

비타민 E 보강식이가 당뇨 KK마우스에서 당화단백질 생성에 미치는 영향

안현숙 · 임은영 · 김해리[†]

서울대학교 식품영양학과

Effects of Vitamin E Supplementation on Glycosylation Products in Diabetic KK Mice

Hyun-Sook Ahn, Eun-Young Lim and Harriet Kim[†]

Dept. of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract

We investigated the effects of vitamin E supplementation on the protein glycosylation *in vivo*. Weaned KK-mice were fed high fat diet containing 20% corn oil(wt/wt), and sacrificed at 4, 6, and 9 months of age. High vitamin E diet was the high fat diet supplemented with an excess amount of dl- α -tocopheryl acetate (2080IU/kg diet). We measured HbA_{1c} as a glycosylation early product, and collagen-linked fluorescence (CLF) of skin as a glycosylation end product. We found that diabetic group had increased levels of HbA_{1c} within 2 months after onset of diabetes and during the experiment. The skin CLF increased dramatically 5 months after onset of diabetics. Treatment with vitamin E did not modify the level of blood glucose. However, we observed a significant lowering in CLF and HbA_{1c} in diabetic mice.

Key words: high vitamin E supplementation, KK mice, glycosylation early product, glycosylation end product

서 론

환원당과 아미노산 사이에서 일어나는 Maillard 반응이 생체내에서도 일어날 수 있으며 그 반응산물은 정상적인 노화과정과 당뇨합병증에 주요한 역할을 한다는 보고들이 있다(1-3). 체내 포도당의 aldehyde 반응기와 아미노산의 N-terminal, 또는 단백질의 lysine residue의 ϵ -amino기가 가역적으로 빠르게 반응하여 비효소적으로 포도당과 amino기가 결합하게 된다 이 반응을 통해서 생성되는 Schiff base는 좀 더 안정한 ketoamine형태로 천천히 재배열(Amadori rearrangement) 되고 이 amadori 산물이 체내에 오래 머물게 되면 탈수, 재배열 과정을 통해 최종 당화산물(AGE, advanced glycosylated end product)이 형성된다. 이 최종 당화산물에서 나오는 특이적인 형광성이 비당뇨쥐에 비해 당뇨쥐의 안구 정맥에서 2.6배 증가됨이 알려졌고, lens protein, renal cortex에서도 비슷한 정도의 결과를 보였다고(4-6).

최근 당뇨병의 유병률이 증가되고 있고, 또한 당뇨 환자의 유병기간이 증가되고 있기 때문에 당뇨 합병증

예방 및 치료의 중요성이 대두되고 있는 바, 당뇨합병증의 기전으로 제시되는 Maillard 반응산물 축적 감소에 관한 연구의 중요성도 강조된다고 보인다. Aspirin, lysine, aminoguanidine이 당화 반응 저해제로 제시되나, 안전성과 유용성이 문제되고, 또한 aminoguanidine은 최종 당화산물에만 영향을 준다(7,8). 또 당뇨병에서는 항산화 방어기전이 저하되고, 세포내외의 단백질로부터 금속 이온이 유리되어 산화성 손상이 진행되므로 비타민 C 투여는 항산화 활성보충효과보다는 산화 촉진제로 작용하여 조직의 손상을 가중시켰음이 보고되었다(9). 제2형 당뇨병환자에게 비타민 E를 900mg/day 씩 4개월간 투여시 placebo에 비해 plasma GSSG-GSH 비를 감소시키고 HbA_{1c} 농도도 감소시켰다는 보고(10)는 당뇨병환자에게 있어서 비타민 E의 사용이 유용함을 제시해 준다. 또 다른 실험에서는 비타민 E를 1200mg/day와 600mg/day씩 당뇨병환자에게 2개월간 투여시 투여 전과 비교할 때 혈당엔 변화가 없었으나 HbA_{1c}와 glycosylated plasma protein은 유의적으로 감소시켰다(11) 이렇듯 비타민 E가 당뇨시의 비효소적 당화과정에 미치는 영향은 주로 초기 당화산물의 감소에 있는

