

단백질의 Maillard 반응의 최종산물인 CML 형성에 미치는 ROS의 영향

이중선¹ · 양 용¹ · 신동범^{2*}

¹연세대학교 생명공학과

²제주대학교 식품영양학과

Effect of Reactive Oxygen Species on the Formation of N^ε-(carboxymethyl)lysine, an Endproduct of Maillard Reaction of Proteins

Jong-Sun Lee¹, Ryung Yang¹ and Dong Bum Shin^{2*}

¹Dept. of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

²Dept. of Food Science and Nutrition, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract

The effect of reactive oxygen species (ROS) on the formation of N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML), one of the endproducts in the Maillard reaction of protein (or glycation), was investigated. Glyoxal, a main precursor of CML formation, was produced from both glucose and fructose during their autoxidation. The transition metal ion showed to involve in the formation of glyoxal by the metal catalyzed oxidation, suggesting that ROS accelerated the reducing sugar autoxidation. The stimulative effect of ROS on the autoxidation was more prominent in glucose than in fructose. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were shown to form glyoxal by peroxidation in proportion to the degree of unsaturation, but ROS did not affect on PUFA peroxidation. Ascorbic acid also showed the similar pattern as of fructose due to its autoxidation. The formation of N^ε-(carboxymethyl)hippuryl lysine (CMHL) in the model system using hippuryl lysine and glucose had a significant effect on ROS, whereas it had no effect on ROS using glyoxal as a reactant. Almost the same trend was obtained by the analysis of antigen coated indirect noncompetitive ELISA using monoclonal antibody (6D12). These data indicated that ROS affected glucose autoxidation as well as mediated both CML and glyoxal formation, but did not affect the reactive compounds such as fructose, PUFAs and ascorbic acid.

Key words: Maillard reaction, glycation, ROS, reducing sugar autoxidation, CML

서 론

단백질의 Maillard 반응인 glycation은 단백질의 amino group과 환원당의 aldehyde group과의 반응에 의해서 Schiff base를 거쳐 ketoamine 형태의 Amadori product를 형성한다(1). Amadori product는 이후 복잡한 형태의 dehydration, oxidation, rearrangement 반응 등을 거쳐 반응활성이 매우 높은 dicarbonyl 중간물질들을 생성하며, 이들 물질들은 단백질과 재차 반응하여 단백질이 중합되거나, 형광성물질이 지닌 열화학적으로 안정한 최종산물인 AGEs(advanced glycation end products)를 형성함으로써 이 반응은 종결된다(2,3). 이 과정에서 생성되는 반응성이 높은 중간물질들은 3-deoxyglucosone(3-DG)(4), glyoxal(2), methylglyoxal(3), glycolaldehyde(2), glyceraldehyde(3) 등이 있으며, 이 중에서도 glyoxal과 methylglyoxal과 같은 dicarbonyl 화합물들은 glycation의 주요 propagator로서 여겨지고 있다(5).

Glycation은 생체단백질이 그 표적이 되어 생체 내에서도

일어나며, 여기서 생성되는 AGEs는 특히 aging-accelerating syndrome이라고 부르는 당뇨병과 관련합병증의 진행 정도와 비례하는 것으로 알려지고 있다(6). 반응의 복잡성에 따라 현재까지 알려진 AGEs는 pentosidine을 비롯하여 pyrrolyne, crossline, N^ε-(carboxymethyl)lysine(CML), imidazolium 유도체 형태 등이 알려져 있을 뿐이다(7,8). 이 중에서 CML은 Amadori product가 산화 분해되어 생성되는 주된 AGE로서 열화학적으로 안정하고 비교적 단순한 구조를 나타내는 물질이다. 대부분의 AGE들이 생성경로가 불명확한 것에 비하여 CML은 생성경로가 구체적으로 밝혀져 있다.

CML 형성에는 세 가지 반응기작이 제시되었는데(Fig. 1), 그 중 하나는 고전적인 경로로서 glucose가 단백질의 lysine 잔기와 반응하여 Amadori 화합물을 형성한 뒤 산화 분해 과정을 통해 CML이 형성되는 Hodge pathway(9,10)이다. 두 번째 경로는 glucose가 자동산화에 의해 반응성이 강한 glyoxal 등의 중간물질이 생성되어 이들이 단백질과 반응하여 CMS를 형성하는 Wolff pathway(2,11,12)이다. 세 번째 경로

*Corresponding author. E-mail: shindb@cheju.ac.kr
Phone: 82-64-754-3556, Fax: 82-64-725-2539

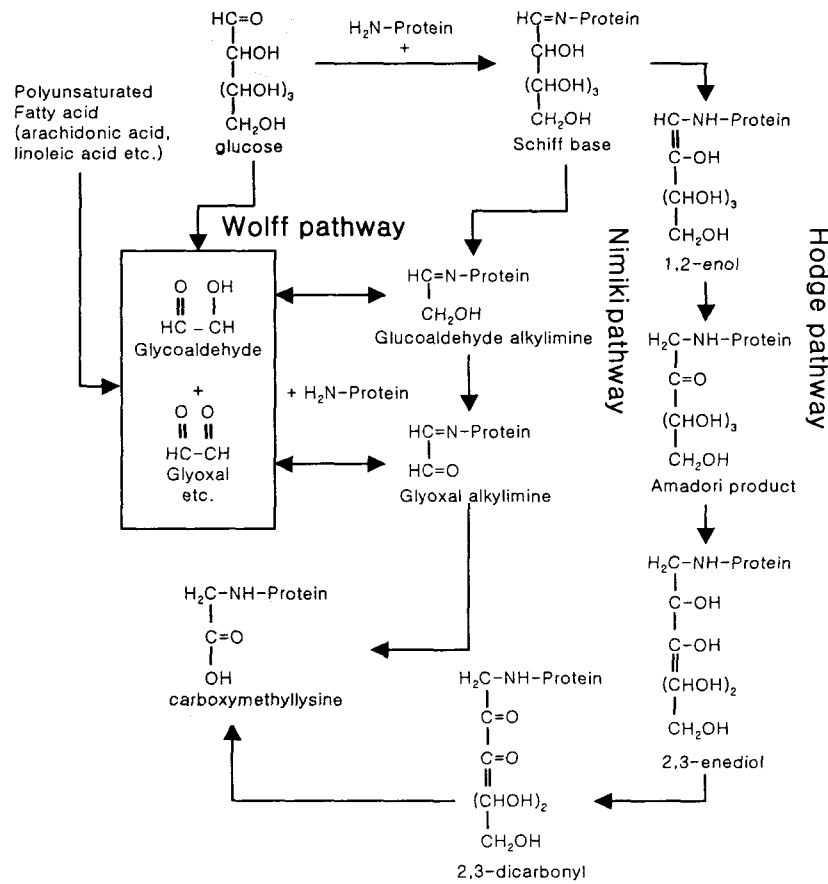


Fig. 1. The pathways on the formation of N^ε-(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction of protein with glucose (2, 9, 11).

