovary), 위(Stomach) 추출물들이 MGO와의 친화도가 특히 높아서 MGO 소거능이 우수할 것으로 판단됨.



[그림 5. CG 유래 각 조직들의 30% EtOH추출물에 대한 MGO affinity assay]
(a) Liver, (b) Gill, (c) Stomach, (d) Muscle, (e) Ovary, (f) Skin, (g) Brain

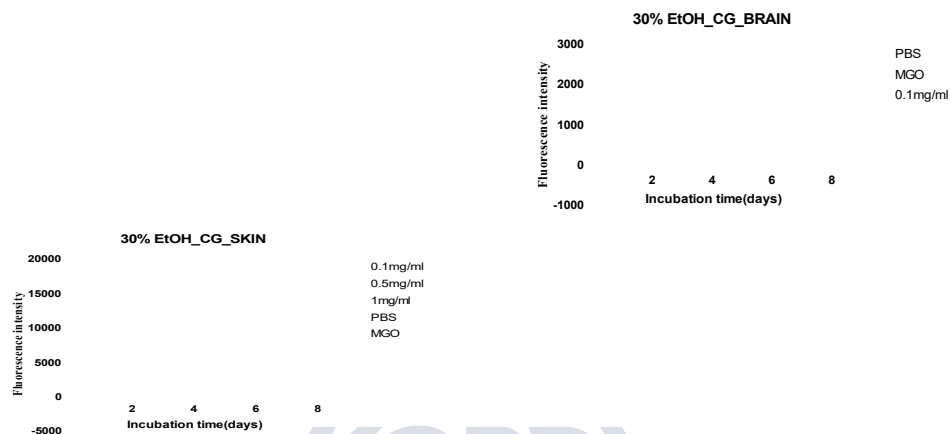
CG 어류의 30% EtOH 추출물 중 간(Liver), 위(Stomach), 피부(Skin), 아가미(Gill), 근육(muscle), 난소(Ovary) 추출물 등이 MGO와의 친화도가 높았음. 그 중에서 위(Stomach), 피부(Skin), 간(Liver) 추출물들에서 MGO와의 친화도가 특히 우수하여 MGO소거능이 높을 것으로 판단됨.

(2) EA추출물에 대한 MGO affinity assay



[그림 6. NR 유래 각 조직들의 ethyl acetate 추출물에 대한 MGO affinity assay]
(a) Liver, (b) Gill, (c) Stomach, (d) Muscle, (e) Ovary, (f) Skin, (g) Brain

NR 어류의 ethyl acetate 추출물 (EA)중 간(Liver), 아가미(Gill), 난소(Ovary), 근육(muscle), 뇌(Brain) 추출물이 MGO와의 반응성이 확인되었음. 그 중에서 간(Liver) 추출물이 MGO와의 친화도가 특히 높아서 MGO 소거능이 우수할 것으로 판단됨.

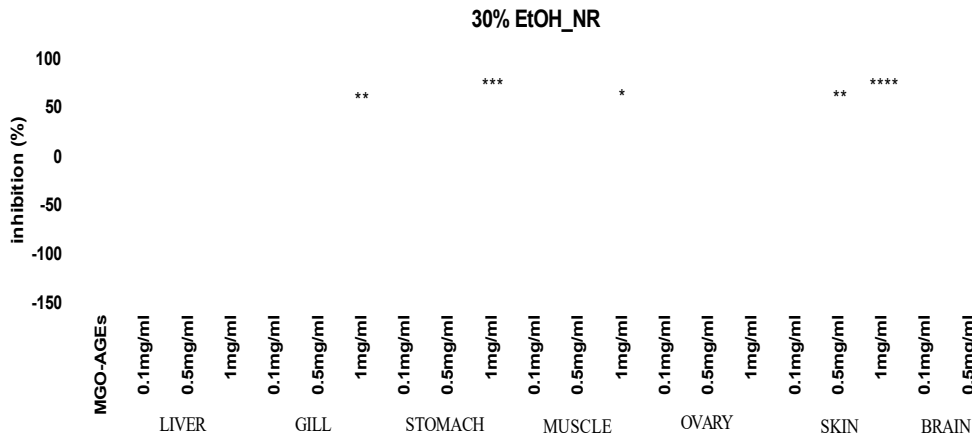


[그림 7. CG 유래 각 조직들의 30% EtOH 추출물에 대한 MGO affinity assay]
(a) Liver, (b) Gill, (c) Stomach, (d) Muscle, (e) Ovary, (f) Skin, (g) Brain

CG 어류의 30% EtOH 추출물 중 간(Liver), 위(Stomach), 피부 (Skin), 아가미 (Gill), 근육(Muscle), 난소(Ovary) 추출물 등이 MGO와의 친화도가 높았음. 그 중에서 위(Stomach), 피부 (Skin), 간(Liver) 추출물들이 MGO와의 친화도가 특히 우수하여 MGO 소거능이 높을 것으로 판단됨.

나. 후보 소재들의 처리에 따른 최종당화산물 형성억제능 평가 (MGO-AGEs formation assay)

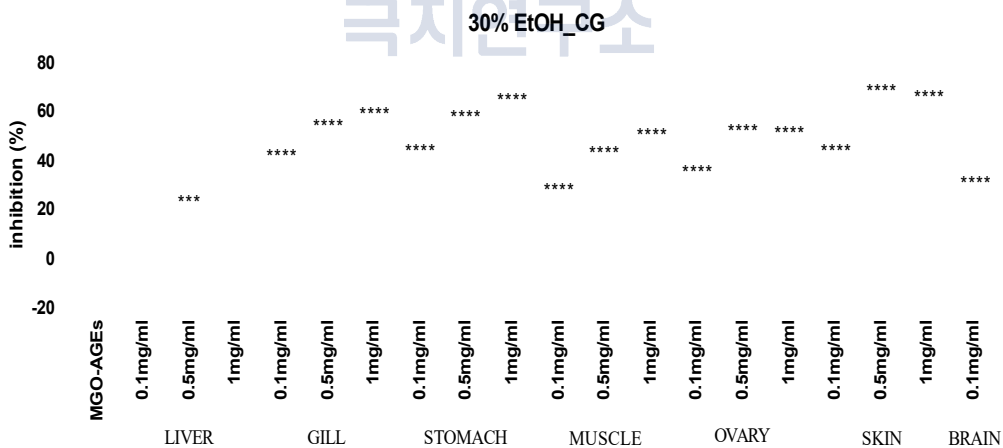
(1) 30% EtOH 추출물에 대한 MGO-AGEs formation assay



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$ vs. MGO-AGEs group

[그림 8. NR 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물에 대한 MGO-AGEs formation assay]

NR어류 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물 중 아가미(Gill), 위(Stomach), 근육(Muscle), 피부(Skin)의 MGO-AGEs 생성 억제효과가 우수하였음. 그 중에서 아가미(Gill), 위(Stomach), 피부(Skin) 추출물들이 MGO-AGEs 생성 억제효과가 탁월한 것으로 나타났음.

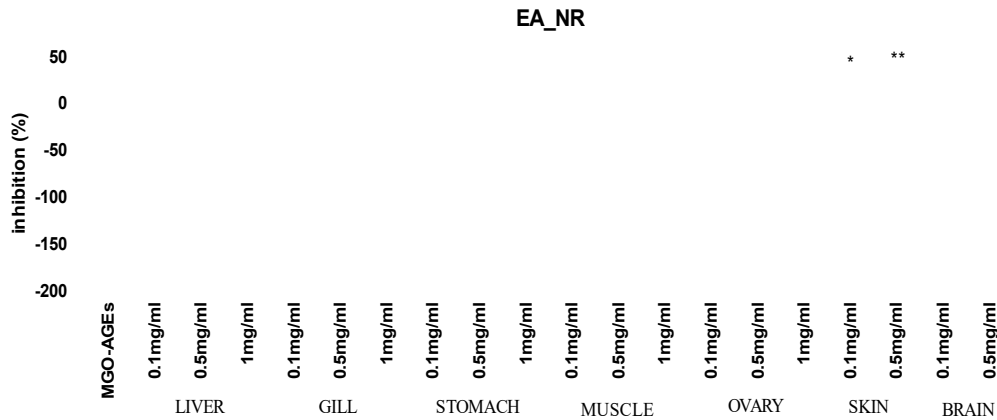


*** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ vs. MGO-AGEs group

[그림 9. CG 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물에 대한 MGO-AGEs formation assay]

CG 어류의 각 장기의 30% EtOH 추출물 중 아가미(Gill), 위(Stomach), 근육(Muscle), 난소(Ovary), 피부(Skin) 추출물 등이 MGO-AGEs 형성 억제 효과가 매우 우수한 것으로 나타났음. 그 중에서 아가미(Gill), 위(Stomach), 피부(Skin) 추출물들이 MGO-AGEs 형성 억제효과가 탁월함. Liver 및 brain 추출물에 대해서는 더 낮은 농도에서 추가실험이 필요한 것으로 사료됨.

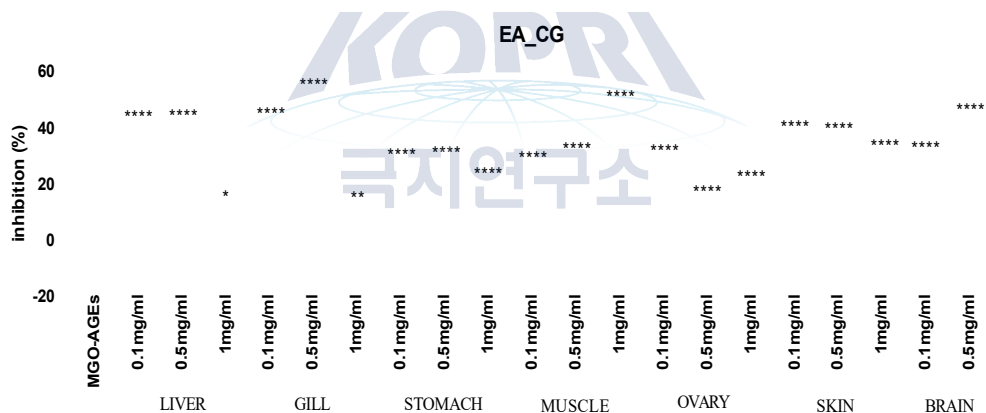
(2) EA 추출물에 대한 MGO-AGEs formation assay



* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. MGO-AGEs group

[그림 10. NR 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 MGO-AGEs formation assay]

NR 어류유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물(EA) 중에서 피부(Skin) 추출물이 MGO-AGEs 형성 억제 효과를 나타냈음.



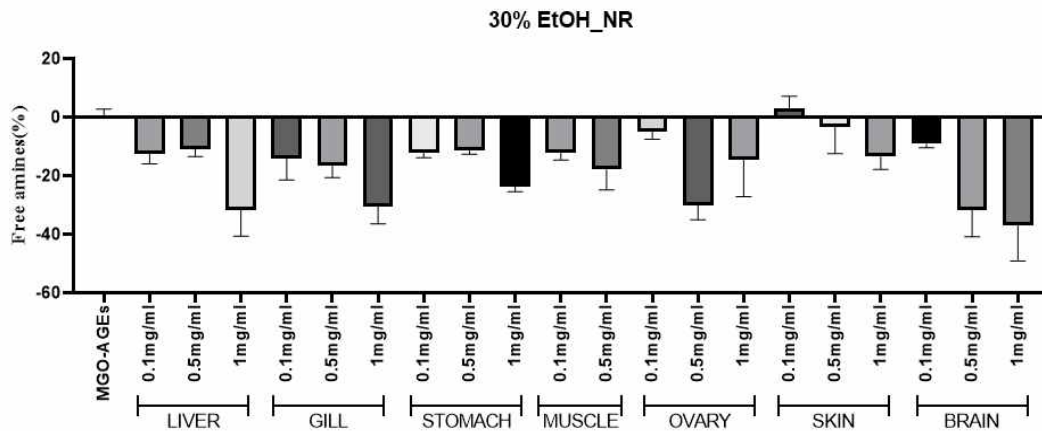
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$ vs. MGO-AGEs group

[그림 11. CG 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 MGO-AGEs formation assay]

CG 어류유래 각 장기의 EA 추출물 중 간(Liver), 아가미(Gill), 위(Stomach), 근육(Muscle), 피부(Skin), 뇌(Brain) 추출물들에서 MGO-AGEs 형성 억제 효과가 우수하였음. 그 중에서 간(Liver), 아가미(Gill), 피부(Skin), 근육(Muscle) 추출물들이 MGO-AGEs 형성 억제효과가 탁월하였음.

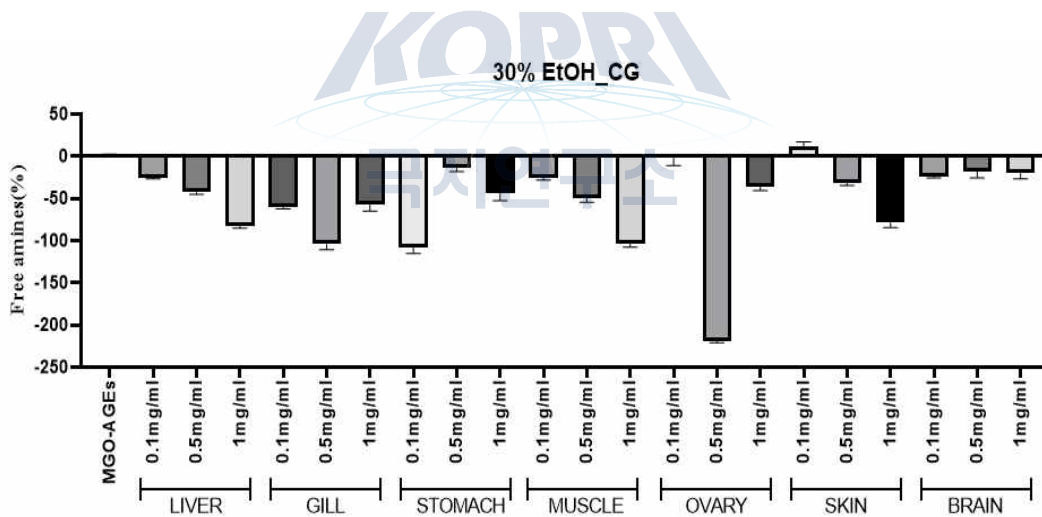
다. 후보 소재들의 처리에 따른 최종당화산물 파쇄능 평가 (MGO-AGEs breaker assay)

(1) 30% EtOH 추출물에 대한 MGO-AGEs breaker assay



[그림 12. NR 유래 각 조직들의 30% EtOH 추출물에 대한 MGO-AGEs breaker assay]

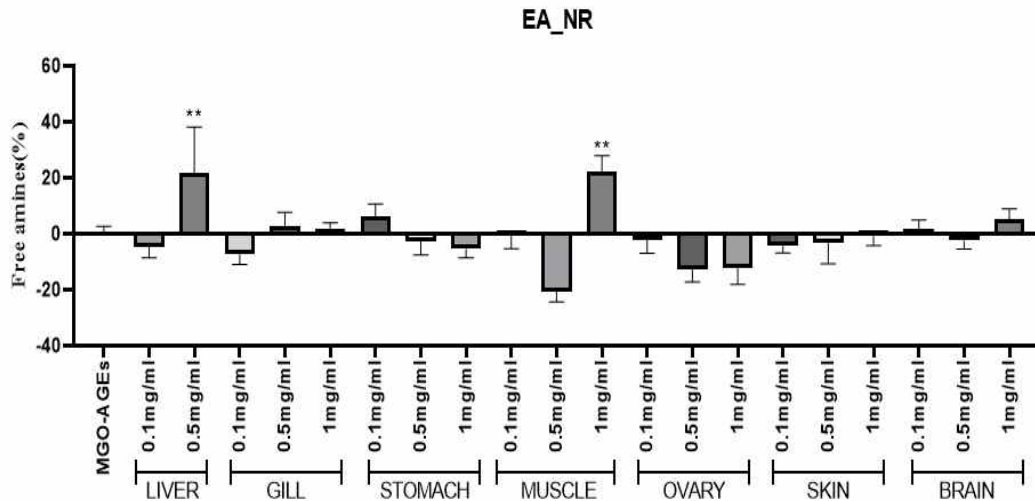
NR 어류 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물들 중 피부(Skin) 추출물 (저농도, 0.1 mg/ml) 외에는 파쇄효능을 나타내지 않았음.



[그림 13. CG 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물에 대한 MGO-AGEs breaker assay]

30% EtOH추출물에 대한 MGO-AGEs breaker assay를 수행했으나 피부(Skin) 추출물 (저농도, 0.1 mg/ml) 외에는 효능을 나타내지 않았음.

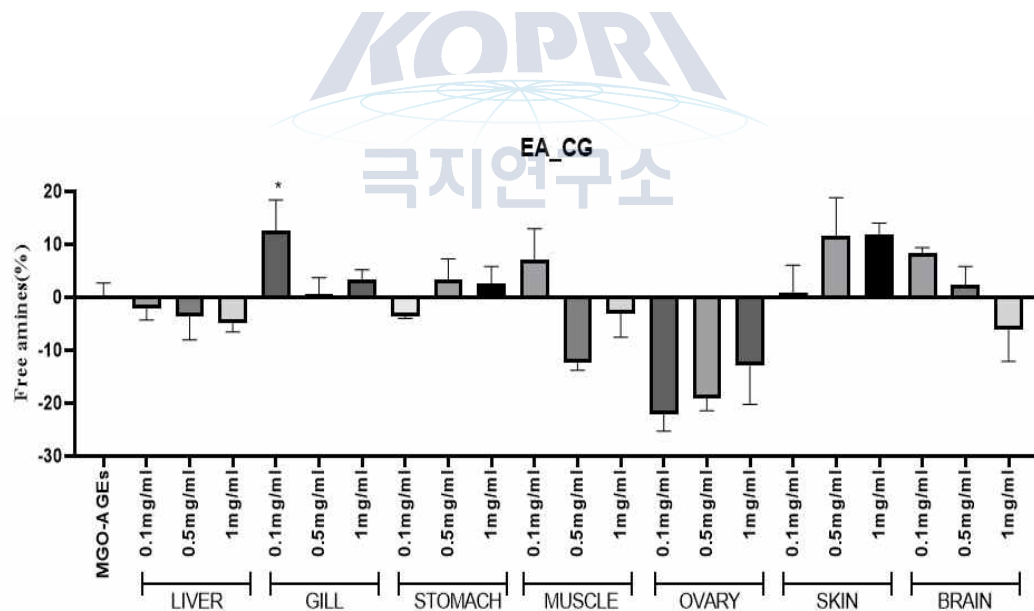
(2) EA 추출물에 대한 MGO-AGEs breaker assay



** $P < 0.01$ vs. MGO-AGEs group

[그림 14. NR 유래 각 조직들의 ethyl acetate 추출물에 대한 MGO-AGEs breaker assay]

NR 어류유래 각 장기들의 EA 추출물 중 간(Liver), 근육(Muscle) 추출물이 MGO-AGEs 파쇄효과를 나타냈음.



* $P < 0.05$: MGO-AGEs group

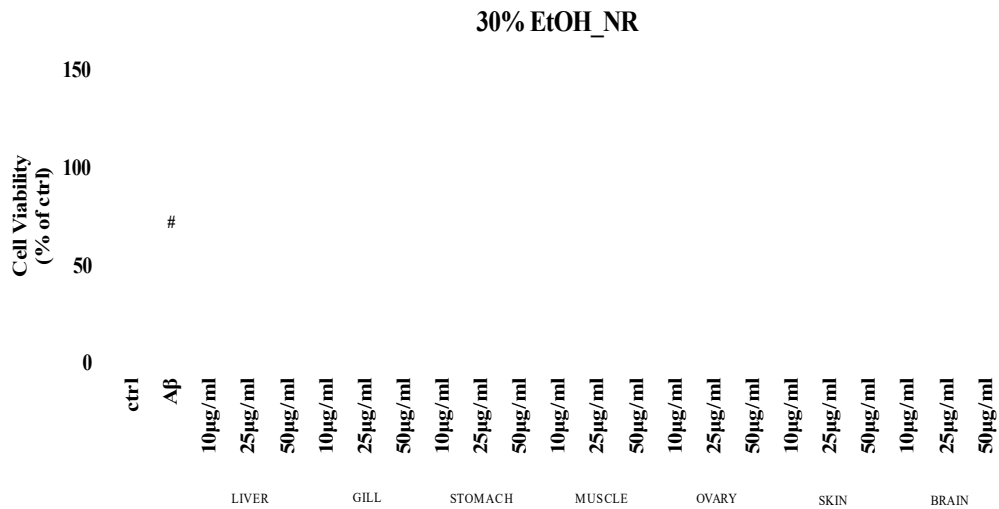
[그림 15. CG 유래 각 조직들의 ethyl acetate 추출물에 대한 MGO-AGEs breaker assay]

CG 어류유래 각 장기들의 EA 추출물 중 아가미(Gill)의 저농도에서 breaker 효과를 나타냄. 추가적으로, 피부(Skin) 추출물은 유의적이지 않으나 breaker 효과를 나타냈음.

3. 뇌조직 유래 세포주에서 항당독소 효능 평가

라. Beta-amyloid (A β) 독성에 대한 신경세포 사멸 억제 효과 확인

(1) 30% EtOH 추출물에 대한 A β 독성평가



$P < 0.05$ vs. ctrl (control) group

[그림 16. NR 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물에 대한 beta-amyloid 독성 보호능 평가]

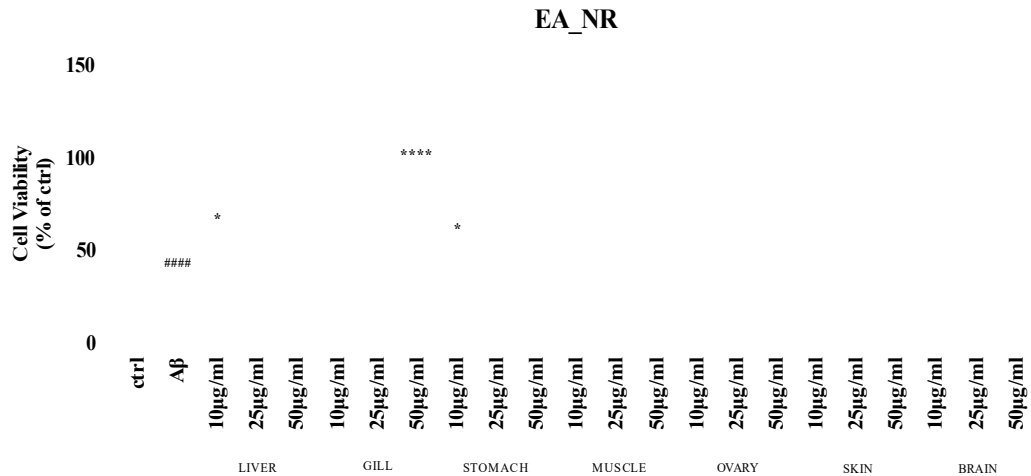
NR 어류유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물 중 간(Liver), 아가미(Gill), 위(Stomach), 근육(Muscle), 뇌(Brain) 추출물들이 A β 로 유도한 음성대조군에 대비 유의적이지 않으나 보호효과를 나타냈음.

$P < 0.0001$ vs. ctrl (control) group

[그림 17. CG 유래 각 조직들의 30% EtOH 추출물에 대한 beta-amyloid 독성 보호 평가]

CG 어류 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물을 뇌세포에 처리한 결과, 아가미(Gill), 피부(Skin), 뇌(Brain) 추출물들에서 A β 로 유도한 음성대조군에 대비 유의적이지는 않으나 보호능을 나타냈음.

(2) EA 추출물에 대한 A β 독성평가



$P < 0.0001$ vs. ctrl (control) group

* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ v.s. beta-amyloid (A β) group

[그림 18. NR 유래 각 장기들의 Ethyl acetate 추출물에 대한 beta-amyloid 독성 보호능 평가]

NR 어류의 EA 추출물 중 아가미(Gill)추출물이 A β 독성에 대한 보호능이 우수한 것으로 나타났음.



