

호르몬 투여가 난소를 절제한 흰쥐의 골단백질 성숙에 미치는 영향

김미향[†] · 유리나^{*} · 하배진^{**} · 김상애^{***} · 고진복^{****}

일본 오차노미즈여자대학 식물학과

^{*}울산대학교 식품영양학과, ^{**}부산여자대학교 화학과

^{***}부산여자대학교 식품영양학과, ^{****}부산여자대학교 생물학과

Effect of Hormone Replacement Therapy on the Changes of Pyridinoline from Bone and Cartilage Collagen of Ovariectomized Rats

Mi-Hyang Kim[†], Rina Yu^{*}, Bae-Jin Ha^{**}, Sang-Ae Kim^{***} and Jin-Bog Koh^{****}

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

**Dept. of Food and Nutrition, University of Ulsan, Ulsan 680-740, Korea*

***Dept. of Chemistry, Pusan Women's University, Pusan 616-736, Korea*

****Dept. of Food and Nutrition, Pusan Women's University, Pusan 616-736, Korea*

*****Dept. of Biology, Pusan Women's University, Pusan 616-736, Korea*

Abstract

A decrease in the circulating levels of estrogen, occurring as a consequence of post menopausal decline or from surgical ovariectomy, results in an accelerated loss of bone. Estrogen has been shown to stimulate lysyl oxidase activity, and the treatment with estrogen increased the pyridinium content of cortical bone. A trivalent mature cross-links of collagen fibrils named pyridinoline, which is especially abundant in collagen of cartilage and bone, markedly increases with growth in humans and rats. The main aim of this study was to examine the increased bone loss caused by ovariectomy through monitoring the concentrations of the collagen and the pyridinium crosslinks of collagen, pyridinoline. The ovariectomized rats, 4 weeks old, were divided at random into two or three groups of 5. Ovariectomies were carried out on both of the saline-treated group(OVX(NH)) and the estrogen-treated group(OVX(H)) using the dorsal approach and sham operations were performed on the sham-operated group(sham). They were maintained under identical conditions for 4 or 8 weeks and were allowed free access to food and water. It was observed that there was no significant difference between the control group and the sham-operated group, however, the control group had a higher content of collagen than the saline-treated group after 4 weeks and 8 weeks. Based on these results, it is supposed that estrogen can enhance collagen synthesis and affects the pyridinoline formation in collagen fibrils through stimulating lysyl oxidase activity.

Key words: ovariectomized rat, collagen, pyridinoline, lysyl oxidase

서론

노령화 현상과 더불어 조직 실질 세포수는 감소하고 그 결과 고령기에 대부분의 조직 중량이 감소한다(1). 이러한 감소현상은 심장, 폐, 뇌와 같은 개체의 생명 유지에 직접 관계있는 조직 보다 골, 연골, 골격근, 피부 등 개체의 생활 활동에 중요한 역할을 하는 조직에 현

저하다.

연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen은 연령과 함께 변화하며, 특히 collagen 가교 형성은 결합조직의 강도를 유지하기 위하여 필요하다(2-10). 인간의 골밀도는 노령화 현상에 따라 감소하는 경향이 있고, 특히 여성들에게는 폐경기 이후에 급격히 감소하여 소위 폐경기 골다공증이 매우 심각한 건강문

[†]To whom all correspondence should be addressed

제로 대두되고 있다(11-13). 내분비선에 의하여 합성, 분비되어지는 스테로이드 호르몬은 유전자 표현을 자극함으로써 표적조직 내부에 생화학적 반응을 일으키는 물질로 collagen생합성능에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(14,15). 피부섬유아세포중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다는 연구보고도 있으나(15), 연령과 함께 나타나는 골기질량의 감소와 collagen 변화에 관해서는 불명확한 점이 많다. Pyridinoline은 골, 연골 collagen의 성숙 가교물질로서 골, 연골 이외의 다른 결합조직에는 거의 존재하지 않으므로 골 흡수의 지표로서 사용되고 있으며(16-19), 특히 폐경기 이후의 여성에 있어서 노중의 pyridinoline 배설량은 증가한다는 것이 보고되고 있어, pyridinoline은 노화현상과 관련이 깊은 물질로 알려져 있다(20-22).

