

Methoxy PEG-45 Thioclate (LA-PEG)의 항노화 효과에 대한 연구

김진화[†] · 오정영 · 배준태 · 이근수 · 표형배

(주)잇츠한불 기술연구원

(2017년 9월 16일 접수, 2017년 9월 25일 수정, 2017년 9월 26일 채택)

Effect of Methoxy PEG-45 Thioclate (LA-PEG) against Oxidative Protein Damage and Anti-glycation

Jin Hwa Kim[†], Jung Young Oh, Jun Tae Bae, Geun Soo Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, IT'S HANBUL, 634 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 06101, Korea

(Received September 16, 2017; Revised September 25, 2017; Accepted September 26, 2017)

요약: 노화는 생리학적으로 비가역적으로 일어나는 과정으로 노화가 진행됨에 따라 단백질의 산화화학반응 등으로 노화징후가 축적된다. 활성산소와 당화된 최종 당화산물(advanced glycation endproducts, AGEs 최종 당화산물)은 생체 조직과 세포를 공격하여 노화를 촉진한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 항산화 물질로 알려진 aminoguanidine을 양성 대조군으로 anti-glycation 효과를 확인하였으며, methoxy PEG-45 thioclate (LA-PEG)를 농도별로 처리하여 anti-glycation 효과를 평가하였다. 실험결과 LA-PEG는 매우 우수한 anti-glycation 효과로 최종 당화산물(AGEs) 생성억제 활성이 매우 우수하게 나타났으며, 항산화 효과와 밀접한 연관을 나타냈다. 또, 세포노화 지표물질인 senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 활성을 사람 섬유아세포(HDF)를 이용하여 확인한 결과, LA-PEG를 처리하였을 때 염색된 세포의 수가 감소하여 세포의 senescence를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구결과, LA-PEG의 anti-glycation 효과 및 산화로 인한 단백질 손상에 대한 보호 효과가 우수하게 나타났으며, 항노화 화장품에 적용 시 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: Aging is a physiological and irreversible, progressive process involving changes in the ability to maintain cellular functionality. It affects tissues, organs and the whole organism and thus finally cause to death. Oxidative stress has been postulated to contribute significantly to the accelerated accumulation of advanced glycation endproducts (AGEs) in collagen, which is implicated in the process of skin aging. In the present study, glycation inhibitory activity of methoxy PEG-45 thioclate (LA-PEG), and its inhibitory effect of cellular oxidation and senescence was investigated. Treatment of LA-PEG significantly showed lower fluorescent intensity induced by AGEs. In addition, LA-PEG was significantly reduced the formation of ROS induced by AGEs. High antioxidant and anti-glycation activities of LA-PEG in glycated collagen model indicated its contribution to anti-aging process. Cellular senescence leads to an increase in senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity, which can be used as a biomarker to identify senescent cells. Treatment with LA-PEG showed a dose-dependent, statistically significant decreased in SA- β -gal indicating reduced senescence. These results suggest that LA-PEG may have potent anti-aging effects and can be used as new functional materials against cellular accumulation of AGEs.

Keywords: anti-glycation, advanced glycation endproducts (AGEs), antioxidant, cellular senescence, anti-aging

