

비타민 C가 *in vitro* 계에서 콜라겐 미숙가교 생성에 미치는 영향

김 미 향

신라대학교 식품영양학과

The Effect of L-Ascorbic Acid on the Formation of Immature Crosslink in Bone Collagen *in vitro*

Mi-Hyang Kim

Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Pusan 616-736, Korea

Abstract

Intermolecular collagen cross-links stabilize collagen fibrils and are necessary for normal tensile strength in collagen fibrils. Once the fibrils are aligned, hydroxylysine, hydroxylysine-derived aldehyde modified enzymatically, reacts with hydroxylysine to form the dehydrodihydroxylysino-norleucine (DHLNL), an immature crosslink. Pyridinoline, one of matured cross-links is presumably formed nonenzymatically through condensation of DHLNL and hydroxylysine residue. It is widely distributed in hard connective tissues such as cartilage, bone and tendon. L-ascorbic acid(AsA) is well known to be required for the enzymatic hydroxylation of proline and lysine in collagen fibrils. The purpose of this study is to clarify the role of AsA on the biosynthesis of DHLNL *in vitro*. We examined the effect of AsA on the formation of hydroxylysine and DHLNL in collagen. Pyridinoline and DHLNL were measured as a function of time. The contents of DHLNL was increased, reached maximum within 2 hr and was held until 24 hr, then it decreased slowly. On the contrary, pyridinoline increased gradually after 24 hr and continued to increase for 2 weeks. Moreover, the contents of DHLNL remarkably decreased at 60 min after incubation, the contents of DHLNL was decreased by addition of AsA or dehydroascorbic acid(DHA). These results suggest that the supplementation of AsA causes decrease in DHLNL formation and pyridinoline formed by nonenzymatic reaction of DHLNL.

Key words: collagen, pyridinoline, lysyl oxidase, hydroxylysine, immature crosslink, dehydrodihydroxylysino-norleucine

서 론

연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen 은 가용성 procollagen 분자로서 합성되어 분자내 또는 분자간에 다수의 가교를 형성하여 collagen 섬유가 된다(1-8). 이때 collagen 가교는 연령과 함께 변화하며, 이러한 변화는 collagen의 불용화, 물리적·화학적 안정성의 증가를 초래한다고 알려져 있다(9). 노화에 의한 결합조직의 변화는, 특히 섬유 구성성분의 주체인 collagen 안정성의 증가이며, 가교 증가에 의한 collagen 불용화는 조직 경화를 일으킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다. Collagen 중의 가교형성은 주로 성장과정에서 이루어지며, 연령과 함께 단순히 증가하는 것이 아니라, 질적으로도 변화하며, 지금까지 미숙가교, 성숙가교, 노화가교의 존재가 보고되어 있다(10). Collagen 성숙 가교의 하나인 pyridinoline은 hydroxylysine 1분자와 hydroxyallysine 1분자가 결합하여 생성되는 collagen 미숙가교인 dehydrodihydroxylysino-norleucine(DHLNL)과 hydroxyallysine 1분

자가 결합하여 생성되며(11-14), hydroxylysine의 생성에는 AsA를 필요로 한다(15,16).

AsA는 예로부터 항괴혈병 인자로 알려져 왔으나, 최근에는 새로운 생리적 역할에 주목하여 장기간에 걸친 건강의 유지, 증진을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(17-22). Collagen 생합성에 미치는 AsA 영향에 관한 보고는 많으나, 노화에 의하여 나타나는 다양한 현상에 대한 AsA 작용 여부는 확실하지 않은 경우가 대부분이다.

앞서의 보고에서 저자는 비타민 C(ascorbic acid; AsA)가 collagen 성숙가교인 pyridinoline 생성에 미치는 영향을 조사하였다(23). 그 결과, AsA는 효소적 반응에서 반응 초기에 일부 환원형 비타민 C(AsA)로서 작용하나 산화형 비타민 C(dehydroascorbic acid; DHA)로서 pyridinoline 생성을 더욱 억제하는 것으로 나타났다. Collagen 분자의 생합성을 촉진하는 AsA가 collagen 분자중의 pyridinoline 생성을 억제하는 실험 결과만으로는 AsA가 미숙가교인 DHLNL의 생성에 영향을 주는 것인지 또는 중간 생성물인 hydroxylysine의 생성에 관여하는지 확실하

지 않다. AsA가 DHLNL 생성을 억제하거나 hydroxylysine의 ϵ -amino기와의 반응을 촉진한다면, 성장기에 과도한 pyridinoline 생성을 막을 수 있고, 노화와 나타나는 collagen 불용화에 의한 조직 경화를 억제하는 수단이 될 것으로 기대할 수 있다.