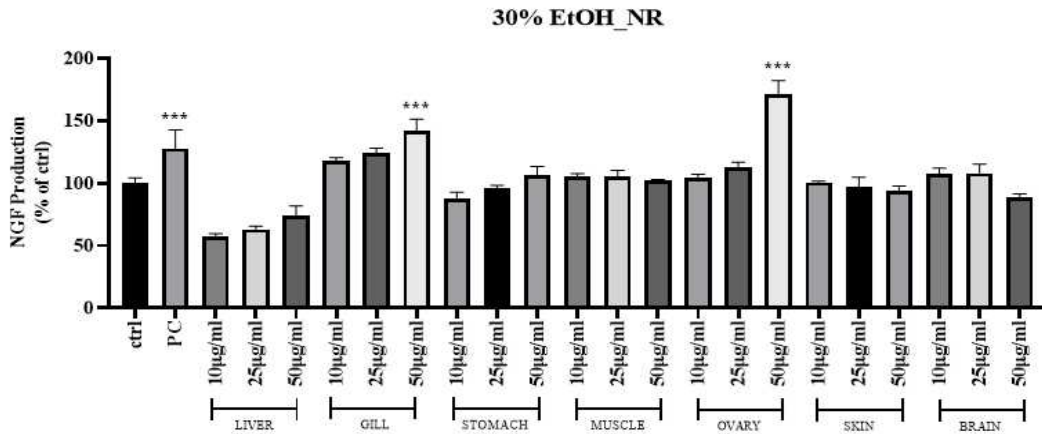
$P < 0.0001$ vs. ctrl (control) group

[그림 19. CG 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 beta-amyloid 독성 보호능 평가]

각 추출물들의 A β 독성에 대한 보호 효능을 나타내지 않았음.

마. Astrocytes (C6 glioma) 유래 세포에서의 Nerve Growth Factor(NGF, 신경성장인자) 생성 및 세포 독성 평가

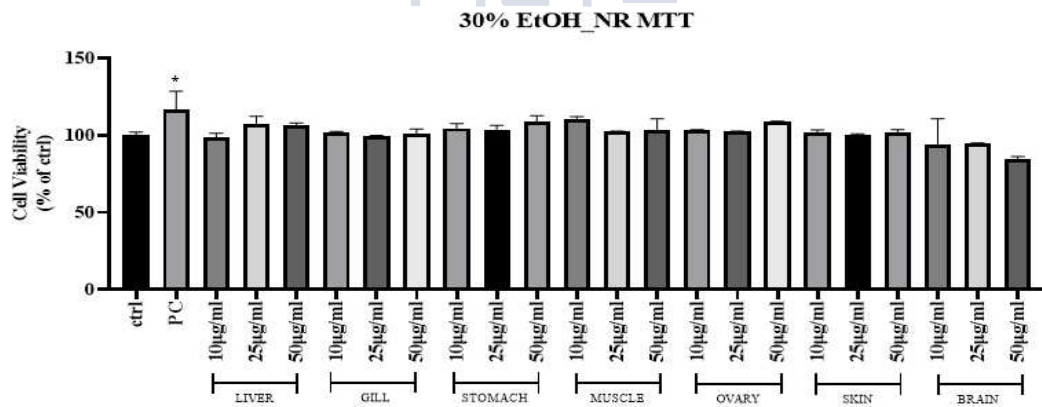
(1) 30% EtOH 추출물에 대한 NGF 생성 및 세포 독성 평가



*** $P < 0.001$ vs. ctrl (control) group
PC, 20 μ M 6-Shogaol

[그림 20. NR 유래 각 장기들의 30%EtOH 추출물에 대한 NGF 생성 효능 평가]

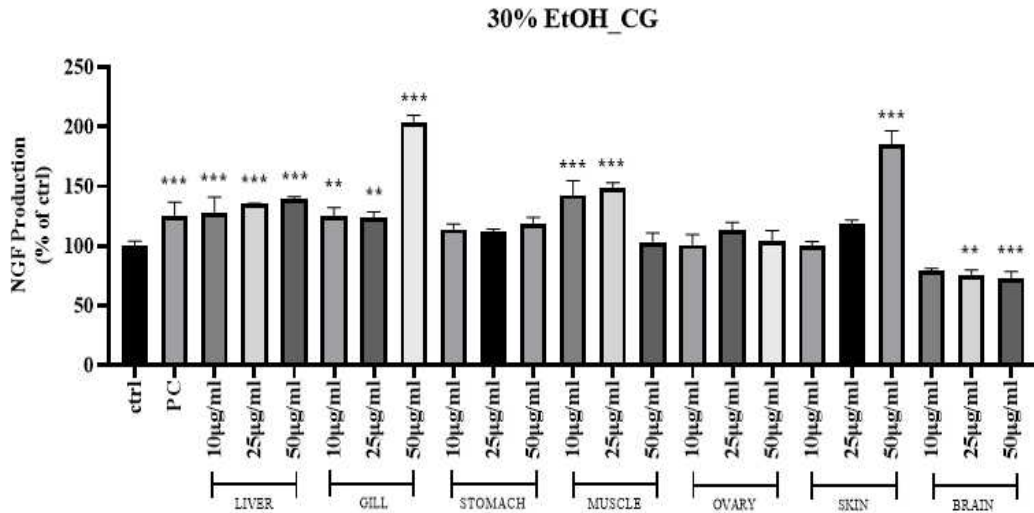
NR 어류 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물 중 아가미(Gill), 난소(Ovary)의 NGF 분비 효과가 우수한 것으로 확인되었음.



* $P < 0.05$ vs. ctrl (control) group
PC, 20 μ M 6-Shogaol

[그림 21. NR 유래 각 장기들의 30%EtOH 추출물에 대한 세포독성에 미치는 영향]

NR 어류유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물 중 뇌(Brain) 추출물은 유의성은 없으나 농도의존적으로 세포독성을 나타냄.

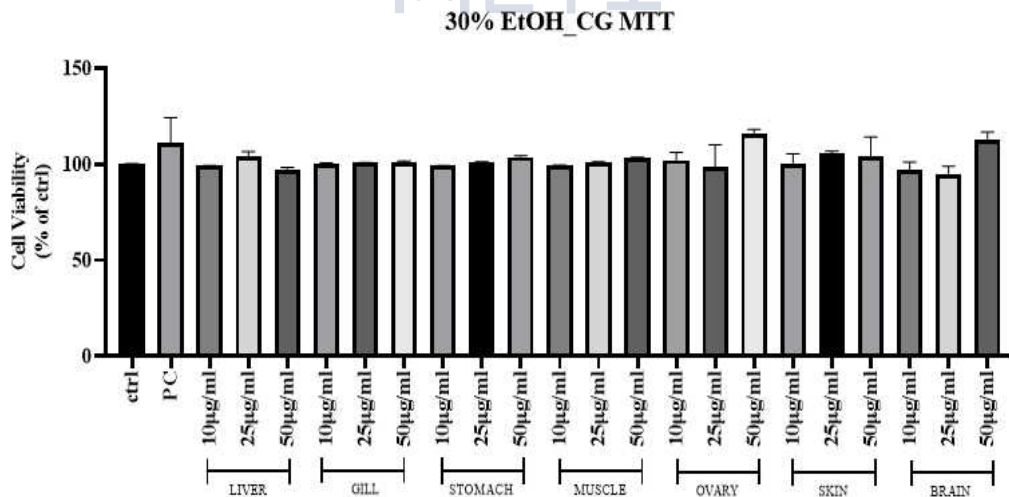


**** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. ctrl (control) group**

PC, 20 μ M 6-Shogaol

[그림 22. CG 유래 각 장기들의 30%EtOH 추출물에 대한 NGF 생성에 미치는 영향]

CG 어류 유래 각 조직들의 30% EtOH 추출물 중 간(Liver), 아가미(Gill), 근육(Muscle), 피부(Skin)들이 NGF생성 효과가 우수한 것으로 확인되었음. 그 중에서 아가미(Gill)와 피부(Skin) 추출물이 NGF분비능이 매우 탁월한 것으로 나타났음.

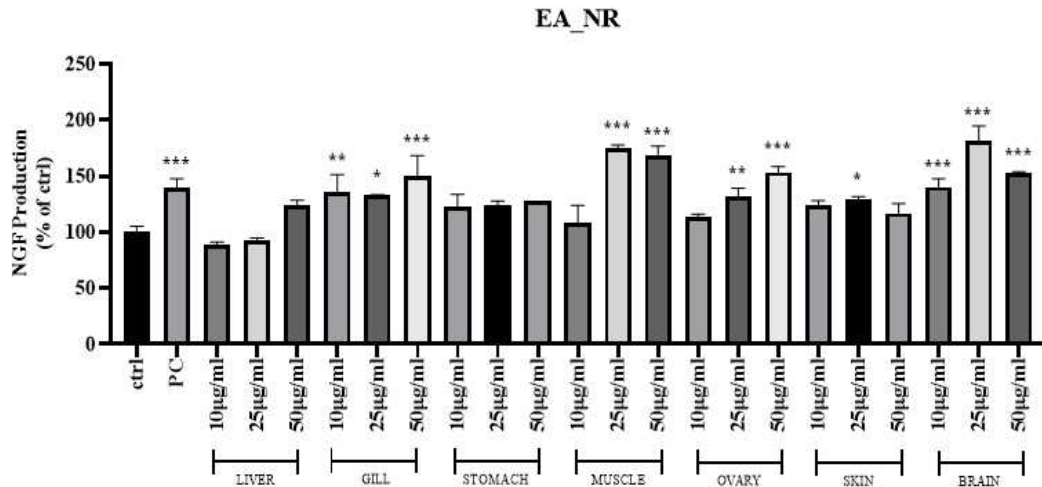


PC, 20 μ M 6-Shogaol

[그림 23. CG 유래 각 장기들의 30%EtOH 추출물에 대한 세포독성에 미치는 영향]

CG 어류 유래 각 조직들의 30% EtOH 추출물은 뇌세포 독성이 없는 것으로 확인되었음.

(2) EA 추출물에 대한 NGF 생성 및 세포 독성 평가

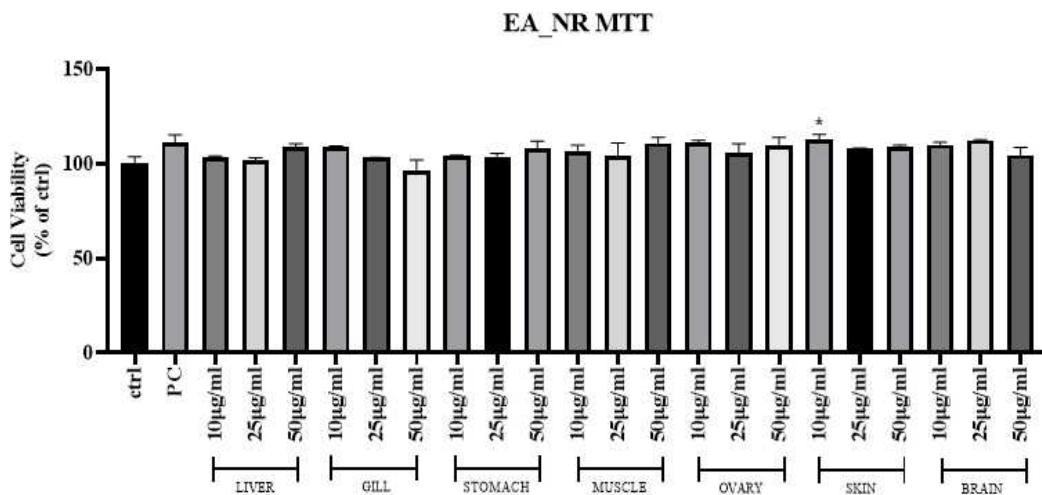


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. ctrl (control) group

PC, 20 μ M 6-Shogaol

[그림 24. NR 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 NGF 생성에 미치는 영향]

NR 어류유래 각 장기들의 EA 추출물 중 간(Liver), 아가미(Gill), 근육(Muscle), 난소(Ovary), 뇌(Brain) 추출물에서 효과가 우수한 것으로 나타났다. 그 중에서 근육(Muscle)과 뇌(Brain) 추출물들이 효과가 탁월하였음.

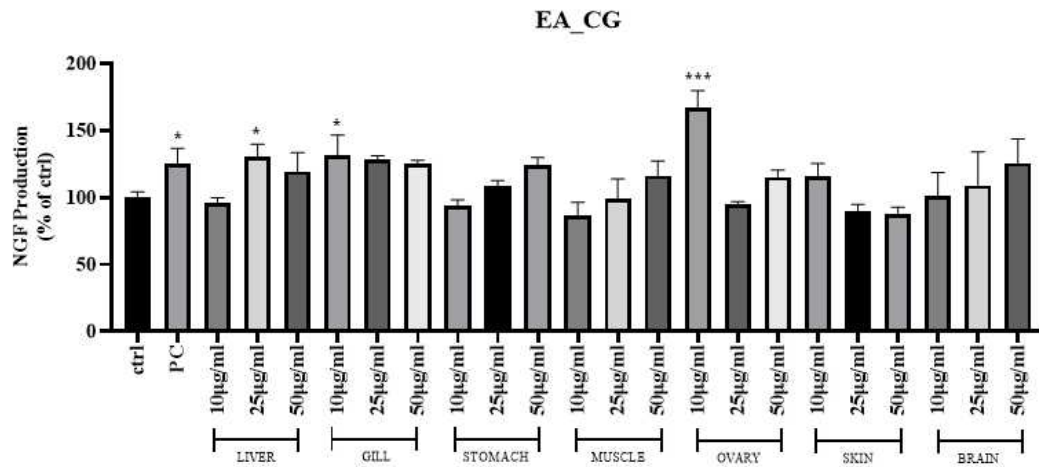


* $P < 0.05$ vs. ctrl (control) group

PC, 20 μ M 6-Shogaol

[그림 25. NR 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 뇌세포 독성 평가]

NR 어류 유래 각 장기들의 EA 추출물은 뇌세포 독성이 없는 것으로 나타났다.

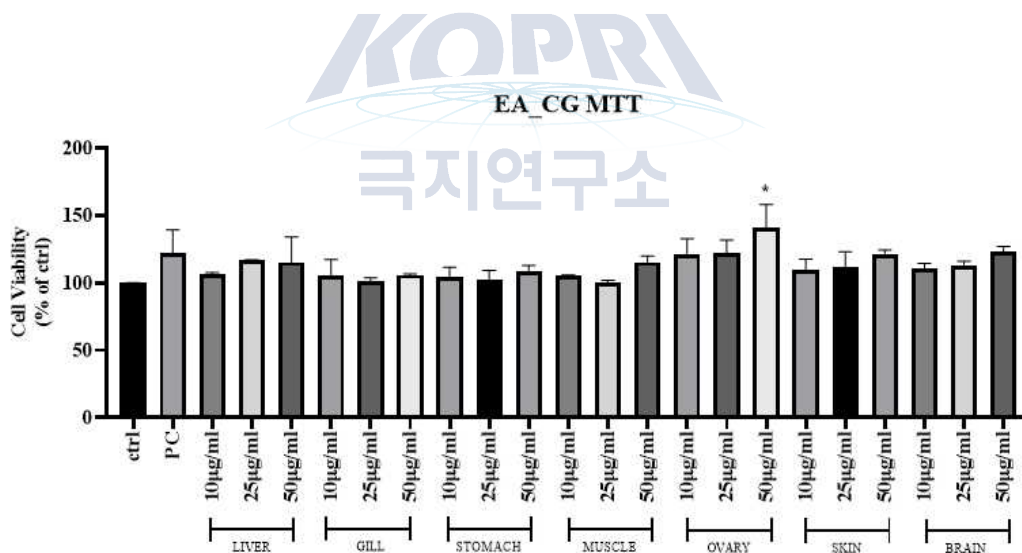


* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$: ctrl (control) group

PC, 20 μM 6-Shogaol

[그림 26. CG 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 NGF 생성에 미치는 영향]

CG 어류 유래 각 장기들의 EA 추출물 중 간(Liver), 아가미(Gill), 난소(Ovary) 추출물들이 NGF분비능이 우수하였음. 특히, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 난소 (Ovary) 추출물에서 매우 뛰어났음.



* $P < 0.05$: ctrl (control) group

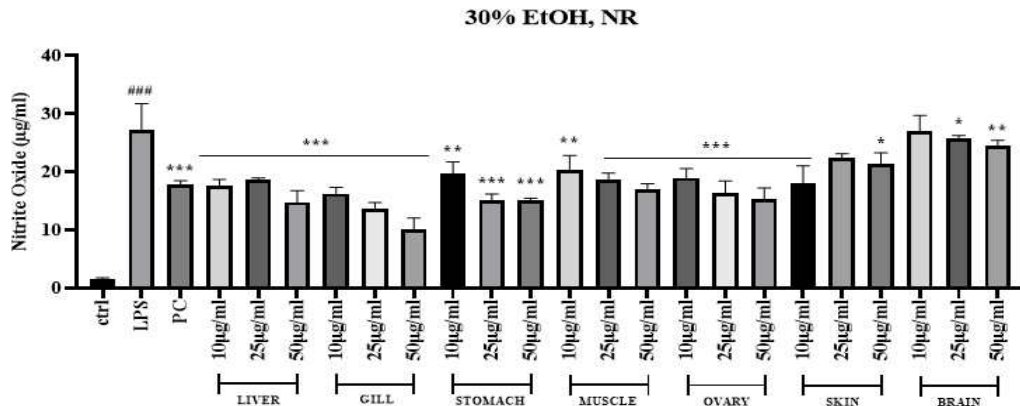
PC, 20 μM 6-Shogaol

[그림 27. CG 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 세포독성에 미치는 영향]

CG 어류 유래 각 장기들의 EA 추출물들은 세포독성이 없는 것으로 나타났음.

바. 미세아소교세포 (BV2 microglia)에서 Nitric Oxide (NO, 산화질소) 생성 억제능 및 세포 독성 평가

(1) 30% EtOH 추출물에 대한 NO 소거능 및 세포 독성 평가

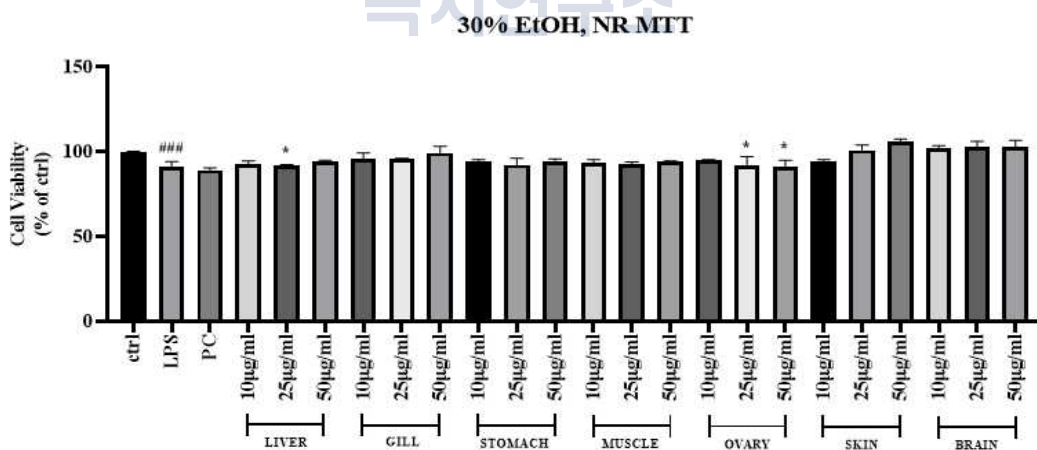


$P < 0.001$: ctrl v.s. LPS group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$: LPS v.s. sample group

[그림 28. NR 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물에 대한 NO생성 억제 효능 평가]

NR 어류 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물 중 아가미(Gill), 난소(Ovary), 간(Liver) 추출물들에서 NO 생성 억제능이 우수한 것으로 확인되었음.

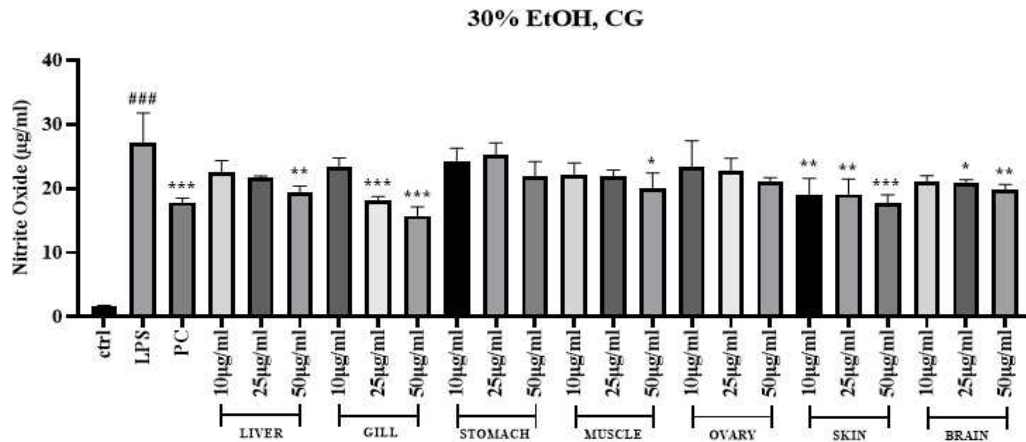


$P < 0.001$: ctrl v.s. LPS group

* $P < 0.05$: LPS v.s. sample group

[그림 29. NR 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물에 대한 세포독성에 미치는 영향]

NR 어류 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물 중 난소(Ovary), 간(Liver) 추출물들에서 LPS로 유도군 대비 유의적으로 세포보호능을 나타냈음.

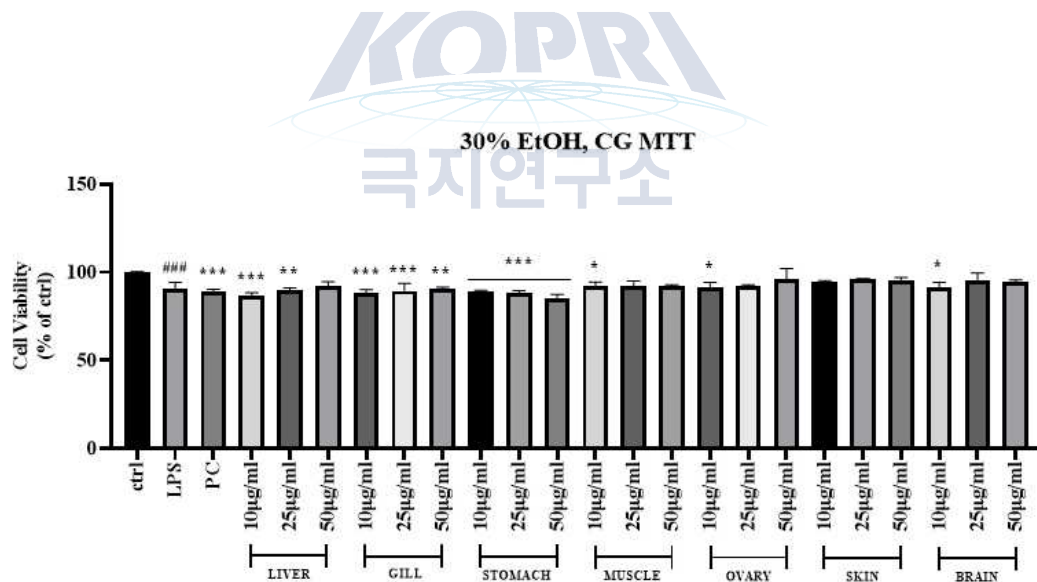


$P < 0.001$: ctrl v.s. LPS group

*** $P < 0.001$: LPS v.s. sample group

[그림 30. CG 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물에 대한 NO생성 억제 효능 평가]

CG 어류 유래 각 조직들의 30% EtOH 추출물 중 아가미(Gill), 피부(Skin), 뇌(Brain) 추출물들에서 NO 생성 억제능이 우수한 것으로 나타났음. 그 중 아가미(Gill)과 피부(Skin) 추출물들이 NO 억제능이 매우 탁월한 것으로 나타났음.