본 연구에서는 스테로이드 호르몬의 분비가 저해되었을 때 나타나는 골기질의 감소를 검토하기 위하여, 흰쥐를 사용하여 난소절제 시술을 한 후, collagen 생합성과 밀접한 관계에 있는 ascorbic acid(AsA)(23-25) 함량과 estrogen 투여와 무투여에 의한 연골·골중의 collagen 생합성량 및 collagen 분자의 성숙 지표로서 collagen 가교 물질인 pyridinoline 함량을 측정하여, collagen의 생합성과 collagen 분자의 성숙 기구에 내분비 환경이 어떻게 관여하고 있는지 명확하게 밝히는 것을 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험동물은 부산여자대학교 생물학과 실험실에서 번식시킨 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 사용하였고, estrogen은 Sigma Chemical Company(U.S.A.)로부터, ascorbate(AsA)는 和光純藥工業(株)(Japan)에서 구입하였다. Pyridinoline standard의 정제는 Fujimoto와 Moriguchi(26)의 방법에 의해 다음과 같이 실시하였다. Achilles tendon collagen을 110°C에서 24시간 가수분해한 후 농축하여, H₂O와 0.5M HCl용액으로 농도 기울기에 의해 p-cellulose column으로 분획 추출하였다. 같은 방법으로 2번 추출한 후 sephadex G-10 column을 사용하여 0.5M acetic acid로 정제하였다. Acetic acid를 제거한 후 0.1M HCl에 용해하여 pyridinoline standard로 사용하였다.

실험동물의 수술 및 시료의 수집

4주령의 흰쥐를 난소절제 후 4주간 호르몬 투여군, 무투여군(대조군)과 sham수술군 및 8주간 호르몬 투

여군과 무투여군(대조군)으로 분류하여 6마리씩 5군으로 나누어, ether 마취 후 sham수술군은 하복부를 절개하였다가 그대로 봉합하였으며, 난소절제군, 난소절제 후 호르몬 투여군은 난소를 적출한 후 봉합하였다. 4주 또는 8주간의 식이공급과 호르몬을 10µg/day i.p. injection한 후 ether 마취법에 의해 희생하였다.

실험식이

실험식이의 구성은 다음 Table 1에 표시한 바와 같다.

분석시료의 조제 및 분석방법

간조직은 일정량을 취하여 10% metallic acid(w/v)를 첨가하여 균질화한 후, 원심분리(9000rpm, 10min)하여 상층을 AsA분석 시료로 하였다. AsA분석 조건을 Table 2에 나타내었다. 탈수, 탈지, 탈회 처리한 골조직과 연골은 6N HCl을 첨가하여 110°C에서 24시간 산가수분해 후 건조시켜 6N KOH을 사용하여 중화, 여과한 후 시료용액으로 하였다. 이 시료용액은 Woessner법(27)에 의하여 Hydroxyproline(Hyp)량을 측정한 후 collagen량으로 환산하였고, Arakawa 등에 의한 HPLC법(28)에 의하여 pyridinoline 양을 측정하였다. Collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen 중의 Hyp 비율은 평균 110잔기/1000잔기(약 10%)이므로 collagen량은 아

Table 1. Composition of diets

Ingredients	(g)
Milled rice	69.0
Casein	15.0
Soybean oil ¹⁾	10.0
DL-methionine	0.3
Choline chloride	0.2
Cellulose ²⁾	2.5
Mineral mix ³⁾	2.0
Vitamin ⁴⁾	1.0
Metabolic Energy(kcal/100g)	373.5
Protein(g/100g)	19.8

¹⁾Baeksul Food Co., Korea

²⁾Cellulose, Sigma Co., LTD. USA

³⁾Mineral mixture(g/100g): calcium lactate, 35.15; calcium phosphate, monobasic, 14.6; potassium phosphate, 25.78; sodium phosphate, monobasic, 9.38; sodium chloride, 4.61; magnesium sulfate, 7.19; ferric citrate, 3.29

⁴⁾Vitamin mixture prepared in glucose: thiamin HCl, 600 mg; riboflavin, 600mg; pyridoxine, 700mg; nicotinic acid, 3g; D-calcium pantothenate, 1.6g; folic acid, 200mg; D-biotin, 20mg; cyanocobalamin, 1mg; vitamin A, 400,000 IU; DL-α tocopheryl acetate, 5,000IU; cholecalciferol (vit D), 2.5mg; menaquinone, 5.0mg

Table 2. Chromatographic conditions for AsA analysis

Apparatus	: Shimadzu LC-5A or Hitachi 638
Detector	: UV detector(254nm)
Column	: 250×4mm id.
Packing material	: LiChrosorb-NH ₂ (Merck)
Eluent	: 0.01M H ₃ PO ₄ /0.01M Na ₂ HPO ₄ (pH 3.3)
Flow rate	: 0.7ml/min

래의 식으로 계산하였다.