[†] 주 저자 (e-mail: kjhi@itshanbul.com)
call: 043)879-2260

1. 서 론

피부 노화는 내인성 노화와 광노화로 나누어진다. 자연적으로 노화된 피부는 얇고, 미세한 주름이 형성되는 반면 광노화된 피부는 거칠고 두꺼우며, 깊은 주름이 형성된다. 또한 광노화는 얼룩덜룩한 색소침착, 일광흑색점, 모세관확장증, 탄력저하 등이 일어난다. 노화에서 산화적 스트레스의 역할은 이미 중요한 과학적 연구가 진행되어 왔으며, 항산화제는 프리라디칼을 소거하고 다양한 생물학적 효과를 나타낸다. 최근 연구에서 피부노화를 조절하는데 중요한 유전자 요인에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 피부 노화에 관련된 유전자 변화는 젊은 피부와 내인성 노화, 광노화 피부에서 비교 연구되고 있다. 이러한 연구들을 통하여 피부 노화는 지방생합성, keratin filaments의 형성, cornified envelope의 형성 등에 관련된 유전자 발현의 감소와 관련이 있다는 것이 밝혀지고 있다. 이것은 피부 장벽기능의 손상과 건조현상이 노인 환자에게 나타나는 것을 설명해주는 것이다. 광노화 피부에서는 콜라겐을 분해하는 효소의 전사인자의 발현이 증가하며, 콜라겐 합성이 감소하여 피부가 얇아지고, 주름이 생성된다[1-3].

산화에 의한 단백질 손상은 노화 과정에 필수적인 역할을 한다. 생명체가 산소호흡하는 과정에서 reactive oxygen species (ROS)에 지속적으로 노출되어 있으며, ROS는 생체 내의 다양한 신진대사 과정 중에 부산물로 나타나고, 외부의 자외선, 대기오염, 담배연기, 약물 등의 외부 환경으로 과도하게 생성되고 있다. ROS는 크게 두 가지 역할을 한다. 낮은 농도의 ROS는 세포의 생리학적 기능에 필수적이지만, 높은 농도일 경우 세포손상을 유발한다. ROS는 세포신호전달과 병원균 방어 조절 시스템 등에서 효과적으로 작용하지만, 외부 환경 등으로 인해 고농도가 될 경우 세포를 손상시키고, 노화를 촉진시키게 된다.

단백질 산화는 protein backbone이나 specific amino acids side chains에서 나타날 수 있으며, 이로 인해 펩타이드 결합이 잘리거나 단백질 cross-linking이 될 수 있다. 단백질 산화는 3단계로 나눌 수 있으며, 1단계는 조금 산화된 형태로 단백질 구조는 변형되지 않았으나 단백질의 기능/활성이 저해된다. 2단계는 산화적 변성이 증가하여 protein unfolding이 일어나 단백질의 활성

이 완전 소실되고, 단백질 구조가 재배열되어 protein core의 소수성 부분이 드러나 proteasome에 잘 인식되어 분해가 시작된다. 산화물의 농도가 더 높아지면, proteolysis에 높은 감수성으로 손상된 단백질이 분해되어 항상성을 유지하게 된다. 하지만, 3단계에서는 단백질이 더 산화되어 cross-linking이 일어나고, proteolytic susceptibility가 저하되어 더 이상 proteasomal system에 의해 분해되지 않고, insoluble protein aggregates가 세포에 축적되어 손상을 일으킨다[4-5].

고농도의 당분(sugar) 섭취는 혈액과 피부에 당분의 함량을 증가시킨다. 피부에 있는 대부분의 당분은 단백질과 결합되어 있고, 당분섭취를 조절함으로써 효과적으로 피부의 당분함량을 줄일 수 있다. 당뇨병에서 혈당은 단백질, 지방, 핵산과 관련이 있으며, advanced glycation end products (AGE)를 형성하게 된다. AGE는 직접적으로 당뇨병에 연관되어 있으며, vascular disease, nephropathy, retinopathy, and neuropathy와도 관련이 있다[6-7]. 피부에서 primary AGE는 glycated collagen이다. Glycated collagen은 covalent bonds로 콜라겐을 딱딱하게 만들며, collagen repair mechanisms을 방해한다. Glycated collagen은 당뇨병에서 나타나는 vascular changes, poor wound healing and skin stiffness와 관련이 있다. 이러한 콜라겐의 glycation은 정상적인 노화과정에서도 일어나며, glycated collagen은 20세기 후반부터 나타나기 시작하여 매년 3.7% 정도씩 증가하고 있다. Glycated collagen의 증가는 식이에 따라 다양하며, sun exposure로도 증가된다. 당류와 더불어 여러 식품으로부터 AGE가 형성되며, 이것은 콜라겐과 다른 단백질들을 당화시킨다. 요리법 중 grilling, frying, and roasting 등도 AGE가 형성과 관련이 있으며, 이러한 AGE는 장내의 normal intestinal flora 형성도 방해한다. 이러한 gut flora의 변화는 영양물질의 흡수에 영향을 미치며, 염증반응과도 관련이 있다. Glycation (당화현상)은 음식이나 체내의 단백질 N-terminal의 아미노기나 lysine이 비효소적 반응으로 과당(fructose)이나 포도당(glucose) 등에 결합하는 현상으로 이는 단백질에 국한되는 것이 아니라 핵산(nucleotide)과 지질(lipid)에도 일어날 수 있다. 이러한 당화 현상은 세포노화(senescence)가 진행됨에 따라 나타나며, 설탕을 많이 함유하는 음식이나 탄 고기, 케이크 등을 많이 섭취하면 당화가 촉진되어 결국 기능을 상실한 당화