이와 관련하여 본 실험에서는, hydroxyllysine 등의 collagen 가교를 포함하지 않는 열가용성 collagen을 시료로 사용하여, AsA가 collagen 분자간의 미숙가교의 생성에 어떻게 관여하고 있는지 명확하게 밝히는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Dehydroascorbic acid(DHA)는 Sigma Chemical Company(USA)로부터 구입하였고, ascorbate(AsA-Na), β -aminopropionitrile, hydroxyproline, hydroxylysine은 (주)和光純藥工業(Japan)에서 구입하였다. Sodium borohydride [^3H]는 Du Pont Company로부터, scintisol 500은 (주)同人化學(Japan)으로부터 구입하였다. 소의 대동맥은 (주)東京芝浦臓器(Japan)에서 도살직후의 신선한 것을 구입하였다. DHLNL과 pyridinoline standard는 각각 Fujii 등과 Fujimoto 등의 방법에 의해 추출하였다(10,17). 2,3-diketo-L-gulonic acid(DKG)는 香川 등의 방법에 의하여 합성하였다(24). 합성한 DKG는 dinitrophenylhydrazine 법 및 HPLC에 의해 순도를 조사하여, 98%이상의 것을 사용하였다.

열 가용성 collagen의 추출

가교가 거의 존재하지 않는 열 가용성 collagen은 소의 연골을 전 처리하여 1M NaCl을 포함하는 완충액(0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.5)으로 4°C에서 2시간 추출하였다(Fig. 1). 원심분리에 의해 얻어진 상등액에 NaCl을 첨가하여 최종농도 20%로 조정된 후 4°C에서 하룻밤 교반하여 원심분리에 의해 상등액의 비 collagen 성분을 제거하였다. 얻어진 침전물은 0.15M NaCl을 포함하는 완충액(0.1M Na_2HPO_4 buffer, pH 7.8)을 사용하여 투석한 후 원심분리하여 상등액을 기질로 하였다.

효소 lysyl oxidase의 부분정제

Lysyl oxidase의 조제법을 Fig. 2에 나타내었다. 지방을 제거한 소의 대동맥 20g에 완충액 A(0.15M NaCl/ 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.8)를 40ml 가하여 균질화한 후 원심분리(17,000g, 10 min)에 의하여 얻어진 침사에 완충액 B를 가하여 효소를 추출하였다. 얻어진 초효소액을 전처리한 DEAE-52 cellulose column에 부하하여 용출액이 280nm에서 흡광도 0.3 이하가 될 때까지 완충

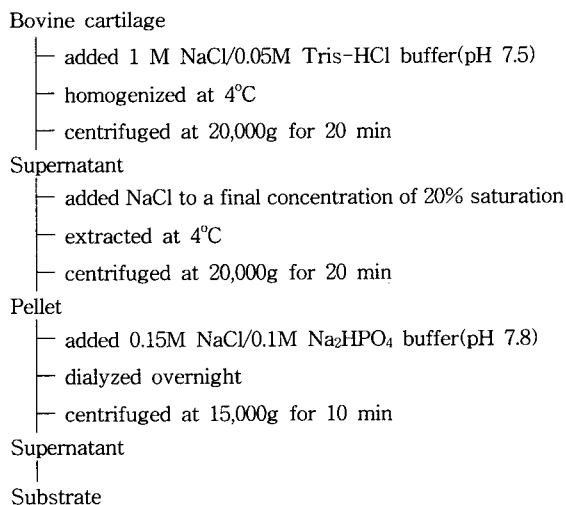
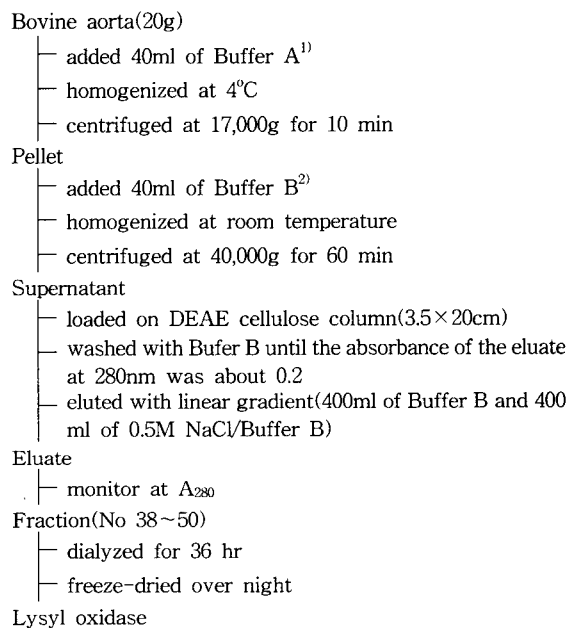


Fig. 1 Preparation of substrate from bovine cartilage.