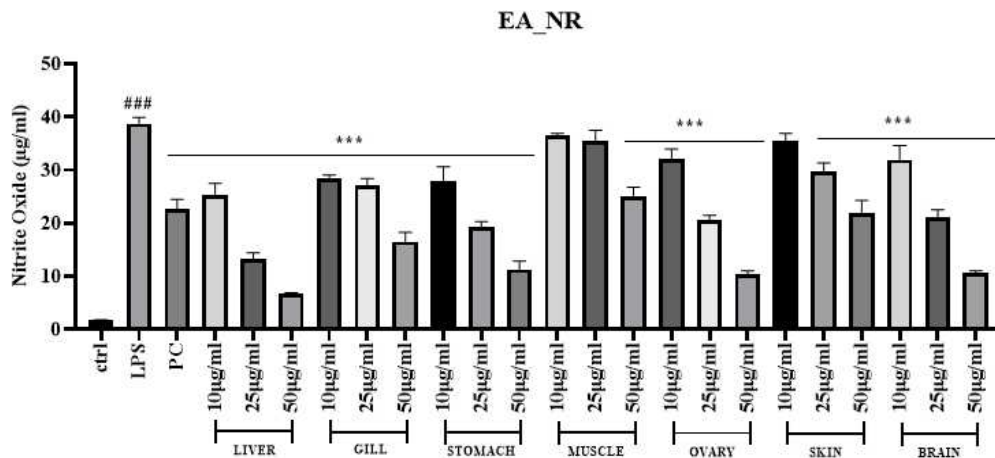
$P < 0.001$: ctrl v.s. LPS group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$: LPS v.s. sample group

[그림 31. CG 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물에 대한 세포독성에 미치는 영향]

CG 어류 유래 각 장기들의 30% EtOH 추출물은 뇌세포 독성이 없는 것으로 확인되었음. 특히, 간(Liver), 아가미(Gill), 위(Stomach), 근육(Muscle), 난소(Ovary), 뇌(Brain) 추출물에서 세포보호능이 우수하였음.

(2) EA 추출물에 대한 NO 소거능 및 세포 독성 평가

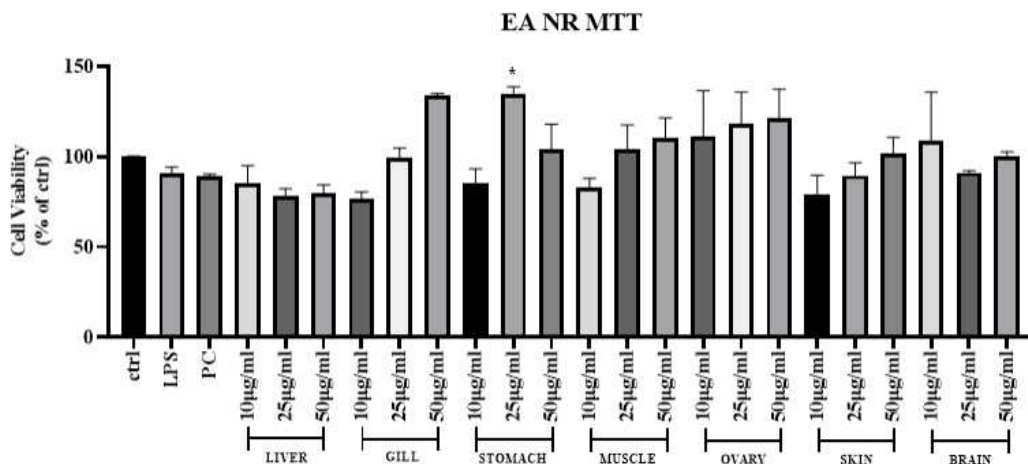


$P < 0.001$: ctrl v.s. LPS group

*** $P < 0.001$: LPS v.s. sample group

[그림 32. NR 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 NO생성 억제 효능 평가]

NR 어류 유래 각 장기들의 EA 추출물 중 간(Liver), 위(Stomach), 아가미(Gill) 추출물들에서 NO 생성 억제능이 우수한 것으로 나타났음. 그 중에서 간(Liver) 추출물의 효과가 탁월하였음.

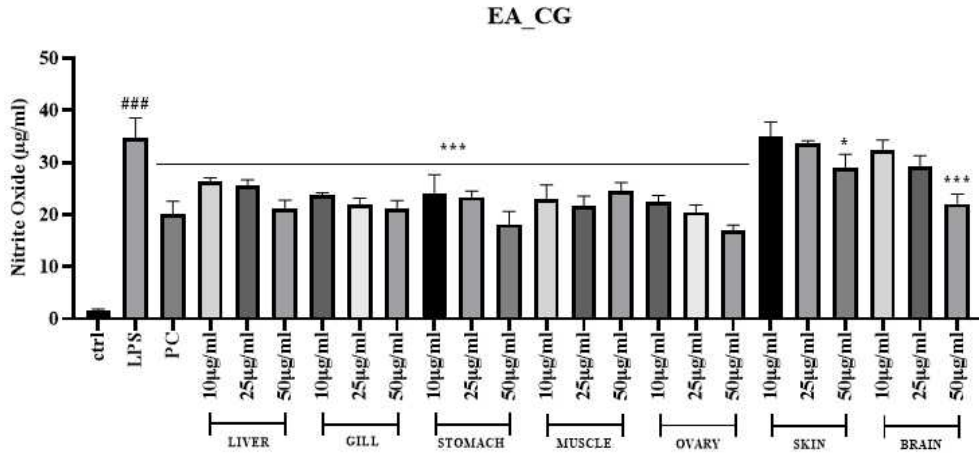


$P < 0.001$: ctrl v.s. LPS group

* $P < 0.05$: LPS v.s. sample group

[그림 33. NR 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 세포독성에 미치는 영향]

NR 어류 유래 각 장기들의 EA 추출물 중 아가미(Gill), 위(Stomach), 근육(Muscle), 난소(Ovary), 피부(Skin)에서 LPS로 유도군 대비 세포보호능이 우수함을 확인함.

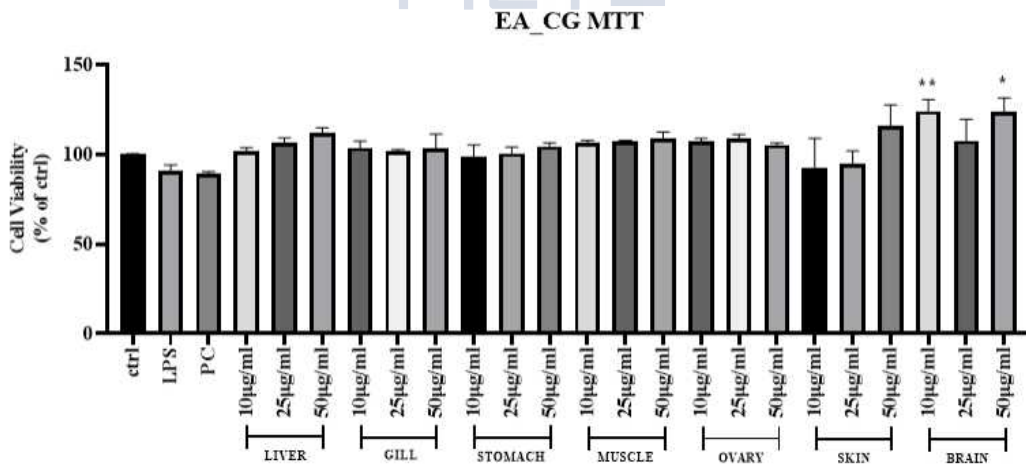


$P < 0.001$: ctrl v.s. LPS group

* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$: LPS v.s. sample group

[그림 34. CG 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 NO생성 억제 효능 평가]

CG 어류 유래 각 장기들의 EA 추출물 중 간(Liver), 아가미(Gill), 위(Stomach), 근육(Muscle), 난소(Ovary) 추출물들이 NO 생성 억제능이 우수함을 확인하였음. 그 중에서 난소(Ovary), 위(Stomach), 아가미(Gill)에서 탁월하게 효능이 우수하였음.



$P < 0.001$: ctrl v.s. LPS group

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$: LPS v.s. sample group

[그림 35. NR 유래 각 장기들의 ethyl acetate 추출물에 대한 세포독성에 미치는 영향]

CG 어류 유래 각 장기들의 EA 추출물들은 세포독성이 없는 것으로 나타났음. 특히, 피부(Skin), 뇌(Brain) 추출물에서 농도의존적으로 세포보호능을 나타내었음.

4. 1차년도 연구결과 소결

		 <i>Notothenia rossii</i>													
		Eye	1												
		Skin													
		Liver		1											
		Heart													
		Testis													
		Ovary					3								
		Intestine													
		Stomach							2						
		Brain													
		Gill								2					
		Muscle													
		Adipose tissue													
		Pyloric caeca													
MGO-Affinity	30% EtOH			1			3		2						
	Ethyl acetate			1			3			2					
MGO-AGEs formation	30% EtOH		1						2		3				
	Ethyl acetate		1								3	2			
MGO-AGEs breaker	30% EtOH														
	Ethyl acetate			2								1			
Neuroprotective effect (Beta amyloid)	30% EtOH			3			2					1			
	Ethyl acetate			3					2		1				
NGF	30% EtOH						1				2				
	Ethyl acetate						3			1		2			
NO inhibition	30% EtOH			3			2				1				
	Ethyl acetate			1					2	3					

		 <i>Champsoccephalus gunnari</i> (CG)													
		Eye	1												
		Skin													
		Liver													
		Heart													
		Testis													
		Ovary													
		Intestine													
		Stomach							3						
		Brain													
		Gill								2					
		Muscle													
		Adipose tissue													
		Pyloric caeca													
MGO-Affinity	30% EtOH		2	3					1						
	Ethyl acetate						1		2						
MGO-AGEs formation	30% EtOH		1						3		2				
	Ethyl acetate		1								2	3			
MGO-AGEs breaker	30% EtOH														
	Ethyl acetate		2						3		1				
Neuroprotective effect (Beta amyloid)	30% EtOH		2							1	3				
	Ethyl acetate														
NGF	30% EtOH		1								2	3			
	Ethyl acetate		3								2	1			
NO inhibition	30% EtOH		2							3	1				
	Ethyl acetate						1		2		3				

[그림 36. 극지 어류 2종 유래 우수활성 소재 선별]

1) *Notothenia rossii* : 1순위-Liver, 2순위-Gill, 3순위-Ovary

2) *Champsoccephalus gunnari* : 1순위-Skin, 2순위-Gill, 3순위-Stomach

본 연구의 1차년도 수행 결과를 종합해 볼 때, 극지 어류 2종의 각 조직별 추출물을 대상으로 당독소(Glycotoxin) 소거능, 형성 억제능 및 분해능(Breaking activity)을 비교 평가한 결과, 메틸글리옥살(MGO) 소거 및 최종당화산물(AGEs) 형성 억제 효능이 매우 탁월함을 확인함.

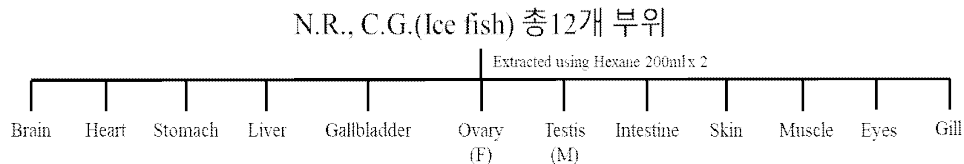
또한, 다양한 뇌 조직 유래 세포 모델에서 MGO 유발 독성에 대한 신경세포 보호능과 신경성장인자(NGF 등) 조절을 통한 신경 재생 효능을 검증하였으며, 이에 따른 유의적인 긍정적 효과를 규명함. 결론적으로, 그림 36과 같이 비교 분석된 소재 중 당독소 제어 및 뇌세포 보호 활성이 가장 우수한 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물을 최종 후보 소재로 선정함.

2절. 극지 어류 유래 항노화 소재로부터 생리활성물질 효능 검증 및 구조 구명

1. 극지 어류 유래 생리활성 물질 도출 (Untargeted metabolomics 분석을 통한 생리활성 물질 동정)

가. 기기분석을 통한 생리활성 물질 구조 동정

N.R.-*Notothenia rossii*(남극대구)
C.G.-*Champscephalus gunnari*(남극빙어)



[그림 37. 남극대구 및 빙어 유래 장기별 추출물 시료 리스트]

[표 1. 후보소재 리스트]

1	C.G. (남극빙어)	skin	30% EtOH
2		stomach	30% EtOH
3		gill	EtOAc
4	N.R. (남극대구)	skin	30% EtOH
5		stomach	30% EtOH
6		muscle	EtOAc
7		liver	EtOAc
8 (추가)	C.G. (남극빙어)	Brain	30% EtOH/ EtOAc

그림 37과 같이 남극대구 및 빙어에서 확보한 장기들 중에서 우수한 활성 및 양이 많은 후보 소재들을 선별 (표 1)하여 표 2의 조건으로 LC-MS 분석을 수행함. 분석결과, 각 시료들에서 특이한 UV 흡수패턴을 나타내지 않아 표적화합물 확인이 어려웠음.

이를 해결하기 위해 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피(Column Chromatography)를 추가적으로 수행함. 시료 확보량이 충분한 남극빙어(CG) 피부(Skin) 30% 에탄올 추출물 (30% EtOH) 및 아가미(Gill) 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물 및 남극대구(NR) 근육(Muscle) EtOAc 분획물을 대상으로 정제 과정을 거친 후, NMR 분석을 통해 구조를 구명함.

표 2 및 표 3과 동일한 조건으로 남극빙어 뇌 시료 분석을 진행함. 뇌 시료에 80% 메탄올(Methanol)을 가하여 혼합(Vortexing)한 후, -20℃에서 1시간 동안 반응시키고 14,000 × g로 10분간 원심분리(Centrifugation)함. 이후 상등액(Supernatant)을 취하여 감압 농축기(Speed-vac)로 건조함. 건조된 시료를 0.1% 포름산(Formic acid) 수용액으로 재용해(Reconstitution)하고, 0.22 μm 스핀 필터(Spin filter)로 여과(Filtering)한 후 LC-MS(Q Exactive with nano UHPLC system)를 이용하여 Positive mode로 분석을 수행함.

[표 2. LC-MS 조건]

Mobile phase
: A) 0.1% formic acid in water
B) 0.1% formic acid in MeCN

Gradient table

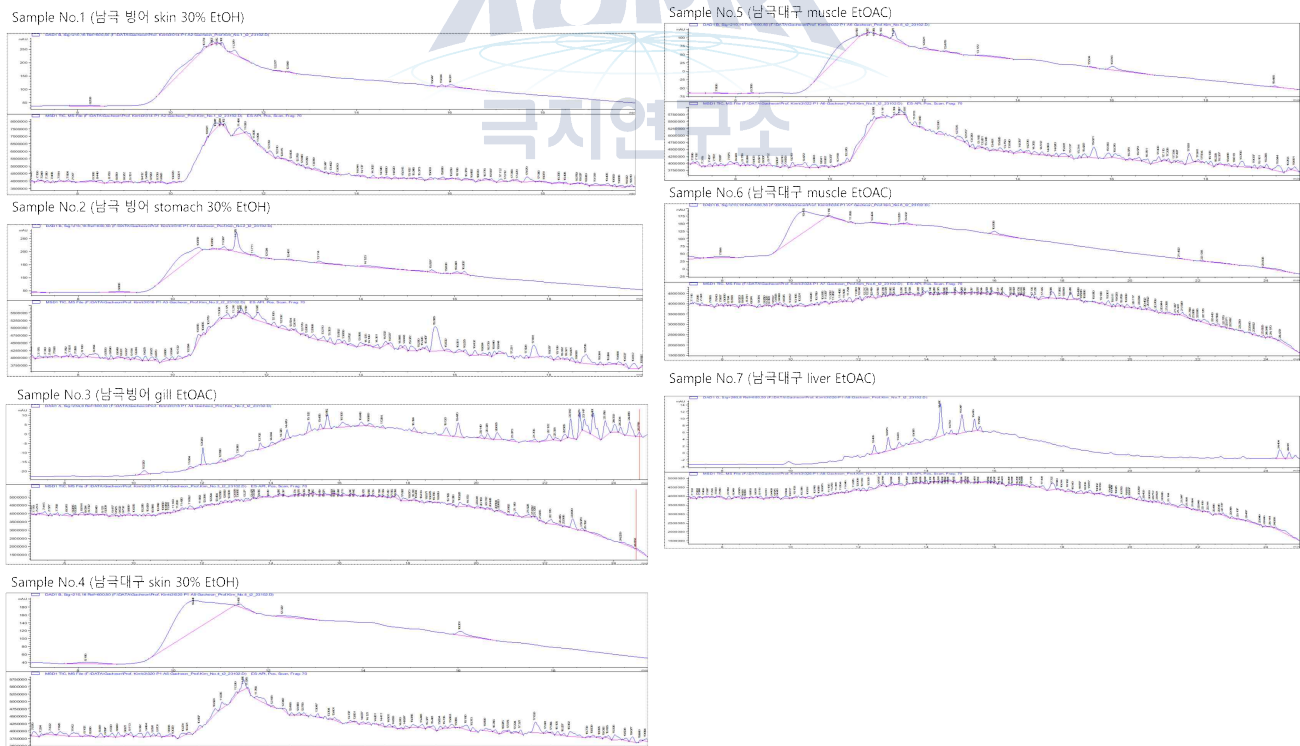
Time (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
3	10	90
20	0	100
25	0	100

Flow rate: 0.4 mL/min

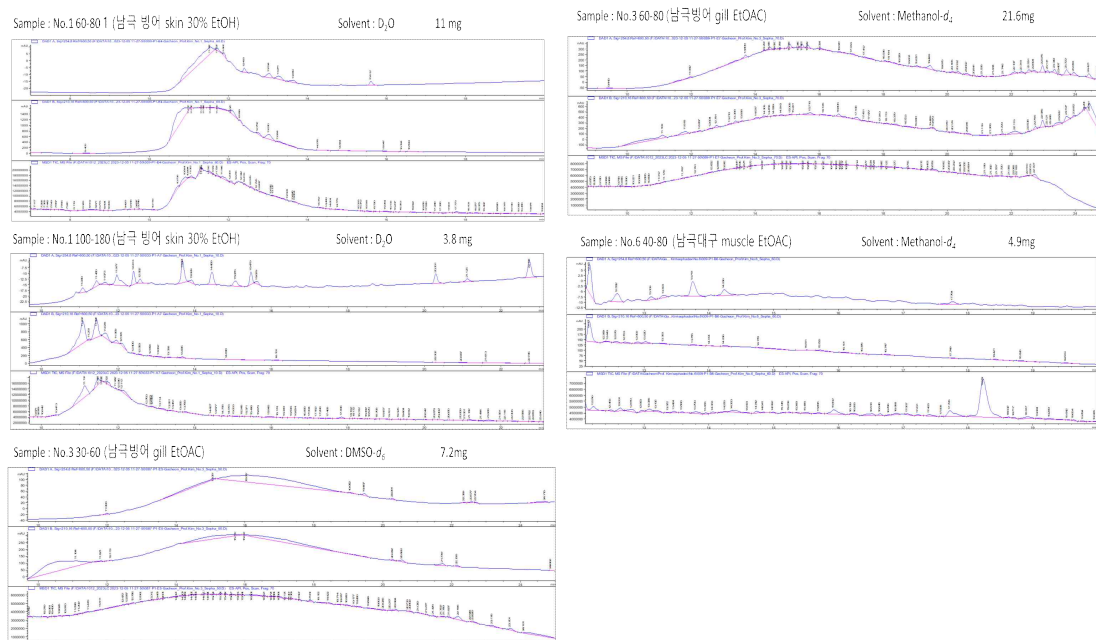
[표 3. nano UHPLC system 기반 대사체 분석조건]

Parameters	Conditions								
Trapping Column	PepMap™ 100 LC column C ₁₈ , 3 μm, 100Å, 75 μm x 2 cm								
Analytical Column	PepMap™ RSLC C ₁₈ , 2 μm, 100Å, 75 μm x 25 cm								
Mobile Phase	(A) : 0.1% formic acid (B) : 80% ACN, 0.1% formic acid								
Gradient	Time (min)	0	5	32	46	46.1	50	50.1	60
	Solvent B(%)	4	4	28	50	96	96	4	4
Column Flow Rate	400 nL/min								
Mass Range	100 ~ 1,000 m/z								

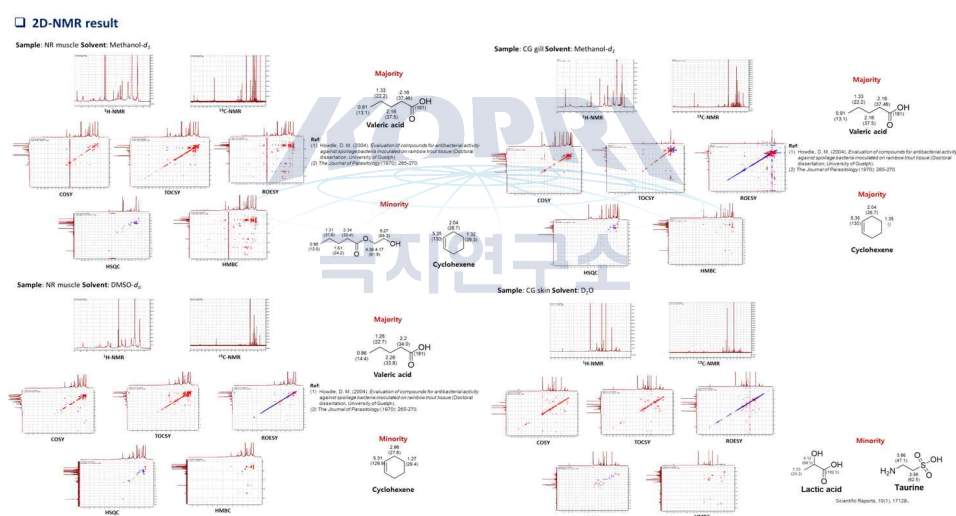
위 그림과 같이 남극대구 및 빙어에서 확보한 장기들 중에서 우수한 활성 및 양이 많은 후보 소재들을 선별 (표 1)하여 LC-MS 분석을 표2에 제시된 조건으로 분석을 진행하였음. 그 결과, 각 시료들에서는 특이한 UV 흡수패턴을 나타내지 않아 표적화합물 확인이 어려웠음. 따라서, 추가적으로 LH-20 size exclusion을 진행하여 분석하였음 (그림 38 및 39). 특히, 1차적으로 시료양이 가장 많은 소재 즉 남극빙어(CG) 피부(Skin) 30% EtOH 추출물, 아가미(Gill) EtOAc 분획물 및 남극대구(NR) 근육(Muscle) EtOAc 분획물을 대상으로 물질을 확보한 후, NMR 분석을 통해 구조를 동정함. 그 결과, 남극대구 (NR) 근육 부위에서 발레릭산(Valeric acid)이 확인되었으며, 남극빙어(CG) 피부에서 젖산(Lactic acid), 타우린(Taurine) 등의 기지 물질(Known compounds)이 확인됨.