산물을 만들어 내게 된다. AGEs가 생성되면 곧 혈관 벽이나 림프구 등의 세포막에 AGE와 결합할 수 있는 수용체(RAGE: Receptor of AGEs)가 만들어지는데, AGEs가 RAGE에 결합하면 염증과 관련된 각종 면역 인자가 활성화되어 만성질환을 유발하거나 악화시킨다[8-9]. 당 성분은 가공 과정 중 Maillard reaction products (MRPs)와 풍미를 증진시키는 갈색 성분을 형성하기도 하나, 이 반응의 최종당화생성물들은 또 다른 물리화학적 특성을 지닌 고분자 물질인 carboxymethyl-lysine (CML)을 생성한다. CML은 최종당화산물인 AGEs의 생성 정도를 나타내는 대표적인 마커로 잘 알려져 있어 anti-glycation 연구에 중요한 결과로 사용될 수 있다[10-11].

본 연구에서는 단백질의 아미노기와 당의 카르보닐기와 결합한 최종당화산물(AGEs)의 생성 억제 효과, RAGE 발현량, CML 생성량을 평가하여 anti-glycation 효과를 확인하는 시험을 실시하였으며, 활성물질을 농도별로 세포에 처리하여 anti-glycation 효과를 평가하고, 관련된 세포내 항산화 및 세포노화(cellular senescence)에 대한 저해효과를 측정함으로써 피부세포노화를 개선시킬 수 있는 효능이 있는지 알아보았다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 aminoguanidine 및 각종 시약은 Sigma 제품(USA)을 사용하였다. Methoxy PEG-45 thiocstate (LA-PEG)는 여명바이오켄(CJ, Korea)에서 구입하였으며[12], Collagen glycation assay kit는 Cosmo Bio (Japan)로부터 구입하여 실험하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS)는 Gibco에서 구입하였으며(USA), RAGE, GAPDH antibodies는 Cell Signaling Technology (CST, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. Anti-glycation Assay

당의 카르보닐기와 단백질의 아미노기와 결합한 최종당화산물(AGEs)의 생성 억제 효과를 평가하여 anti-glycation 효과를 확인하는 시험으로 최종당화산물의

단백질 교차결합 부분 일부는 형광을 띄어 반응물의 생성 정도를 형광도로 측정할 수 있다. 5 mL의 neutralizing solution을 collagen solution에 넣고 잘 섞어준 다음 50 μ L의 collagen solution을 96-well plate에 넣는다. 양성대조군인 20 mM aminoguanidine solution을 sample dilution buffer로 희석하여 준비한다. 실험용 샘플을 sample dilution buffer로 희석하고, 각 well에 positive control or samples를 40 μ L 넣었다. 10 μ L의 500 mM glyceraldehyde solution을 각 well에 넣고 잘 섞어준 후 standard and sample wells을 a fluorescent microplate reader (the excitation wavelength of 370 nm and an emission wavelength of 440 nm)로 바로 측정하였다(before incubation (0 h)). 37 $^{\circ}$ C에서 24 h 동안 고습도 incubator에 두고, 24 h 후 standard and sample wells을 a fluorescent microplate reader (the excitation wavelength of 370 nm and an emission wavelength of 440 nm)로 측정하였다. Incubation 전후의 형광값을 비교하여 anti-glycation 효과를 확인하였다.