는 glucose가 단백질의 lysine 잔기와 반응하여 형성된 Schiff base가 Amadori 전위를 거치지 않고 산화 분해과정을 통하여 CML을 형성하는 Nimiki pathway(13)이다. Glucose와 같은 환원당 이외에도 ascorbic acid나 다가 불포화 지방산도 자동산화에 의해 CML을 형성한다는 보고가 있다(6,14,15). 한편, 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)은 단백질의 Maillard 반응에도 직접적인 영향을 미친다고 알려져 있으며(16,17), CML의 형성을 매개하고 있다는 보고가 있다(18).

본 연구에서는 AGEs의 하나인 CML형성에 ROS가 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보았다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 시약들은 특급시약이고 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

환원당 및 지방산의 자동산화와 glycation 반응조건

50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 반응물질을 용해시켜 37°C에서 0.2 μm filter cap이 달린 T-flask를 사용하여 oxidative incubation을 시켰다. 자동산화

반응의 환원당의 농도는 각각 250 mM이었으며, ascorbic acid와 지방산의 농도도 250 mM로 하였다.

Radical과 metal ion의 영향을 알아보기 위하여 5 mM DTPA, 0.4 mM H₂O₂, 0.4 mM FeCl₂를 조건을 달리하여 첨가하였다.

지방산의 자동산화는 linoleic acid를 buffer에 첨가하여 격렬히 vortex mixing을 하여 miscell을 형성시켜 shaking incubation을 행하였다.

Girad-T assay를 이용한 α-dicarbonyl 화합물 생성량의 측정

Girad-T reagent((carboxymethyl)trimethylammonium chloride hydrazide)가 glyoxal과 methylglyoxal과 같은 α-dicarbonyl 화합물에 선택적으로 결합하여 유도체를 생성하는 성질을 이용하여 Wells-Knecht 등의 방법(2)을 수정 사용하여 하였다. 즉, 반응액 100 μL에 0.5 M sodium formate buffer(pH 2.9) 850 μL와 0.5 M Girad-T reagent 50 μL를 혼합하여 한시간 동안 반응시킨 후 295 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Girad-T reagent를 첨가하지 않은 대조구를 이용하여 흡광도를 보정하였다(5).

HPLC를 이용한 glyoxal 생성량의 측정

Wells-Knecht 등의 방법(2)을 응용하여 Girad-T 유도체

를 만들어 HPLC를 행하였다. 반응액 1 mL에 0.5 M Girad-T reagent 50 μ L와 2 N HCl 300 μ L를 첨가하여 실온에서 24시간 반응시킨 후 HFBA(heptafluorobutyric acid)를 최종농도가 0.25%가 되도록 첨가한 뒤 reverse phase HPLC를 행하였다. Waters model 510 pump와 model 486 turnable absorbance detector를 사용하여 295 nm에서 흡광도를 측정하였고, Waters symmetry C-18 column(3.9 \times 150 mm)을 사용하였다. 분석조건은 0.25% HFBA aqueous solution(용액 A)과 0.25% HFBA acetonitrile solution(용액 B)을 0~1분: 10% B, 1~25분: 10~14% B, 25~30분: 14~100%로 하는 gradient system을 사용하였고, 유속은 0.7 mL/min로 하였다.

ELISA를 이용한 CML(carboxy methyl lysine) 생성량 비교

CML 형성의 전구체로 알려진 환원당, PUFAs, α -dicarbonyls, ascorbic acid 등의 다양한 화합물들과 human serum albumin(HSA)와의 반응에서 형성되는 CML의 생성량을 비교하기 위하여 Nagai 등의 방법(18)에 따라 주요 epitope이 CML로 밝혀진 anti-AGE monoclonal antibody(6D12)를 이용한 ELISA를 실시하였다. 먼저 반응액을 1 μ g/mL의 농도로 50 mM sodium carbonate buffer(pH 9.6)에 희석하여 100 μ L씩 well plate에 넣고 4°C에서 overnight coating을 하였다. PBS/Tween으로 3회 세척 후 3% casein 200 μ L를 넣고 한시간 동안 37°C에서 incubation하여 plate를 blocking 하였다. 다시 3회 세척 후 6D12를 1 μ g/mL의 농도로 well에 첨가한 후 37°C에서 한시간 동안 incubation 하였다. 3회 세척 후 horse radish peroxidase conjugate anti-mouse IgG antibody를 넣고 37°C에서 한시간 반응시켰다. 이어서 o-phenylenediamine과 H₂O₂를 기질로 하여 발색시켜 30분 후 Molecular Device Emax microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Autoxidation반응에 대한 ROS의 영향

환원당의 autoxidation을 통하여 형성되는 α -dicarbonyl 화합물과 glyoxal 생성을 비교함으로써 Wolff pathway의 첫 번째 반응단계에 미치는 ROS의 영향을 알아보았다. Girad-T assay를 이용한 glucose와 fructose의 autoxidation 결과는 시간에 따라 모두 α -dicarbonyl 화합물들의 양이 증가함을 보여주었다(Fig. 2). Glucose에 비해 fructose의 반응속도가 빠르게 나타나는 것은 수용액 상태에서 ring 상보다는 open된 상으로의 존재비율이 fructose가 높으며 따라서 반응성도 높게 나타나고 있는 것이다(19). 천이금속이온의 존재는 두 환원당 모두의 반응성을 증가시키는 것으로 나타났는데, 이는 두 환원당의 autoxidation이 metal catalyzed oxidation임을 보여주고 있다. 천이금속이온과 H₂O₂의 Fenton 반응에 의해 형성되는 \cdot OH가 이 반응을 촉매하는 것으로