[그림 38. 선별된 남극대구 및 빙어 시료추출물의 LC-MS chromatogram]



[그림 39. Sephadex 진행 후 분리된 남극대구 및 빙어 시료추출물의 LC-MS chromatogram]

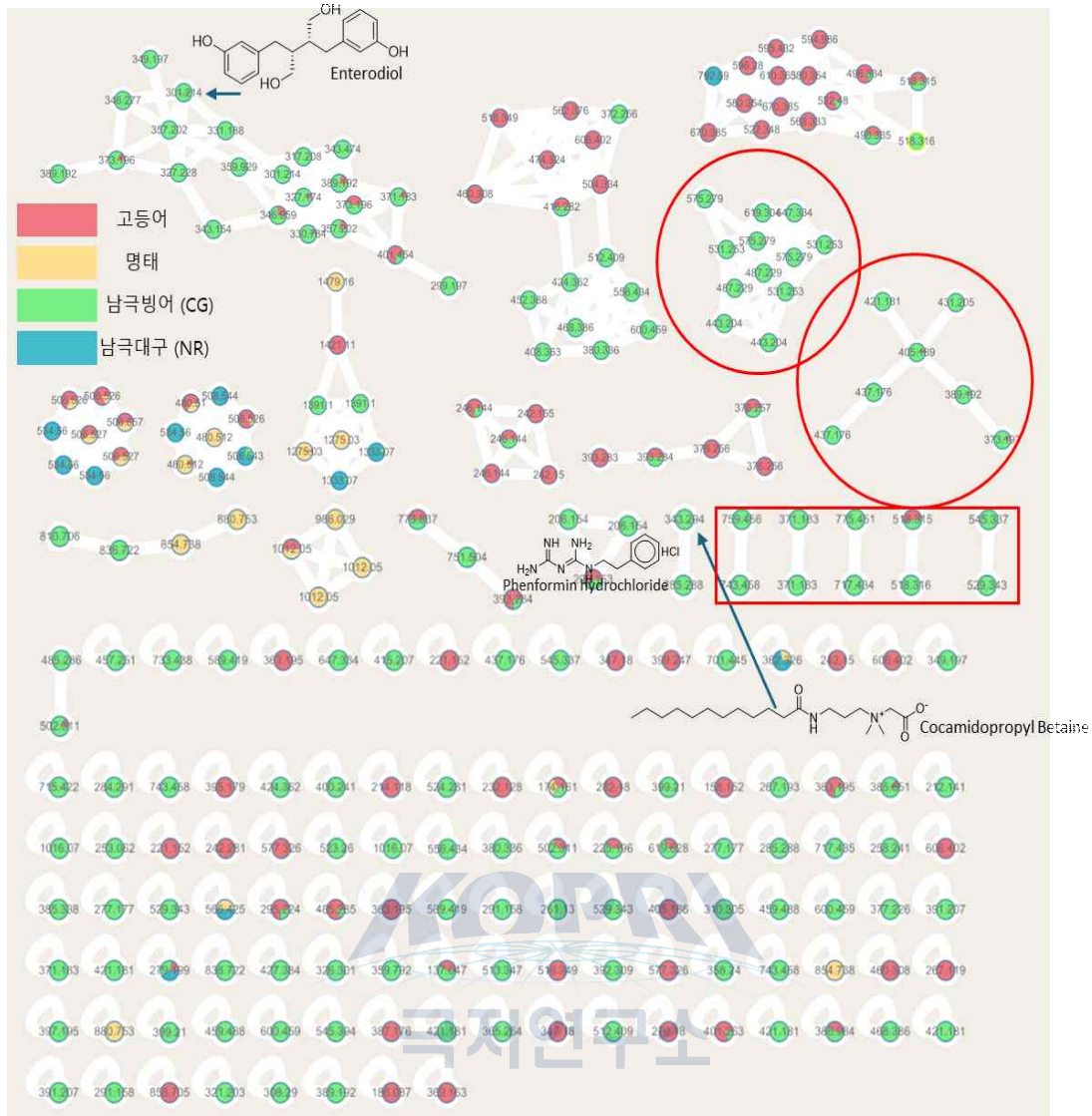


[그림 40. NMR 분석을 통한 물질동정]

비극지 어류(고등어, 명태)와 극지 어류(남극대구[NR], 남극빙어[CG]) 유래 생리활성 물질의 비교 분석을 위해 그림 41과 같이 분자 네트워크(Molecular Networking, GNPS) 분석을 수행함.

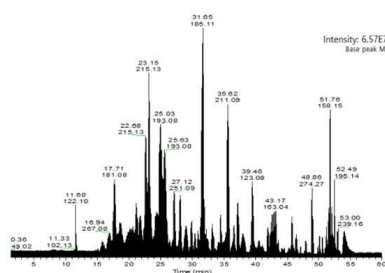
GNPS 분석 결과, CG(남극빙어)에서 마이오-이노시톨(Myo-inositol), 펜포르민 염산염(Phenformin hydrochloride), 코카미도프로필 베타인(Cocamidopropyl betaine) 등의 물질이 라이브러리와 일치하는 것으로 확인됨.

또한, 라이브러리에 등록되지 않은(Unannotated) 미지 물질 중, 남극빙어(CG)에서 특이적으로 검출된 물질 군(녹색 노드 클러스터)에 대한 분리 및 구조 규명이 필요함. 이는 본 분석이 표준 라이브러리(Standard library)에 기반하여 수행되었기에, 어류 유래 특이 대사체(Fish metabolites)에 대한 정보가 충분히 반영되지 않았을 가능성이 있음을 시사함.



[그림 41. Molecular networking (GNPS) 분석을 통한 극지 소재 유래 생리활성 후보물질 동정]

LC-MS/MS Chromatogram



[그림 42. nanoUPLC기반 대사체분석]

추가적으로 신경세포 보호 활성 및 신경성장인자 생성 촉진능이 우수한 남극빙어(CG) 뇌 조직 추출물을 대상으로 표 3의 조건에서 Nano UPLC 분석을 수행하여 총 421종의 대사체를 동정함. 동정된 물질에 대한 정밀 재검증을 수행하였으며, 선행 연구(Tsentlovich *et al.*, 2020)를 참고하여 류신(Leucine) 및 N-아세틸-L-류신(N-acetyl-L-leucine) 계열 물질의 존재를 확인함.

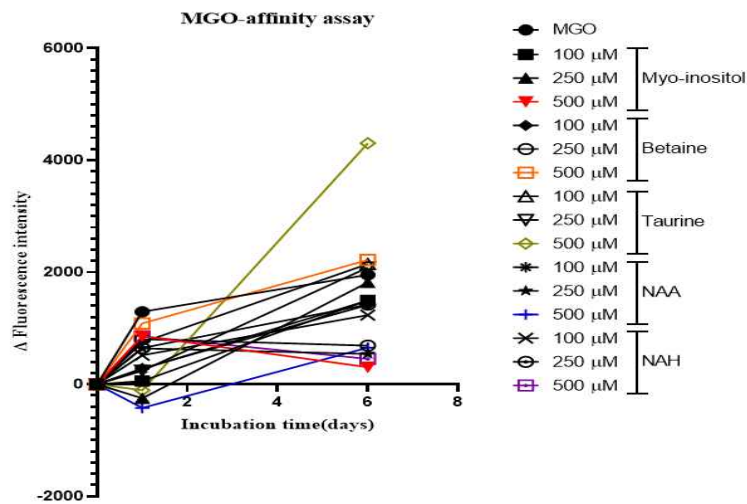
결론적으로, 상기 분석 시스템을 통해 후보 소재로부터 동정된 물질 중 상용 표준품(Standard) 확보가 가능한 핵심 물질 5종, 즉 타우린(Taurine), 마이오-이노시톨(Myo-inositol), 베타인(Betaine), N-아세틸-L-히스티딘(N-acetyl-L-histidine monohydrate, NAH) 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA)을 최종 선별함.

[표 4. nanoUPLC 분석을 통한 CG brain 소재 유래 대사체 확인]

Name	Name	Name	Annotation	MW	Calc. MW	m/z	RT [min]	Area: CG Brain
5(8)-(2-methylpropanoyl)5-hydroxyisamide	C12 H23 N O2 S2	-4.79	277.11702	277.1157	278.123	31.852	782781.6487	
1-(3-furyl)-1,4-pentanediol	C9 H14 O3	0	170.09429	170.0943	193.0835	25.024	2545996460	
1-O-hydroxyisocaproic acid	C9 H15 N O4	-0.27	201.10011	201.1001	202.1073	26.599	24525778.26	
Valeramide	C5 H11 N O	4.9	101.08406	101.0846	102.0919	17.5	26934556.43	
2,4,6-Octatriynoic acid	C8 H4 O2	-0.53	132.02113	132.0211	133.0283	20.628	11572537.5	
3-Oxocaproic acid	C5 H8 O3	2.68	116.04734	116.0477	117.0549	18.147	19478943.51	
α-Alanyl-4-Hydroxyproline	C9 H14 N2 O6	4.8	246.08519	246.0864	247.0936	29.789	13070397.77	
N-Acetyl-L-leucine	C8 H15 N O3	0.38	173.10519	173.1051	174.1126	22.925	9947786.161	
Alanyl-N-(6-amino-2-pyridinyl)-α-glutamine	C13 H19 N5 O4	-3.09	309.1437	309.1428	310.15	21.947	7163405.763	
1-Deoxyinositol	C6 H12 O5	-0.4	164.06847	164.0684	165.0757	34.34	4993470.672	
N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-leucine	C11 H21 N O4	1.55	231.14706	231.1474	232.1547	17.907	2636676.755	
Dipropylene glycol dimethyl ether	C8 H18 O3	0.06	162.12559	162.1256	185.1148	31.682	17493247.66	
Cyclohexanecarboxylic acid	C7 H12 O2	2.33	128.08373	128.084	111.0808	25.018	13146167.31	
3-Methylsuccinic acid	C9 H16 O4	-1.54	188.10486	188.1046	211.0938	35.637	836964960	
trans,trans-2,4-Hexadienal	C7 H10 O	1.41	110.07316	110.0733	111.0809	25.599	705004740	
(n-3-Hexenyl) Pyruvate	C9 H14 O3	-1.42	170.09429	170.0941	153.0908	35.608	51482347.9	
2,4-Octadienal	C8 H12 O	0.13	124.08881	124.0888	125.0961	25.056	490417071	
Diethyl succinate	C8 H14 O4	-1.75	174.08921	174.0889	197.0781	28.098	46193051.7	
1-(5-Hydroxy-4-methyltetrahydro-3-furyl)ethanone	C7 H12 O3	0.62	144.07864	144.0787	127.0757	20.265	42082966.34	
5-Hydroxy-4-(3-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-2-one	C12 H16 O5	1.17	240.09977	240.1001	263.0892	19.832	31260317.44	
Diethyl oxalopropionate	C9 H14 O5	1.41	202.08412	202.0844	185.0812	18.678	296741292.1	
(1S,3R,4S)-3,4-Dihydroxycyclohexanecarboxylic acid	C7 H12 O4	0.38	160.07356	160.0736	183.0628	21.651	267249386.7	
5,8,12-Trihydroxy-2-oxododecanoic acid	C12 H22 O6	-1.23	262.14164	262.1413	285.1305	34.519	26154672.18	
11-Nitro-1-undecene	C11 H21 N O2	0.06	199.15723	199.1572	200.1645	42.661	200097260.2	
2,4-Undecadien-1-ol	C11 H18 O	-0.59	166.13577	166.1357	167.1429	45.985	193289076.6	
6-(1-Hydroxyethyl)-3-(hydroxymethyl)-2,7-dioxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-5-one	C8 H10 O5	1.11	186.05282	186.053	209.0421	19.279	158077494	
3-((2Z)-1-Oxo-2-buten-2-yl)pentanedioic acid	C9 H12 O5	0.14	200.06847	200.0685	223.0577	23.669	121566234.7	
4-Oxododecanoic acid	C12 H20 O5	-1.59	244.13107	244.1307	267.1198	37.831	108248381.1	
1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-1,2-propanedione	C12 H14 O5	0.38	238.08412	238.0842	221.0811	25.152	100169068.8	
1,2,4-Butanetriol	C4 H10 O3	2.91	106.06299	106.0633	107.0706	31.636	99186198.69	
Vinyl(1R)-1-(1,4-dihydroxyphenyl)acrylate	C11 H10 O4	2.04	206.05791	206.0583	207.0657	24.484	98476754.52	
(1R,5R)-3,3,5-Trimethylcyclohex-5-ene-1,3-pentadiene	C14 H22 N O3	0.41	253.16779	253.1679	254.1753	47.957	79543288.57	
1-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1,2,3-propanetriol	C11 H16 O6	1.26	244.09469	244.095	262.1288	16.862	78828787.06	
Choline	C8 H16 O4	-2.7	176.10486	176.1044	199.0936	23.919	72849190.38	
5-(3,4-Dihydroxyphenyl)pentanoic acid	C11 H14 O4	-0.47	210.08921	210.0891	193.0861	29.269	70877811.7	
(E)-2-Decene-8,8,8-trimethyl-1-ol	C10 H18 O	1.25	144.05751	144.0577	145.065	16.966	42658731.97	
4-Carboxine	C11 H21 N O4	-1.51	231.14706	231.1467	232.154	27.384	26169507.3	
Isobutyramide	C9 H10 O4	3.61	182.05791	182.0586	183.0658	24.568	25676094.94	
Adrenaline	C9 H13 N O3	0.26	183.08954	183.0896	184.0968	32.696	24511529.36	
Hexamine	C6 H15 N	4.2	101.12045	101.1209	102.1282	11.334	24481465.27	
Undecylic acid	C11 H22 O2	-1.77	186.16198	186.1617	209.1509	46.701	24105442.78	
5-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)pentanoic acid	C11 H14 O5	-3.03	226.08412	226.0834	249.0725	31.725	23946235.23	
Morphenol	C14 H18 O3	0.27	234.12559	234.1257	235.1329	28.694	23116729.08	
N-Lauroglycine	C14 H27 N O3	1.26	257.19909	257.1994	258.2067	19.637	21480131.94	
(+)-Lactospermine	C8 H15 N O4	1.09	189.10011	189.1003	190.1076	19.359	17661760.76	
1-(4-Hydroxyphenyl)-1-decane-1,9-dione	C16 H30 O3	-1.63	260.14134	260.1408	261.1481	42.994	17076462.67	
(2Z)-2-(3-Hydroxycyclohexyl)pentanoic acid	C14 H18 O3	-1.1	234.12559	234.1253	235.1327	47.112	16527953.45	
4-Hydroxyphenylpyruvate	C9 H8 O4	3.36	180.04226	180.0429	181.0501	21.334	16159632.7	
1-Hexanecarboxylic acid	C13 H25 N O4	1.07	259.17836	259.1786	260.1859	16.671	15148149.85	
Thymine	C5 H8 N2 O2	1.13	126.04293	126.0431	127.0504	23.091	1429254.86	
Butyrylamine	C11 H19 N O4	-0.14	229.13141	229.1314	230.1386	40.268	14246472.39	
6-Hydroxy-5-methyl-4,11-dioxundecanoic acid	C12 H20 O5	-1.06	244.13107	244.1308	245.1381	32.739	13780138.29	
(1R)-1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-methyl-1-gentian-3-one	C13 H16 O3	-3.55	220.10994	220.1092	221.1164	28.091	13735511.47	
Hemidecanedioic acid	C11 H20 O4	-1.82	216.13616	216.1357	217.143	29.016	13439763.53	
2,3-Dihydroxy-2-methylbutanoic acid	C5 H10 O4	2.71	144.05791	144.0583	117.0555	21.707	13291689.45	
Triethanolamine	C6 H15 N	4.13	101.12045	101.1209	102.1281	11.218	13114764.92	
propionylcarbazone	C10 H19 N O4	0.11	217.13141	217.1314	218.1389	21.628	12877507.77	
α-Hydroxy-β-carboline	C14 H27 N O4	1.26	273.19401	273.1944	274.2016	21.103	12792670.74	
3-Hydroxyisocaproic acid	C9 H18 O3	-9.45	174.12559	174.125	197.1141	37.194	11821536.37	
Homocaproic acid	C9 H10 O4	0.02	182.05791	182.0579	165.0546	52.488	8178759.279	
ε-Carboxine	C11 H21 N O4	1.16	231.14706	231.1473	232.1546	16.469	7372423.091	
(2S)-2-Amino-8-oxododecanoic acid	C10 H19 N O3	-1.07	201.13649	201.1363	202.1436	30.189	7350067.099	
1-β-Hydroxytyrosine	C10 H12 N2 O4	1.46	224.07971	224.08	225.0873	29.301	7238374.538	
11-Aminoundecanoic acid	C11 H23 N O2	0.94	201.17288	201.1731	202.1803	19.819	7167644.956	
2-Hydroxytyrosine	C10 H23 N O4	0.5	257.16271	257.1628	258.1701	48.173	4073727.418	
3-Hydroxytyrosylcarbazone	C15 H29 N O5	0.72	303.20457	303.2048	304.2121	17.426	4070190.945	
Butyryl-L-homoserine lactone	C8 H13 N O3	0.09	171.08954	171.0896	172.0969	22.899	3427904.912	
β-Ethadul	C18 H34 O2	-3.7	272.17763	272.1766	273.1839	47.201	3050766.529	
Dodecanedioic acid	C12 H22 O4	-1.98	230.15181	230.1514	231.1586	35.835	2885843.997	
(1R,6R,8R,10R,12R,14R)-5,12,20,26-Pentahydroxy-6,8,10,14-isoctatetraenoic acid	C20 H32 O7	-2.95	384.2148	384.2137	385.221	29.233	2831404.928	
Decanethydranamic acid	C10 H21 N O2	-0.96	187.15723	187.1571	170.1538	31.945	2293915.79	
Esthene	C18 H22 O2	-1.73	270.16198	270.1615	271.1687	50.428	2030353.983	
5-(5-deoxy-β-D-ribof-5-yl)-L-homocysteine	C9 H17 N O6 S	2.33	267.07766	267.0783	134.5464	23.296	1991132.141	
(+)-Estrone	C18 H22 O2	0.42	270.16198	270.1621	271.1696	49.842	1655530.68	
Methylolpropanol	C10 H13 N O4	2.97	211.08446	211.0851	212.0924	23.4	1555670.774	
Pyridoxal	C8 H9 N O3	-1.66	167.05824	167.058	168.0653	30.688	1163071.76	
C12 Carboxine	C19 H37 N O4	0.11	343.27226	343.2723	344.2796	52.663	1148143.589	
3-Hydroxy-12,13-epoxytrichosteo-9-ene-4,15-diol diacetate	C19 H28 O7	-3.67	366.16785	366.1665	367.1738	18.674	621996.598	
(2Z)-N-(6-Amino-2-((Z)-1,2,3-dihydroxyphenyl)hydroxymethyl)amino-1-hydroxyethylidene)uracine	C16 H22 N3 O7	3.25	369.1536	369.1548	370.1623	17.261	608122.667	
3-Hydroxyestra-1,3,20-trien-1-one	C18 H26 O2	-0.24	270.16198	270.1619	271.1692	38.566	593089.8398	
2,2'-di-Phenyl-1H-1,2,4-triazole-3,5-diyldiphenol	C20 H15 N3 O2	4.1	329.11643	329.1178	330.1251	26.415	578331.3811	
6-((1Z)-1-Propen-1-yl)-2,3,4,5-tetrahydroquinoline	C8 H13 N	0.04	123.10418	123.1048	124.1121	38.418	466113.4768	
Benzocyclopentadiene	C10 H15 N3 O5	-3.34	257.10117	257.1002	258.1076	37.878	421419.8365	
(2S)-3-Phenyl-2-(((1R,4S,5R)-2,3,4-trihydroxy-5-hydroxymethyl)tetrahydro-2-furyl)methyl)amino)propanoic acid (non-preferred name)	C15 H21 N O7	-3.96	327.13118	327.1305	328.1378	33.957	395582.0989	
2',3a-Dimethylbenzylidene(1,3-dithio(4,5-dihydro-2,3'-bisan)-	C10 H16 O2	-1.89	232.05917	232.0587	233.066	22.926	388107.0174	
Cyclohexanediol	C15 H23 N O4	-0.33	281.16271	281.1626	282.1699	32.73	383828.0878	
(1R,5R)-24-Hydroxy-24-oxocyclohex-3-yl-β-D-glucopyranosiduronic acid	C30 H48 O9	-3.67	552.32983	552.3278	553.3351	52.243	382854.3504	
Lambdane	C6 H15 N4 O6 P	2.16	270.07292	270.0735	271.0808	29.888	376756.8552	
Ureidopropylamine	C7 H14 N2 O3	0.02	219.07728	219.0779	220.0851	27.707	369167.3735	
Glycyl-L-proline	C7 H12 N2 O3	0.02	172.08479	172.0848	173.0921	10.538	249242.4039	
((1R,2R)-2-((2Z)-5-β-D-glucopyranosyloxy)pent-2-en-1-yl)-3-oxocyclopentylacetic acid	C18 H28 O9	-1.74	388.17233	388.1727	389.1799	20.548	160505.9907	
7-Thiopyranosulfon	C14 H11 N O3	-3.45	241.07389	241.0731	242.0803	22.808	111502.2723	

2. 생리활성 물질의 당독소 물질 소거능 측정

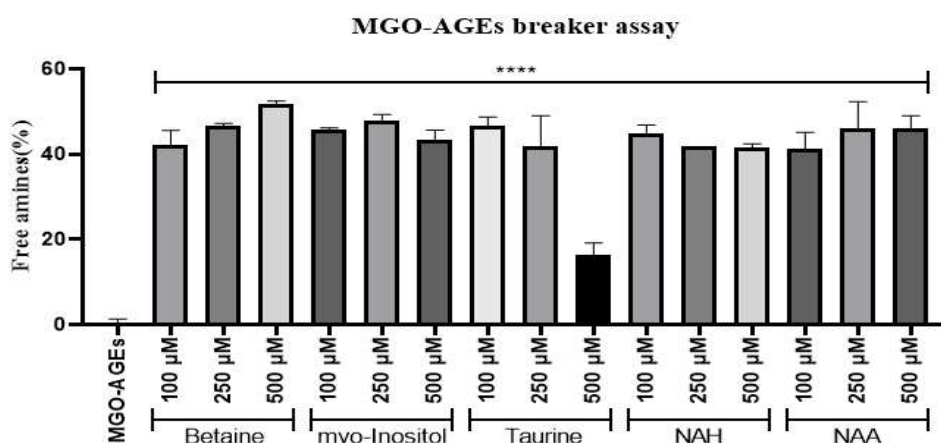
가. 선정된 극지 어류 유래 생리활성 물질의 MGO-affinity 평가



[그림 43. 극지 어류 유래 생리활성 물질에 대한 MGO affinity assay]

그림 43와 같이 메틸글리옥살(MGO)과의 화학적 반응성(Chemical reactivity) 정도를 확인하기 위해, 선별된 5종의 화합물을 다양한 농도로 반응시킨 후 형광 강도 변화량(Δ Fluorescence intensity) 측정을 통해 결합 친화도(Binding affinity)를 평가함. 분석 결과, 생리활성 물질 중 타우린(Taurine)이 MGO에 대해 가장 높은 친화도를 나타내어, 직접적인 MGO 소거 활성이 우수할 것으로 예측됨. 이에 대한 검증을 위해 반응 후 결합하지 않고 유리(Free) 상태로 잔존하는 MGO의 양을 HPLC 기기 분석을 통해 정량적으로 분석함.

