

In vitro Aging에 있어서 콜라겐 성숙가교의 변화에 대한 비타민 C의 영향

김 미 향

일본 오차노미즈여자대학 식물과학과

The Effect of Ascorbic Acid on the Changes in Amounts of Pyridinoline from Bone Collagen during *In vitro* Aging

Mi-Hyang Kim

Dept. of Nutrition and Food Science, Ochanomizu University, Tokyo 112, Japan

Abstract

As pyridinoline is one of the predominant cross-links in a mature collagen, pyridinoline formation may be an essential step during the growth process to obtain normal mechanical strength in collagen fibrils. However, the excess formation of pyridinoline in collagen will probably make the tissue stiffer, less soluble and less digestible by enzymes. We investigated the changes of pyridinoline of bone collagen and the role of ascorbic acid(AsA) on the formation of pyridinoline. The pyridinoline content of bone collagen significantly increased during incubation for 1~5 weeks at 37°C *in vitro*. The addition of AsA decreased pyridinoline to half the amount found in controls with 5 week incubation. When dehydroascorbic acid(DHA) and L-2,3-diketogulonic acid(DKG), the oxidative products of AsA, were supplemented to bone collagen solution instead of AsA, the content of pyridinoline in bone collagen was about 80% or 70% that of controls, respectively. These results suggest that pyridinoline content decreases by the addition of AsA *in vitro*. Furthermore, it was shown that AsA in oxidized form also affected the formation of pyridinoline.

Key words: pyridinoline, collagen, AsA, DHA, DKG, *in vitro*

서 론

비타민 C(ascorbic acid: AsA)는 예로부터 항피혈 병 인자로 알려져 왔으나, 최근에는 새로운 생리적 역할-혈관 내피세포의 보전, Ca 대사의 조절인자, cholesterol 대사 등-에 주목하여 장기간에 걸친 건강의 유지, 증진을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(1-4). Collagen 생합성에 미치는 AsA의 영향에 관한 보고는 많으나(5-8), 노화에 의하여 생체내에 나타나는 여러 가지 현상에 대한 AsA의 작용 여부는 확실하지 않은 경우가 대부분이다. Collagen은 연령과 함께 변화하며, 특히 collagen 가교 변화는 불용화, 물리적·화학적 안정성의 증가를 초래한다고 알려져 있다(9-17). 그러므로, 가교증가에 의한 collagen 불용화는 조직경화를 일으킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

In vivo aging에 있어서 collagen은 다음과 같은 변화를 나타낸다. 가용성 procollagen 분자로서 합성되는 collagen은, 분자내 또는 분자간에 다수의 가교를 형성하여 collagen 섬유가 된다(18-21). 동물의 성장기

에 조직은 다량의 가용성 collagen을 함유하고 있으나 성장기 이후에 그 양은 저하한다(16,22). 노화에 의한 결합조직의 변화는, 특히 섬유 구성성분의 주체인 collagen 안정성의 증가이며, 이러한 안정성은 collagen을 구성하는 collagen 분자간 가교의 증가에 의한 것이다. Collagen 중의 가교형성은 주로 성장 과정에서 이루어지며, 이러한 *in vivo* aging에서의 collagen 변화현상은 *in vitro* aging에서도 일어나고 있는 것으로 추측되고 있다. Pyridinoline은 collagen의 성숙가교물질로서 hydroxylysine 1분자와 생체내에서 효소적 반응에 의해 생성되어진 hydroxyallysine 2분자가 결합하는 비효소적 반응에 의해 생성된다(23-26)(Fig. 1).