2.2.2. 세포 배양

섬유아세포(human dermal fibroblasts, HDFs)는 ATCC로부터 구입하였고, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 세포를 실험에 이용하였다.

2.2.3. 세포내 항산화 효과

섬유아세포(HDFs)를 96-well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. 자외선(UVB) 조사 전에 배양 배지를 제거한 후 HCSS (HEPES-buffered control salt solution: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 2.3 mM CaCl₂, 15 mM Glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)로 세척하여 배지내 serum 성분을 제거하였다. 4 μ M CM-DCFDA (molecular probe, USA) in HCSS with 0.1% Pluronic F-127 (molecular probe, USA)를 빛이 들어가지 않도록 주의하여 처리한 후 37 $^{\circ}$ C 20 min 반응시킨 후 실험원료를 농도별로 처리해 준다. 37 $^{\circ}$ C 30 min 반응시킨 후 20 mJ/cm² UVB (UVBG15T8E, SankyoDenki, Japan)를 조사하였다. 모든 시료를 처리 후 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 시간별(20 min, 1 h, 2 h)로 luminescence spec-

trophotometer (Perkin Elmer, UK)를 사용하여 형광값을 측정하였다. DCF를 488 nm에서 흥분시키고, 525 nm에서 방출시켜 luminescence spectrophotometer (Perkin Elmer, UK)를 이용하여 세포 내 형광값을 측정하였다.

2.2.4. Cell Senescence (SA Beta-gal.)

세포 노화는 세포 노화 측정의 바이오마커로 사용되는 β -galactosidase를 이용하여 염색하는 방법인 SA- β -gal assay를 통해 측정하였고, 이를 위해 senescence detection kit (Sigma, USA)를 사용하였다. HDFs를 60 mm culture dish에 접종하여 24 h 동안 배양하여 안정화 시킨 후 시료를 처리한 후 다시 24 h 동안 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 제거하고 1 mL PBS로 1회 세척 후 0.5 mL fixing solution을 첨가하여 상온에서 15 min 방치하여 고정화하였다. 고정된 세포는 다시 1 mL PBS로 2번 세척한 후 staining solution mix (staining solution 470 μ L, staining supplement 5 μ L, 20 mg/mL X-gal in dimethylformamide 25 μ L)를 0.5 mL씩 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 24 h 동안 염색을 하였다. 염색된 세포는 1 mL PBS로 세척 후 1 mL 70% glycerol을 넣고 광학현미경 (Olympus, Japan)을 통하여 염색된 세포 수를 측정하였다. 염색된 세포의 측정은 각 plate당 동일한 5곳의 위치에서 사진을 촬영한 후, 전체 세포의 수와 염색된 세포의 수를 계수하여 시행하였다.

2.2.5. N ϵ -(carboxymethyl) lysine (CML) 함량측정

대표적인 당화산물인 N ϵ -(carboxymethyl) lysine (CML)은 주요 AGE 구조를 가지는 물질로 enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) kit (Cell Biolabs, Inc., USA)를 이용해서 함량을 측정하였다. 샘플의 흡광도는 CML-BSA standard와 비교하여 정량하였다.

2.2.6. Protein Extraction and Western Blotting

시료를 처리한 세포를 RIPA buffer (10 mM sodium fluoride, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM DTT, 500 μ M sodium orthovanadate, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 1 mM PMSF)로 용해하고 원심 분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 10% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 5% skim milk가 함유된 tris 완충용액에서 RAGE (primary anti-RAGE antibody (CST 4679, 1:

2000; Cell Signaling Technology (CST), Danvers, MA, USA)), GAPDH (CST, Danvers, MA, USA) 항체와 각각 반응시켰다. Secondary antibody로 anti-rabbit IgG를 1 h 반응시킨 후 washing하고 Supersignal West Pico Trial kit (Thermo prod# 34079, USA)를 이용하여 검출하였다.