나. 선정된 극지 어류 유래 생리활성 물질의 MGO 유래 최종당화산물 파쇄능 평가

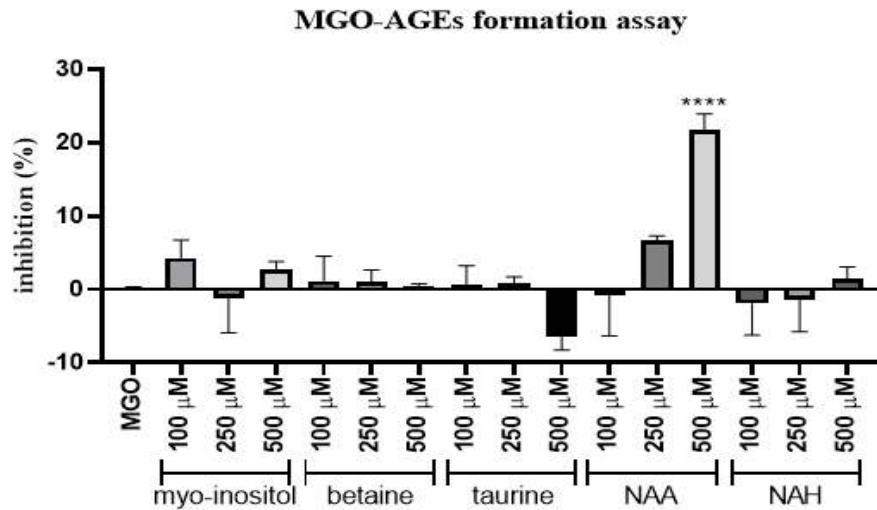


**** $P < 0.0001$ vs. MGO-AGEs

[그림 44. 극지 어류 유래 생리활성 물질에 대한 MGO-AGEs breaker assay]

생리활성 물질 5종 모두 유의적으로 MGO-AGEs의 파쇄능이 우수함. 특히, MGO-AGEs의 파쇄능은 베타인(Betaine)이 농도의존적으로 가장 우수한 활성을 나타냄.

다. 선정 한 극지 어류 유래 생리활성 물질의 MGO 유래 최종당화산물 형성 억제능 평가



**** $P < 0.0001$ vs. MGO-AGEs**

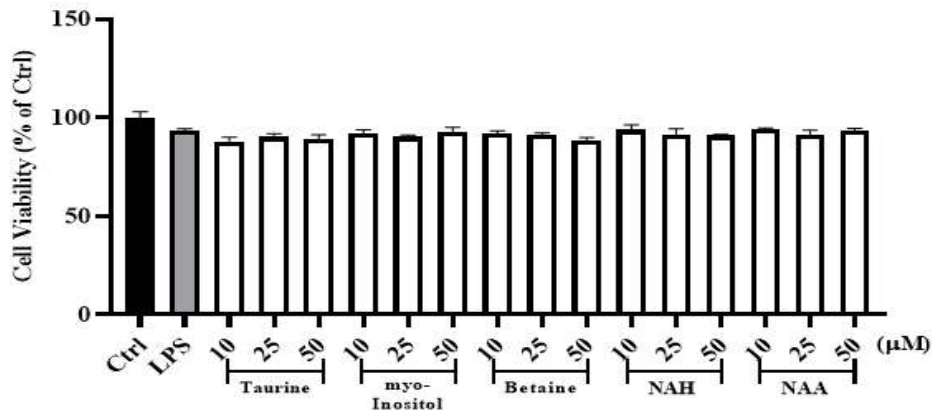
[그림 45. 극지 어류 유래 생리활성 물질에 대한 MGO-AGEs formation assay]

각 생리활성 물질류에 대한 MGO-AGEs의 파쇄능을 그림 45와 같이 확인하였음. 그 결과, 생리활성 물질 5종 모두 유의적으로 MGO-AGEs의 파쇄능이 우수함. 특히, MGO-AGEs의 파쇄능은 베타인(Betaine)이 농도의존적으로 가장 우수한 활성을 나타냄.



3. 뇌조직 유래 신경세포주에 생리활성 물질에 대한 효능 평가

가. Microglia (BV2) 유래 세포에서의 NO 및 IL-6 형성 억제를 통한 항신경염증 평가



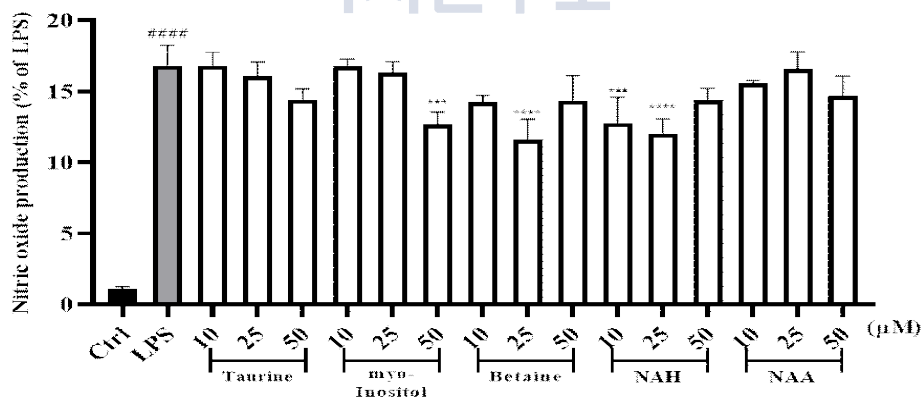
####P < 0.0001 vs. Ctrl

P < 0.001, *P < 0.0001 vs. LPS

PC, L-NMMA (25 μM)

[그림 46. 극지 어류 유래 생리활성 물질에 대한 NO 생성에 미치는 영향]

그림 46와 같이 LPS로 유도된 활성화된 microglia 세포주에 처리된 각 시료 처리군은 세포생존율이 유의적인 차이가 없음. 따라서, 각 시료는 세포독성이 없는 것을 확인함.



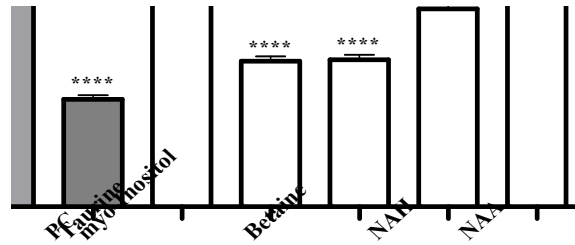
####P < 0.0001 vs. Ctrl

P < 0.001, *P < 0.0001 vs. LPS

PC, L-NMMA (25 μM)

[그림 47. 극지 어류 유래 생리활성 물질에 대한 NO 생성에 미치는 영향]

LPS로 유도된 BV2 세포주에서 각 생리활성 물질들의 처리에 따른 NO 생성 억제능을 그림47과 같이 확인하였음. 그 결과, 마이오-이노시톨(Myo-inositol), 베타인(Betaine), N-아세틸-L-히스티딘(N-acetyl-L-histidine monohydrate, NAH)에서 유의적으로 NO생성을 억제하였음.



####P < 0.0001 vs. Ctrl

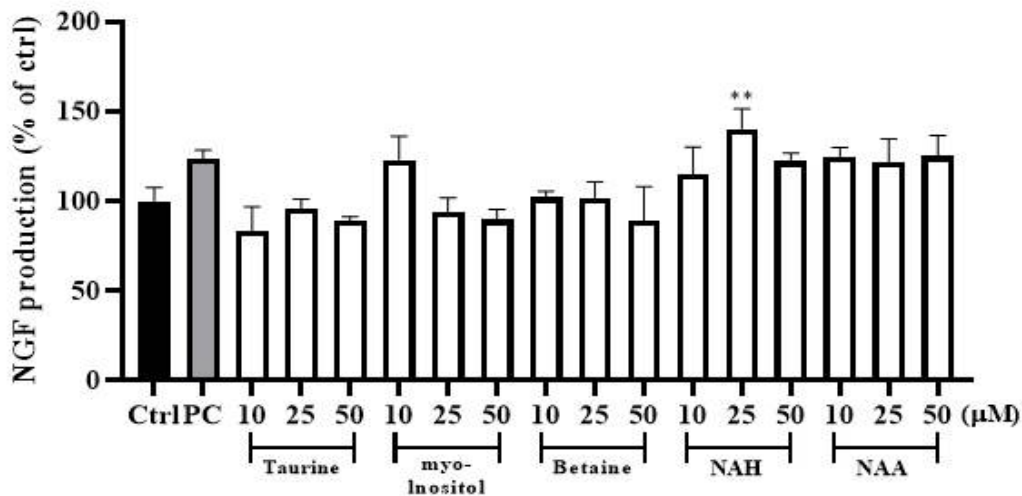
P < 0.01, **P < 0.0001 vs. LPS

PC, L-NMMA (25 μ M)

[그림 48. 극지 어류 유래 생리활성 물질에 대한 IL-6 생성에 미치는 영향]

LPS로 유도된 BV2 세포주에서 각 생리 활성 물질들의 처리에 따른 IL-6 생성 억제능을 그림48과 같이 확인하였음. 그 결과, 마이오-이노시톨(Myo-inositol), 베타인(Betaine), N-아세틸-L-히스티딘(N-acetyl-L-histidine monohydrate, NAH) 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 모두 LPS 유도군에 비하여 유의적으로 염증성 사이토카인인 IL-6 생성을 억제시킴을 확인할 수 있었음.

나. 뇌의 정상세포에서의 NGF 생성 및 세포 독성 평가

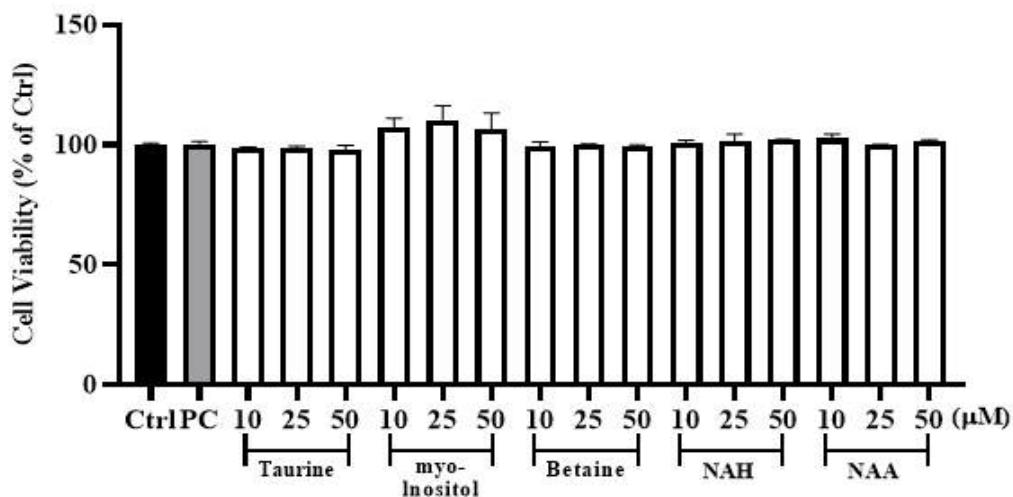


** $P < 0.01$ vs. Ctrl

PC, 6-Shogaol (25 μM)

[그림 49. Astrocyte C6 세포주에서 극지 어류 유래 생리활성 물질 처리에 따른 NGF 수준 확인]

그림 49과 같이 가 화합물 5종 중에서 N-아세틸-L-히스티딘(N-acetyl-L-histidine monohydrate, NAH)가 신경영양인자인 NGF 수준을 양성대조군 (PC)인 6-shogaol 만큼 유의적으로 증대시켰고, 10 μg/ml의 마이오-이노시톨(Myo-inositol) 처리군에서도 유의적이지는 않으나 NGF 분비를 증가시키는 것을 확인함.

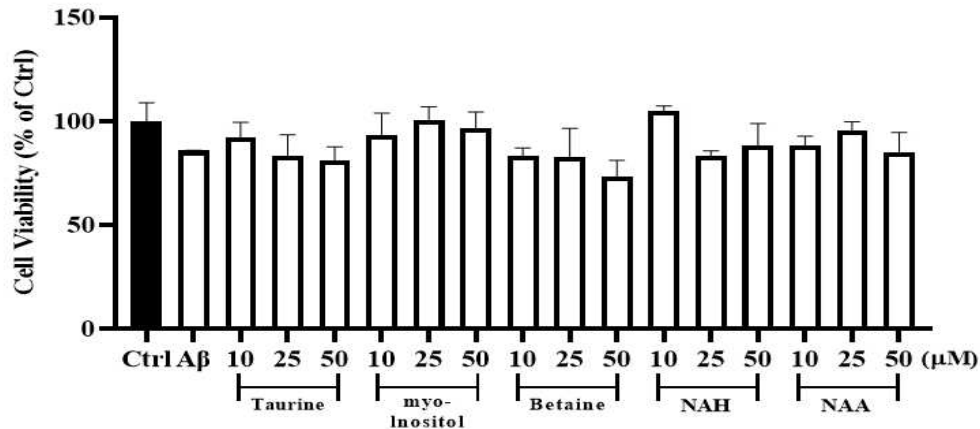


PC, 6-Shogaol (20 μM)

[그림 50. Astrocyte C6 세포주에서 극지 어류 유래 생리활성 물질 처리에 따른 세포생존률]

신경영양인자를 분비하는 정상세포에서 각 시료들은 세포독성이 없는 것으로 확인됨.

다. Beta-amyloid (A β) 처리로 유도된 신경세포사에 대한 세포보호능 확인



[그림 51. A β 로 유도된 인간유래 SH-SY5Y 신경세포주에서의 신경세포보호능]

인지 저하 관련 인자인 A β 로 유도한 신경세포주에 각 시료를 처리한 후 세포생존율을 확인함 (그림 51). 그 결과, N-아세틸-L-히스티딘(N-acetyl-L-histidine monohydrate, NAH)와 마이오-이노시톨(Myo-inositol)이 유의적이지 않으나 신경 세포 보호능을 나타냄.

5. 2차년도 연구결과 소결

극지 어류 유래 소재로부터 타우린(Taurine), 마이오-이노시톨(Myo-inositol), 베타인(Betaine) 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 등의 저분자 대사체 구조가 구명(Identification)되었으며, 이들 화합물은 MGO-AGEs 파쇄능 및 형성 억제능에서 전반적으로 우수한 특성을 나타내었음. 또한, 뇌 조직 유래 세포모델에서 신경염증 및 신경독성에 대한 보호 반응과 신경성장인자(NGF 등) 관련 지표의 긍정적인 변화가 확인됨.

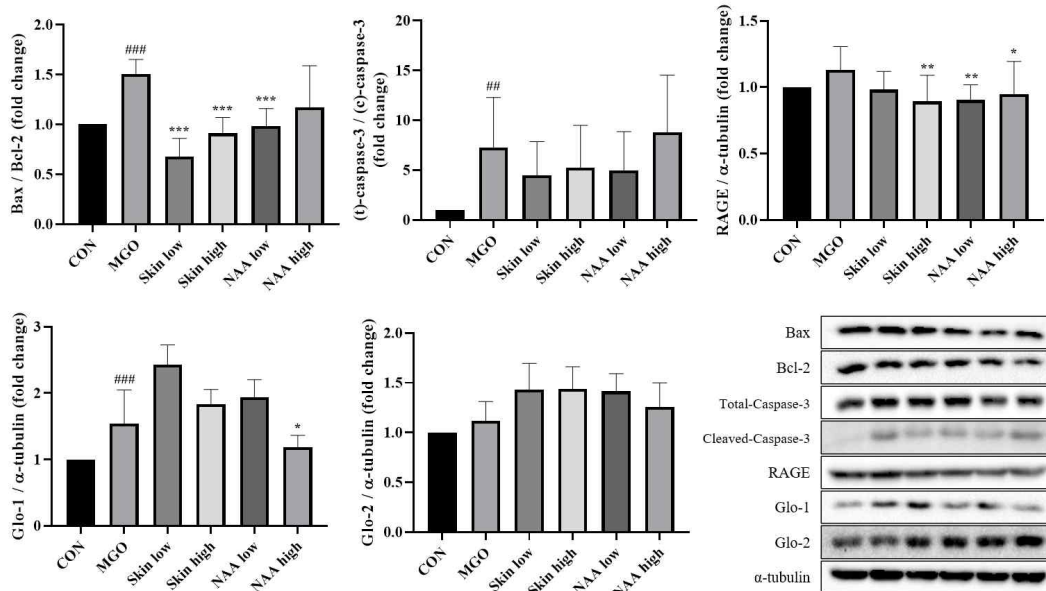
1차년도 세포 기반 연구 결과를 바탕으로 2차년도에는 동물 실험 적용이 가능한 후보 소재 선별을 수행하였음. 남극빙어(CG) 피부(Skin)추출물은 추출 용매 조건에 따라 성분 조성 및 반응 양상이 상이하였으나, 이 중 30% 에탄올(EtOH)추출물은 수용성 대사체와 일부 지용성 성분을 함유하는 최적 조건으로 확인되었음. 또한, 해당 추출물은 대량 확보가 용이하고, 세포 실험에서 효능의 재현성이 우수하여 동물 실험 적용 시 데이터 신뢰도 확보 측면에서 가장 적합한 소재로 판단됨. 이에 따라, 2차년도 연구에서는 CG 피부 30% EtOH 추출물을 복합 성분 기반의 최종 후보 소재로 확정함.

한편, 구명 된 대사체 중 베타인(Betaine) 유도체 및 아세틸화 아미노산(Acetylated amino acid)계열은 당독소 표적 세포모델에서 일관된 반응을 보였으며, 이 중 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA)는 신경계 관련 세포모델에서 안정적인 보호 반응이 확인되어 단일 후보 물질로 선정하였음. 따라서, 2차년도 연구에서는 극지 어류 추출물 (30% EtOH CG Skin)과 단일 대사체 (N-acetyl-L-aspartic acid)를 선정하여 연구를 수행하였음.

3절. 뇌 조직 유래 세포 및 동물모델에서 최적 소재의 유효성 평가실험 설계 및 분석 방법

1. 뇌 조직 유래 세포 모델에서 최적 소재의 유효성 평가

가. N2a 세포 기반 MGO 유도 신경독성 모델에서 후보 소재의 유효성 평가



$P < 0.01$ and ### $P < 0.001$: ctrl v.s. MGO group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$: MGO v.s. sample group

[그림 52. MGO로 유도된 N2a 세포에서 후보 소재 처리에 따른 단백질 발현 변화]

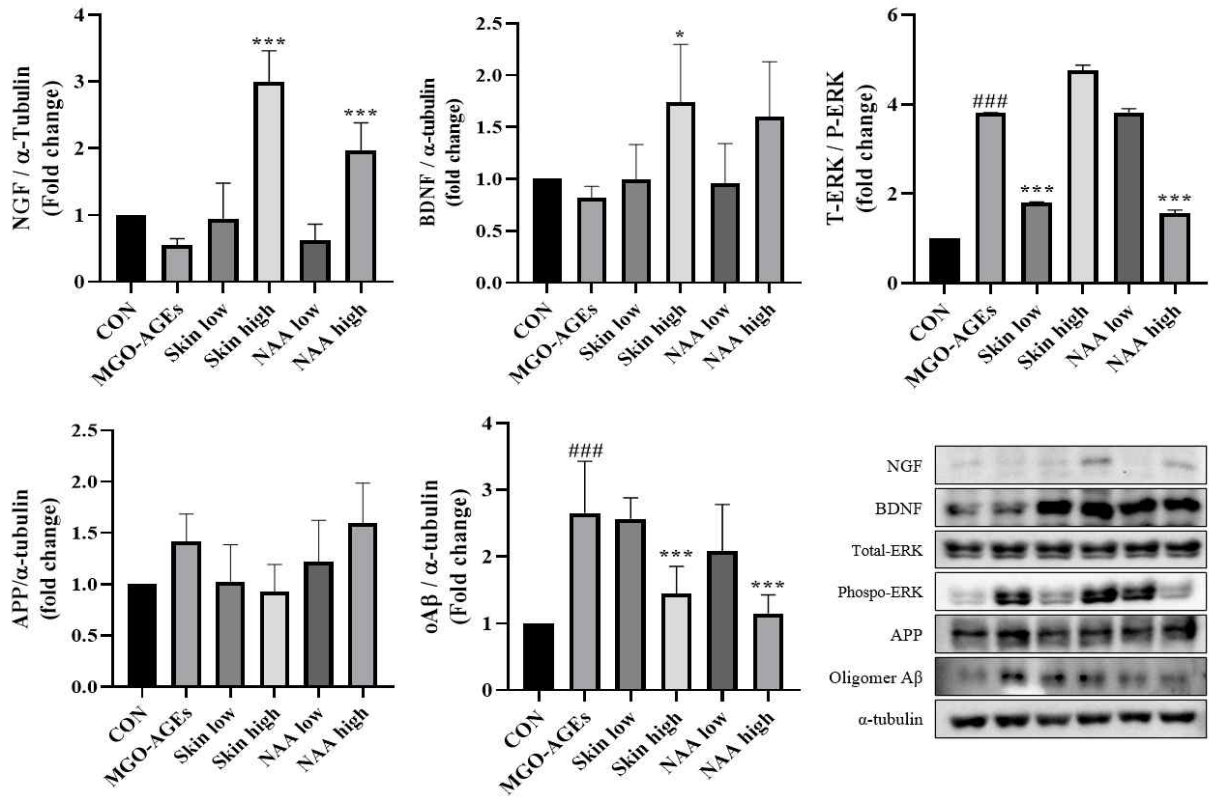
메틸글리옥살(MGO)에 따른 신경세포 독성 및 관련 기전 변화를 평가하기 위하여 마우스 신경모세포종 세포주(Neuro-2a, N2a)를 이용한 단백질 발현 분석(Western blotting)을 수행함. 주요 분석 대상으로는 세포 사멸(Apoptosis), 당독소 수용체 신호 및 해독 효소 관련 인자를 선정함.

분석 결과, MGO 처리군에서 Bax/Bcl-2 비율 및 활성형 카스파제-3(Cleaved Caspase-3)의 발현이 관찰되어, MGO에 의한 세포 사멸 신호 활성화를 확인함. 반면, 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA)처리군에서는 MGO 처리군 대비 해당 사멸 인자들의 발현이 현저히 감소하여, 소재 처리에 의한 신경세포 보호 효능을 검증함.

최종당화산물 수용체(Receptor for Advanced Glycation End products, RAGE) 분석 결과, CG 피부 추출물 및 NAA 처리군에서는 RAGE 발현이 감소하거나 대조군 수준에 근접하는 경향이 확인되었음. 또한, MGO 처리에 의해 정상군(Control) 수준으로 회복됨을 확인함. 또한, 당독소 해독 효소인 글리옥살레이즈-1(Glyoxalase-1, Glo-1)의 경우 소재 처리에 의해 발현량이 회복되는 양상을 보였으나, 글리옥살레이즈-2(Glo-2)의 발현은 실험군 간 유의적인 차이가 관찰되지 않음.

결론적으로, CG 피부 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA)은 N2a 세포에서 MGO에 의해 유도된 RAGE 과발현을 억제하고 세포 사멸 기전(Apoptosis pathway)을 차단함으로써 신경 보호 활성을 나타냄을 최종 검증함.

나. SH-SY5Y 세포 기반 MGO-AGEs 유도 신경독성 모델에서 후보소재의 유효성 평가



$P < 0.001$: ctrl v.s. MGO-AGEs group
 $*P < 0.05$ and $***P < 0.001$: MGO-AGEs v.s. sample group

[그림 53. MGO-AGEs로 유도된 SH-SY5Y 세포에서 후보 소재 처리에 따른 단백질 발현 변화]

메틸글리옥살 유래 최종당화산물 (MGO-AGEs)로 신경독성이 유도된 SH-SY5Y 세포 모델에서 후보 소재의 신경보호 및 기능 조절 효능을 검증함. MGO 처리군에서는 신경성장인자(NGF) 및 뇌유래신경영양인자(BDNF)의 발현 감소와 함께, 세포의 신호조절 키나아제(ERK) 신호의 과도한 활성화 및 올리고머 아밀로이드 베타 (Oligomeric Amyloid β , oA β)의 축적이 관찰됨.

CG 피부 추출물 및 N-아세트-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 처리 시, NGF 및 BDNF 발현이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 고농도 처리군에서 유의한 발현 ($***P < 0.001$) 증가가 확인되었음. 또한, MGO 처리에 의해 과활성화된 인산화 ERK(p-ERK)의 비율은 소재 처리에 의해 정상 수준으로 유의적으로 감소함.

아울러 oA β 발현은 MGO-AGEs 처리군에서 증가하였으나, 후보 소재 처리군에서는 전반적으로 감소하는 경향을 보였음. 반면, 아밀로이드 전구체 단백질(Amyloid Precursor Protein, APP) 발현은 실험군 간 유의적인 차이가 관찰되지 않음. 이는 후보 소재가 APP 생성 단계가 아닌, oA β 의 응집 및 축적을 직접적으로 억제하는 기전에 작용함을 시사함.