본 연구에서는 *in vitro* aging에 있어서 collagen 가교 변화와 collagen 가교 변화에 대한 AsA의 역할을 규명하기 위하여, collagen 성숙 가교 중의 하나인 pyridinoline의 *in vitro* aging에서의 변화와 collagen 생합성과 관련이 깊은 AsA의 pyridinoline 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 가교 저해제인 β -amino-propionitrile(BAPN)과 D-penicillamine, AsA 관련물

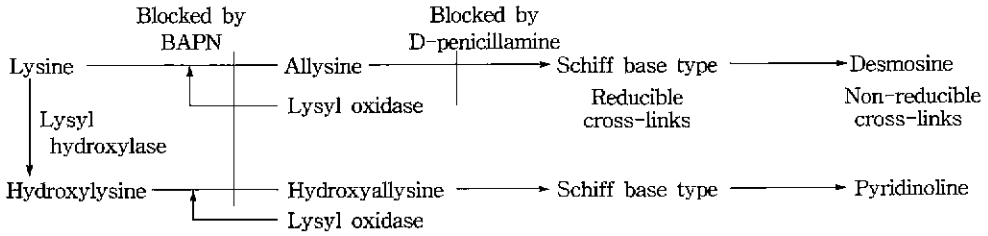


Fig. 1. Biosynthetic pathway of collagen crosslinks.

질인 dehydroascorbic acid(DHA)와 2,3-diketo-L-gu-
lonic acid(DKG) 및 각종 환원제인 erythroic acid(ErA),
glutathione(GSH), hydroquinone에 대해서도 비교 검
토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

D-penicillamine hydrochloride 및 dehydroascorbic
acid(DHA)는 Sigma Chemical Company(U.S.A.)로
부터 구입하였고, ascorbate(AsA), erythroate(ErA),
glutathine(GSH), hydroquinone 및 catalase는 和光純
藥工業(株)(Japan)에서 구입하였다. Pyridinoline stan-
dard는 Fujimoto와 Morigachi의 방법에 의해 다음과 같
이 추출하였다(23). Achilles tendon collagen을 110°C
에서 24시간 가수분해한 후 농축하여, H₂O와 0.5M HCl
용액으로 농도 기울기에 의해 p-cellulose column으로
분획 추출하였다. 같은 방법으로 2번 추출한 후 Sephadex
G-10 column을 사용하여 0.5M acetic acid으로 정제
하였다. Acetic acid를 제거한 후 0.1M HCl에 용해하여
pyridinoline standard로 사용하였다. 2,3-diketo-L-gu-
lonic acid(DKG)는 香川과 龍口の 방법에 의하여 합성
하였다(27). 합성한 DKG는 dinitrophenylhydrazine법
및 HPLC에 의해 순도를 조사하여, 98%이상의 것을 사
용하였다.

시료조제

실험동물은 2주된 Hartley종의 수컷 guinea pig (200g
전후)를 사용하였고, 실험동물로부터 채취한 골조직은
Fig. 2, 3에 표시한 바와 같이 탈수, 탈지, 탈회처리한 다
음 본 실험의 시료로 사용하였다.

반응조건의 설정

골콜라겐 추출물을 각각 0.2g 평량하여 아래와 같이
각 군으로 분류한 다음, 0.15M NaCl/0.05M Tris-HCl

Tissue

- Dehydrated with 100ml Acetone
- Defatted with 250ml Chloroform : Methanol(2 : 1)
- Rinsed with 500ml H₂O

Dehydrated and defatted sample

Fig. 2. Preparation for dehydrated and defatted tissues.

Bone

- Pulverized
- Added 20% NaCl/0.05M Tris-HCl Buffer(pH 7.5)
- Centrifuged at 15,000g for 15min

Precipitate

- Dialyzed with 0.5M EDTA/0.05M Tris-HCl Buffer (pH7.5) for 4days
- Centrifuged at 15,000g for 15min
- Rinsed with H₂O
- Centrifuged at 15,000g for 15min

Precipitate

Fig. 3. Decalcification of bone.

Buffer(pH 7.5)를 가하여 37°C에서 1~5주간 진동, 가
온하였다. 각 실험군은 장시간의 가온에 의한 세균번
식을 막기위해 2~3방울의 toluene을 표층에 첨가하였
다. In vitro aging에 있어서 collagen 중의 pyridinoline
함량의 변화를 조사하기 위해 대조군(C), AsA첨가군
(A), 가교저해제인 BAPN(B), D-penicilline(D) 첨가
군의 4군으로 나누어 37°C에서 5주간 진동 가온하였다.
또한, AsA, DHA 및 DKG의 최종 농도가 각각 0.1, 1.0,
5.0 및 10.0mM 되도록 시료에 첨가하여 37°C에서 2주
간 진동 가온하여pyridinoline 생성에 대한 AsA 및 AsA
분해물질의 영향을 검토하였다. Pyridinoline 생성에 미
치는 각종 환원제의 영향을 관찰하기 위하여 AsA, ErA,
GSH 및 hydroquinone의 각 용액을 최종 농도가 0.1과
1.0mM 되도록 시료에 첨가하여 37°C에서 2주간 진동
가온하였다.