[†]To whom all correspondence should be addressed

것으로 제시된 연구들이 많고, 당뇨합병증이 일어나는 단계까지 연구한 것은 아직 불충분한 형편이다. 본 연구는 당뇨병에서 Maillard 반응의 변화를 확인하고, 비타민 E 보강식이가 당뇨합병증의 기전으로 제시되는 Maillard 반응산물에 미치는 영향을 밝혀보고자 계획되었다. 이를 위해서 제2형 당뇨 동물모델인 KK 마우스를 사용하였는데 KK 마우스는 베타세포의 증식, 고인슐린혈증, 경도의 고혈당 및 내당능이상을 나타내며 일본에서 처음 개발된 Japanese KK 마우스와 이를 C-57BL/6종과 교잡시킨 Toronto-KK(T-KK) 잡종마우스, 이외의 몇가지 종으로 나누어진다. T-KK 마우스의 경우 체중증가가 나타나면서 고혈당이 나타나나, Japanese KK 마우스의 경우 당뇨병을 발현시키기 위하여서는 고칼로리식이의 투여가 필요하고, KK 마우스의 고혈당 증세는 생후 약 4개월에서 1년 사이에만 나타나는 것으로 보고되어 있다(12).

본 실험에서는 KK 마우스에 고지방식을 섭취시켜 당뇨를 유발하고, Maillard 반응의 초기산물인 HbA_{1c}와 후기산물에서 나오는 CLF(collogen-linked fluorescence)가 증가하는지 확인하고, 당뇨병에 의해 증가되는 Maillard 반응이 비타민 E의 투여로 억제되는지 관찰하였다.

재료 및 방법

실험식이 및 당뇨 유도

생후 4주째인 KK 마우스를 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 공급받아 6마리씩 나누어 플라스틱 cage에 수용하여 생후 2개월까지 일반 고형사료(삼양사)를 먹이면서 사육하였고 그후 고지방 저비타민 E 식이군(이하 고지방식이군)과 고지방 고비타민 E 식이군(이하 고비타민 E 식이군)으로 나누어 사육하였다.

고지방식이(fat 20% wt/wt, 39% cal/cal)의 조성은 Table 1과 같다. 이 고지방식이의 비타민 E는 옥수수 기름에 들어 있는 α -tocopheryl acetate 양으로부터 기인된 것으로서 56IU/kg diet이다. 비타민 E free 비타민 혼합물은 ICN(ICN Biochemicals, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 고비타민 E 식이에는 dl- α -tocopheryl acetate(Sigma Chemical, U.S.A.)를 첨가하여 비타민 E의 수준은 2080IU/kg diet로 하였다.

실험기간 동안 사육 환경은 온도 20~25°C를 유지하였으며 습도는 60%로 맞추고 명암주기는 12시간 간격으로 유지하였다. 생후 2개월, 4개월, 6개월, 9개월에 각각 일주일간의 체중과 식이량을 일정한 시간에 측정하였다.

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredient	(g/kg diet)
Corn starch	544
Cascin	150
Corn oil	200
α -Cellulose	50
Mineral mixture ¹⁾	40
Vitamin mixture ²⁾	10
DL-Methionine	5
Choline chloride	1

¹⁾Composition of mineral mixture(/kg mixture)

CaHPO₄ 500g, NaCl 74g, K₂SO₄ 52g, potassium citrate monohydrate 220g, manganous carbonate 3.5g, ferric citrate 6.0g, zinc carbonate 1.6g, cupric carbonate 0.3g, K₂IO₃ 0.01g, KCr(SO₄)₂ · 2H₂O 0.55g, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.01g, sucrose, finely powdered 118.9g

²⁾Vitamin E free mixture, ICN Biochemicals(Cleveland, Ohio)(/kg mixture)

Vitamin A acetate(500,000IU/g) 1.8g, vitamin D₂(850,000 IU/g) 0.125g, ascorbic acid 45g, inositol 5g, choline chloride 75g, menadione 2.25g, p-aminobenzoic acid 5.00g, niacin 4.25g, riboflavin 1.00g, pyridoxine hydrochloride 1.0g, thiamine 1.00g, calcium pantothenate 3.00g, biotin 0.02g, folic acid 0.09g, vitamin B₁₂ 0.00135g, sucrose, finely powdered to 1kg