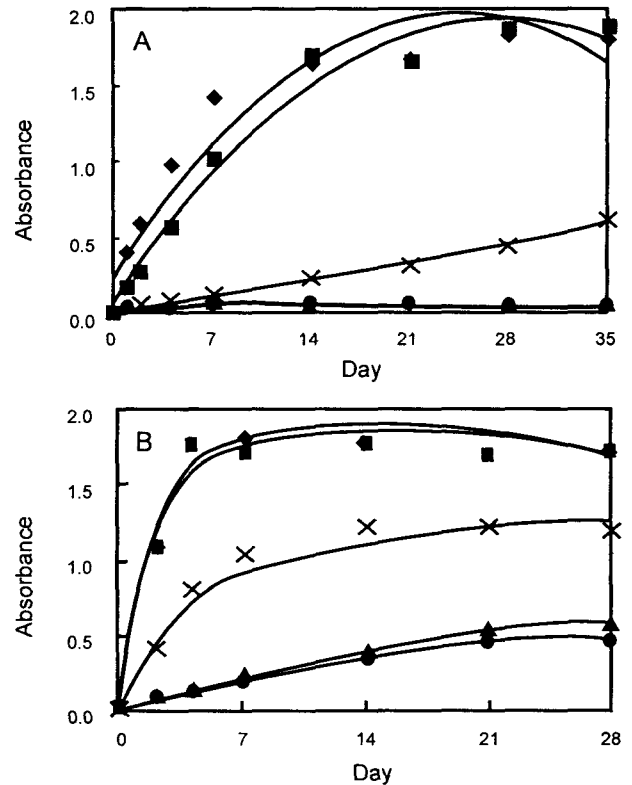


Fig. 2. Time course formation of α -dicarbonyl compounds in the autoxidation of glucose and fructose. (A) 250 mM glucose was incubated alone (x), added with 5 mM DTPA (●), with 5 mM DTPA and 0.4 mM H₂O₂ (▲), with 0.4 mM FeCl₂ (◆), and with 0.4 mM FeCl₂ and 0.4 mM H₂O₂ (■) at 37°C in 50 mM sodium phosphate buffer (pH7.4). Absorbance was measured at 294 nm by detecting the color of Girad-T reagent reacted with α -dicarbonyl compounds. (B) 250 mM fructose was incubated under the identical conditions.

여겨졌다. 천이금속이온만을 첨가한 경우에도 거의 비슷한 수준으로 반응이 증가되었는데, 이는 반응액 중에 용해된 분자상 산소가 천이금속이온의 촉매작용에 의해 \cdot OH로 변형되었거나, 환원당의 autoxidation중에 형성되는 O₂⁻가 non-enzymatic dismutation을 통해 H₂O₂로 변형된 후 천이금속이온에 의해 \cdot OH로 변형되었을 가능성(20)이 높았다. 천이금속이온이 두 환원당 모두에게 autoxidation을 일으키는 촉진인자라는 사실은 이 반응에 금속이온 킬레이트제인 DTPA를 첨가했을 때 반응성이 현저히 떨어진다는 것에서 알 수 있었다. 그러나 H₂O₂ 단독으로는 반응성에 전혀 영향을 주지 않았다. 이상의 결과는 \cdot OH가 CML 형성을 증가시키지만, O₂와 H₂O₂는 영향을 주지 못했다는 Nagai 등의 결과와 일치하고 있다(18).

환원당은 autoxidation을 통하여 arabinose, glycolaldehyde, glycoaldehyde, glyoxal, methylglyoxal을 비롯한 다양한 형태의 화합물들이 형성되는 것으로 알려져 있다(3,21-23). 이 중에서도 glyoxal과 methylglyoxal과 같은 dicarbonyl 화합물들은 높은 반응성으로 인해 glycation의 propagator로 알려지고 있다(5). 본 실험에서도 Wolff 경로에 의한 CML형성

(2)에 가장 중요한 역할을 담당하는 물질이라고 알려진 glyoxal 생성에 미치는 ROS의 영향을 살펴본 결과, 두 환원당 모두 glyoxal 생성에 미치는 ROS의 영향은 α -dicarbonyl 화합물들의 생성과 거의 유사한 양상을 나타내었으며(Table 1), 이는 glucose의 autoxidation에서 생성되는 주된 dicarbonyl 화합물이 glyoxal이라는 Wells-Knecht 등의 주장을 상당부분 뒷받침하고 있다(2).

Fu 등에 의해 제기된 PUFA로부터의 CML 형성 가능성(24)을 확인하기 위하여, 생체 내 PUFA의 대표적인 fatty acid인 linoleic acid(C18:2)와 arachidonic acid(C20:4)를 사용하여 α -dicarbonyl 화합물과 glyoxal의 형성 여부를 알아보았다. 그 결과 linoleic acid에 비해 arachidonic acid의 peroxidation이 보다 빠른 속도로 일어남을 알 수 있었다(Fig. 3). 이는 불포화도가 클수록 peroxidation 속도가 빨라진다는 Fu 등의 결과와 일치하였다(24). PUFA 단독으로 peroxidation시켰을 때, linoleic acid의 경우 2주 후에 α -dicarbonyl 화합물의 생성량이 최대 값에 도달했지만, arachidonic acid의 경우에는 불과 3일 만에 비슷한 수준의 반응이 일어났다. ROS의 영향 또한 두 PUFA에서 다른 형태로 나타났는데, linoleic acid의 경우 천연금속이온의 영향을 어느 정도 받고 있는 반면, arachidonic acid의 경우는 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Arachidonic acid에 비해 반응성이 현저히 떨어지는 linoleic acid의 경우에는 glucose에 비해 대단히 빠른 속도로 α -dicarbonyl 화합물을 형성하는 것으로 나타났다. 이는 환원당에 비해 PUFA의 산화속도가 더 빠르다는 Fu 등(24)과 Miyata 등(25)의 결과와도 일치하였다. PUFA의 이런 빠른 과산화속도는 LDL의 산화에는 glycation보다는 지질의 과산화 반응이 보다 결정적인 역할을 하게 될 가능성을 시사한다.