분석시료의 조제 및 분석방법

반응이 끝난 각 실험군은 원심분리 후 침사에 6N HCl
을 첨가하여 110°C에서 24시간 산가수분해 후 전조시

켜 6N KOH을 사용하여 중화, 여과한 후 시료용액으로 하였다. 이 시료용액은 Woessner법(28)(Fig. 4)에 의하여 hydroxyproline(Hyp)량을 측정한 후 collagen량으로 환산하였고, Arakawa 등에 의한 HPLC법(29)(Table 1)에 의하여 pyridinoline량을 측정하였다. Collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen 중의 Hyp 비율은 평균 110잔기/1000잔기(약 10%)이므로 collagen량의 환산은 일반적으로 다음 식에 준한다.

$$\text{Collagen량}(\mu\text{g}) = 1/11 \times \text{Hyp량}(\mu\text{g})$$

결과 및 고찰

In vitro aging에 있어서 collagen 중의 pyridinoline 함량 및 AsA의 영향

Shimizu 등(30)의 보고에 의하면 토끼의 골collagen에 생리적 식염수를 첨가하여 37°C의 호기적 조건하에서 장시간 가온한 경우 12주까지 pyridinoline 생성량이 증가하며, 소의 골collagen의 경우 4주까지는 증가하나 그 이후에는 감소하는 경향을 나타낸다(Table 2). Guinea pig의 골collagen을 사용한 본 실험의 결과에서, pyridinoline은 반응 2주후 약 3.27mmol/mol hydroxyproline으로 초기의 약 1.5배 정도로 급격히 증가하였고, 4주 이후는 감소하는 경향을 나타냈다(Table 2). In vitro aging에 있어서 guinea pig의 골collagen 중의 pyridinoline 생합성에 영향을 미치는 인자에 대하여 검토한 결과(Fig. 5), 진동 가온을 시작하여 2주간까지는 AsA첨가군(A), β-aminopropionitrile(B)첨가군, 대조군(C) 및 D-penicillamine첨가군(D)의 각군 모두에서 pyridinoline 증가가 확인되었다. D-penicillamine 첨가군(D)의 pyridinoline 함량은 대조군(C)과 유사하였으며, 따라서 in vitro에서는 pyridinoline 생합성에 관여하지 않는 것으로 평가되었다. BAPN 투여군의 pyridinoline 생성률은 대조군에 비해 낮았다. In vitro에서는

- 2.0ml sample soln. or 2.0ml standard soln.
- ├ Added 1.0ml of A soln.*
- ├ Allowed to stand at room temperature for 20min
- ├ Added 1.0ml of B soln.**
- ├ Allowed to stand at room temperature for 5min
- ├ Added 1.0ml of C soln.***
- └ Incubated at 60°C for 20min

Measurement of absorbance at 560nm

*A soln.: 0.7% Chloramine T/15% Methylcellosolve/0.5M Citrate Buffer pH 6

**B soln.: 19% Perchlorate

***C soln.: 20% p-Dimethylaminobenzaldehyde/ Methylcellosolve

Fig. 4. Determination of hydroxyproline.