이상의 결과를 통해, 후보 소재가 신경성장인자 생성을 촉진하고 ERK 신호 전달 경로를 정상화하며, 아밀로이드 베타 기인 신경독성을 완화하는 복합적인 신경보호 기전을 가짐을 확인할 수 있었음.

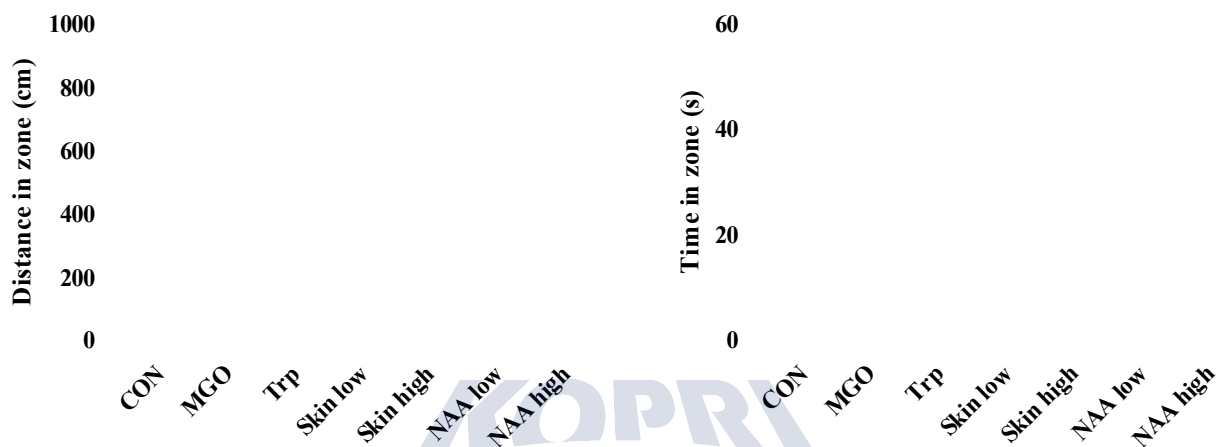
2. 당독소물질 유도 동물 모델에서의 극지 어류 물질의 평가

가. 동물 디자인

7주령의 male ICR mice를 Orientbio, Korea로부터 구입하여, 1주일간 일반 배합 사료와 물을 충분히 공급하면서 이상적인 항온항습 환경 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 5\%$)으로 유지하고 12시간씩 밤과 낮을 자동 조절하여 적응시켰음. 60 mg/kg MGO로 2주/16주간 유도하는 동시에 후보 소재를 경구투여하여 우울증 및 인지 기능에 개선시키는 확인하고자 하였음.

나. 극지 어류 추출물 투여 당독소 물질 유도 동물 모델에서의 행동 실험 결과

(1) Open field test



[그림 54. MGO 유도 동물모델에서 자발적 활동성 및 불안 행동 평가 결과 (Open Field Test)]

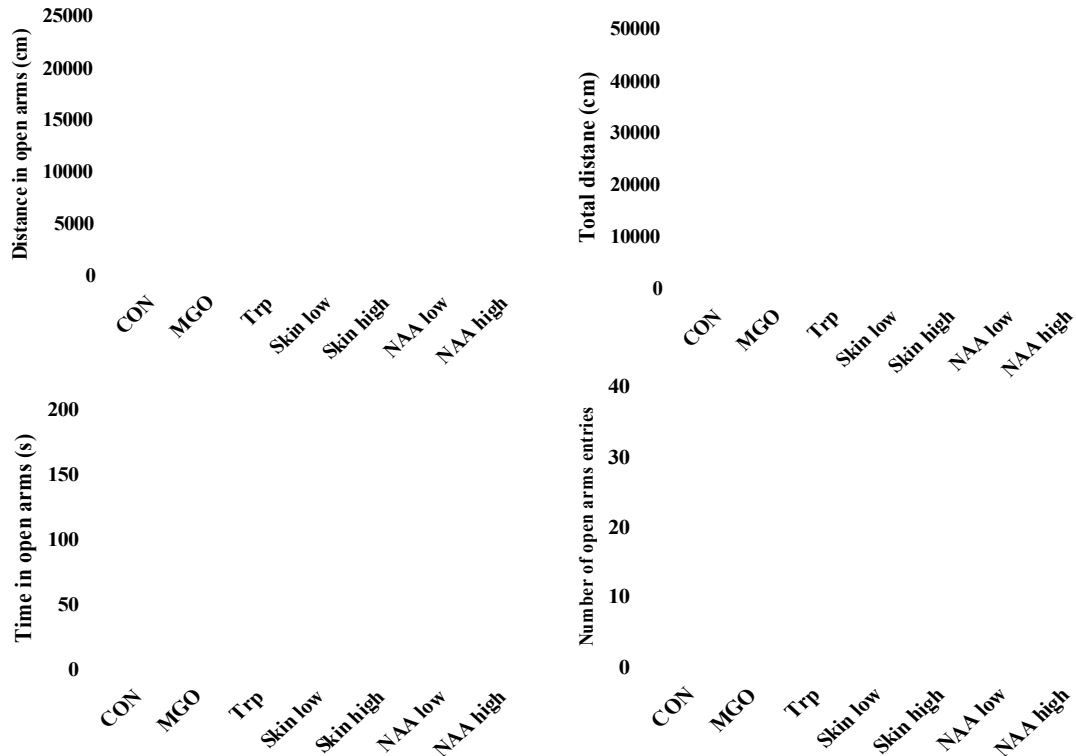
자발적 활동성(Spontaneous activity) 및 불안 관련 행동 변화를 평가하기 위하여 개방장 행동 실험 (Open Field Test, OFT)를 수행함. 각 실험군에 대해 특정 영역(zone) 내 이동 거리(distance in zone) 및 체류 시간(time in zone)을 측정하여 군 간 차이를 비교 분석함.

영역 내 이동 거리 분석 결과, 정상 대조군(CON)에 비해 MGO 처리군에서 이동 거리가 다소 증가하는 경향이 관찰되었으나, 통계적으로 유의적인 차이는 없었음. 양성대조군(Trp), 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군 또한 MGO 처리군 대비 감소하는 양상을 보였으나 유의성을 나타내지 않음.

영역 내 체류 시간 분석 결과 역시, MGO 처리군에서 증가하고 소재 투여군에서 다소 변화하는 경향이 있었으나, 모든 실험군 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않음.

OFT 실험 결론 이상의 결과를 종합할 때, MGO 처리 및 후보 소재(Skin, NAA) 투여는 실험동물의 자발적 활동성 및 기초 운동 능력(Locomotor activity)에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨. 이는 앞서 수행된 반즈 미로(Barnes Maze) 및 고가 십자 미로(EPM)에서의 행동 변화가 동물의 운동 능력 이상(Motor deficit)에 기인한 것이 아니라, 소재의 인지 기능 개선 및 항불안 효능에 의한 고유한 결과임을 뒷받침함.

(2) Elevated plus maze



[그림 55. MGO 유도 동물모델에서 불안 관련 행동 실험 결과 (EPM)]

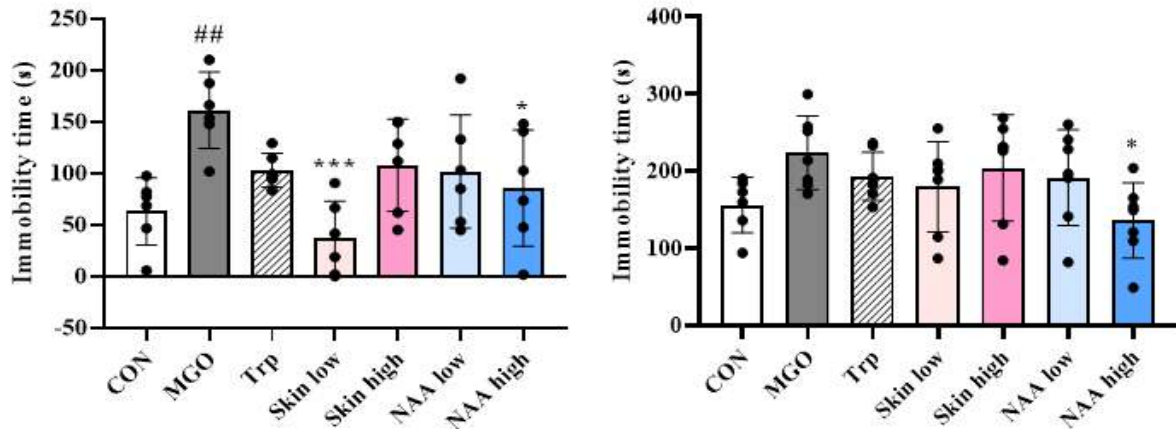
불안 행동(Anxiety-like behavior) 변화를 평가하기 위하여 고가 십자 미로(Elevated Plus Maze, EPM) 행동 실험을 수행함. 각 실험군에 대해 개방 팔(Open Arm)에서의 이동 거리(distance), 체류 시간(time), 진입 횟수(number of entries) 및 총 이동 거리(total distance)를 측정하여 군 간 차이를 비교 분석함.

개방 팔에서의 이동 거리 및 체류 시간을 분석한 결과, 정상 대조군(CON)에 비해 MGO 처리군에서 이동 거리가 감소하여 불안 행동이 증가함을 확인함. 반면, 양성 대조군(Trp), 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군에서는 MGO 처리군 대비 개방 팔에서의 활동성이 농도 의존적으로 회복되는 양상을 보임. 개방 팔로의 진입 횟수 또한 MGO 처리군에서 감소하였으나, CG 피부 추출물 및 NAA 투여군에서 유의적으로 증가하여 소재 처리에 의한 불안감 감소 효과를 검증함.

총 이동 거리 분석 결과, 실험군 간 총 이동 거리에는 유의적인 차이가 관찰되지 않음. 이는 소재 투여가 실험동물의 신체적 운동 능력(Locomotion)에는 영향을 미치지 않았음을 의미하며, 상기 개방 팔 지표의 변화가 순수한 항불안 효능(Anxiolytic effect)에 기인함을 시사함.

이상의 결과를 종합하면, MGO 처리에 의해 유도된 불안 행동 증가가 CG 피부 추출물 및 NAA 투여에 의해 효과적으로 완화(Alleviation)됨을 최종 규명함.

(3) Tail suspension test (TST) 및 Forced swimming test (FST)



^{##} $P < 0.01$: ctrl v.s. MGO group

^{*} $P < 0.05$ and ^{***} $P < 0.001$: MGO v.s. sample group

[그림 56 (좌) Tail suspension test (TST)와 (우) Forced swimming test (FST)에서 immobility time 결과]

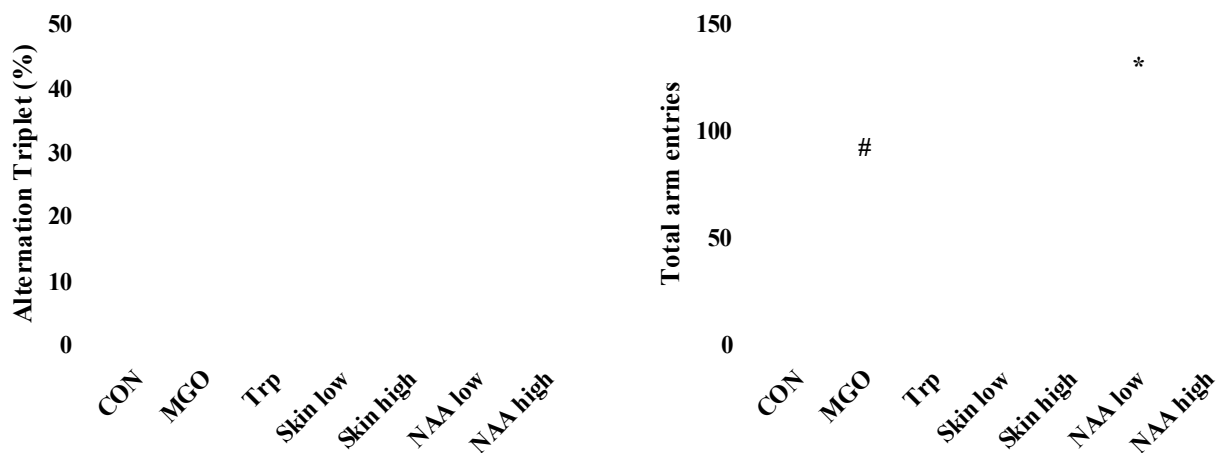
메틸글리옥살(MGO) 처리에 따른 우울 관련 행동 변화를 평가하기 위하여 그림 58과 같이 (좌) 꼬리 매달기 검사(Tail Suspension Test, TST) 및 (우) 강제 수영 검사(Forced Swimming Test, FST)를 수행하였음. 각 실험군에 대해 우울증의 주요 지표인 부동시간 (immobility time)을 측정하여 군 간 유의성을 비교 분석함.

꼬리 매달기 검사 (TST) 분석 결과, 정상 대조군(CON) 대비 MGO 처리군에서 부동 시간이 유의적으로 증가(^{##} $P < 0.05$)하여 우울 행동이 유발됨을 확인함. 양성대조군(Trp) 투여군에서는 MGO 처리군 대비 부동 시간이 감소하는 양상이 관찰되었음. 남극빙어(CG) 피부 (Skin) 추출물 투여군의 경우, 특히 저농도 처리군에서 MGO 처리군 대비 부동 시간이 유의하게 감소하였으며, 고농도군에서도 감소 효과를 확인함. N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군 또한 저농도 및 고농도 조건에서 부동 시간의 감소 효능이 검증됨.

강제 수영 검사(FST) 분석 결과 FST 분석 결과 역시, 정상 대조군 대비 MGO 처리군에서 부동 시간이 증가하는 양상이 관찰됨. 반면, CG 피부(Skin) 추출물 투여군은 저농도 및 고농도 모두에서 MGO 처리군 대비 부동 시간이 뚜렷하게 감소하는 양상을 보임. NAA 투여군 또한 부동시간이 감소하였으며, 특히 고농도 투여군에서 가장 우수한 개선 효과를 나타냄.

우울 행동 평가 결론 종합적으로, MGO 처리에 의해 유도된 우울 행동(TST 및 FST에서의 부동시간 증가)이 CG 피부 추출물 및 NAA 투여에 의해 효과적으로 완화(Amelioration)됨을 최종 규명함. 이는 후보 소재가 단순한 스트레스 반응 제어를 넘어 실질적인 항우울 효능(Anti-depressant activity)을 보유하고 있음을 시사함.

(4) Y-maze



$P < 0.05$: ctrl v.s. MGO group

* $P < 0.05$: MGO v.s. sample group

[그림 57. MGO 유도 동물모델에서 공간 작업 기억 평가 결과 (Y-maze test)]

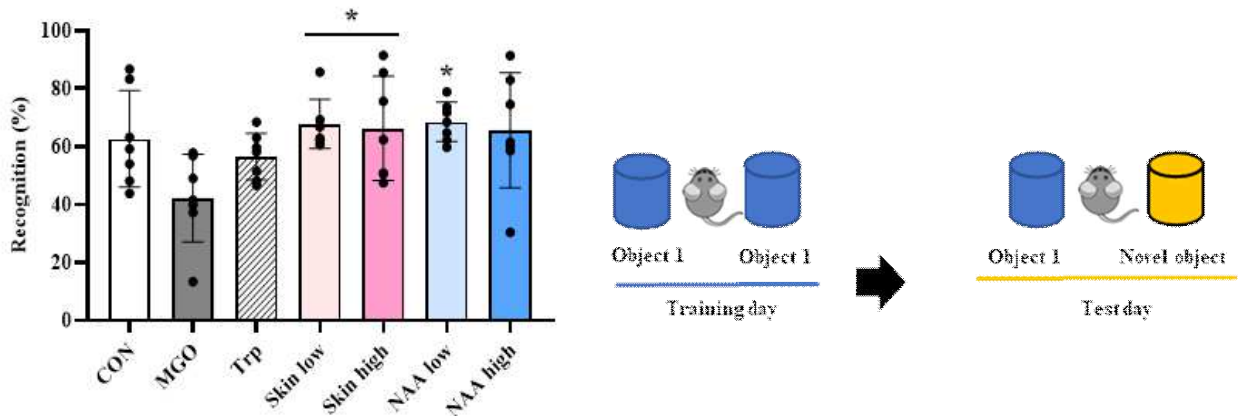
공간 작업 기억(spatial working memory) 변화를 평가하기 위하여 Y-미로(Y-maze) 행동실험을 수행함. 각 실험군에 대해 기억력 지표인 자발적 교대 행동(spontaneous alternation, alternation triplet %)과 활동성 지표인 총 팔 진입 횟수(total arm entries)를 측정하여 군 간 유의성을 비교 분석함.

자발적 교대율 분석 결과, 정상 대조군(CON)에 비해 MGO 처리군에서 자발적 교대율이 감소하는 양상이 관찰되었음. 반면, 양성대조군(Trp) 투여군은 MGO 처리군 대비 교대율이 증가하는 경향이 나타났음. 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군의 경우, MGO 처리군 대비 자발적 교대율이 증가하는 양상이 관찰되었으며, 특히 일부 처리군에서는 정상 대조군과 유사한 수준까지 기억력이 회복됨을 검증함.

총 팔 진입 횟수 분석 결과, MGO 처리군에서 정상 대조군 대비 진입 횟수가 감소하여 탐색 의욕 저하가 관찰됨. CG 피부 추출물 및 Trp 투여군에서는 MGO 처리군 대비 진입 횟수가 증가하여 활동성이 회복되는 양상을 보임. NAA 투여군의 경우, 저농도 투여군에서는 진입 횟수의 상대적으로 뚜렷한 증가가 확인되었으나, 고농도 투여군에서는 MGO 처리군과 유사한 수준을 유지함.

Y-maze 실험 결론 종합적으로, Y-maze 실험을 통해 MGO 처리에 의한 공간 작업 기억력 감퇴 및 탐색 행동 저하를 확인하였으며, CG 피부 추출물 및 NAA 투여가 손상된 단기 기억력과 활동성을 효과적으로 개선함을 최종 규명함.

(5) Nobel object recognition test (NORT)



* $P < 0.05$: MGO v.s. sample group

[그림 58. MGO 유도 동물모델에서 탐색 기반 인지 기능 평가 결과 (Novel Object Recognition Test)]

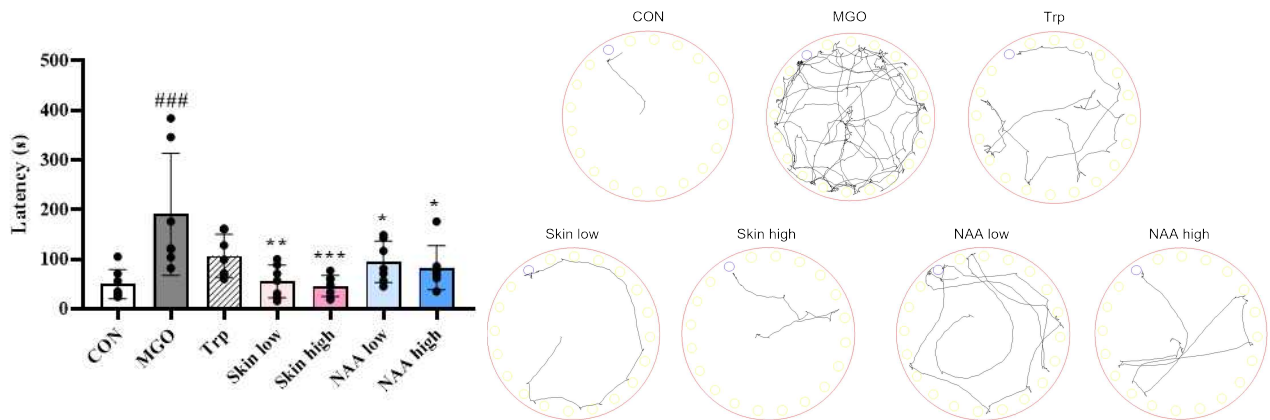
인지 기억 능력을 평가하기 위하여 신물체 인식 실험 (Novel Object Recognition Test, NORT)를 수행함. 각 실험군에 대해 새로운 물체에 대한 인지 지수(recognition, %)를 측정하여 군 간 유의성을 비교 분석함.

분석 결과, 정상 대조군(CON)에 비해 MGO 처리군에서 신물체 인지 지수가 유의적으로 감소하여, 인지기능 저하가 성공적으로 유도됨을 확인함. 반면, 양성대조군인 트립토판(Trp) 투여군에서는 MGO 처리군 대비 인지 지수가 회복되는 결과를 보임.

남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 투여군의 경우, 저농도 및 고농도 처리군 모두에서 MGO 처리군 대비 인지 지수가 뚜렷하게 증가하였으며, 특히 일부 처리군에서는 통계적으로 유의한(* $P < 0.05$) 차이가 검증됨. N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군 또한 저농도 및 고농도 조건에서 MGO 처리군 대비 신물체 인지율이 유의적으로 개선됨을 확인함.

이상의 결과를 종합하면, MGO 처리에 의해 유도된 인지 기억 저하 양상이 NORT에서 입증되었으며, CG 피부 추출물 및 NAA 투여가 저하된 물체 인지 능력을 효과적으로 회복시킴을 확인함.

(6) Barnes maze



$P < 0.001$: ctrl v.s. MGO group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$: MGO v.s. sample group

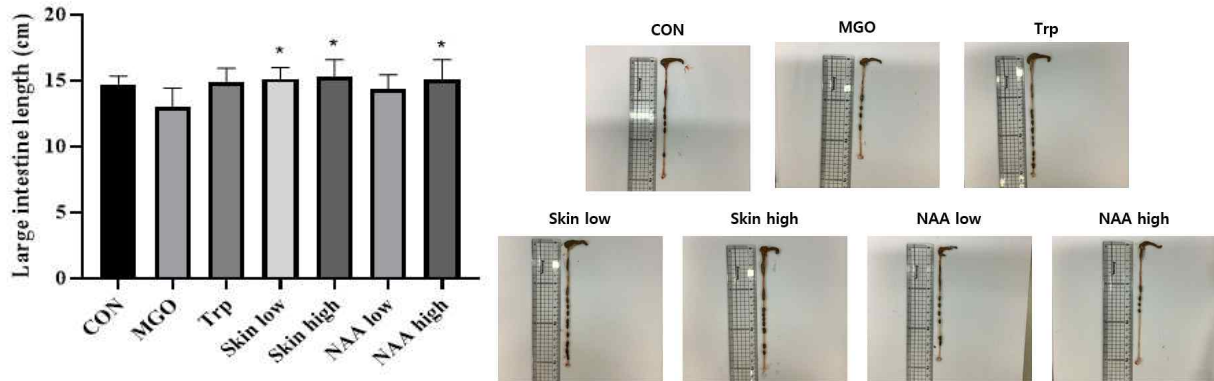
[그림 59. MGO 유도 동물모델에서 반복 학습 기반 인지 기능 평가 결과 (Barnes Maze test)]

퇴행성 신경계 질환 모델에서의 공간 학습 및 기억 능력 변화를 평가하기 위하여 반즈 미로(Barnes Maze, BM) 행동 실험을 수행함. 각 실험군에 대해 탈출구 도달까지 소요되는 탈출 잠복기(Escape Latency)를 측정하여 군 간 유의성을 비교 분석함.

분석 결과, 정상 대조군(CON)에 비해 메틸글리옥살(MGO) 처리군에서 탈출 잠복기가 현저히 증가하여 기억력 감퇴가 유도됨을 확인함. 양성 대조군인 트립토판(Trp) 투여군에서는 MGO 처리군 대비 잠복기가 유의적으로 감소함. 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물의 경우, 저농도 및 고농도 처리군 모두에서 MGO 처리군 대비 탈출 잠복기가 농도 의존적으로 단축되었으며, 특히 고농도 처리군에서 뚜렷한 개선 효과를 확인함. N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군에서도 저농도 및 고농도 처리 시 MGO 처리군 대비 탈출구 도달 시간이 감소하는 양상이 관찰되었음. 각 실험군의 이동 경로(Track plot) 분석 결과, MGO 처리군은 복잡하고 분산된 탐색 패턴을 보인 반면, 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 NAA 투여군은 비교적 직선적이고 효율적인 탈출 경로를 나타냄.