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

통계처리

본 연구에 대한 모든 실험결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 p<0.01, p<0.05 수준에서 상호비교 하였다.

결과 및 고찰

간조직 중의 AsA 함량

난소 절제후 호르몬 투여가 collagen 생합성에 관여하는 AsA에 미치는 영향을 조사하기 위해, 생체내 대표적 장기이며 평소 AsA 함유량이 높은 간조직 중의 AsA 함량을 측정하였다(Table 3). 그 결과, 난소절제후 4주간 호르몬 투여군(68.3mg/100g)은 대조군(67.8 mg/100g)인 난소 절제군에 비하여 유의성있는 차이를 보이지 않았고, 8주간 호르몬 투여군에서도 유사한 경향을 나타내었다. 즉, 조직중 AsA 함량은 스테로이드 호르몬 분비에 크게 영향을 받지 않는 것을 시사하고 있다. 일반적으로, AsA 함성이 불가능한 guinea pig의 혈청 및 간조직중의 AsA 농도는 미숙기(2~4주경)에는 낮으나, 사람의 성장기에 해당되는 8, 10주경에 그 함량이 증가하여 성장기 이후에 감소한다는 보고가 있다(29). 본 실험에서도 8주에서 보다 12주에 간조직중의 AsA 함량이 저하하였고, 간중량의 감소도 보였으

Table 3. Concentration of AsA in liver of rats

Groups	AsA(mg/100g)
8 weeks	
Ovx(NH)	67.8±9.4 ¹⁾
Ovx(H)	68.3±5.7
Sham	67.6±5.9
12 weeks	
Ovx(NH)	62.3±3.9
Ovx(H)	64.9±6.7

¹⁾Mean±SE

Sham=Sham operated group

Ovx=Ovariectomized group

H=Hormone supplemented group

NH=None hormone supplemented group

므로 AsA 농도만 감소한 것이 아니라 총 AsA 함량도 저하하였다고 볼 수 있다.

연골, 골조직 중의 collagen 함량의 변화

연골조직중의 collagen 함량의 변화는 Table 4와 같다. 4주간 사육한 흰쥐의 연골조직 중의 collagen 함량은 대조군(117.3mg/g)에 비해 절제 후 호르몬 투여군(137.2mg/g)에서 증가하는 경향이 보였고, sham군에 있어서도 대조군 보다 유의하게 증가하였다(p<0.05). 또한, 난소 절제 후 8주간 estrogen을 투여한 군에서도 대조군 보다 유의하게 collagen 함량이 증가하였다(p<0.01). 이러한 경향은 골조직중의 collagen 함량 변화에서도 관찰되었다(Table 5). 내분비선에 의하여 합성, 분비되어지는 스테로이드 호르몬은, 유전자 표현을 자극함으로써 표적조직 내부에 생화학적 반응을 일으키는 물질로서 collagen생합성능에 관여하고 있는 것으로 알려져 있고, 피부섬유아세포중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다는 연구보고도 있다(14,15). Collagen은 골조직중의 유기기질의 약 90%를 차지하며, 대사회전이 대단히 낮은 단백질로서 흰쥐의 피부 collagen의 반감기는 성장기에 약 27일 성숙 후에는 약60일이라고 한다(15). 즉, collagen은 성숙기에 다량으로 합성되고 그 이후에는 생합성이 크게 이루어지지 않음을 시사하고 있다. 호르몬을 투여한 8주령의 흰쥐에

Table 4. Concentration of collagen in cartilage of rats

Groups	Collagen(mg/g)
8 weeks	
Ovx(NH)	117.3± 9.6 ¹⁾
Ovx(H)	137.2±23.6
Sham	135.8±11.2**
12 weeks	
Ovx(NH)	130.8± 7.5
Ovx(H)	149.2± 9.2*

¹⁾Mean±SE

Significantly different from the value of Ovx(NH) group at *p<0.01, **p<0.05, respectively