두 PUFA의 과산화 반응에서는 모두 glyoxal의 생성이 확인되었는데, 이는 linoleic acid와 arachidonic acid의 per-

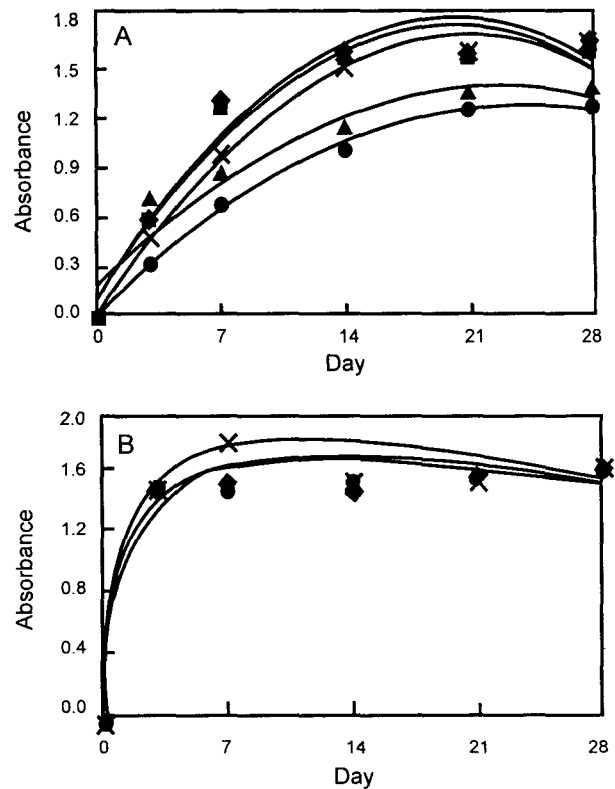


Fig. 3. Time course formation of α -dicarbonyl compounds in the peroxidation of linoleic acid and arachidonic acid. (A) 250 mM linoleic acid was incubated alone (x), added with 5 mM DTPA (●), with 5 mM DTPA and 0.4 mM H_2O_2 (▲), with 0.4 mM $FeCl_2$ (◆), and with 0.4 mM $FeCl_2$ and 0.4 mM H_2O_2 (■) at 37°C in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Absorbance was measured at 294 nm by detecting the color of Girad-T reagent reacted with α -dicarbonyl compounds. (B) 250 mM arachidonic acid was incubated under the identical conditions.

oxidation product 중에 glyoxal이 존재한다는 Loidl-Stahlhofen 등의 주장과 일치하였다(26). 환원당의 자동산화 생성물 중에는 glyoxal이 주된 화합물이었으나, PUFA의 경우에

Table 1. Relative amounts of α -dicarbonyl compounds, glyoxal and fluorescent products formed from the reaction indicated in the presence of metal ion and chelator

	+DTPA	+ $FeCl_2$	+ $FeCl_2$, H_2O_2	+DTPA, H_2O_2
α -dicarbonyl compounds ¹⁾ formed from				
1) glucose autoxidation	9.7 ± 0.8 ²⁾	429.4 ± 2.6	418.0 ± 1.8	9.5 ± 1.1
2) fructose autoxidation	37.9 ± 6.4	145.8 ± 4.5	145.5 ± 8.2	48.2 ± 2.5
3) linoleic acid peroxidation	79.1 ± 0.2	101.7 ± 0.1	99.5 ± 1.2	84.7 ± 1.4
4) arachidonic acid peroxidation	96.4 ± 1.6	96.3 ± 1.7	95.9 ± 1.5	96.1 ± 1.8
Glyoxal formed from				
1) glucose autoxidation	18.1 ± 0.6	750.5 ± 9.0	700.2 ± 12.2	21.0 ± 0.7
2) fructose autoxidation	7.9 ± 2.3	294.3 ± 9.1	286.7 ± 3.8	9.9 ± 1.7
3) linoleic acid peroxidation	107.0 ± 36.1	130.8 ± 23.1	132.3 ± 26.9	106.2 ± 33.1
4) arachidonic acid peroxidation	86.5 ± 7.1	88.5 ± 7.9	88.4 ± 5.1	87.5 ± 6.7
Fluorescent products formed from ascorbic acid autoxidation				
	87.7 ± 9.7	85.1 ± 15.7	82.2 ± 21.5	59.8 ± 20.1

¹⁾Expressed as the relative percentage compared with the control value which was obtained from the sample added neither metal ion nor chelator after incubation for 4 weeks.

²⁾Means ± SD (n=3).

는 그렇지 않았다. 이것은 glyoxal이 PUFA의 과산화 결과 주요 산물이 아니라는 것을 의미하며, PUFA의 peroxidation 과정에서는 glyoxal을 제외한 다른 종류의 α -dicarbonyl 화합물인 4-hydroxynonenal이나 malondialdehyde와 같은 물질들이 형성되고 있다는 가능성을 유추할 수 있었다.

PUFA의 peroxidation을 통한 glyoxal 생성에 있어서 ROS의 영향은 α -dicarbonyl 화합물들의 경우와 유사한 결과를 보여주고 있다(Table 1). 일반적으로 알려진 반응성과 동일하게 linoleic acid에 비해 arachidonic acid에서의 glyoxal 생성량이 더 많았고, 생성속도 또한 빠르게 나타났다.

Ascorbic acid는 환원당은 아니지만 생체 내의 중요한 영양성분이자 안구 내에 고농도로 존재하면서 그 안에서 형성되는 ROS를 소거하는 항산화 기능을 하는 물질로 알려져 있다(27). 이 물질은 glycation을 유발시킬 뿐만 아니라 그 반응성도 glucose에 비해 높은 것으로 알려지면서, ascorbic acid에 의한 안구 단백질인 lens crystalline의 중합이 백내장과 깊이 관련되어 있을 가능성이 제기되고 있다(14). Ascorbic acid는 autoxidation을 통해 dehydroascorbic acid, threose, xylosone, 2,3-diketogulonate 등의 물질을 형성한 뒤 단백질과 결합해서 CML을 형성하는 것으로 알려지고 있다(14,28). 또한 ascorbic acid로부터 glyoxal이 형성될 가능성도 제기되고 있다(2,3). 본 실험에서는 ascorbic acid가 자동산화과정 동안 강한 형광물질을 형성하는 것에 착안하여 이를 측정함으로써 자동산화 정도를 판단하였다. 자동산화시킨 후 형광광도계로 scanning한 결과 ascorbic acid는 446 nm의 최대흡수파장과 527 nm의 최대방출파장을 특징으로 하는 형광물질을 형성하는 것을 확인하였다. 각 조건에 따라 형광강도를 측정된 결과, ascorbic acid의 자동산화는 친이금속이온의 존재여부에 크게 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 이 결과는 두 가지로 해석이 가능한데, 하나는 glucose에 비해 glycation 반응성이 더 높다고 알려진 ascorbic acid가 높은 반응성으로 인하여 오히려 ROS의 영향을 작게 받았을 가능성이고, 다른 하나는 ascorbic acid에 의한 형광물질의 형성이 자동산화와는 무관한 반응일 가능성이 다. 이와 비슷한 예로 항산화 조건에서도 pentose류는 glycation을 통해 중합체를 형성하며, 단백질중합의 주요 전구체인 3-DG 또한 산화와는 무관하게 형성되는 것으로 알려지고 있다(29). 따라서 ascorbic acid의 형광물질의 형성에는 자동산화가 관련되지 않으며, ROS 역시 크게 영향을 끼치지 못할 가능성이 높았다.