당뇨 판정

고지방식이로 사육한지 1개월 후부터 혈당을 측정하기 시작하였다. 월 2회 아침 9:00~10:00 사이에 꼬리정맥에서 혈당을 측정하여 200mg/100ml 이상이면 당뇨병으로 판정하였다(13). 혈당은 혈당감지기(Blood glucose sensor, Medisense, Inc., Waltham, MA, U.S.A)로 측정하였는데, 생후 4개월에 정상군과 당뇨군으로 나누어서 각각 9개월까지 사육하였다. 4개월에는 정상이었다가 실험기간 도중 당뇨가 발생된 것은 정상군에서 제외시켰다. 4개월에 당뇨가 발생된 것만 당뇨군으로 분류 후 실험에 이용하였으므로 당뇨군 6개월은 당뇨 발생 후 2개월, 당뇨군 9개월은 당뇨발생 후 5개월이 된다.

시료수집 및 분석

실험동물은 희생시키기 전 18시간동안 금식을 시켰다. 실험동물은 생후 4개월, 6개월, 9개월에 decapitation 방법으로 희생하였고 희생시키기 전 혈당과 체중을 측정하였다. 피부조직을 적출하여 차가운 생리식염수에 세척한 후, 흡수지로 물기를 제거하고 액체질소로 급속 냉동시킨 후 냉동보관했다가 분석에 사용하였다. 혈액은 EDTA가 들어있는 tube에 받아 충분히 혼합한 후 냉동보관하였다. HbA_{1c}의 측정에는 micro column test

kit(Hemoglobin A_{1c} Micro Column Test, BIO-RAD, California, USA)를 이용하였다. CLF의 측정법은 Soullis-Liparota 등(14)의 방법을 따랐다. 1M NaCl과 1mM phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF)를 첨가한 용액에 피부조직을 4°C에서 72시간동안 담근 후 수술용 칼로 모발과 피하지방을 제거하고 식염수로 세척하여(15) 습기를 제거한 후 분석에 사용하였다. 피부조직을 잘게 다진 것에 50mM potassium phosphate buffer를 넣고 2분간 균질하였다. 이 균질액을 4°C, 19,872×g에서 30분간 원심분리하여, 상층액은 버리고 남아있는 pellet에 chloroform-methanol 용액을 5ml씩 넣고 24시간동안 4°C에서 mild shaking하였다. Chloroform-methanol 용액을 제거하고 pellet을 methanol과 탈이온수로 4번씩 씻어낸 후, pellet을 pepsin(pepsin 0.1g/100ml acetic acid)이 들어있는 acetic acid 용액에 부유시켜 18시간동안 4°C에서 냉장시켜 collagen 외의 물질들을 제거시켰다. Acetic acid 용액을 제거시키고 pellet을 0.1M CaCl₂, 0.02 M Tris-HCl과 0.05% toluene으로 2번씩 씻었다. Pellet에 enzyme solution(collagenase, proteinase K)을 4ml씩 넣고 chloroform과 toluene을 1방울씩 넣고 잘 섞은 후 37°C에서 72시간동안 가온하였다. 그후 4°C, 19,872×g에서 30분간 원심분리하였다. 상층액을 spectrofluorometer를 이용해 excitation 370nm, emission 440nm에서 형광도를 측정하였다

CLF를 측정된 상층액을 산으로 가수분해한 후 hydroxyproline이 시약과 발색반응을 일으키도록 하여 hydroxyproline 농도를 측정하였다(16). Hydroxyproline은 collagen의 14%를 구성하므로 hydroxyproline으로부터 collagen 양을 구해 mg collagen 당 fluorescence unit으로 나타내었다.

통계처리

각 분석치는 평균±표준편차로 제시하였다. 각 실험군간의 유의도 검증은 Tukey's HSD test에 의하여 p<0.05 수준에서 실시하였고, 각 지표간의 유의성을 알아보기 위해서는 대조군과 T-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

식이섭취량과 체중변화

식이섭취량 및 체중변화는 Fig. 1과 Fig. 2와 같다. 고지방식이군과 비교해볼 때 고비타민 E 식이에 의해서 식이섭취량 및 체중증가에서 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 혈당의 변화는 Fig. 3과 같다. 희생하기 전 18시간 금식 후 측정된 혈당은 4개월, 6개월, 9개월에

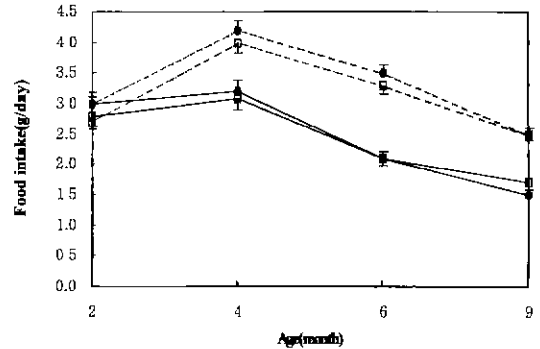


Fig. 1. Effects of vitamin E supplementation on food intake of KK mice.