2.3. Statistical Analysis

본 연구의 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였고 통계자료의 값은 mean \pm S.D.로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA) 프로그램을 이용하였으며, Student's *t*-test 및 one-way ANOVA 검정을 적용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. LA-PEG의 Glycation 생성 억제효과

Anti-glycation 효과 평가는 glyceraldehyde를 이용하여 단기간에 glycation을 유도하는 조건에서 진행하였으며, LA-PEG 및 aminoguanidine에 대한 농도별 실험을 진행하였다. 실험결과 LA-PEG 0.1 mM에서 45% 이상의 anti-glycation 효과 및 0.5 mM에서 85% 정도의 저해 효과로 최종 당화산물(AGEs) 생성 억제 활성이 매우 우수하게 나타났으며, anti-glycation agent로 알려진 aminoguanidine과 비교한 결과 농도별로 우수한 anti-glycation 효과가 있는 것을 확인하였다(Figure 1).

3.2. 세포 내 항산화 효과

피부세포에서 자외선 조사에 의해 생성된 프리라디칼은 형광물질 생성량을 측정함으로써 확인할 수 있으며, 실험결과는 Figure 2에 나타내었다. 양성 대조군으로 EGCG를 이용하여 LA-PEG의 세포 내 항산화 효과 측정 결과, LA-PEG 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM 농도에서 각각 21.4%, 55.7%, 76.2%, 85.5%로 농도 의존적으로 프리라디칼 저해효과가 우수하게 나타났으며, EGCG와 비교하였을 때도 우수한 저해 효과가 있는 것으로 나타났다(Figure 2).

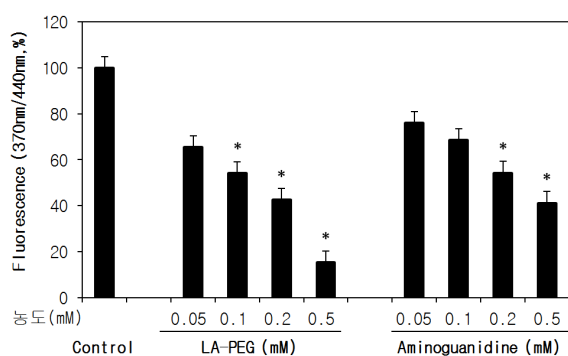


Figure 1. Anti-glycation effects of LA-PEG on glycerinaldehyde-derived AGE formation. Collagen gel was incubated with glycerinaldehydes in the absence (control) and presence of various concentrations from both LA-PEG and aminoguanidine (0.05-0.5 mM) for 24 h, respectively. Aminoguanidine was used as a positive control. Fluorescence of samples was measured at Ex 330 nm and Em 420 nm. Results were expressed as the average of triple determinations with S.D. * $p < 0.05$, significantly different from control.

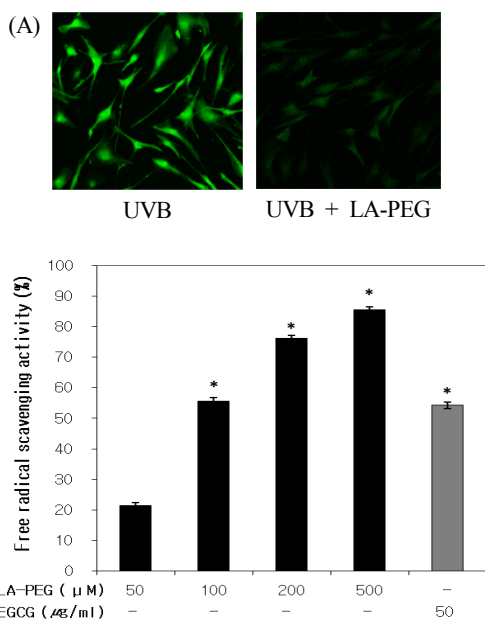


Figure 2. The effects of LA-PEG on the production of intracellular ROS in human dermal fibroblasts (HDFs). HDFs were incubated with 4 μ M CM-H₂DCFDA for 20 min, and irradiated by UVB 20 mJ/cm². (A) Confocal microscopic observation of ROS by CM-H₂DCFDA staining in cultured HDFs, (B) Various concentrations of LA-PEG were used for treatment. ROS generation was assessed by luminescence spectrophotometer. The values of DCF fluorescence are significant (* $p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm S.D.