Table 1에는 4주간의 반응시간을 기준으로 glucose와 fructose의 자동산화, linoleic acid와 arachidonic acid 등 PUFA의 과산화, ascorbic acid의 자동산화에 의한 α -dicarbonyl 화합물과 glyoxal 생성에 있어서의 금속이온의 영향을 정리하였다. Glyoxal 형성에 있어서 glucose는 친이금속이온에 의해 반응이 약 7배 증가되지만, fructose는 약 3배, linoleic acid는 약 1.3배 증가하는데 그치고 있다. Arachidonic acid의

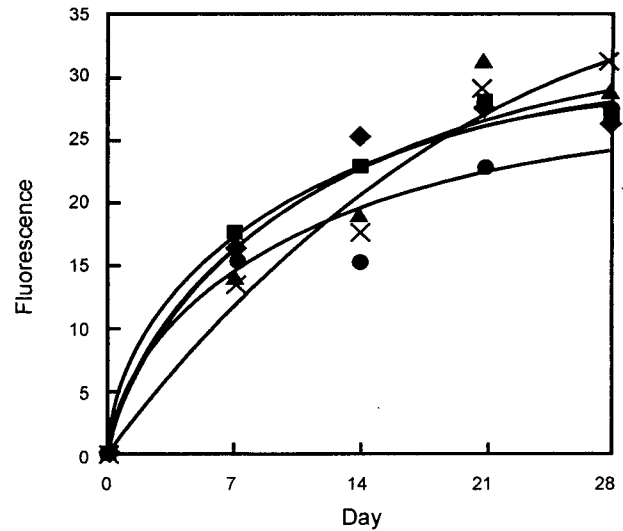


Fig. 4. Time course formation of fluorescent compounds in the autoxidation of ascorbic acid. 250 mM ascorbic acid was incubated alone (x), added with 5 mM DTPA (●), with 5 mM DTPA and 0.4 mM H₂O₂ (▲), with 0.4 mM FeCl₂ (◆), and with 0.4 mM FeCl₂ and 0.4 mM H₂O₂ (■) at 37°C in the 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Fluorescence was measured at ex. 446 nm/em. 527 nm.

경우 거의 영향을 받지 않고 있다. 전체적으로 볼 때 반응성이 낮은 물질일수록 친이금속이온의 촉진 및 저해효과가 더욱 뚜렷하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 볼 때 생체 내에 풍부히 존재하는 glucose는 ROS의 영향을 받을 경우 자동산화를 통해 glyoxal과 같은 반응성이 높은 dicarbonyl 화합물로 빠르게 분해될 수 있는 가능성을 보여주고 있었다. 즉 ROS는 glucose에 의한 glycation에 중요한 촉진제로 작용하고 있다고 예상할 수 있다.

Hippuryl lysine model system에서의 ROS의 영향

CML 형성에 대한 model system으로는 lysine의 α -amino group을 benzoyl group으로 blocking시킨 hippuryllysine(HL, N ^{α} -benzoyl-glycine-lysine)을 이용하여 N ^{ϵ} -carboxymethyl hippuryllysine(CMHL)을 조제하여 이후의 실험에 표준물질로 이용하였다. HL의 benzoyl기는 280 nm 근처에서 쉽게 검출이 가능하며, benzoyl기의 소수성으로 인하여 역상 HPLC 분석에 이로운 점이 있다.

Glucose 또는 glyoxal과 HL과의 반응에서 형성되는 CMHL을 분석하기 위해서 capillary electrophoresis(CE) 분석을 수행하였다. CMHL은 25분 정도의 이동시간에서 검출되었다. CMHL의 생성량은 231 nm의 흡광도에서 peak 면적을 구하여 각 반응조건에서의 CMHL 생성량을 비교하였다. 그 결과 glucose로부터의 CMHL 생성과정에는 친이금속이온의 영향이 뚜렷이 나타났다(Fig. 5). 이것은 앞의 glucose의 자동산화결과와 유사하게 금속이온이 첨가된 경우에는 H₂O₂의 첨가여부에 관계없이 반응이 2배정도 증가된 것이었다. 이러한 결과는 용해된 분자상의 산소가 영향을 주었거나 또는 glucose의 자동산화나 Amadori 화합물에서 형성되는 O₂⁻가

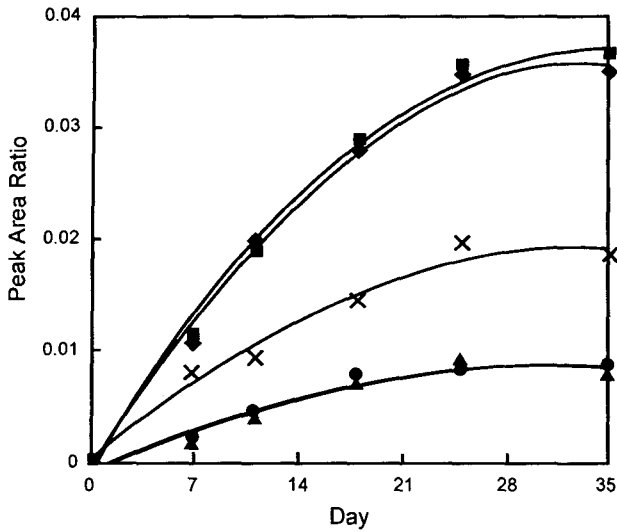


Fig. 5. Formation of carboxymethyl hippuryl lysine during the incubation of hippuryl lysine with glucose. 300 mM hippuryl lysine and 300 mM glucose were incubated (×), added with 5 mM DTPA (●), with 5 mM DTPA and 0.4 mM H₂O₂ (▲), with 0.4 mM FeCl₂ (◆), and with 0.4 mM FeCl₂ and 0.4 mM H₂O₂ (■) at 37°C in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Peak area was calculated using capillary electrophoresis.