8 KK mice for each point. Values are mean±SD. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 5IU VE/kg diet).

High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet).

● Low VEDM, ● Low VE Normal
□ High VEDM, □ High VE Normal

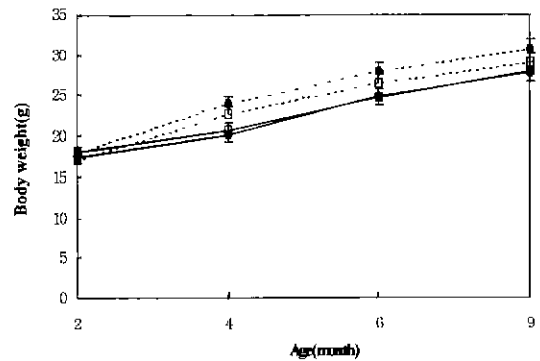


Fig. 2. Effects of vitamin E supplementation on body weight of KK mice.

8 KK mice for each point. Values are mean±SD. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 5IU VE/kg diet).

High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet).

● Low VEDM, ● Low VE Normal
□ High VEDM, □ High VE Normal

정상군에서는 83, 86.2, 86mg/100ml이었고, 당뇨군에서는 180, 156.3, 127.5mg/100ml이었다. 고비타민 E 식이에 의해 공복시 혈당에 유의적인 차이는 없었다.

당뇨 유도에 의한 변화

Fig. 4에는 Millard 반응 초기 생성물인 HbA_{1c}의 변화를 나타내었다. 정상군에서는 월령이 증가하여도 HbA_{1c}의 양은 변화되지 않았는데, 생후 6개월의 정상군은 2.30%, 당뇨군은 4.68%를 나타내어 당뇨 발병 후 2개월이 경과된 6개월부터 HbA_{1c}가 증가되었다. 그러나,

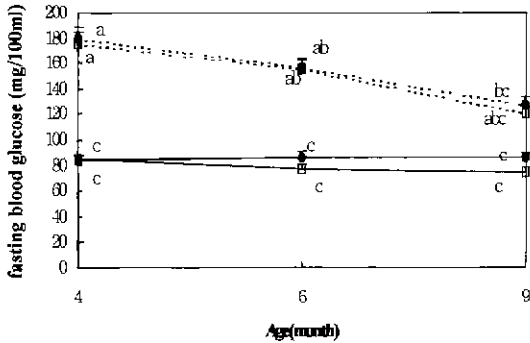


Fig. 3. Effects of vitamin E supplementation on fasting blood glucose in normal and diabetic KK mice. 8 KK mice for each point. Values are mean±SD. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet). High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet) Means with the same alphabets are not significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test
●- Low VEDM, ●- Low VE Normal
□- High VEDM, □- High VE Normal

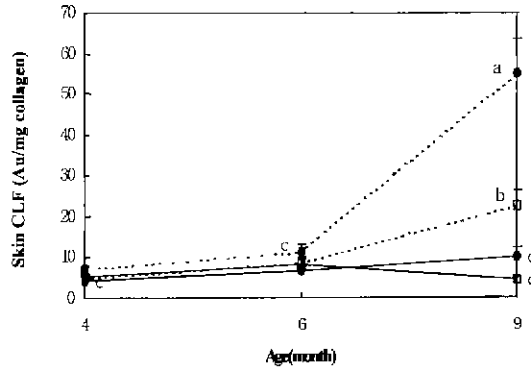


Fig. 5. Effects of vitamin E supplementation on skin CLF in normal and diabetic KK mice. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet). High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet) Means with the same alphabets are not significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test. Values are mean±SD, n=5-9
●- Low VEDM, ●- Low VE Normal
□- High VEDM, □- High VE Normal