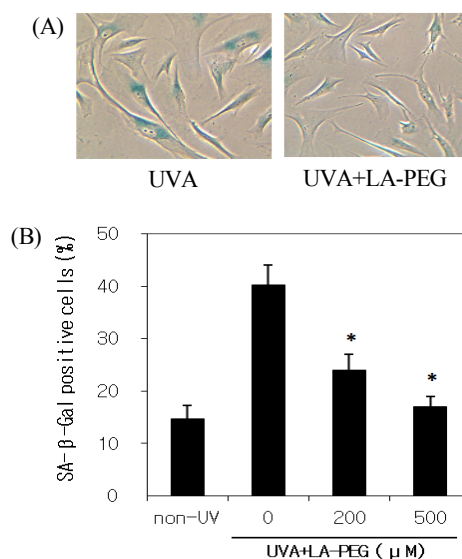


Figure 3. (A) Effects of LA-PEG on UVA-induced photoaging feature of HDFs tested by cytochemical staining of SA- β -gal (light microscopy, $\times 200$). (B) Senescent cells were measured by HDFs pretreated with LA-PEG and indicated by percentage of decrease in comparison with that of UVA-irradiated HDFs as a control. The activity is significant (* $p < 0.05$) and the values are mean \pm S.D.

3.3. Senescence Associated β -galactosidase 활성 평가

X-gal은 lactose의 유사체로서 β -galactosidase에 의해서 galactose와 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole로 분해된다. X-gal로부터 분해된 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole은 dimer를 형성하여 파란색을 띄게 된다. β -galactosidase는 senescence가 발생한 세포에서 특히 발현이 높기 때문에 노화된 세포에 X-gal을 처리하면 세포가 파란색으로 염색된다.

자외선에 의해 증가된 세포노화 지표물질인 senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 활성을 확인한 결과, LA-PEG를 처리하였을 때 염색된 세포의 수가 급격히 감소하여 세포의 senescence를 억제하는 것으로 나타났다(Figure 3). 이는 LA-PEG의 항산화 활성을 통하여 세포의 산화스트레스에 대한 저항성을 증가시키고 활성 산소를 감소시켜 세포손상 방어 및 세포 노화를 억제하는 것으로 생각된다.