Table 1. Chromatographic conditions for pyridinoline analysis

Apparatus	: Shimadzu LC-6A
Detector	: Fluorescence HPLC Monitor RF-535
Column	: Inertsil ODS-2 5μm(250×4.6mm id.)
Eluent	: Acetonitrile/0.1M Sodium phosphate buffer, pH 3.5(25 : 75) containing SDS and Na ₂ EDTA
Flow Rate	: 1.0ml/min
Excitation wavelength	: 295nm
Emission wavelength	: 395nm

Table 2. Changes of pyridinoline content in vitro aging of bone collagen

Animals	Incubation time (week)	Pyridinoline contents	
		Initial (mmol/mol Hyp)	Final (mmol/mol Hyp)
Guinea pigs	2	1.56	3.27
	4	1.56	2.79
Chicks	4	0.05	0.4
		(0.005) ¹⁾	(0.04)
Rabbits	12	1.3	2.9
		(0.13)	(0.29)
Bovines	4	0.8	1.3
		(0.08)	(0.13)

¹⁾Res/100Hyp

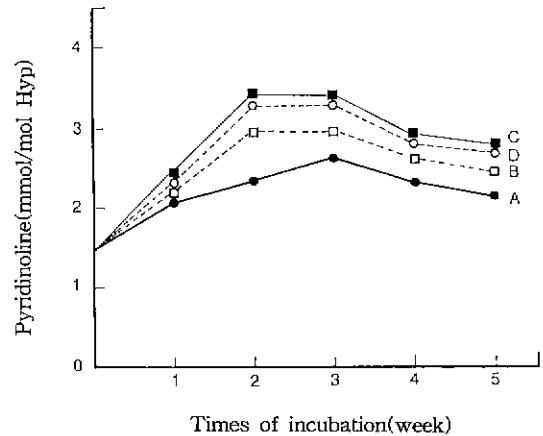


Fig. 5. Concentration of pyridinoline in bone collagen of guinea pigs.

A : AsA, B : β-Aminopropionitrile, C : Control, D : D-penicillamine.

BAPN의 투여는 골의 기형이나 결합조직 강도의 저하 등을 초래하는 것으로 알려져 있는데(16). 본 실험에서도 이 lysyl oxidase는 pyridinoline 생성을 저해하는 것으로 나타났다. AsA 첨가군의 pyridinoline의 생성률은 대조군에 비해 낮았으며, 5주째에는 대조군의 약 50% 수준이었다. 이러한 결과는 guinea pig의 골collagen 중의 pyridinoline 생성은 in vitro aging 모델에서 증가하며 AsA에 의해 pyridinoline의 합성이 억제되어짐을 시사하고 있다.

In vitro aging에 있어서 AsA 및 AsA 산화물이 pyridinoline 생성에 미치는 영향

AsA는 중성 조건하에서 가온에 의해 24시간 이내에 산화되므로 pyridinoline의 생성억제는 반응의 초기 단계에서 영향을 주는 것으로 추측하여 AsA 산화생성물인 DHA와 DKG의 영향에 대해서도 조사하였다. AsA를 첨가한 경우의 pyridinoline량은 AsA 농도의 상승과 더불어 감소하였고, DHA 및 DKG 첨가시에 비해 그 생성량이 낮았다(Fig. 6). 대조군의 초기 pyridinoline 함량은 1.91mmol/mol Hyp였으나, 반응이 끝난 2주 후에는 2.53mmol/mol Hyp으로 생성량은 0.62mmol/mol Hyp이었다. AsA 0.1mM 첨가한 경우, 2주간의 생성량은 0.60mmol/mol Hyp로서 대조군의 95% 정도였으나, 1.0mM 이상의 AsA 첨가시에는 대조군의 약 60%(0.39 mmol/mol Hyp) 정도로 AsA에 의한 pyridinoline의 생성억제가 확인되었다.

또한 DHA 및 DKG 1.0mM 첨가한 경우, 각각 0.49, 0.52mmol/mol Hyp가 생성되었으며, 대조군에 비해 80%의 생성률을 나타내었다. DHA의 경우, 첨가 농도의 증가에 따라 적은 양이나 생성물의 저하가 관찰되었으나, AsA 첨가시에 비해 높은 생성률을 나타내었다. 이것은 DKG의 경우에 있어서도 같은 경향이었다. 즉, AsA에 의한 pyridinoline 생성억제 정도가 가장 컸으며, DHA 및 DKG에 의한 pyridinoline의 생성억제 정도는 AsA에 의한 생성억제의 반 이상을 차지하는 것으로 나타났다. 본 실험 model계에서 AsA의 소실이 매우 빠르게 일어나는 것을 고려하면, 비효소적 반응계의 초기 단계에서는 환원형 AsA에 의한 pyridinoline 생성 억제효과는 크지않을 것으로 사료된다. 한편, DHA에 관