¹⁾Buffer A : 0.15 M NaCl/0.1 M Na_2HPO_4
²⁾Buffer B : 6 M Urea/0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)

Fig. 2. Purification of lysyl oxidase by DEAE cellulose ion-exchange column chromatography.

액 B로 세정하였다. Buffer B를 혼합조에 0.5M NaCl/ buffer B를 보급조에 넣고 직선적농도균배법에 의해 용리하였다. 용출액은 fraction collector를 이용하여 9ml씩 분획하여 자외선 280nm에서 흡광도 0.2 이상을 나타내는 용출획분을 모아, 완충액 B 중에서 2일간 투석하였다. 이상의 조작에 의해 얻어진 투석내액을 초효소액으로 하여 동결건조후 -80°C에서 동결보존하였다. 효소단백질은 Lowry법에 의해 측정하였다(25).

In vitro에서 DHLNL과 pyridinoline 생성의 경시적 변화

시험관에 염가용성 collagen 0.2mg을 넣고 2시간 37°C에서 진동·가온하였다. 여기에 부분 정제된 lysyl oxidase 용액을 3mg/2ml 또는 대조실험으로서 효소를 첨가하는 대신에 buffer A를 2ml 첨가하여 장시간의 가온에 의한 세균번식을 막기 위해 2~3방울의 toluene을 표층에 첨가하였다. 경시적으로 시험관을 꺼내어 원심분리(20,000g × 20min)에 의해 얻어진 침전물을 가수분해관에 옮겨 6N HCl을 5ml 첨가한 후 질소 치환하여 110°C 20시간 산가수분해 하였다. 가수분해물은 감압건조하여 2ml로 하여 분석시료로 하였다. Hyp 함량은 Woessner법에 의하여 pyridinoline은 HPLC에 의해 측정하였다(26,27). Hydroxylysine은 postcolumn법에 의하여 측정하였고, 이동상에는 0.2N Na⁺ citrated buffer pH 3.2 : 0.6N Na⁺ citrate buffer pH 10.0(91 : 9)를 사용하였다. DHLNL은 postcolumn 형광법에 의해 분석하고(Table 1), 각각 2분마다 분획하여 그 방사활성은 scintillation counter에 의해 측정하였다. 반응 후 시험관에 직접 NaBH₄를 10mg 첨가하여 30분간 진동하여 반응시킨 후 다시 NaBH₄ 10mg 첨가하여 1시간 진동하여 환원시킨다. CH₃COOH으로 pH를 4로 조절하여 반응을 정지시킨 후 원심분리에 의해 침전물을 얻어 가수분해하여 분석시료로 하였다(Fig. 3).

AsA가 효소적 반응에서 DHLNL 생성에 미치는 영향

기질존재하에서의 AsA의 변화

염가용성 collagen 0.1mg에 AsA-Na를 1mM 되도록 첨가하고 37°C에서 진동·가온하였다. 2시간째에 AsA, DHA, DKG 농도를 정량하였다. AsA는 HPLC를 이용하여 정량하였고(28), DHA는 DTT로 환원시킨 후 AsA로 측정하여 환산하였다. DKG는 HPLC 및 hydrazine법에 의해 순도를 조사하여 98% 이상의 것을 사용하였다.

염가용성 collagen 0.1mg에 AsA-Na를 1mM 또는 DHA 1mM되도록 첨가하였다. 이것에 대하여 완충액(0.15M NaCl/0.1M Na₂HPO₄ buffer, pH 7.8)에 AsA-Na 1mM 또는 DHA 1mM을 첨가하였다. 각각 37°C에서 진동·가온하여 경시적으로 그 농도를 측정하였다.

Table 1. Chromatographic conditions for amino acid analysis

Apparatus	: Hitachi 835 S-Type
Column	: 150×2.6mm id.
Eluent	: Citrate buffer stock solution 5X
Packing material	: Hitachi Kastum ion-exchange resin
Flow rate	: Buffer-0.225ml/min Ninhydrin-0.3ml/min
Temperature	: 98±0.3°C
Detector	: UV detector(440nm, 570nm)

Reaction mixture

- incubated with shaking at 37°C for 30 min~7 days
- added 10mg Na₂BH₄
- shaken for 30 min
- added 10mg Na₂BH₄
- shaken for 60 min
- adjusted to the pH 4.0 with acetic acid to stop reaction
- centrifuged at 20,000g for 10 min

Precipitate

- hydrolyzed with 3ml of 6N HCl at 110°C for 20 hr

Hydrolyzate

- evaporated to dryness under vacuo
- filled up to 2ml with H₂O
- filtered(pore size 0.45µm)

DHLNL analysis

Fig. 3. Enzymatic reaction for the formation of dehydrodi-hydroxylysineonorleucine and reduction of reaction mixture.