3.4. CML 생성 저해 효과

Glyoxal은 glycation product의 중간체로 단백질과 반응하여 빠르게 AGEs를 생성시킨다. 최종당화생성물들

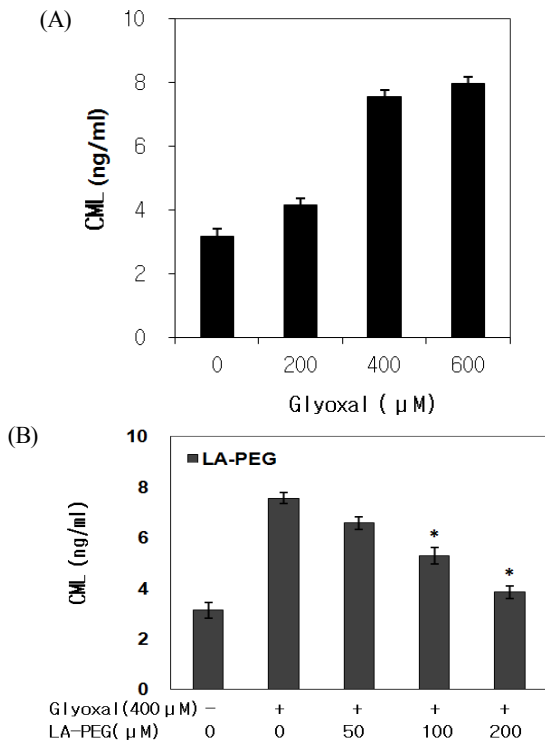


Figure 4. Effects of LA-PEG on N ϵ -CML formation to HDFs induced by glyoxal. (A) Cells were treated with various concentrations of glyoxal for N ϵ -CML production, (B) Inhibitory effect of LA-PEG on glyoxal-induced N ϵ -CML formation. Results are the mean \pm S.D. of triplicate samples. * p < 0.05 compared with control.

은 고분자 물질인 CML (carboxymethyl-lysine)을 생성하며, CML은 최종당화산물인 AGEs의 생성 정도를 나타내는 대표적인 마커로 사용될 수 있다.

섬유아세포에 glyoxal 농도별로 처리하고 5일 동안 배양 후 CML 생성량을 측정된 결과 glyoxal 농도 의존적으로 증가하였으며, glyoxal 400 μ M 농도에서 세포독성 없이 CML이 생성되는 것을 확인하였다(Figure 4A).

Glyoxal 처리 후 피부세포에서 CML 생성이 증가하는 것을 확인하였으며, glyoxal 처리 시 증가되었던 CML 생성이 LA-PEG를 농도별로 처리함으로써 감소되는 것으로 나타났다(Figure 4B).

3.5. 섬유아세포에서 Glyoxal로 유도된 RAGE 생성 저해 효과

Glyoxal은 fructosyl-lysine and N-terminal amino acid residue-derived fructosamines로부터 생성된 glycation

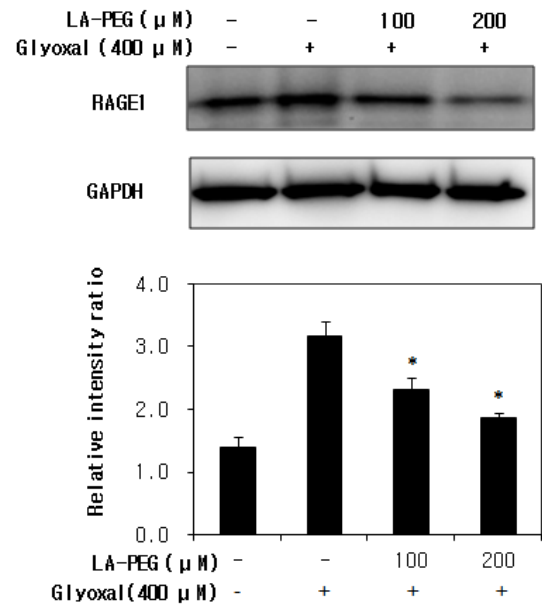


Figure 5. Effects of LA-PEG on RAGE expression in HDFs. The HDF cells were treated with different doses of LA-PEG for 24 h. Total RAGE expression was determined by western blotting. The band intensities were quantified by densitometry, normalized to the level of GAPDH. All data are shown as mean \pm S.D. of at three independent experiments. * p < 0.05 compared with control.

product의 중간체로 단백질과 반응하여 빠르게 AGEs를 생성시킨다. 섬유아세포에서 glyoxal을 농도별로 처리한 결과 RAGE의 생성량이 증가하는 것을 확인하였으며, glyoxal 400 μ M 농도에서 세포독성 없이 RAGE 생성이 가장 높게 생성되는 것으로 나타났다.

Glyoxal 400 μ M 처리 조건에서 LA-PEG를 농도별로 처리한 결과 농도의존적으로 RAGE의 생성량이 감소되어, 세포내 신호전달과정에서도 anti-glycation 효과가 나타나는 것으로 확인되었다(Figure 5).