결론적으로, 극지 빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 NAA 투여가 MGO로 유도된 공간 학습 및 기억 능력 손상을 효과적으로 회복시킴을 규명함.

다. MGO로 유도된 동물모델의 대장길이 비교



[그림 60. MGO 유도 동물모델에서 대장 길이(large intestine length) 비교]

메틸글리옥살(MGO)로 유도된 동물모델에서 장 조직의 육안적 변화를 평가하기 위하여 대장 길이(Colon length)를 측정하고 군 간 차이를 비교 분석함. 일반적으로 대장의 길이는 장내 염증 및 조직 손상의 지표로 활용됨.

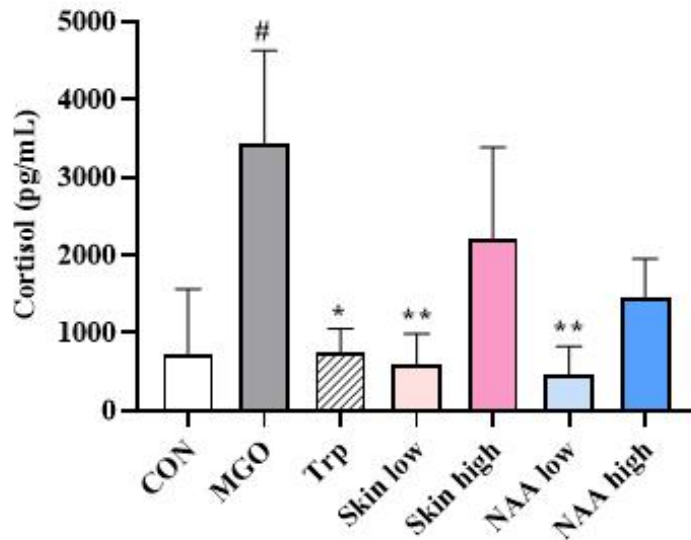
분석 결과, 정상 대조군(CON) 대비 MGO 처리군에서 대장 길이가 단축되는 양상을 보여, MGO에 의한 장 조직 손상이 유발됨을 확인함.

반면, 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 위축된 대장 길이가 회복되는 결과가 관찰됨. 특히 CG 피부 추출물 저용량 및 고용량 투여군과 NAA 고용량 투여군에서는 MGO 처리군 대비 통계적으로 유의한(*P < 0.05) 길이 회복이 검증됨. 양성대조군인 트립토판(Trp) 투여군에서도 회복 경향은 관찰되었으나, 통계적인 유의성은 나타나지 않음.

결론적으로, 본 결과는 MGO 투여로 인해 유발된 장 조직의 구조적 손상(대장 단축)이 후보 소재(CG 피부 추출물 및 NAA) 처리에 의해 효과적으로 개선(Amelioration)될 수 있음을 시사하며, 해당 소재가 장 조직 수준에서도 MGO 기인 손상을 완화하는 보호 효능을 가짐을 최종 확인함.

라. Cortisol level 및 염증성 사이토카인류 관련 측정

1) Cortisol level 측정



$P < 0.05$: ctrl v.s. MGO group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: MGO v.s. sample group

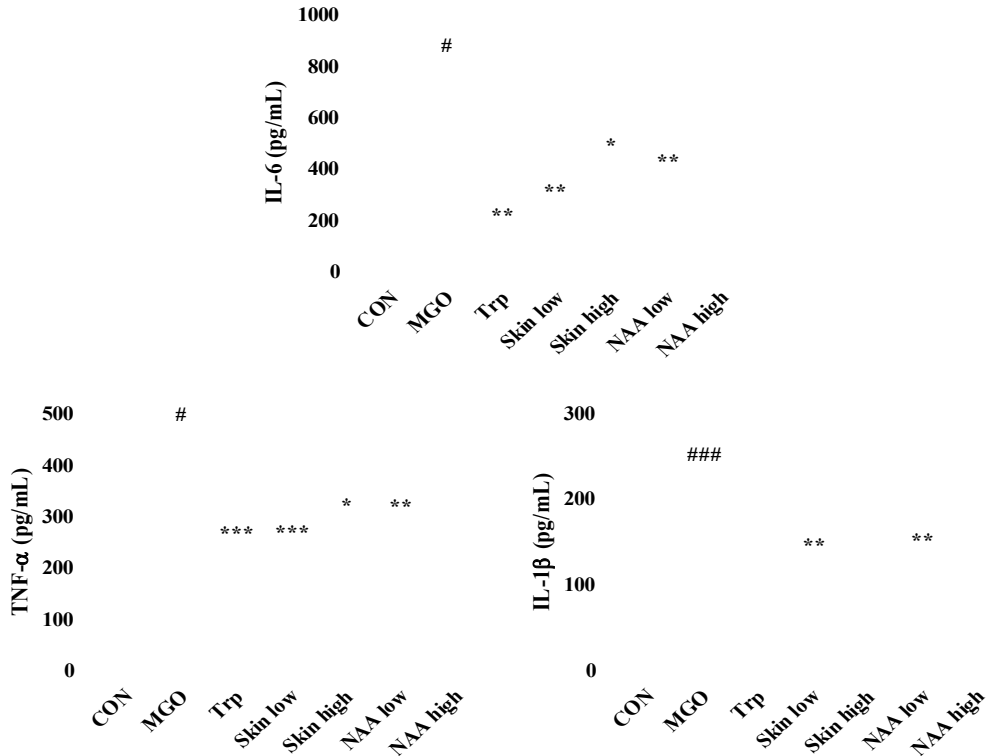
[그림 61. Cortisol 정량 분석 결과]

스트레스 호르몬(Cortisol) 변화 분석 스트레스 반응과 관련된 내분비계 변화를 평가하기 위하여, 마우스 혈청(Serum) 내 코르티솔(Cortisol) 농도를 ELISA kit를 이용하여 정량 분석함.

분석 결과, 정상 대조군(CON)에 비해 MGO 처리군에서 혈중 cortisol 농도가 유의하게 증가($P < 0.05$) 하여, MGO 투여가 생체 내 스트레스 반응을 유발함을 확인함. 양성대조군 트립토판(Trp) 투여군에서는 MGO 처리군 대비 혈중 cortisol 농도가 감소하는 결과를 보임. 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 투여군의 경우, 특히 저용량 처리군에서 MGO 처리군 대비 혈중 cortisol 농도가 유의하게 감소하였으며, 고용량 처리군에서도 감소 효과가 확인됨. N-아세틸-L-아스파르트산 (N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군 또한 저용량 처리 시 MGO 처리군 유의적인 감소를 나타내었으며, 고농도군에서도 억제 효능이 유지됨.

결론적으로, MGO 처리에 의해 유도된 혈중 스트레스 호르몬(Cortisol)의 증가가 CG 피부 추출물 및 NAA 투여에 의해 효과적으로 완화(Alleviation)됨을 확인할 수 있었음.

2) 염증성 사이토카인류 측정



$P < 0.05$ and ### $P < 0.001$: ctrl v.s. MGO group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$: MGO v.s. sample group

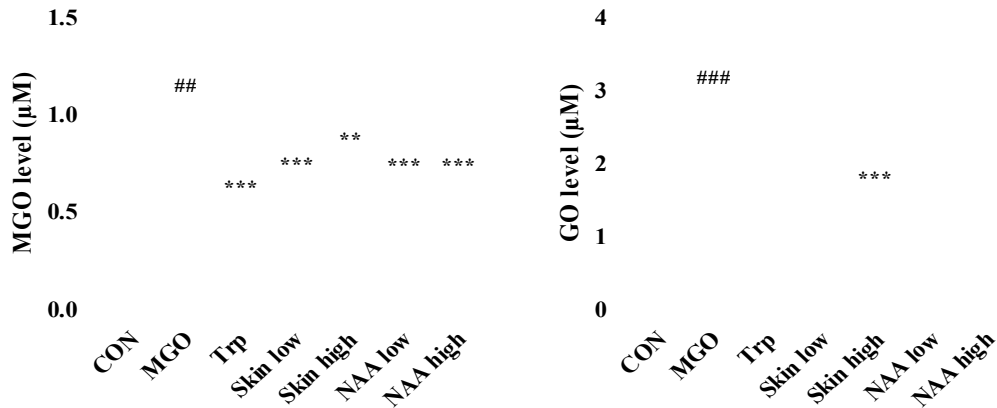
[그림 62. 염증성 cytokine(IL-6, TNF- α , IL-1 β) 정량 분석 결과]

뇌 조직 내 염증성 사이토카인(Neuroinflammation) 분석 MGO 처리에 따른 중추 신경계 염증 반응을 평가하기 위하여, 뇌 조직(Brain tissue) 내 염증성 사이토카인(IL-6, TNF- α , IL-1 β) 농도를 정량 분석함.

- IL-6: 정상 대조군 대비 MGO 처리군에서 IL-6 농도가 증가($P < 0.05$)하였으나, 트립토판(Trp) 및 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 저용량 처리군에서는 수치가 유의적으로 감소함. N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군 또한 용량 의존적인 감소 효능을 나타냄.
- TNF- α : MGO 처리군에서 증가된 TNF- α 수치가 Trp 투여군에서 유의하게 억제됨. CG 피부 추출물 투여군은 저농도 및 고농도 모두에서 감소 효과를 보였으며, 일부 처리군에서는 통계적으로 유의한 감소가 검증됨. NAA 투여군 역시 전반적인 감소 효능을 확인함.
- IL-1 β : MGO 처리군에서 정상 대조군 대비 유의적인 증가가 관찰됨. CG 피부 추출물 저용량 처리군은 IL-1 β 농도를 유의하게 억제하였으며, NAA 투여군 또한 저용량 및 고용량 모두에서 억제 경향을 확인함.

종합적으로, MGO 처리에 의해 뇌 조직 내 주요 염증성 사이토카인(IL-6, TNF- α , IL-1 β)의 과발현이 유도되었으나, CG 피부 추출물 및 NAA 투여가 이를 효과적으로 억제하여 신경염증(Neuroinflammation) 완화 효능을 가짐을 최종 확인함.

마. MGO 및 GO level 측정



$P < 0.01$ and ### $P < 0.001$: ctrl v.s. MGO group

** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$: MGO v.s. sample group

[그림 63. MGO 및 GO 농도 정량 분석 결과]

메틸글리옥살(Methylglyoxal, MGO)과 글리옥살(Glyoxal, GO)은 체내 당대사 과정에서 생성되는 대표적인 반응성 디카보닐 화합물로, 단백질, 지질 및 핵산과 비효소적 당화 반응을 일으켜 카보닐 스트레스(Carbonyl stress) 및 advanced glycation end products(AGEs)의 생성을 촉진하는 주요 인자로 알려져 있음. 특히 이들 물질의 체내 과도한 축적은 신경세포 기능 저하 및 퇴행성 신경질환의 병리 기전과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고됨. 이에 본 연구에서는 MGO 처리에 따른 체내 카보닐 스트레스 유발 여부와 후보 소재 투여에 따른 조절 효과를 평가하기 위하여 체내 MGO 및 GO 농도를 정량 분석함.

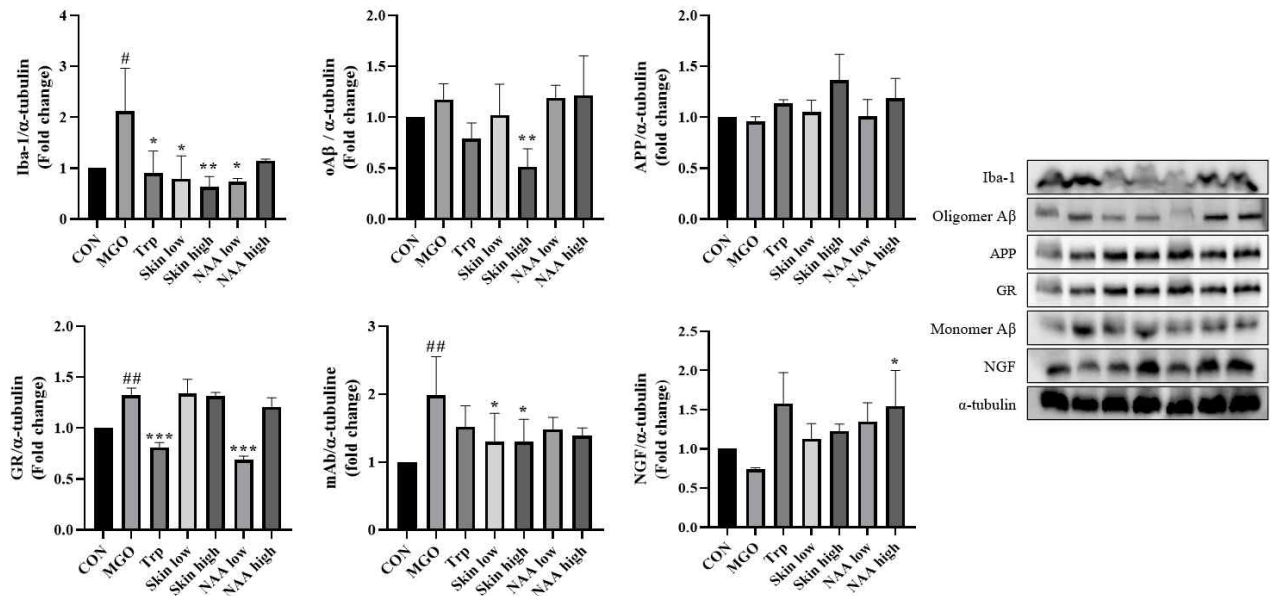
MGO 농도 분석 결과, 정상 대조군 (CON)에 비해 MGO 처리군에서 체내 MGO 농도가 유의적으로 증가하여, 본 실험 조건에서 카보닐 스트레스가 성공적으로 유도되었음을 확인할 수 있음. 이는 MGO 투여가 체내 디카보닐 항상성을 교란시켜 병리적 환경을 안정적으로 재현하였음을 의미함. 반면, 양성 대조군인 트립토판(Trp) 투여군에서는 MGO 처리군 대비 체내 MGO 농도가 감소하는 경향을 보였으며, 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산 (N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군에서도 MGO 처리군 대비 MGO 농도가 낮아지는 양상이 관찰됨. 일부 처리군에서는 통계적으로 유의한 감소가 확인되어, 후보 소재 투여에 따른 카보닐 스트레스 완화 가능성을 확인할 수 있었음.

GO 농도 분석 결과 역시 MGO 처리군에서 정상 대조군 대비 상대적으로 높은 수치를 나타내어, MGO 투여가 단일 물질의 증가에 국한되지 않고 체내 전반적인 디카보닐 스트레스 환경을 강화함을 보여줌. Trp 투여군에서는 GO 농도가 효과적으로 감소하였으며, CG 피부 추출물 및 NAA 투여군에서도 MGO 처리군 대비 GO 농도가 유의적으로 감소하는 양상을 보였음. 이러한 결과는 후보 소재가 MGO뿐만 아니라 GO를 포함한 복합적인 디카보닐 스트레스 인자 조절에 관여할 가능성을 시사함.

결론적으로, MGO 처리에 의해 유도된 체내 MGO 및 GO의 과도한 축적은 후보 소재 투여에 의해 효과적으로 완화되는 것으로 확인함.

바. Western blotting

(1) Brain



[#] $P < 0.05$ and ^{##} $P < 0.01$: ctrl v.s. MGO group

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, and ^{***} $P < 0.001$: MGO v.s. sample group

[그림 64. MGO 유도 동물모델에서 뇌 조직 내 단백질 발현 변화]

메틸글리옥살(MGO)에 따른 중추신경계 단백질 발현 변화를 평가하기 위하여 마우스 뇌 조직을 이용한 Western blot 분석을 수행하였음. 분석 대상으로는 미세아교세포 활성화 지표 (Iba-1), 스트레스 관련 수용체 (Glucocorticoid receptor, GR), Amyloid-beta precursor protein (APP), oligomeric Aβ (oAβ), monomeric Aβ (mAβ), 그리고 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF)의 발현 수준을 분석함.

1. 신경염증 및 스트레스 반응인자 제어 효능

- **Iba-1:** MGO 처리군에서 Iba-1 발현이 현저히 증가하여 신경염증 반응을 주도하는 미세아교세포(Microglia)의 과활성화를 확인함. 반면, 양성대조군(Trp), 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군에서는 Iba-1 발현이 MGO 처리군 대비 유의적으로 감소하여 우수한 항염증 효능을 입증함.
- **GR:** 스트레스 관련 수용체인 GR 역시 MGO 처리에 의해 발현이 증가하였으나, Trp 및 NAA 저농도 처리군에서 발현이 억제되는 양상을 보여 스트레스 반응 조절 가능성을 확인함.

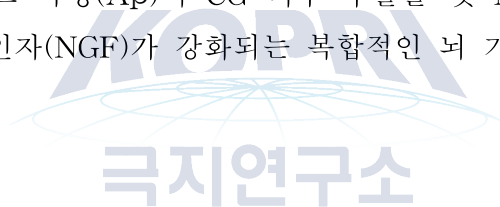
2. 아밀로이드 베타(A β) 관련 병리 억제

- APP vs A β : 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 발현은 실험군 간 유의적인 차이가 없었으나, MGO 처리군에서 신경독성을 유발하는 단량체(Monomeric, mA β) 및 올리고머(Oligomeric, oA β) 형태의 A β 축적이 증가함.
- 억제 효과: CG 피부 추출물 및 NAA 등 후보 소재 투여 시, 독성 형태인 oA β 의 발현이 감소하는 결과가 확인됨. 이는 소재가 APP의 생성보다는 A β 의 응집 억제 또는 분해 촉진 기전에 작용함을 시사함.

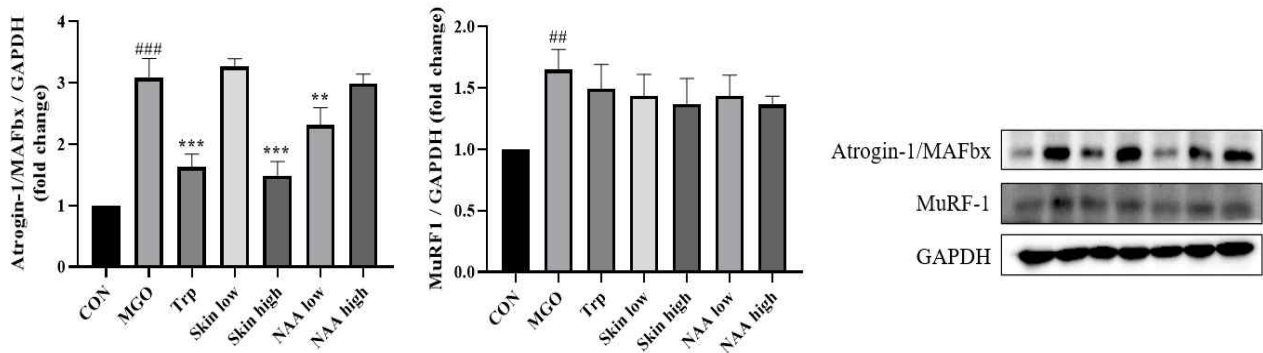
3. 신경성장인자(NGF) 활성 조절

- NGF 회복: MGO 처리군에서는 신경세포 생존에 필수적인 NGF 발현이 정상 대조군 대비 감소하는 양상을 보임. 그러나 Trp, CG 피부 추출물 및 NAA 투여에 의해 감소된 NGF 발현이 정상 수준으로 회복되거나 유의적으로 증가함.
- 의미: 이는 후보 소재가 손상된 뇌 조직에서 신경가소성 (Neuroplasticity) 유지 및 신경세포 생존을 돕는 신경 보호 기전을 활성화함을 시사함.

뇌 조직 단백질 분석 결론 종합적으로, MGO 처리에 의해 유발된 신경염증(Iba-1), 스트레스(GR) 및 아밀로이드 독성(A β)이 CG 피부 추출물 및 NAA 투여에 의해 효과적으로 제어되고, 동시에 신경성장인자(NGF)가 강화되는 복합적인 뇌 기능 개선 및 신경 보호 효능을 최종 검증하였음.



(2) 운동능력관련 인자에 미치는 영향(Muscle - GCM)



$P < 0.01$ and ### $P < 0.001$: ctrl v.s. MGO group

** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$: MGO v.s. sample group

[그림 65. MGO 유도 동물모델에서 근육 GCM 조직 내 단백질 발현 변화]

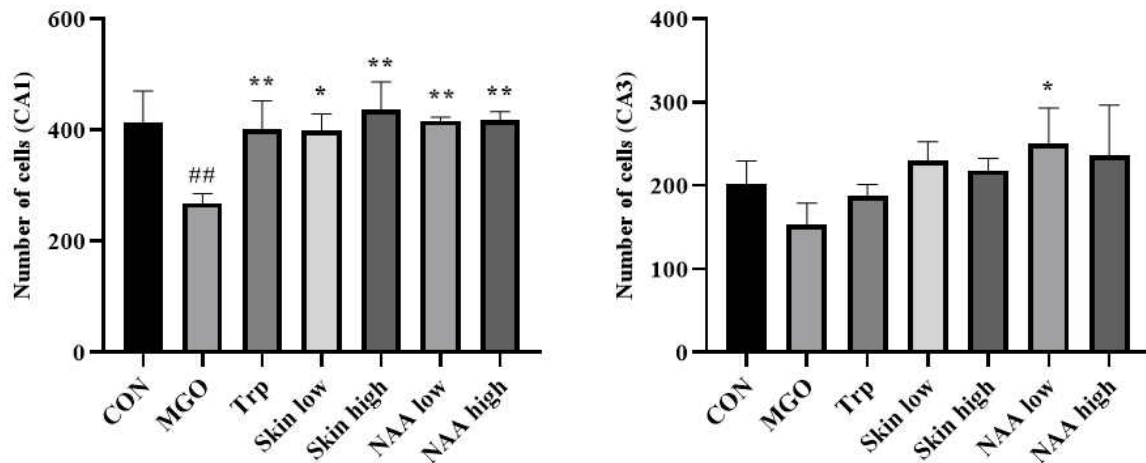
메틸글리옥살(MGO)에 따른 근육 조직 수준의 단백질 분해 및 근위축 관련 변화를 평가하기 위하여, 마우스 비복근(gastrocnemius muscle, GCM) 조직을 이용한 Western blot 분석을 수행하였음. 분석 대상으로는 근위축을 유발하는 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(Ubiquitin - proteasome system)의 핵심 인자인 Atrogin-1/MAFbx 및 MuRF-1을 선정함.

분석 결과, 정상 대조군(Normal) 대비 MGO 처리군에서 Atrogin-1 발현이 유의적으로 증가(### $P < 0.001$)하여, MGO에 의한 근단백질 분해 신호의 활성화를 확인함. 반면, 양성대조군(Trp) 투여군에서는 MGO 처리군 대비 Atrogin-1/MAFbx 발현이 유의하게 감소하였으며, 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 처리군 또한 용량 의존적인 감소 양상을 보임. 특히, CG 피부 추출물 고용량 처리군에서 발현 억제 효과가 가장 뚜렷하게 나타남. N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 처리군 역시 저농도 조건에서 유효한 감소 및 억제 효능을 검증함.

MuRF-1 발현의 경우, MGO 처리에 의해 발현이 증가하고 후보소재 (CG 피부 추출물 및 NAA) 처리에 의해 다시 감소하는 전반적인 경향성은 확인되었으나, Atrogin-1에 비해 변화의 폭이 상대적으로 제한적이었음. 이는 본 모델에서 MGO에 의한 근손상 기전이 MuRF-1 보다 Atrogin-1 경로를 더욱 우세하게 자극함을 시사함.