AsA가 효소적 반응에서 DHLNL 생성에 미치는 영향
염가용성 collagen을 37°C에서 2시간 진동·가온한 후 AsA-Na 또는 DHA를 1mM 되도록 첨가하고 효소액을 가하여 37°C에서 30분 및 60분 진동·가온하였다. 또한 대조군으로서 lysyl oxidase의 저해제인 β-aminopropionitrile (BAPN)를 첨가하여 효소를 가하여 진동·가온하였다. Hydroxylysine양은 24시간 후에 측정하였고, ε-amino기를 가지는 lysine양도 함께 측정하였다(Table 2).

결과 및 고찰

Hyl 및 DHLNL로부터 pyridinoline 생성이 예상되는 경로를 Fig.4에 제시하였다. 본 실험에서는 hydroxyall-lysine과 DHLNL 등의 가교를 포함하지 않는 염가용성 collagen을 시료로 하여 37°C 완충액 중에서 진동·가온하면서 AsA 또는 lysyl oxidase 등을 첨가하는 model 반응계를 선택하여 DHLNL과 pyridinoline 생성의 경시적인 변화 및 AsA 첨가가 DHLNL 형성에 미치는 영향을 조사하

Table 2. Chromatographic conditions for determination of cross-links

Apparatus	: Shimadzu LC6-A
Column	: Shimadzu shim-pack ISC-07/S1504 Na column 150×40 mm id.
Eluent	: 0.3M sodium citrate buffer pH 4.49
Reaction phase	: A-NaClO, B-OPA
Flow rate	: Buffer-0.3ml/min Reaction phase-0.2ml/min
Temperature	: 55°C
Detector	: Fluorescence HPLC monitor RF-550
Excitation wavelength	: 348nm
Emission wavelength	: 450nm

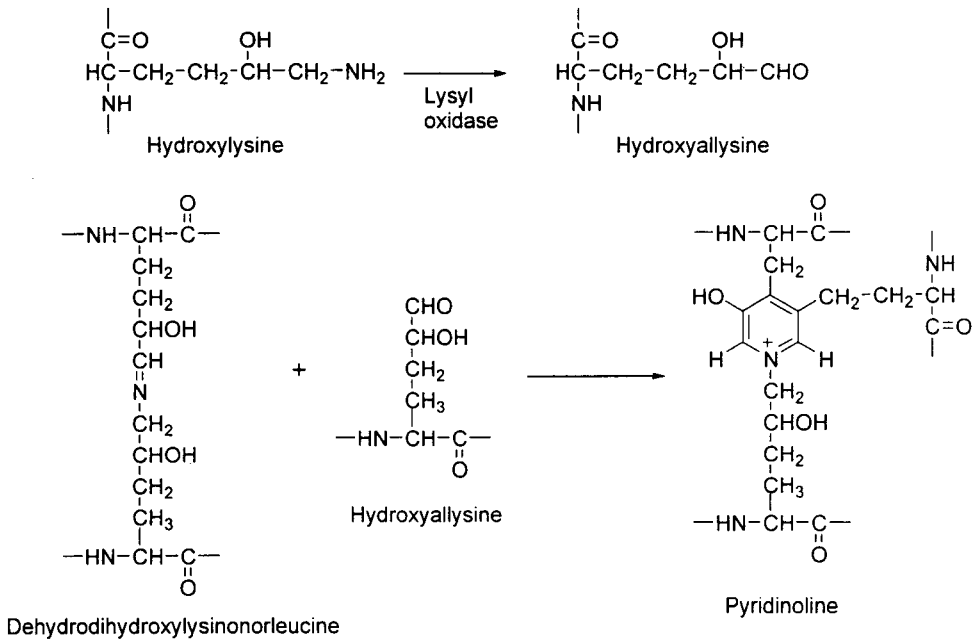


Fig. 4. Postulated scheme of biosynthesis for pyridinoline(17).

였다. DHLNL은 collagen 중의 미숙가교로 그 함량은 collagen 중의 양으로 나타내어야 하나, collagen 중의 Hyp 비율은 평균 110잔기/1000잔기이며 일반적인 collagen 함량분석은 Hyp 함량을 측정하여 collagen 함량으로 환산되므로, DHLNL 양은 Hyp 양에 대한 값으로 나타내었다.