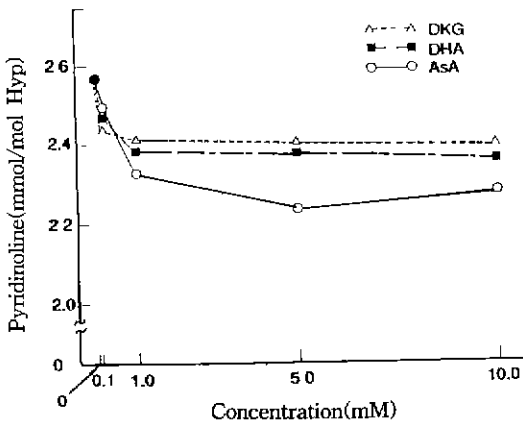


Fig. 6. Effect of AsA, DHA and DKG concentration on the synthesis of pyridinoline in bone collagen.

한 지금까지의 보고에 의하면, 단백질 중의 lysine잔기 또는 유리 lysine과의 반응에서 Maillard 반응의 초기 단계와 유사한 반응에 의해 N-carboxymethyllysine이 생성되고 그 생성량은 AsA 보다 DHA를 첨가하였을 때 더 높았다고 한다(31). 단백질과 DHA를 혼합하여 공기중에 방치하였을 때 lysine의 감소가 급격히 나타났던 것으로 보아 단백질 중의 lysine 잔기와 DHA가 높은 반응성을 가지고 있음을 알 수 있고, pyridinoline은 hydroxyallysine 2분자와 Hyl 1분자로부터 생성되므로 37°C의 중성 조건하에서 Hyl의 ε-amino기와 DHA의 amino-carbonyl 반응이 진행되었을 가능성도 충분히 고려해 볼 수 있다.

본 실험결과, pyridinoline 생성의 비효소적 반응 model계인 *in vitro* aging 모델계에 있어서 AsA 분해 생성물이 최종 생성물로서 pyridinoline량을 저하시키는 것으로 관찰되었고, AsA에 의한 pyridinoline 생성 억제 작용은 AsA 분해생성물이 관여하고 있는 것으로 확인되었다. 그러나, AsA에 의한 pyridinoline 생성이 DHA나 DKG에 비해 pyridinoline 생성억제 효과가 큰 것으로 보아, 이러한 분해생성물의 작용 만으로는 AsA에 의한 pyridinoline 생성억제 효과를 완전히 설명하기 어렵다. 배양세포의 collagen 합성량은 AsA 농도에 의존하여 AsA 농도 0.1mM에서 최대가 되나 그 이상의 농도에서는 합성이 저해되어 1.0mM 이상에서는 세포의 성장이 저해되는 것으로 보고되었다(8). 또한, AsA을 collagen과 함께 37°C에서 30분간 가온한 경우, 반응 생성물의 hydroxy radical이 collagen에 작용하여 collagen 중의 histidine 함량을 저하시킨다는 보고도 있다(32).

본 실험에서도 AsA 농도가 1.0mM 이상에서 pyridinoline생성이 억제되었다(Table 3). 그러므로 hydroxy radical을 생성하는 원인물질 중의 하나로 과산화수소를 분해하는 효소인 catalase를 첨가하여 AsA의 pyridinoline생성에 대한 영향을 조사하였다(Table 2). Catalase 존재하에서 AsA을 첨가한 군에서는 pyridinoline 생성량이 증가하였으나, 대조군의 수준에는 미치지 못하였다. Fig. 6에 나타난 것과 마찬가지로 AsA과 DHA를 첨가한 경우의 pyridinoline 생성량의 차이는 10% 정도였으며, 본 실험결과에서도 catalase에 의해 거의 같은

Table 3. Effect of catalase and AsA on pyridinoline content in bone collagen of guinea pigs

Compounds	Pyridinoline formed (mmol/mol Hyp)
Control	0.756
AsA	0.515
AsA+catalase	0.563

정도의 회복률(8.5%)을 나타내었으므로, 적은 효과이기는 하나 AsA에 의한 free radical 생성이 pyridinoline 생성을 억제하는데 기여한 것으로 추정되었다.