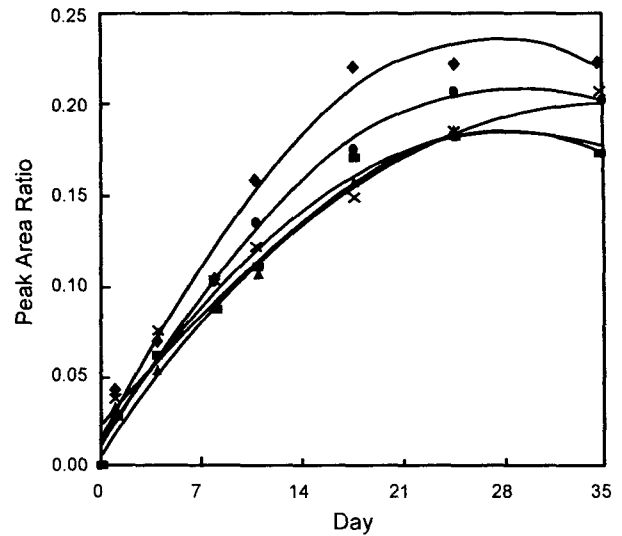


Fig. 6. Formation of carboxymethyl hippuryl lysine during the incubation of hippuryl lysine with glyoxal. 300 mM hippuryl lysine and 300 mM glyoxal were incubated (×), added with 5 mM DTPA (●), with 5 mM DTPA and 0.4 mM H₂O₂ (▲), with 0.4 mM FeCl₂ (◆), and with 0.4 mM FeCl₂ and 0.4 mM H₂O₂ (■) at 37°C in the 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Peak area was calculated using capillary electrophoresis.

H₂O₂로 변형된 후 천이금속이온에 의해 ·OH로 변형되었을 가능성(30)을 의미하였다.

Glycation propagator인 glyoxal의 경우 동일한 형태로 CMHL을 생성하였으며, 그 생성량이 glucose에 비해 약 7배 정도 증가된 것을 확인할 수 있었다. Glyoxal에 의한 CMHL 생성에는 천이금속이온의 영향이 거의 나타나지 않고 있는데, 이는 앞의 oxidation 결과들과 마찬가지로 glyoxal의 높은 반응성에 기인한 결과로 추측된다(Fig. 6). 이러한 결과는 glyoxal에 의한 CML 생성이 oxidation과 무관한 Cannizzaro reaction에 의해 일어난다는 Glomb와 Monnier의 결과(12)와도 일치하였다.

ELISA를 이용한 CML의 분석

CML에 특이적으로 결합하는 monoclonal antibody(6D12)를 이용한 antigen coated noncompetitive indirect ELISA 분석을 통해서 HSA와 여러 가지 화합물들과의 반응에 의해 시간대 별로 형성되는 CML을 분석하였다. Glucose와 fructose의 경우 model system에서의 결과와 유사한 천이금속이온의 영향을 나타내었다. Glucose에 의한 CML 형성은 기질 농도에 비례하였으며, 첨가 농도가 10 mM의 경우에는 반응 3주 정도에 최대생성량에 도달한 반면 100 mM의 경우에는 불과 1주 후에 반응이 종결되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 20 mg의 HSA가 가지는 58개의 lysine 잔기가 대략 0.0175 mM 정도이므로 10 mM 정도의 glucose는 HSA의 모든 lysine 잔기와 결합하기에 충분한 양이다. 따라서 HSA의 외부로 노출된 lysine잔기들은 일정 시간 경과 후 모두 CML로 변형될 것이며 물질의 반응성에 따라 그 시간에는 차이가 있지만, 일정시간 후에는 모두 최대치의 CML 생성량에 도

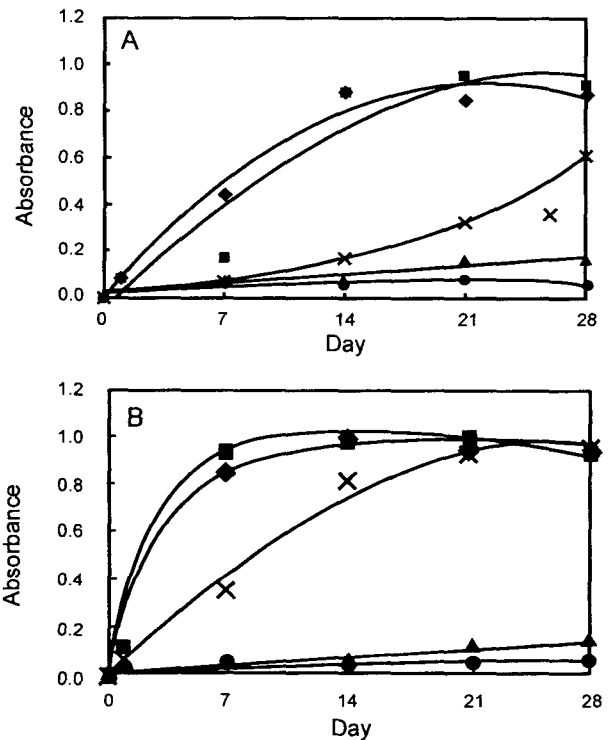


Fig. 7. Time course formation of carboxymethyl hippuryl lysine residue on human serum albumin incubated with glucose and fructose. (A) 20 mg human serum albumin was incubated with 10 mM glucose alone (×), added with 5 mM DTPA (●), with 5 mM DTPA and 0.4 mM H₂O₂ (▲), with 0.4 mM FeCl₂ (◆), and with 0.4 mM FeCl₂ and 0.4 mM H₂O₂ (■) at 37°C in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Absorbance was measured at 294 nm by detecting the color of Girad-T reagent reacted with α-dicarbonyl compounds. (B) 10 mM fructose was incubated under the identical conditions.

달하고 있음을 알 수 있다.

Fructose의 경우 glucose와 거의 유사한 결과를 나타내었지만, 자동산화의 경우와 마찬가지로 glucose에 비해 반응성이 매우 높게 나타났다(Fig. 7). 특히 100 mM을 첨가했을 경우 더 이상의 금속이온에 의한 상승효과가 나타날 수 없을 정도로 반응속도가 빨라짐을 알 수 있었다. Knecht 등은 fructose로부터는 CML이 형성되지 않는다고 하였는데(6), 본 실험에서는 fructose가 glucose보다 빠른 속도로 CML을 형성하는 것으로 나타났다. 하지만 fructose의 autoxidation 결과 glyoxal이 형성되는 것으로 볼 때 Wolff pathway와 동일한 경로로 fructose 또한 CML을 형성할 가능성을 배제할 수 없다고 여겨졌다.