*In vitro*에서 DHLNL과 pyridinoline 생성의 경시적 변화

DHLNL 생성량 및 pyridinoline 생성량, Hyl량의 경시적 변화를 Fig. 5에 나타내었다. DHLNL은 30분에 급속하게 상승하였고 2시간까지 계속 증가하였다. 24시간 후까지는 거의 변화를 나타내지 않았으나, 그 후 완만하게 감소하여 7일 후에는 소실하였다. Pyridinoline은 DHLNL이 감소하는 3~5일 사이에 생성량이 증가하였으므로 DHLNL에서 pyridinoline이 생성되기 위해서는 수일정도 필요한 것으로 나타났다. 또한 효소를 첨가하지 않은 경우에 DHLNL은 전혀 생성되지 않았다. 닭의 태아로부터 추출한 lysyl oxidase를 첨가하여 DHLNL 생성량의 경시적 변화를 살펴본 결과에 의하면, 6시간까지 급속하게 증가하였고 24시간까지는 완만한 증가가 계속되었으나 그 후 3일이 지나서 소실하는 것으로 보고되고 있다(29). 본 실험결과에서는 DHLNL의 함량이 1일 후 감소하는 경향을 나타내었으나, 아미노산 잔기의 조성이 다소 다르므로 추출장기에 의해 효소활성이 달라진 것으로 추측되어진다. 또한 hydroxylysine양은 효소반응(0~24시간) 중 감소하는 경향을 나타내었으므로 hydroxylysine이 DHLNL로 변화한 것으로 볼 수 있다. 그 후 hydroxy-

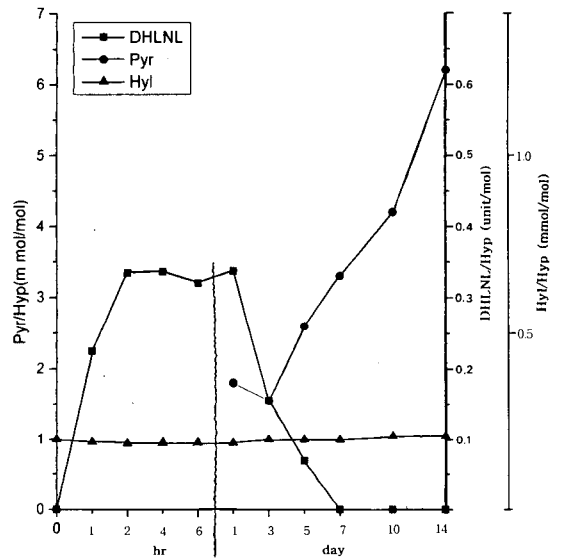


Fig. 5. Concentration of dehydrodihydroxylysinonorleucine, pyridinoline and hydroxylysine in soluble collagen *in vitro*.

Soluble collagen solution was incubated at 37°C. DHLNL: dehydrodihydroxylysinonorleucine, Pyr: pyridinoline, Hyl: hydroxylysine, Hyp: hydroxyproline

lysine 함량에는 변화가 없었으나 10일경에 약간 증가하는 경향이 나타났다. 이것은 pyridinoline 생성과정에 있어서 추정되어지는 3가지의 경로 중 DHLNL이 2분자 결합한 후 hydroxylysine 한 분자가 해리한다는 설을 지지하는 것으로 사료된다.

본 실험의 결과로부터 DHLNL 생성을 위한 효소적 반응은 약 2시간까지 거의 종료하고 반응은 개시 후 30분내에 일어나는 것으로 나타났다. 또한 그 이후에 일어나는 비효소적 반응에서는 DHLNL은 거의 소실하고 5일 이후에 pyridinoline이 점차로 증가하기 시작하였다. 그러므로, 효소적 반응을 0시간에서부터 2시간까지로 설정하여 *in vitro* model 반응실험을 실시하였다.

AsA가 효소적 반응에서 DHLNL 생성에 미치는 영향

AsA의 분해는 수용액 중에서 pH에 큰 영향을 받는다. 산성부근에서는 안정한 AsA라도 본 실험 조건의 pH 7.8에서는 수 시간 후에 산화되어 DHA로 되고 DHA도 다시 2,3-Diketo-L-gulonic acid(DKG)로 변화하는 것으로 알려져 있다. 그러므로, 본 실험에서는 *in vitro* model 반응계에서 AsA 첨가실험을 하기 전에 AsA 자신의 경시적 변화를 조사하였다. 또한 기질의 존재가 AsA의 소실시간과 관련있는 것으로 예상되므로 AsA 및 DHA를 기질 존재하에서 그 변화를 조사하였고, 다음으로 효소적 반응(0~2시간)에 미치는 AsA의 영향 및 DHA가 DHLNL 생성량에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