4. 결 론

본 연구는 노화가 진행되면서 생성되는 최종당화산물(AGEs)의 생성을 평가함으로써 피부 속 노화 및 탄력 저하 현상을 개선할 수 있는 항노화 신소재를 개발하고자 하였다. Anti-glycation 효과는 최종당화산물의 단백질 교차결합 부분의 일부가 형광을 띄어 반응물의 생성 정도를 형광도로 측정할 수 있었으며, *in vitro* 실

험법 세팅으로 다양한 신소재에 대한 스크리닝이 가능하며, 선별된 소재에 대해 세포단계에서의 최종당화산물(AGEs) 발현량 평가도 가능하다. LA-PEG는 우수한 anti-glycation 효과로 최종 당화산물(AGEs) 생성 억제 활성이 매우 우수하게 나타났다. 세포내 항산화효과 및 세포노화 지표물질인 SA- β -gal 활성 저해 효과도 확인할 수 있었으며, glyoxal을 사용하여 사람 피부세포에서 AGE관련 물질인 CML과 RAGE의 발현량도 확인하였다. Glyoxal로 인해 증가된 CML과 RAGE 발현량이 LA-PEG 농도별 처리에 의해 농도의존적으로 감소하는 효과를 나타내었다.

기존에 미백제로 알려진 LA-PEG는 시험 결과 다양한 메카니즘의 항노화 효과를 나타내어 미백 기능과 함께 복합적인 노화 개선 화장품으로 적용 가능할 것으로 생각된다.

Reference

1. G. Jenkins, Molecular mechanisms of skin ageing, *Mech. Ageing. Dev.*, **123**, 801 (2002).
2. E. J. Middleton, C. Kandaswami, and T. C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.*, **52**(4), 673 (2000).
3. E. Naru, T. Suzuki, M. Moriyama, K. Inomata, A. Hayashi, K. Arakane, and K. Kaji, Functional changes induced by chronic UVA irradiation to cultured human dermal fibroblasts, *Br. J. Dermatol.*, **153**, 6 (2005).
4. T. Jung, B. Catalgol, and T. Grune, The proteasomal system, *Mol. Aspects Med.*, **30**(4), 191 (2009).
5. K. Bedard and K. H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol Rev.*, **87**, 245 (2007).
6. K. Nowotny, T. Jung, T. Grune, and A. Hohn, Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging, *Exp. Gerontol.*, **57**, 122 (2014).
7. T. Kueper, T. Grune, S. Prahl, H. Lenz, V. Welge, T. Biernoth, Y. Vogt, G. M. Muhr, A. Gaemlich, T. Jung, G. Boemke, H. P. Elsasser, K. P. Wittern, H. Wenck, F. Stab, and T. Blatt, Vimentin is the specific target in skin glycation, structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging, *J. Biol. Chem.*, **282**, 23427 (2007).
8. M. A. Baraibar and B. Friguet, Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging, *Exp. Gerontol.*, **48**, 620 (2013).
9. S. Y. Tang, M. Whiteman, Z. F. Peng, A. Jenner, E. L. Yong, and B. Halliwell, Characterization of antioxidant and antiglycation properties of active ingredients from traditional chinese medicines, *Free. Radic. Biol. Med.*, **36**, 1575 (2004).
10. S. Shin, J. A. Lee, M. Kim, H. Kum, E. Jung, and D. Park, Anti-glycation activities of phenolic constituents from *Silybum marianum* (milk thistle) flower *in vitro* and on human explants, *Molecules*, **20**, 3549 (2015).
11. H. Pigeon, H. Zucchi, Z. Dai, D. R. Sell, C. M. Strauch, V. M. Monnier, and D. Asselineau, Biological effects induced by specific advanced glycation end products in the reconstructed skin model of aging, *Biores. Open. Access.*, **4**(1), 54 (2015).
12. J. H. Kim, G. S. Sim, J. T. Bae, J. Y. Oh, G. S. Lee, D. H. Lee, B. C. Lee, and H. B. Pyo, Synthesis and anti-melanogenic effects of lipoic acid-polyethylene glycol ester, *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**(7), 863 (2008).