종합적으로, MGO 처리에 의해 유도된 비복근 내 근위축 신호(Ubiquitin-proteasome pathway)가 CG 피부 추출물 및 NAA 투여에 의해 효과적으로 제어(Regulation)함으로써 근육 증강에 의한 운동능력을 향상시킬 가능성을 확인함. 이는 당독소(MGO)가 중추신경계뿐만 아니라 말초 근육 조직(Peripheral muscle tissue)에도 손상을 입히며, 후보 소재가 이를 동시에 방어하여 '뇌-근육(Brain-Muscle)'을 아우르는 복합적인 항노화 및 관련 운동기능 향상기능에 영향을 미칠 것으로 예상됨.

사. H&E 염색 및 면역조직화학염색 (IHC)을 통한 뇌 조직 병리학적 변화 분석



^{##} $P < 0.01$: ctrl v.s. MGO group

^{*} $P < 0.05$, and ^{**} $P < 0.01$: MGO v.s. sample group

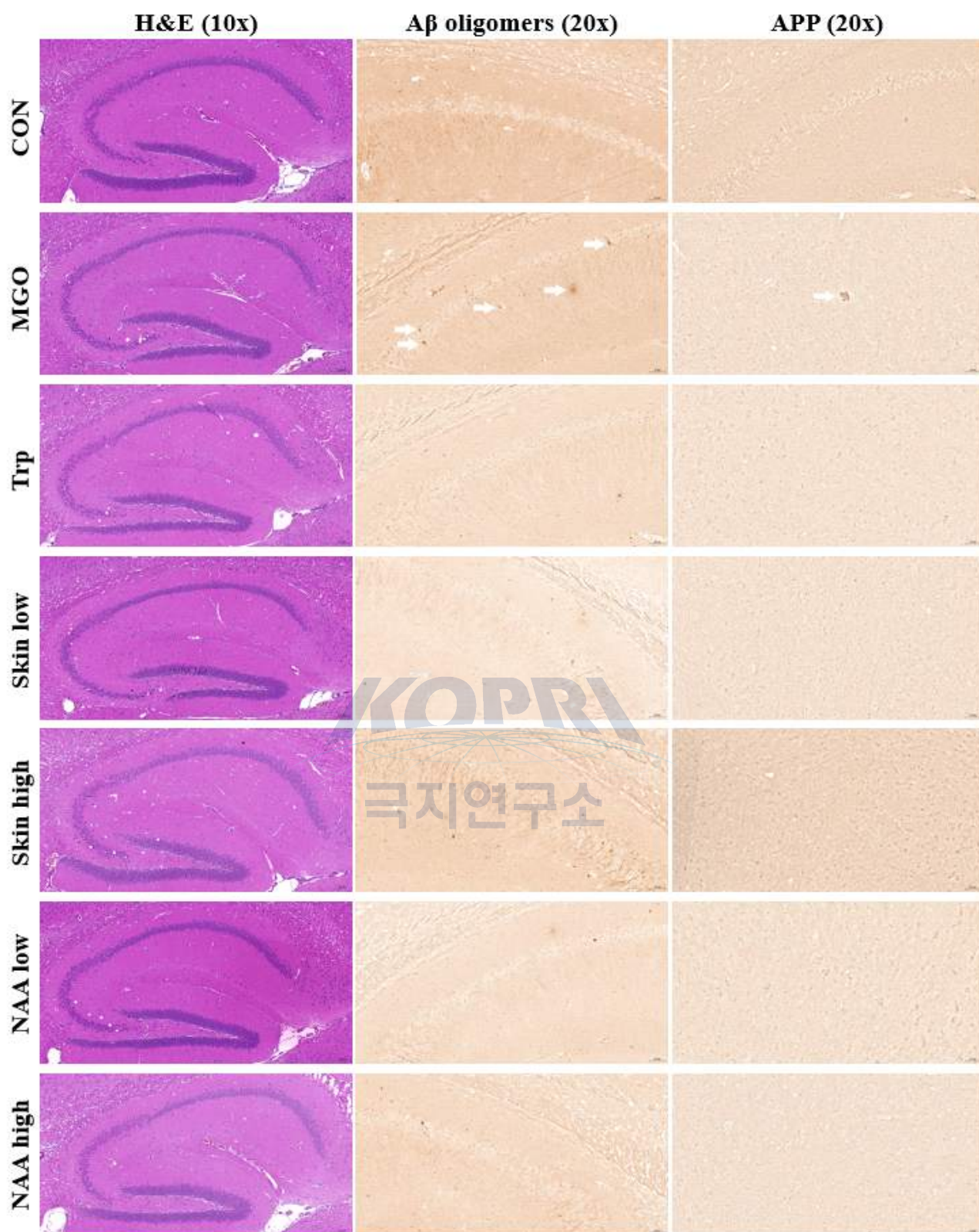
[그림 66. MGO 유도 동물 모델 해마 영역의 신경세포 밀도 변화에 대한 조직학적 분석 결과 (H&E염색)]

MGO 투여에 따른 해마 조직의 형태학적 변화 및 β -amyloid 축적 양상을 평가하기 위하여, 뇌 조직을 대상으로 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색과 $A\beta$ oligomers 및 APP에 대한 면역조직화학염색 (Immunohistochemistry, IHC)을 수행하였다 (그림 66, 67).

H&E 염색 결과, 정상 대조군(CON)에서는 CA1 및 CA3 영역에서 신경세포 층이 치밀하고 규칙적인 배열을 유지하고 있었으나, MGO 투여군에서는 해마 신경세포 밀도의 감소와 함께 세포 배열의 불규칙성이 관찰되었다. 특히 CA1 영역에서 신경세포 손실이 뚜렷하게 나타나 MGO에 의한 해마 구조 손상이 확인되었다. 반면, 양성대조군(Trp), 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA) 투여군에서는 MGO 처리군 대비 해마 신경세포 밀도가 유의적으로 회복되는 양상을 보였으며, CA1 영역에서의 신경세포 수가 정상 대조군 수준에 근접하는 경향을 나타냄 (그림 73).

$A\beta$ oligomers에 대한 면역조직화학염색 결과, MGO 처리군에서 해마 영역 전반에 걸쳐 갈색 침착 신호가 뚜렷하게 증가하여 $A\beta$ oligomer 축적이 현저히 증가함을 확인하였다. 특히 CA1 및 CA3 영역에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 반면, Trp, CG 피부 추출물 및 NAA 투여군에서는 MGO 처리군 대비 $A\beta$ oligomer 양성 신호가 감소하는 경향을 보임.

한편, APP 발현은 해마가 아닌 대뇌피질(cortex) 영역에서 면역조직화학염색을 통해 확인함. 그 결과, MGO 투여에 따라 APP 면역반응의 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으며, Trp, CG 피부 추출물 및 NAA 처리군에서도 APP 발현 수준은 MGO 처리군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않음 (그림 74). 이는 본 실험 조건에서 APP 발현 자체보다는 $A\beta$ oligomer 축적 수준의 변화가 보다 민감한 병리 지표임을 시사함.



[그림 67. MGO 유도 동물 모델에서 뇌 조직의 조직학적 변화(H&E) 및 A β oligomer와 APP 발현 결과]

3. 3차년도 연구결과 결론

2차년도에 선정된 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물 및 N-아세틸-L-아스파르트산(N-acetyl-L-aspartic acid, NAA)의 생체 적용 가능성을 MGO 유도 노화관련 뇌질환 저하 동물모델에서 종합적으로 검증하였음. 즉 인지관련 행동 실험, 혈중 생화학 지표, 뇌 및 장 조직 병리 분석을 연계하여 후보 소재의 항당독소(Anti-glycation) 및 신경보호(Neuroprotection) 약리효능을 다각도로 평가함.

행동 실험 결과, MGO 투여에 의해 유발된 불안 행동 증가 및 인지 기능 저하가 후보 소재 투여에 의해 유의적으로 개선됨을 확인함. 특히, 고가 십자 미로(EPM)검사에서의 항불안 효과와 신물체 인식(NORT)에서의 기억력 회복 효능이 뚜렷하게 관찰되어, 후보 소재가 신경행동학적 결손을 근본적으로 조절할 수 있음을 규명함.

혈중 스트레스 호르몬(Cortisol) 및 뇌 조직 내 신경염증 인자(Cytokines) 분석 결과, 후보 소재 투여가 전신적 스트레스 반응을 억제하고 중추신경계의 염증 및 스트레스 단백질 발현을 효과적으로 차단함을 입증함. 이는 1차년도 세포 실험(*In vitro*)에서 확인된 항염·신경보호 기전이 동물모델에서도 일관되게 재현됨을 검증한 결과임.

장 조직 분석을 통해 MGO에 의한 장 구조적 손상(대장 단축 등)을 확인하였으며, 후보 소재가 이를 회복시킴을 확인함. 이는 당독소에 의한 병리 현상이 뇌뿐만 아니라 장에서도 발생하며, 후보 소재가 뇌-장 축(Gut-Brain Axis) 관점에서 전신적인 보호 효과를 나타낼 가능성을 강력히 시사함.

이상의 결과를 종합할 때, CG 피부 추출물과 NAA는 행동, 혈액, 조직(뇌·장) 수준의 다중 병리 지표를 동시에 제어하는 복합 기능성을 보유하고 있음을 확인함. 이에 따라, 본 연구는 극지 어류 유래 소재의 생체 적용 타당성을 최종 검증하였으며, 향후 당독소 표적 차세대 뇌질환 예방 및 치료용 기능성 소재 개발을 위한 확고한 과학적 기초자료를 제공함.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 연구개발목표 설정 및 추진 전략

가. 연구개발의 최종 목표

본 연구는 극지 어류 자원인 남극대구(*Nototothenia rossii*, NR)와 매켈빙어 (*Champsocephalus gunnari*, CG)를 활용하여, 노화 및 퇴행성 신경질환의 핵심 원인인 당독소(Glycotoxin)를 표적으로 하는 항노화·항퇴행성 신경질환 후보 소재를 도출하고, 그 유효성과 인체 적용 가능성을 단계적으로 검증하는 것을 최종 목표로 함.

나. 연차별 단계적 추진 전략

이를 달성하기 위해 소재 발굴부터 세포(*In vitro*) 및 동물모델(*In vivo*)을 활용한 생체 수준 검증까지 연계하는 전주기적 연구 전략을 수립하였음. 각 연차별 연구 성과가 다음 단계의 심화 연구로 유기적으로 연결되도록 다음과 같은 구조로 연구를 수행함.

- **1단계 (소재 발굴 및 기전 탐색):** 극지 어류 조직별 추출물의 라이브러리 구축 및 당독소 저감 효능 스크리닝을 통한 핵심 후보 소재 선정
- **2단계 (유효 성분 규명 및 심화 검증):** 선정된 후보 소재의 지표 성분(대사체) 규명 및 뇌세포 모델에서의 작용 기전(Mode of Action) 해석
- **3단계 (생체 효능 입증 및 최적화):** 질환 동물모델을 이용한 신경행동학적, 생화학적, 조직학적 효능 검증을 통한 최종 기능성 소재 확립

극지연구소

2. 연차별 연구개발 목표 및 달성도

구분	1차년도	2차년도	3차년도
연구개발 목표	·극지 어류 유래 생물소재 중 항당독소 활성이 우수 후보 소재 발굴	·남극빙어(CG) 피부(Skin) 30% EtOH 추출물의 세포 수준 유효성 검증 및 핵심 후보물질 확정	·후보 소재 및 핵심 지표 물질의 동물모델 기반 생체 효능 및 적용 가능성 최종 검증
연구수행 내용	·극지 어류(NR, CG) 조직별 추출물 라이브러리 구축 ·MGO 소거능 및 AGEs 형성 억제능 비교 평가	·MGO 유도 신경독성·신경염증 세포 모델 구축 ·핵심 대사체 분석 및 구조 규명	·MGO 처리 동물모델 구축 ·신경행동학적 평가 및 혈액·뇌·장 조직 병리 분석
주요연구결과	·CG 피부 30% EtOH 추출물의 탁월한 MGO 소거 활성 확인 ·추출 조건 최적화를 통한 효능의 재현성 및 안정성 확보	·신경독성 방어 및 신경성장인자(NGF) 활성 증진 효능 검증 ·NAA, Taurine 등 5종의 핵심 유효 대사체 구조 규명	·우울 및 인지 기능 저하의 유의적 개선 효능 입증 ·뇌-장 축 기반의 전신적 당독소 및 염증 제어 기전 최종 규명
목표달성도	·최적 후보 소재(CG 피부 30% EtOH 추출물) 선정 완료	·구조 안정성 및 생체 적용 가능성을 고려하여 NAA 최종 후보 물질로 확정 ·세포 수준 유효성 검증 및 후보 물질 확정으로 2차년도 목표달성	·동물모델에서 기능성 검증 완료로 3차년도 목표 달성함
종합평가	·본 연구는 당초 계획된 연차별 연구개발목표를 100% 충실히 이행하였음. 1차년도 소재 발굴을 시작으로, 2차년도 유효 성분 규명 및 세포 수준 기전 해석, 3차년도 동물 모델을 이용한 생체 효능 검증까지 전주기적 연구를 체계적으로 수행하였음. 그 결과, 남극빙어(CG) 피부(Skin) 추출물과 N-아세트-L-아스파르트산 (N-acetyl-L- aspartic acid, NAA)가 당독소에 의한 퇴행성 신경질환을 제어할 수 있는 유망한 기능성 소재임을 과학적으로 최종 규명하여 연구개발목표를 성공적으로 달성함.		

3. 대외기여도

본 연구는 극지 어류 유래 생물소재를 당독소(Glycotoxin) 표적 관점에서 체계적으로 분석하고, 퇴행성 신경질환 제어 효능을 단계적으로 규명한 선도적 연구 사례로서 중요한 학술적·기술적 기초 자료를 확보하였음. 또한, 미활용 극지 생물자원의 신규 고부가가치 창출 가능성을 구체적으로 제시함으로써, 향후 차세대 기능성 소재 및 치료제 개발을 위한 핵심 원천 기술로 활용될 수 있는 기반을 마련함.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- ▶ 본 연구를 통해 도출된 결과는 노화 및 퇴행성 신경계 질환의 병리기전에 대한 이해를 확장하고, 당독소물질을 표적으로 하는 새로운 치료 전략을 제시함으로써 학술적·산업적 활용가능성을 지님.
- ▶ 특히 극지 어류 유래 생물소재를 기반으로 한 당독소 제어 전략은 기존 연구와 차별화되는 접근으로, 후속 연구 및 산업화 단계로의 확장이 가능함.
- 노화 및 퇴행성 신경질환 치료제 개발 활용
 - 본 연구에서 확인된 메틸글라이옥살 (MGO)을 중심으로 한 당독소 표적 제어 전략은 비특이적 노화 모델의 한계를 보완하는 표적 기반 연구 체계를 제시함. 이를 통해 노화 및 퇴행성 신경계 질환 치료제 개발 과정에서 후보 물질의 효능 검증과 기전 분석에 효율적으로 활용될 수 있으며, 전임상 연구를 위한 기초 자료로 활용 가능함.
- 신약 개발의 새로운 타겟 및 전략 제시
 - 본 연구는 당독소물질을 노화 및 만성 난치성 신경계 질환의 핵심 표적으로 설정 하고, 기존의 소거제(scavenger) 중심 연구에서 벗어나 당독소 파쇄(Breaker) 개념을 적용한 새로운 제어 전략을 제시함. 이러한 접근은 first-in-class 신약 후보물질 탐색뿐만 아니라 기존 FDA 승인 약물을 활용한 drug repositioning 연구에도 적용 가능함.
- 지식재산권 확보 및 BT 산업화 연계
 - 본 연구에서 도출된 당독소 표적 저감화 소재 및 극지 어류 유래 생리활성 물질은 다양한 노화 관련 질환으로의 확장 적용이 가능하며, 신규 물질 및 약리 효능에 대한 지식재산권 확보가 가능함. 이를 기반으로 향후 기술 이전 및 바이오·의약 산업화 전략 수립을 통해 국내 제약·바이오 산업 경쟁력 강화에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

가. 학술적 파급효과

- 극지 어류 및 그 구성성분의 유용 생물소재로서의 활용 가능성을 제시함으로써, 기존 극지 생명과학 연구의 적용 범위를 확장함.
- 당독소물질을 중심으로 한 표적 연구 전략을 통해 극지 생물자원의 바이오·의약 소재, 개발에 대한 새로운 연구 접근법을 제시함.
- 천연물 기반 항노화 및 항퇴행성 신경질환 연구의 기반을 확장함으로써, 다양한 질환 치료제 개발 연구로의 확장 가능성을 확보함.
- 개별적·분절적으로 수행되던 기존 연구와 달리, 당독소물질을 중심으로 한 통합적 연구 체계를 확립함으로써 당독성 연구 분야의 학문적 수준을 제고함.

나. 경제적 파급효과

- 본 연구 결과를 기반으로 한 신규 유효물질 및 표적 전략은 first-in-class 신약 개발 가능성을 제시하며, 고령화 사회에서 증가하는 노화 및 퇴행성 질환 관련 의료 비용 절감에 기여할 수 있음.
- 노화 및 퇴행성 신경질환 관련 제약·바이오 산업 활성화를 통해 국내 제약사의 기술 경쟁력 및 글로벌 진출 기반 강화에 기여할 수 있음.
- 당독소물질 기반 기술은 제약 산업뿐만 아니라 기능성 식품 및 화장품 산업 등으로의 확장이 가능하여, 관련 산업 전반의 부가가치 창출에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구 수행 과정에서 메틸글리옥살(MGO) 및 최종당화산물(AGEs)을 표적으로 하는 항노화 및 퇴행성 신경질환 제어 기술과 관련된 최신 해외 과학기술 동향을 심층적으로 수집·분석함. 이를 통해 당독소 기반의 병리 기전과 치료 전략을 고찰하고, 극지 생물자원의 신규 소재로서의 활용 가능성을 파악하고자 하였음.

1. MGO/AGEs와 신경퇴행성 질환의 병리학적 연관성

최신 해외 연구에 따르면, 메틸글리옥살(MGO)은 뇌 내 포도당 대사 저하(Hypometabolism) 상태에서 축적되기 쉬운 대표적인 당독소 물질로, 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같은 노화 및 퇴행성 뇌질환의 발병 및 진행과 밀접한 연관이 있음이 밝혀짐 [1,2]. 과도하게 축적된 MGO는 단백질 및 지질의 당화(Glycation)를 유도하여 독성 복합체인 최종당화산물(AGEs) 형성을 촉진하며, 이는 신경세포의 기능 저하와 아밀로이드 베타 등 병리 단백질의 응집을 가속화하는 핵심 요인으로 작용함 [2].

2. AGE - RAGE 축(Axis) 기반 신경염증 유발 기전

AGEs는 수용체인 RAGE와 결합하여 하위 염증성 신호전달 경로를 활성화하고, 미세아교세포(Microglia) 및 성상세포(Astrocyte)의 과활성을 유도하여 만성적인 신경염증(Neuroinflammation) 상태를 야기함 [3,4]. AGEs - RAGE 축은 다양한 신경퇴행성 질환에서 공통적으로 관찰되는 주요 병리 기전으로 보고되고 있으며, 질환의 진행 속도를 조절하는 핵심 치료 표적으로 인식되고 있음 [3,5].

3. Glyoxalase 시스템 조절을 통한 당독소 해독 전략

생체 내 방어 기전인 글리옥살레이즈 (Glyoxalase) 시스템, 특히 글리옥살레이즈-1 (Glyoxalase-1, Glo-1) 효소는 세포 내 MGO를 무독성 물질로 해독하는 데 중요한 역할을 수행함. 그러나 노화 및 대사 질환 상태에서는 Glo-1의 활성이 급격히 감소한다는 사실이 보고됨에 따라, Glo-1의 활성을 유지하거나 증강시키는 전략이 당독소 기반의 유망한 치료 접근법으로 주목받고 있음[6,7]. 최근에는 부작용이 적은 천연물 유래 소재를 활용한 Glo-1 활성 조절 및 다중 표적 제어 연구가 활발히 진행되고 있음[8].

4. 항당독소(Anti-glycation) 치료 기술의 최신 동향

최근의 항당독소 치료 전략은 단순한 항산화 작용을 넘어 AGEs 생성 억제, 직접적인 MGO 소거(Scavenging), 가교 결합 분해(AGE-breaking), 그리고 RAGE 신호 차단 등 다각적인 표적 접근 방식으로 발전하고 있음 [9]. 특히, 천연물 기반의 기능성 소재는 MGO 소거 활성과 항산화, 항염증 효능을 동시에 발휘할 수 있어(Multi-target), 합성 의약품의 한계를 보완할 수 있는 대안적 치료 전략으로 높게 평가됨 [10].

5. 극지 생물자원의 신경보호 활성 및 소재화 연구

극지 생물은 저온 및 고산화 스트레스 등 극한 환경에 적응하는 과정에서 특이적인 2차 대사산물을 생합성하며, 이들 중 일부 성분은 강력한 항산화 및 신경보호 효능을 나타내는 것으로 보고됨 [11]. 특히 극지 어류 유래 대사체는 신경퇴행성 질환 제어를 위한 신규 후보 소재로서의 활용 가능성이 지속적으로 제시되고 있으며, 기존 육상 자원과는 차별화된 신규소재 pool로서 그 가치를 인정받고 있음[12].

6. 종합 분석 및 기술적 시사점

해외 연구 동향을 종합적으로 분석한 결과, MGO/AGEs를 중심으로 한 당독소 제어 전략은 노화 및 신경퇴행성 질환의 예방과 치료를 위한 핵심적인 접근법으로 자리 잡고 있음. 따라서 본 연구에서 수행한 극지 생물자원을 활용한 다중 표적(MGO 소거, 신경염증 억제 등) 제어 기술 개발은 글로벌 연구 트렌드에 부합하며, 향후 극지어류 자원 및 물질 기반 고부가가치 기능성 소재 및 차세대 치료제 개발을 위한 중요한 기술적 토대가 될 것으로 사료됨.



제 7 장 참고문헌

- [1] Gayger F, Dias-Silva D, Canto C, et al. Methylglyoxal, a Knot to Be Untied in Brain Glucose Hypometabolism. *Metabolites*. 2025;15(11):690.
- [2] Lai D, Gonzalez J, Shadfar S, et al. Methylglyoxal and Its Adducts: Induction, Repair, and Association with Disease. *Antioxidants*. 2022;11(10):2096.
- [3] Bhattacharya R, Alam MR, Kamal MA, et al. AGE-RAGE axis culminates into multiple pathogenic processes: a central road to neurodegeneration. *Front Mol Neurosci*. 2023;16:1155175.
- [4] Dong H, Zhang Y, Huang Y, Deng H. Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2022;13:931473.
- [5] Gasparotto N, Fão L, Rocha SM, Rego AC. Defining the role of RAGE in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2024;161(4):519 - 545.
- [6] Xue M, Weickert MO, Qureshi S, et al. Exploring the Interplay with the Glyoxalase System. *Antioxidants*. 2024;13(2):212.
- [7] Rabbani N, Thornalley PJ. Glyoxalase 1 modulation in obesity and diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30(11):1425 - 1447.
- [8] Xue M, Rabbani N, Momiji H, et al. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2. *Biochem J*. 2012;443(1):213 - 222.
- [9] Targeting the AGEs - RAGE axis: pathogenic mechanisms and therapeutic strategies. *Front Med (Lausanne)*. 2025;12:1667620.
- [10] Ahmad S, Akhter F, Shahab U, et al. Role of medicinal plants in AGE formation. *Food Chem Toxicol*. 2021;153:112272.
- [11] Patel S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds. *Biotech*. 2012;2(3):171 - 185.
- [12] Moffett JR, Ross B, Arun P, et al. N-Acetylaspartate in the CNS. *Prog Neurobiol*. 2007;81(2):89 - 131.

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.