Fig. 6에 AsA를 기질 존재하에 pH 7.8로 가온하였을 때 AsA, DHA 및 DKG의 농도 변화를 나타내었다. 초기 농도 1mM의 AsA는 2시간에 2/3, 4시간에 1/3까지 감소하였고 그 후 점점 감소하였다. 한편, DKG는 2시간에 약 6mg%까지 증가하였고 6시간까지 거의 같은 농도를 유지하였다. 5시간 후에 AsA는 DKG량보다 낮았으며, 그 후 DKG량도 점점 감소하였다. DHA는 1mg% 이하의 미량으로 항상 일정량을 유지하였다. AsA 농도와 DKG 농도의 합계는 6시간까지 약 19.2mg%(1mM)이었으므로 pH 7.8에서 DHA는 대단히 불안정하여 곧 DKG로 변화한 것으로도 추측할 수 있다. 생체내에서 AsA가 산화되어 monodehydroascorbic acid에서 DHA로 되고 gluta-

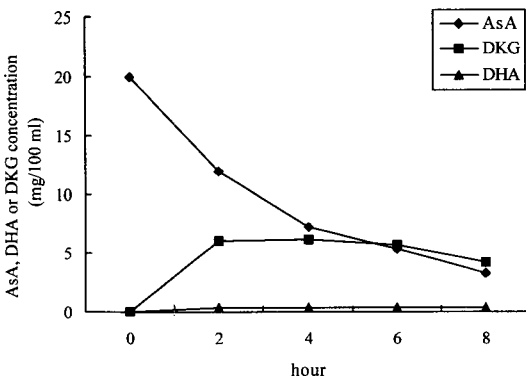


Fig. 6. The degradation of ascorbic acid during incubation with substrate.
AsA: ascorbic acid, DKG: diketogulonic acid, DHA: dehydroascorbic acid

thione 등의 환원제나 환원효소의 작용으로 일부는 AsA로 다시 환원되었다고 볼 수 있다. 그러나, 본 실험에 있어서 기질 중에서 AsA는 급속히 산화된 것으로 나타났다.

기질 존재시 또는 비존재시에 AsA 및 DHA의 소실시간을 Fig. 7에 나타내었다. AsA는 완충액 중에서 기질 존재 시 그 소실이 확실히 빨랐다. DHA는 20분 후에는 거의 소실하였고 앞의 결과와 마찬가지로 곧 DKG로 변화한 것으로 볼 수 있다. DHA의 경우 소실시간이 대단히 빠르므로 기질이 존재할 때와 존재하지 않을 때 큰 차이가 없었다. 본 model 반응계에서 collagen 기질 존재하에서 1mM의 환원형 AsA는 적어도 5~6시간까지 존재하는 것으로 나타났다.

염가용성 collagen에 AsA 및 DHA를 첨가하여 37°C에서 30분과 60분 진동·가온 후의 DHLNL 생성량을 Table 3에 나타내었다. AsA 및 DHA 첨가에 의해 DHLNL의 생성량은 확실히 억제되었다. 60분 반응계에서는 AsA 및 DHA 첨가군은 대조군에 비해 낮은 수치를 나타내었다. 또한, AsA와 DHA를 비교하면 30분 및 60분 반응계

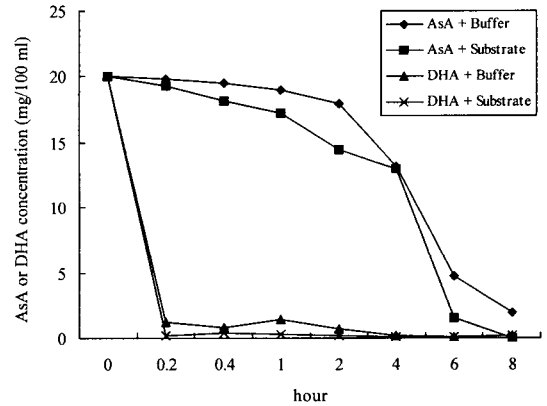


Fig. 7. The degradation of ascorbic acid or dehydroascorbic acid during incubated with substrate or non-substrate.
AsA: ascorbic acid, DHA: dehydroascorbic acid

Table 3. Effect of AsA, DHA and BAPN on the formation of dehydridihydroxylysionorleucine of soluble collagen *in vitro*

Compound	DHLNL/Hyp(unit/mol)	
	30 min	60 min
Control	0.245 ± 0.005 ¹⁾ (100%)	0.321 ± 0.009 (100%)
AsA	0.201 ± 0.009 ²⁾ (82%)	0.212 ± 0.022 (66%)
DHA	0.233 ± 0.010 (95%)	0.231 ± 0.013 ³⁾ (72%)
BAPN	0.169 ± 0.005 (69%)	-