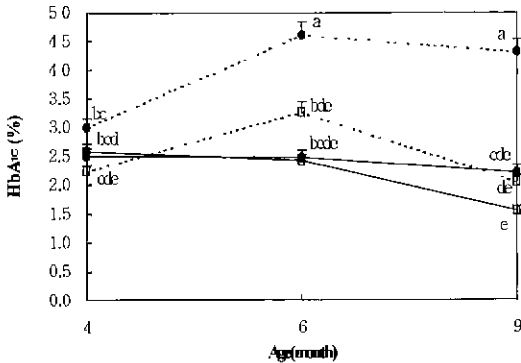


Fig. 4. Effects of vitamin E supplementation on HbA1c in normal and diabetic KK mice. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet). High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet). Means with the same alphabets are not significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test. Values are mean±SD, n=5-9
●- Low VEDM, ●- Low VE Normal
□- High VEDM, □- High VE Normal

당뇨가 진행되어도 HbA1c수준은 더 이상 증가되지 않았다. HbA1c는 당화 초기 산물로서 마우스에서는 Hb의 반감기가 20일 정도이므로(17) 20일간의 평균 혈당치를 반영하기 때문에 당뇨 2개월부터 증가되기 시작하였고, 또한 HbA1c가 탈수, 재배열 과정을 통해서 최종 당화산물로 되기 때문에 당뇨가 진행되어도 계속 HbA1c의 양이 증가되지는 않는 것으로 사료된다.

피부조직의 CLF의 변화는 Fig. 5와 같다. 고지방식이 섭취시 4개월, 6개월, 9개월군에서 피부조직의 CLF는 각각 4.03, 6.63, 10.21AU/mg collagen의 값을 나타내어서 정상군에서 월령이 증가되면서 증가되었으나, 통계적으로 유의적이지는 않았으며, 9개월에는 4개월의 2.5배가 되었다. 당뇨군에서는 당뇨발생에 의해서 CLF는 증가되지 않았다. 그러나 9개월에 급격한 증가를 나타내어서 4개월 당뇨군의 7.9배, 9개월 정상군의 5.4배로 증가되었다. 노화에 의한 증가보다 당뇨에 의한 증가가 더 크다는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 Odetti 등(8)이 STZ 당뇨쥐에서 당뇨 22주에 이르러 피부조직의 CLF의 증가를 관찰한 보고와 Monnier 등(18)이 당뇨환자의 피부조직에서 CLF를 측정하였을 때 당뇨환자군에서 정상군보다 CLF가 증가되었다는 보고들과 함께 제2형 당뇨 모델인 KK 마우스에서도 당뇨에 의해서 Maillard 반응이 증가됨을 보여주었다.

본 연구에서 AGE를 측정하기 위해 선택한 collagen은 결합조직과 기저막에 주로 존재하는 섬유상 단백질로 포유동물 구성단백질 중에서도 많이 가장 많다(19). Kohn과 Monnier(20)은 노화현상은 collagen 함량이 높은 조직에서 현저하게 진행되기 때문에 나이가 들어감에 따라 피부, 동맥, 허파 및 관절에서의 탄력성이 현저한 감소를 보이는 것이라고 하였다. Monnier 등(21)은 정상 collagen에서도 노화에 따라 Maillard 반응의 최종 산물축적이 일어나지만 당뇨병에 의해서 더 가속화되었다고 보고하였는데, 본 연구에서도 노화에 의한

증가보다 당뇨에 의한 증가가 더 현저함을 관찰할 수 있었다.