In vitro aging에 있어서 각종 환원제가 pyridinoline 생성에 미치는 영향

비효소적 반응의 초기단계에서, 환원형으로서의 AsA가 pyridinoline 생성억제에 일부 효과를 나타내었으므로, in vitro aging에서 골collagen 중의 pyridinoline 생성에 미치는 각종 환원제의 영향을 조사하였다(Table 4). AsA의 입체이성체이며 항산화제로서 식품첨가제로 넓게 이용되고 있는 ErA를 첨가한 경우, AsA와 유사한 pyridinoline 생성 억제효과가 관찰되었고, 생체내에서 산화 환원 반응에 관여하는 GSH를 첨가한 경우에 있어서도 pyridinoline 생성량이 억제되었다. Hydroquinone은 강한 환원성을 나타내는 물질로서 pyridinoline 생성에 대한 억제효과가 AsA 보다 큰 것으로 나타났다. In vitro 실험에서, pyridinoline 중간체인 shiff염기 또는 dehydrodihydroxylysinonorleucine은 NaBH₄에 의한 환원으로 안정한 화합물인 dihydroxylysinonorleucine으로 변화하는 것으로 알려져있다(33). NaBH₄는 hydroquinone과 마찬가지로 생체성분은 아니지만, NaBH₄에 의한 반응과 유사한 환원반응이 생체내에서 작용하는 환원제에 의해 생체내에서도 일어날 것으로 추정되고 있다(34). 이러한 결과로 보아, AsA은 ErA 및 GSH와 같이 생체내에서 환원제로서 작용하여 dehydrodihydroxylysinonorleucine 등의 pyridinoline 중간체를 더욱 안정한 화합물로 변화시켜 hydroxylysine의 ε-amino기와의 반응을 억제함으로써 pyridinoline 생성을 억제할 수 있는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 in vitro aging에 있어서 골collagen

중의 pyridinoline 변화에 대한 AsA의 역할에 대해 조사하였다. Guinea pig의 골collagen 중의 pyridinoline은 in vitro에 있어서도 증가하였다. 가교저해제인 D-penicillamine은 pyridinoline 생성에 영향을 거의 미치지 않았으나, lysyl oxidase의 저해물질인 BAPN은 in vitro aging에서도 효소적 또는 비효소적 반응계에서 pyridinoline 생성을 저해하는 것으로 나타났다. 또한, AsA 1.0mM 이상의 농도는 pyridinoline 생성을 현저히 억제하였다. AsA 산화생성물인 DHA와 DKG도 in vitro aging에서 pyridinoline 생성을 부분적으로 억제하였다. 또한, 환원형 AsA으로서의 역할을 규명하기 위해 각종 환원제의 영향을 비교 검토한 결과, AsA는 ErA 및 GSH와 같이 생체내에서 환원제로 작용하여 pyridinoline 중간체를 환원하여 더욱 안정한 화합물로 변화시켜 pyridinoline 반응을 억제하는 것으로 추정되었다. 이러한 제반 결과로부터, guinea pig의 골collagen 중의 pyridinoline은 in vitro aging에 있어서도 증가하며, 이러한 pyridinoline의 생성증가는 AsA에 의해 억제되었다.

문 헌

1. 吉岡滿城：血清ビタミン濃度と血壓との關聯. 武田藥報, 373, 15(1988)
2. 村田 晃：中高年の健康とビタミンC. 武田藥報, 373, 1 (1988)
3. 村田 晃：ビタミンC の多様な作用と作用機作. 日本農藝化學會誌, 64, 1843(1990)
4. Frei, B. : Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 1113S(1991)
5. 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(1990)
6. Murad, S., Grove, D., Lindberg, K. A., Reynolds, G., Sivarajah, A. and Pinnell, S. R. : Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2879(1981)
7. Heino, J., Mattikahari, V., Jaakkola, S. and Peltonen, J. : Collagen in the extracellular matrix of cultured scleroderma skin fibroblasts: changes related to ascorbic acid-treatment. *Matrix*, 9, 34(1989)
8. Hata, R., Sunada, H., Arai, K., Sato, T., Ninomiya, Y., Nagai, Y. and Senoo, H. : Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and ascorbate in cultured human skin fibroblasts. *Eur. J. Biochem.*, 173, 261(1988)
9. 藤本大三郎：コラーゲン分子の變化とエシinger-老化をくいとめる方法はみつかるか. 現代化學, 8, 10(1982)
10. Fujimoto, D. : Aging and cross-linking in human aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109, 1264(1982)