¹⁾Values: mean ± SE. ²⁾Significantly different from the value of the control group at a(p<0.001). Soluble collagen solution was incubated at 37°C for 30 or 60 minutes, respectively. AsA: ascorbic acid, DHA: dehydroascorbic acid, BAPN: β-aminopropionitrile, DHLNL: dehydridihydroxylysionorleucine, Hyp: hydroxyproline

Table 4. Concentration of hydroxylysine and lysine of soluble collagen *in vitro* after incubation for 24 hr

Compound	Hyl or Lys/Hyp(mol/mol)	
	Hydroxylysine	Lysine
Control	0.239±0.009 ¹⁾ (100%)	5.54±0.07(100%)
AsA	0.240±0.016 (100%)	6.93±0.06(125%)
DHA	0.226±0.012 (94.6%)	6.89±0.10(124%)

¹⁾Values: mean±SE. Hyl: hydroxylysine, Lys: lysine, Hyp: hydroxyproline, AsA: ascorbic acid, DHA: dehydroascorbic acid

의 어느 경우에 있어서도 그 억제 효과가 높은 것으로 나타났다. 특히, 30분 반응의 경우 AsA 첨가군이, 60분 반응의 경우 DHA 첨가군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($p<0.001$). AsA에 의한 DHLNL 생성억제에는 몇가지 요인이 추측되어지는데, 그 하나로서 collagen 분자내의 hydroxylysine과 AsA의 산화형인 N^ε-(carboxymethyl) lysine(CML)을 생성할 가능성이 있으므로, hydroxylysine의 소비량에 AsA이 관여하는지를 조사하였다. AsA 및 DHA 첨가에 의한 24시간 후의 hydroxylysine 및 lysine량을 Table 4에 나타내었다. 그 결과, hydroxylysine 및 lysine 함량에 대한 AsA 및 DHA에 의한 영향은 보여지지 않았으므로, AsA에 의한 억제는 예상과는 달리 AsA가 hydroxylysine 및 lysine과 반응하여 기질 중의 ε-amino기를 소비한 것은 아닌 것으로 추측되었다. Lysyl oxidase는 그 활성부를 강하게 보좌하는 보조소로서 o-quinone의 pyrroloquinoline quinone(PQQ)의 존재를 들 수 있다. 1980년 초반에는 pyridoxal phosphate (PLP)가 보조소로 알려졌으나 소의 대동맥의 lysyl oxidase에서는 PLP가 negative한 것으로 밝혀졌다(30). 최근 들어 plasma amine oxidase의 경우 보조소는 효소의 활성부인 trihydroxyphenylamine(TOPA)의 quinone을 보좌하는 PQQ가 carbonyl cofactor인 것으로 확인되었다(31). Lysyl oxidase의 활성부는 아직 확인되지 않았으나, PQQ가 cofactor인 것으로 알려져 있고 그 산화반응 기구는 amine oxidase와 거의 다르지 않은 것으로 추측된다. 본 연구의 결과로부터 collagen 미숙가교 DHLNL은 AsA와 그 산화 생성물인 DHA에 의하여 생성이 억제되었고, 특히 AsA의 억제효과가 높아 AsA의 환원제로서의 역할이 크게 관여하고 있는 것으로 추측된다. 이러한 요인으로서 위의 반응계의 carbonyl cofactor인 PQQ나, 구리를 직접 또는 간접적으로 환원하여 전자를 공유하고 있을 가능성도 있다.

요 약

효소적 반응에서 미숙가교 DHLNL 생성에 대한 AsA의 영향을 조사하기 위해 hydroxylysine 등의 collagen 가교를 포함하지 않는 염가용성 collagen을 시료로 사용

하여 *in vitro*에서 DHLNL 함량의 변화를 관찰하였다. DHLNL과 pyridinoline 생성의 경시적 변화에서 효소적 반응은 반응개시 후 30분내에 일어나며, 효소반응에서 생성된 미숙가교 DHLNL은 1일 이후부터 감소하여 5일 이후에는 성숙가교 pyridinoline으로 변화하는 것으로 나타났다. 또한 효소적 반응에서 AsA와 DHA 첨가는 대조군에 비해 DHLNL 생성을 억제하였고, 특히 DHA보다 AsA에 있어서 그 억제 효과는 높았다. 이러한 요인으로 collagen 중에서 AsA의 산화형과 hydroxylysine이 반응하여 CML을 생성할 가능성도 있으므로 hydroxylysine의 소비량에 AsA의 관여여부를 조사하였으나, AsA에 의한 억제는 hydroxylysine 및 lysine과의 반응에 의하여 기질 중의 ε-amino기의 소비에 의한 것은 아닌 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터, AsA는 DHLNL 생성을 억제하며, AsA가 collagen 미숙가교 형성에 환원제로 작용하여 미숙가교를 안정화하여, 미숙가교에서 pyridinoline이 생성되는 반응을 억제시키는 것으로 사료된다.