반응성이 강한 α -dicarbonyl 화합물인 glyoxal과 methylglyoxal은 모두가 빠른 속도로 CML을 형성하였다(Table 2). Glyoxal의 경우 불과 하루만에 반응이 종결되었으나, methylglyoxal의 경우에는 좀더 많은 시간이 소요되었다. Eum 등은 glyoxal에 비해 methylglyoxal이 반응성이 크다고 보고 하였다(5). 이는 본 실험의 결과와 다소 차이가 있는데, Dunn 등(28)은 methylglyoxal이 단백질의 lysine잔기와 반응하여 carboxyethyllysine(CEL)을 형성한다고 하였고, Ikeda 등(30)은 6D12는 아니지만 CML에 대한 antibody가 CEL에도 결합한다는 주장을 하였다. 따라서 본 실험의 ELISA 분석결과는 methylglyoxal에 의한 CML의 형성은 CEL일 가능성을 배제할 수는 없었다. 두 α -dicarbonyl 화합물은 모두 빠른 반응 속도로 인해 천이금속이온의 영향을 거의 받지 않았다.

Ascorbic acid 역시 glucose와 fructose, 그리고 다른 di-carbonyl 화합물과 유사한 수준의 CML을 형성하고 있었다(Table 2). 이는 methylglyoxal의 경우와 유사한 수준의 반응속도를 나타내고 있는데, 한가지 차이라면, α -dicarbonyl 화합물에 비하여 금속 킬레이터인 DTPA를 첨가했을 때

CML 생성이 저해되고 있다는 점이다. 하지만, DTPA와 H₂O₂를 같이 첨가했을 경우에는 저해효과가 거의 나타나지 않는 것을 볼 수 있었다. 이는 환원당의 경우와는 달리 ascorbic acid 산화에서는 H₂O₂가 단독으로도 반응을 촉진시킬 가능성을 보여주는 것이다.

PUFA의 경우에는 두 fatty acid 모두 4주의 반응기간 동안 다른 실험군에 비해 비교적 작은 양의 CML을 생성하였다. 반응성이 높은 arachidonic acid 쪽이 반응성이 떨어지는 linoleic acid에 비하여 약 2배 정도의 CML이 형성되었다(Table 2). Fu 등은 glycation에 비해 PUFA의 peroxidation에 의한 CML 형성속도가 더 빠른 것으로 보고하였다(24). 본 실험의 결과 또한 CML 생성량에서는 PUFA가 glucose에 비하여 떨어지지만 반응속도 면에서는 glucose보다 우위에 있음을 알 수 있었다.

Table 2는 또한 4주간의 반응시간 후에 HL model system에서 형성되는 CMHL을 CE와 HPLC를 이용하여 분석한 값과 HSA에 형성되는 CML을 ELISA를 이용하여 분석한 값을 토대로 각 반응에서의 천이금속이온의 영향을 요약한 것이다. Glucose의 경우 각 분석방법에 따라 차이는 있지만, 대략 금속이온에 의해 CML 생성이 1.5~1.7배정도 증가되는 것을 볼 수 있으며, 킬레이터의 저해 효과는 HL model system에서는 60%, HSA에서는 80~90%정도를 나타내었다. 이 결과는 glucose에 의한 단백질의 CML 형성과정은 금속이온촉매 산화과정이며, ROS에 의해 촉진될 수 있음을 보여주고 있었다. 즉, Table 1에 나타낸 바와 같이 glucose 자동산화에 의한 glyoxal 생성량이 금속이온에 의해 약 7배정도 증가하는 것에 비해 glucose에 의한 CML 형성 과정에서는 그 촉진효과가 현저히 줄어든다는 점이다. 이는 glucose에 의해 CML이 형성되는 세 가지 pathway 중에서 Wolff pathway가 minor pathway일 가능성을 보여준다. 만일 Wolff pathway가

Table 2. Relative amounts of N^ε-carboxymethyl hippuryl lysine (CMHL) and N^ε-carboxymethyl lysine (CML) formed from the reaction of human serum albumin with various precursors in the presence of metal ion and chelator using CE, HPLC and ELISA analysis

	+DTPA	+FeCl ₂	+FeCl ₂ , H ₂ O ₂	+DTPA, H ₂ O ₂
CMHL ¹⁾ formed from (using CE analysis)				
Glucose	44.3 ± 1.4 ²⁾	167.0 ± 4.0	173.3 ± 4.3	43.3 ± 0.8
Glyoxal	96.7 ± 19.2	130.6 ± 15.3	119.1 ± 21.7	87.3 ± 16.0
CMHL formed from (using HPLC analysis)				
Glucose	39.3 ± 0.93	170.3 ± 4.4	180.3 ± 4.3	42.7 ± 0.6
Glyoxal	84.0 ± 1.6	102.4 ± 7.2	93.2 ± 13.7	78.3 ± 2.2
CML formed from (using ELISA)				
Glucose	8.7 ± 0.1	151.2 ± 2.2	141.4 ± 3.1	26.0 ± 0.2
Fructose	5.7 ± 0.3	102.0 ± 4.0	103.4 ± 3.5	12.8 ± 1.4
Glyoxal	98.1 ± 4.5	99.3 ± 9.7	100.4 ± 6.8	101.3 ± 8.6
Methylglyoxal	96.0 ± 3.4	99.2 ± 2.9	97.6 ± 3.8	95.2 ± 3.5
Ascorbic acid	68.0 ± 4.0	112.3 ± 2.7	116.4 ± 1.2	106.6 ± 2.1
Linoleic acid	96.7 ± 1.2	140.1 ± 3.4	203.3 ± 0.3	183.3 ± 2.4
Arachidonic acid	100.2 ± 1.7	82.4 ± 2.8	76.5 ± 2.5	104.9 ± 6.3

¹⁾Expressed as the relative percentage compared with the control value which was obtained from the sample added neither metal ion nor chelator after incubation for 4 weeks.

²⁾Means ± SD (n=3).

major pathway라면 그 초기단계이자 율속단계인 glucose 자동산화가 CML 형성과정 전체를 지배하게 될 것이다. 즉 glucose 자동산화에서의 ROS의 촉진효과와 거의 동일한 수준으로 전체 CML 형성과정 역시 ROS에 의해 촉진될 것이다. 하지만, 본 실험결과는 glucose 자동산화에 비해 ROS의 영향이 작게 나타나는 다른 반응경로가 CML 형성의 주 경로일 가능성을 시사하고 있다. 현재 glucose에 의한 CML 형성 기작으로 제시되고 있는 세 가지 pathway 중에서 어느 것이 가장 주된 반응경로인지 아직 의견이 확실하게 모아지지 않고 있다. Wells-Knecht 등은 생체 내의 CML pathway는 산화적 환경에 따라 결정된다고 하였다(13). 그에 의하면 high oxidative stress가 작용하는 경우에는 Nimiki pathway와 Wolff pathway가 추가 되고 low oxidative stress가 작용하는 경우에는 Hodge pathway가 추가 된다는 것이다. Monnier 등은 생체 내의 CML은 50%정도는 Hodge pathway, 40%정도는 Nimiki pathway, 10%정도는 Wolff pathway를 통해서 형성된다고 주장하였다(8). 본 실험의 결과 또한 Monnier 등의 주장과 일치하고 있다.