Table 4. Effect of various reducing agents on the formation of pyridinoline in bone collagen

Compounds	Amount added (mM)	Pyridinoline formed (mmol/mol Hyp) (%)	
AsA	0.1	0.644	97.9
	1.0	0.329	50.0
ErA	0.1	0.664	100.9
	1.0	0.477	72.5
GSH	0.1	0.665	101.1
	1.0	0.444	67.5
Hydroquinone	0.1	0.378	57.5
	1.0	0.056	8.5
Control	-	0.658	100

11. Robins, S. P. and Baily, A. J. : The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem. J.*, **163**, 339(1977)
12. Robins, S. P. : Turnover and cross-linking of collagen. *Collagen in Health and Disease*, **9**, 160(1982)
13. Yamauchi, M., Woodley, D. T. and Mechanic, G. L. : Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 898(1988)
14. Kuboki, Y. and Mechanic, G. L. : Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. *Calcif. Tissue Int.*, **34**, 306(1982)
15. Siegel, R. C. : Collagen cross-linking effect of D-penicillamine on cross-linking *in vitro*. *J. Biologic. Chem.*, **252**, 254(1977)
16. Eyre, D. R., Dickson, I. R. and Ness, K. V. : Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem. J.*, **252**, 495(1988)
17. Kim, M. H., 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(1994)
18. 畑隆一郎 : コラーゲン-その機能と代謝. 蛋白質核酸酵素, **31**, 29(1986)
19. Davison, P. F. : Bovine tendons-aging and collagen cross-linking, *J.B.C.*, **253**, 5635(1978)
20. Fujimoto, D. : Aging and cross-linking in human Aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1264(1982)
21. Yamauchi, M., Woodley, D. T. and Mechanic, G. L. : Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 898(1988)
22. Light, N. D. and Bailey, A. J. : Changes in crosslinking during aging in bovine tendon collagen. *FEBS LETTERS*, **97**, 183(1979)
23. Fujimoto, D. and Moriguchi, T. : Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. *J. Biochem.*, **83**, 863(1978)
24. Fujimoto, D., Moriguchi, T. and Hayashi, H. : The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 52(1978)
25. Barber, M., Bordoli, R., Elliott, G. J., Fujimoto, D. and Scott, S. E. : The structures of pyridinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1041(1982)
26. Tsuda, M., Ono, T., Ogawa, T. and kawamishi, Y. : Pyridinoline is a real moiety of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1407(1982)
27. 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(1962)
28. Woessner, J. F. : The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containig small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 440(1961)
29. Arakawa, N., Kim, M. H. and Otsuka, M. : An improved high-performance liquid chromatographic assay for the determination of pyridinoline in connective tissues. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**, 375 (1992)
30. Shimizu, K., Yamamuro, T., Higuchi, K. and Takeda, T. : *In vitro* aging of pyridinoline crosslinks in bone and tendon collagens. *Arch. Jpn. Chir.*, **50**, 789(1981)
31. Uchiyama, A., Inove, T. and Fujimoto, D. : Synthesis of pyridinoline during *in vitro* aging of bone collagen. *J. Biochem.*, **90**, 1795(1981)
32. Dunn, J. A., Ahmed, M. U., Murtiashaw, M. H., Richardson, J. M., Walla, M. D., Thorpe, S. R. and Baynes, J. W. : Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions. *Biochemistry*, **29**, 10964(1990)
33. 永井 裕, 藤本大三郎 : コラーゲン代謝と疾患. 講談社, p.69(1982)
34. Mechanic, G. L., Gallop, P. M and Tanzer, M. L. : The nature of crosslinking in collagens from mineralized tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 664(1971)

(1997년 3월 13일 접수)