문 헌

1. Siegel, R. C. : Collagen cross-linking effect of D-penicillamine on cross-linking *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **252**, 254-259(1977)
2. Robins, S. P. and Baily, A. J. : The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem. J.*, **163**, 339-346(1977)
3. 藤本大三郎 : コラーゲン分子の變化とエシグ-老化をくいとめる方法はみつかるか. *現代化学*, **8**, 10-15(1982)
4. Fujimoto, D. : Aging and cross-linking in human aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1264-1269(1982)
5. Robins, S. P. : Turnover and cross-linking of collagen. In "Collagen in health and disease" Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, pp.160-178(1982)
6. Kuboki, Y. and Mechanic, G. L. : Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. *Calcif. Tissue Int.*, **34**, 306-308(1982)
7. Yamauchi, M., Woodley, D. T. and Mechanic, G. L. : Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 898-903(1988)
8. Eyre, D. R., Dickson, I. R. and Ness, K. V. : Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem. J.*, **252**, 495-500(1988)
9. Kim, M., Otsuka, M. and Arakawa, N. : Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 95-103(1994)
10. Fuji, K and Tanzer, M. L. : Age-related changes in the reducible crosslinks of human tendon collagen. *FEBS LETTERS*, **43**, 300-302(1974)
11. Fujimoto, D. and Moriguchi, T. : Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. *J. Biochem.*, **83**, 863-867(1978)
12. Fujimoto, D., Moriguchi, T. and Hayashi, H. : The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 52-57(1978)
13. Barber, M., Bordoli, R., Elliott, G. J., Fujimoto, D. and

- Scott, S. E. : The structures of pyridinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1041-1046(1982)
14. Tsuda, M., Ono, T., Ogawa, T. and Kawamishi, Y. : Pyridinoline is a real moiety of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1407-1412(1982)
 15. Nurad, S., Sivarah, A. and Pinnel, S. R. : Regulation of propyl and lysyl hydroxylase activities in cultured human skin fibroblasts by ascorbic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 868-875(1981)
 16. Chan, D., Lamande, S. R., Cole, W. G. and Bateman, J. F. : Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation *in vitro*. *Biochem. J.*, **269**, 175-181(1990)
 17. 吉岡満城 : 血清ビタミン濃度と血圧との關聯. 武田藥報, **373**, 15-22(1988)
 18. 村田 晃 : 中高年の健康とビタミンC. 武田藥報, **373**, 1-8 (1988)
 19. 村田 晃 : ビタミンC の多様な作用と作用機作. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **64**, 1843-1845(1990)
 20. Frei, B. : Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1113S-1118S(1991)
 21. Kim, M., Yu, R., Ha, B., Kim, S. and Koh, J. : Effect of hormone replacement therapy on the changes of pyridinoline from bone and cartilage collagen of ovariectomized rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 475-479(1997)
 22. Ha, B. and Kim, M. : Effect of chondroitin sulfate on collagen maturity and aging. *J. Korean Fd. Hyg. Safety*, **14**, 45-54(1999)
 23. Kim, H. : The effect of ascorbic acid on the changes in amounts of pyridinoline from bone collagen during *in vitro* aging. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 501-506(1997)
 24. 香川靖雄, 龍口 久 : 2,3-Diketo-L-gulonic acid의 合成方法. 酵素科學シンポジウム, **16**, 107-111(1962)
 25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
 26. Woessner, J. F. : The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **93**, 440-447(1961)
 27. Arakawa, N., Kim, M. and Otsuka, M. : An improved high-performance liquid chromatographic assay for the determination of pyridinoline in connective tissues. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**, 375-380(1992)
 28. Kim, H. : The effect of ascorbic acid on the enzyme reaction in pyridinoline formation during soluble collagen maturation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 305-312(1998)
 29. Siegel, R. C. and Fu, J. C. C. : Collagen cross-linking. *J. Biol. Chem.*, **251**, 5779-5785(1976)
 30. Williamson, P. R., Kittler, J. M., Thanassi, J. W. and Kagan, H. M. : Reactivity of a functional carbonyl moiety in bovine aortic lysyl oxidase : Evidence against pyridoxal 5'-phosphate. *Biochem. J.*, **235**, 597(1986)
 31. Janes, S. M., Mu, D. and Wemmer, D. : *Science*, **248**, 981(1990)

(1999년 9월 21일 접수)