요 약

단백질의 Maillard 반응의 최종산물의 하나인 N^ε-carboxy methyl lysine(CML)의 형성에 미치는 reactive oxygen species(ROS)의 영향을 살펴보았다. Glucose와 fructose는 자동산화과정을 통하여 CML형성의 주된 propagator인 α-dicarbonyl 화합물은 물론 glyoxal을 생성시키는 것이 확인되었다. 또한 이 과정은 ROS를 형성하는 천이금속이온에 의해 촉진되는 산화과정임을 알 수 있었다. 반응성이 높은 fructose에 비해 glucose의 경우가 ROS의 영향이 더욱 현저하게 나타났다. 불포화 지방산도 glyoxal을 형성하고 있었으며, 불포화도가 클수록 glyoxal 생성량이 빠르게 나타났으나 ROS의 영향은 비교적 작게 나타났다. Ascorbic acid 역시 ROS와는 무관하게 glyoxal을 생성하였다. 이는 ROS의 영향 이전에 이들 물질들의 반응성이 매우 높다는 것을 의미하고 있다. Hippuryl lysine을 이용한 model system에서도 glucose로부터의 N^ε-carboxymethyl hipuryllysine(CMHL) 형성에는 ROS의 영향이 높게 나타났으나, 반응성이 매우 높은 glyoxal에 의한 CMHL 생성에는 ROS의 영향이 거의 나타나지 않았다. CML에 특이적으로 결합하는 monoclonal antibody (6D12)를 이용한 antigen coated noncompetitive indirect ELISA 분석을 통해서 CML생성에 미치는 ROS의 영향을 살펴본 결과 대체로 위의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 반응성이 높은 물질일수록 CML 형성에 ROS의 영향이 작게 나타남을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구의 일부는 2001년도 제주대학교 발전기금 국외과

견 연구지원계획에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Hodge JE. 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Chem Soc* 1: 928-943.
- Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. 1995. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 34: 3702-3709.
- Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. 1995. N^ε-(Carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue protein. *Biochemistry* 34: 10872-10878.
- Shin DB, Hayase F, Kato H. 1988. Polymerization of proteins caused by reaction with sugars and the formation of 3-deoxy-glucosone under physiological conditions. *Agr Biol Chem* 52: 1451-1458.
- Eum SY, Chung JO, Shin DB, Yang R. 1996. Identification of glyoxal as the reactive intermediates during autoxidative glycosylation of glucose and fructose. *Kor J Gerontol* 16: 57-61.
- Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, McCance DR, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. 1991. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes* 40: 190-196.
- Bucala R, Vlassara H. 1995. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Int* 26: 875-888.
- Monnier VM, Nagaraj RH, Portero-Otin M, Glomb M, Elgawish AH, Sell DR, Friedlander MA. 1996. Structure of advanced Maillard reaction products and their pathological role. *Nephrol Dial Transplant* 11 (Suppl 5): 20-26.
- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. 1986. Identification of N^ε-(carboxymethyl)lysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261: 4889-4894.
- Smith PR, Thornalley PJ. 1992. Mechanism of the degradation of non-enzymatic glycated proteins under physiological conditions. *Eur J Biochem* 210: 729-739.
- Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. 1999. Amadorin: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 251-258.
- Glomb MA, Monnier VM. 1995. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 270: 10017-10026.
- Wells-Knecht MC, Thorpe SR, Baynes JW. 1995. Pathway of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry* 34: 15134-15141.
- Shin DB, Fearher MS. 1990. 3-Deoxy-L-glycero-pentos-2-ulose(3-deoxy-L-xylosone) and L-threo-pentos-2-ulose-xylosone as intermediates in the degradation of L-ascorbic acid. *Carbohydrates Res* 208: 245-250.
- Mlakar A, Spiteller G. 1994. Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid. *Biochim Biophys Acta* 1214: 209-220.
- Nerlich AG, Schleicher ED. 1999. N^ε-(Carboxymethyl)lysine in atherosclerotic vascular lesions as a marker for local oxidative stress. *Atherosclerosis* 144: 41-47.
- Bynes JW. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412.
- Nagai R, Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Araki T, Horiuchi S. 1997. Hydroxyl radical mediates N^ε-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori products. *Bio-*

- chem Biophys Res Commun* 234: 167-172.
19. Suarez G, Rajarm R, Oronsky AL, Gawinowicz MA. 1989. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). *J Biol Chem* 264: 3674-3679.
 20. Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y, Taniguchi N. 1992. Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. *J Biol Chem* 267: 18505-18510.
 21. Monnier VM, Cerami A. 1983. Detection of nonenzymatic browning products in the human lens. *Biochim Biophys Acta* 760: 97-10.
 22. Cerami A. 1985. Hypothesis glucose as a mediator of aging. *J Am Geria Soc* 33: 626-632.
 23. Inagi R, Miyata T, Yamamoto T, Suzuki D, Urakami K, Saito A, Strihou CY, Kurokawa K. 1999. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells; role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett* 463: 260-264.
 24. Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. 1996. The advanced glycation end product, N^ε-(carboxymethyl)lysine, is a products of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 271: 9982-9986.
 25. Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, Uchida K, Kurokawa K. 1998. Generation of protein carbonyls by glycoxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 437: 24-28.
 26. Loidl-Stahlhofen A, Spiteller G. 1994. α -Hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1211: 156-160.
 27. Varna SD, Richards RD. 1988. Ascorbic acid and eye lens. *Ophthalmic Res* 29: 164-173.
 28. Dunn JA, McCance DR, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW. 1991. Age-dependent accumulation of N^ε-(carboxymethyl)lysine and N^ε-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* 30: 1205-1210.
 29. Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. 1999. Oxygen is not required for browning and crosslinking of protein by pentoses; relevance to Maillard reactions *in vivo*. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 1297-1305.
 30. Ikeda K, Nagai R, Sakamoto T, Sano H, Araki T, Sakata N, Nakayama H, Yoshida M, Ueda S, Horiuchi S. 1998. Immunochemical approaches to AGE-structures; characterization of anti-AGE antibodies. *J Immunol Methods* 215: 95-104.

(2003년 8월 6일 접수; 2003년 11월 19일 채택)