고비타민 E 식이 섭취에 의한 변화

HbA_{1c}는 고비타민 E 식이를 섭취한 경우 정상군에서는 고지방식을 섭취한 정상군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았으나 당뇨군에서는 고지방식을 섭취한 당뇨군에 비해 유의적으로 감소되었다(Fig. 4). 9개월군(당뇨 5개월)에서 고비타민 E 식이 섭취시 HbA_{1c}가 2.06±1.08%로 고비타민 E 식이를 섭취하지 않은 당뇨군의 HbA_{1c}값인 4.32±0.52%에 비해 52% 가량 감소되어 있었다. 피부조직의 CLF를 측정하였을 때, 고비타민 E 식이를 섭취한 경우 정상군에서는 고비타민 E 식이에 의한 효과를 볼 수 없었으나 당뇨군에서는 9개월부터 감소효과를 나타내었다(Fig. 5). 9개월군(당뇨 5개월)에서 고비타민 E 식이 섭취시 CLF가 22.60±3.89AU/mg collagen으로 고비타민 E 식이를 섭취하지 않은 당뇨군의 CLF값인 54.93±15.56AU/mg collagen에 비해 59% 가량 감소되어 있었다. 지금까지 비타민 E가 당뇨시의 비효소적 당화과정에 미치는 영향은 주로 초기 당화산물의 감소에 있는 것으로 제시되어진 연구들이 많으나 본 실험의 결과는 KK 마우스에서 비타민 E가 초기 당화산물 뿐 아니라 후기 당화산물도 감소시킴을 제시하였다. 비타민 E가 HbA_{1c}, 즉 초기 당화산물 형성을 억제하는 기전은 확실치 않으나 Hunt 등(22)에 따르면 포도당의 자동산화과정 중 생성되는 enediol radical anion을 비타민 E가 enediol로 다시 환원시켜 포도당의 자동산화과정을 억제해 amadori 산물을 감소시킨다고 했다. 따라서 비타민 E는 포도당 자동산화를 방해하여 단백질 당화를 감소시키고 동시에 포도당 자동산화와 당화 단백질에 의해 생성된 free radical에 대해 scavenger로 작용할 수 있기 때문에 비타민 E는 비효소적 당화반응에 의한 손상과 산화적 스트레스를 제한함으로써 당뇨합병증 예방과 치료에 효과적일 수 있다고 사료된다.

당화반응 억제제로서 aminoguanidine에 대한 연구가 많이 진행되었는데 aminoguanidine은 *in vivo*와 *in vitro*에서 collagen의 교차 결합을 저해하고, 최종 당화산물 축적을 감소시키는 효과가 있음이 보고되었다(8, 23). 그러나, aminoguanidine이 포도당으로부터 H₂O₂를 생성하며 catalase를 저해한다는 결과도 제시되고 있다(24)

본 실험에서는 KK 마우스에서의 당뇨에 의한 초기 및 후기 당화산물의 축적이 고비타민 E 식이에 의해 억제되었음을 확인하였는데, 비타민 E는 다른 Maillard

반응 억제제나 항산화제들에 비교하여 볼 때 Maillard 반응의 초기단계에 작용하며(7), 인슐린의 작용도 돕고(10), 안정성이 높다는(25) 장점이 있는 바 비타민 E의 이용은 당뇨합병증 예방에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

KK 마우스에 고지방식을 섭취시켜 당뇨를 유발하고, Maillard 반응의 초기 산물인 HbA_{1c}와 후기 산물의 CLF가 증가되는지를 확인하고, 당뇨병에 의해 증가되는 Maillard 반응이 비타민 E의 투여로 억제되는지 관찰하였다. 이유 쥐시 KK 마우스를 1개월간 pellet diet로 적응시킨 후 고지방식이(corn oil 20%, wt/wt)를 먹여 당뇨를 유도하였다. 비타민 E 보강은 2080IU/kg diet 수준으로 하였으며, 생후 4개월, 6개월, 9개월(당뇨 0개월, 2개월, 5개월)에 희생시켰다. 초기 당화산물은 HbA_{1c}를 측정하였으며 최종 당화산물을 측정하기 위해 피부조직의 collagen-linked fluorescence를 측정하였다. 정상 KK-마우스에서는 월령이 증가하였을 때, 혈당과 HbA_{1c}는 유의적인 변화를 보이지 않았으나 피부조직의 CLF는 점진적으로 증가되었다. 당뇨군에서 HbA_{1c}는 6개월군에서 증가되기 시작하였고 9개월군과 차이가 없었으며, 피부조직의 CLF는 9개월군에서 급격히 증가하였다. 또 고비타민 E 식이를 섭취시킨 경우 당뇨군에서 초기 및 후기 Maillard 반응 생성물의 감소가 관찰되었다. 이상의 결과로부터 KK 마우스에서는 월령이 증가함에 따라 초기 및 후기 당화산물의 축적이 나타났고, 또한 당뇨 유발에 의해 이 변화들은 더욱 촉진되었으나, 2080IU/kg diet 수준의 고비타민 E 식이를 섭취시켰을 때 이런 변화들이 억제되었음을 확인하였다.

문 헌

1. Brownlee, M., Vlassara, H. and Cerami, A : Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.*, **101**, 527(1984)
2. Kennedy, L. and Baynes, Y. W. : Nonenzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes. an overview. *Diabetologia*, **26**, 93(1984)
3. Brownlee, M. : Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.*, **46**, 223(1995)
4. Hammes, H. D., Martini, S., Federslin, K., Geisen, K. and Brownlee, M. : Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11555(1991)
5. Mitsuhashi, T., Nakayama, H., Itoh, T., Kuwajima, S., Aoki, S., Atsumi, T. and Koike, T. : Immunohistochemical detection of advanced glycation end product in lens crystallins from streptozotocin-induced diabetic rat.

- Diabetes*, **42**, 826(1993)
6. Brownlee, M., Cerami, A. and Vlassara, H. : Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1315(1988)
 7. Cerello, A., Quatraro, A. and Giugliano, D. : New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabetic Med*, **9**, 297(1992)
 8. Odetti, P. R., Borgglio, A., Pascal, A. D., Rolandi, R. and Adezati, L. : Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked fluorescence by aminoguanidine and rutin. *Diabetes*, **39**, 796(1990)
 9. 박형섭, 홍혜남, 장연진. 당뇨병 유발백서에서의 비타민 C에 의한 폐병변의 유발 당뇨병, **17**, 183(1993)
 10. Paolisso, G. and D'Amore, A. : Pharmacological doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetes patients. *Am J Clin. Nutr.*, **57**, 650(1993)
 11. Cerello, A., Giugliano, D., Quatraro, A., Donzella, C., Dipalo, G. and Lefevre P. J. : Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes *Diabetes Care*, **14**, 68(1991)
 12. Dulin, W. E. and Wyse, B. M. : Diabetes in the KK-mouse. *Diabetologia*, **6**, 317(1970)
 13. 이귀영, 이종순 : 임상 병리 과일 의학문화사, 서울, p.90 (1990)
 14. Soulis-Liparota, T., Cooper, M., Papazoglou, D., Clarke, B. and Jerums, G. : Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes*, **40**, 1328(1991)
 15. 이법주, 김수찬, 안성구, 이수현 : 표피-진피 분리방법에 따른 자가면역 수포성 질환 항원성. 대한피부과학 학회지, **31**, 19(1993)
 16. Stegemann, H. and Stalder, K. H. : Determination of hydroxyproline *Clin Chim. Acta*, **18**, 267(1967)
 17. Berlin, N. and Berk, P. : The biological life of the red cell. In "The red blood cell II" Surgenor, D. M. (ed.), Academic Press, New York, p.958(1975)
 18. Monnier, V. M., Vishwanath, V., Frank, K. E., Elmets, C. A., Dauchot, P. and Kohn, R. R. : Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 403(1986)
 19. Bonar, L. C., Lees, S. and Mook, H. A. : Neutron diffraction studies of collagen in fully mineralized bone. *J. Mol. Biol*, **181**, 265(1985)
 20. Kohn, R. R. and Monnier, V. M. : Normal aging and its parameters. In "Clinical pharmacology in the elderly" Swift, C. G. (ed.), Marcel Dekker Inc, New York, p.3(1987)
 21. Monnier, V. M., Kohn, R. R. and Cerami, A. : Accelerated age related browning of human collagen in diabetes mellitus *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 583 (1984)
 22. Hunt, J. V., Dean, R. T. and Wolff, S. P. : Hydroxyl radical production and nonoxidative glycosylation. *Biochem J.*, **256**, 205(1988)
 23. Nicholls, K. and Mandel, T. E. : Advanced glycosylation end-products in experimental murine diabetic nephropathy : effect of islet isografting and of aminoguanidine *Lab Invest.*, **60**, 486(1989)
 24. Ou, P. and Wolff, S. : Aminoguanidine : A drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide *in vitro Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1139(1993)
 25. Tappel, A., Fletchers, B. and Deamer, D. : Effect of an antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse. *J. Gerontol.*, **28**, 415(1973)

(1997년 7월 2일 접수)