Table 5. Concentration of collagen in bone of rats

Groups	Collagen(mg/g)
8 weeks	
Ovx(NH)	184.9±13.5 ¹⁾
Ovx(H)	217.6±18.3*
Sham	213.3± 9.5*
12 weeks	
Ovx(NH)	205.7± 5.7
Ovx(H)	225.6±13.5**

¹⁾Mean±SE

Significantly different from the value of Ovx(NH) group at *p<0.01. **p<0.05, respectively

서 보다 12주령에서 collagen 함량이 더 높게 나타난 본 실험의 결과로부터, 연골, 골조직에서도 collagen 대사 회전이 늦게 진행됨을 추측할 수 있다. 또한, 난소절제 후 estrogen을 투여하지 않은 대조군에서 collagen 함량이 낮았으므로 estrogen 투여에 의해 collagen 생합성이 촉진되었음을 알 수 있다. 폐경기 이후의 여성들에게서 볼 수 있는 골 손실은 골 교체율과도 관계있으며, 난소를 절제한 흰쥐의 골기질 구성성분인 collagen 함량 감소는 골흡수를 증가시키는 요인이 됨을 추정할 수 있다.

연골, 골조직 중의 pyridinoline 함량의 변화

노화에 의한 결합조직의 변화는 섬유 구성성분의 주체인 collagen의 안정성의 증가이며, 이러한 안정성은 collagen을 구성하는 collagen 분자간 가교의 증가에 의한 것이다(30). Pyridinoline은 collagen의 성숙 가교물질로서 주로 골, 연골의 collagen 중에 존재하며, hydroxylysine 1분자와 생체내에서 lysyl oxidase에 의해 합성되어진 hydroxyallysine 2분자가 결합하여 생성된다(31-33). 본 실험에서 난소절제 후 4주간 estrogen을 투여한 결과, 대조군에 비해 연골 collagen 중의 pyridinoline 함량이 유의하게 증가하였고($p < 0.01$), 8주간 투여군에 있어서도 비슷한 경향을 보였다($p < 0.05$)(Table 6). 그러

Table 6. Concentration of pyridinoline in collagen from cartilage of rats

Groups	Pyridinoline/Collagen(mol/mol)
8 weeks	
Ovx(NH)	0.97 ± 0.09 ¹⁾
Ovx(H)	1.28 ± 0.11*
Sham	1.27 ± 0.09*
12 weeks	
Ovx(NH)	0.95 ± 0.30
Ovx(H)	1.22 ± 0.18**

¹⁾Mean ± SE

Significantly different from the value of Ovx(NH) group at * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, respectively

Table 7. Concentration of pyridinoline in collagen from bone of rats

Groups	Pyridinoline/Collagen(mol/mol)
8 weeks	
Ovx(NH)	0.47 ± 0.09 ¹⁾
Ovx(H)	0.55 ± 0.09
Sham	0.56 ± 0.04
12 weeks	
Ovx(NH)	0.43 ± 0.03
Ovx(H)	0.52 ± 0.03*

¹⁾Mean ± SE

Significantly different from the value of Ovx(NH) group at * $p < 0.01$

나, 골 collagen 중의 pyridinoline 함량은 난소절제 후 4주간 호르몬을 투여한 군(0.55mol/mol)과 대조군(0.47 mol/mol) 사이에 유의적인 차이는 별로 없었으나 호르몬 투여군에서 다소 증가하는 경향이 있었다(Table 7). 반면, 8주간 호르몬 투여군에서는 호르몬 투여에 의한 collagen 중의 pyridinoline 생성량이 대조군에 비해 유의하게 높은 경향을 보였다(Table 7). 연골이 어느정도 성장하면 석회화가 일어나고, 골막으로부터 혈관 침입이 시작되어 연골의 분해와 신생골의 형성이 진행된다. 골격이 더 성장하면 관절표면과 성장판을 제외한 모든 연골이 골로 치환되므로, 8주령의 흰쥐에 있어서는 연골의 분화가 충분히 이루어지고 있지 않은 단계이며, 그 결과 호르몬 투여와 무투여에 의한 영향이 확실하게 나타나지 않은 것으로 추측된다. 이러한 제반결과를, 내분비 환경이 세포외에 분비되는 collagen 분자의 성숙 기구에 관여하고 있음을 나타내고 있으며, estrogen은 collagen 합성이 이루어지고 있는 연골, 골조직의 lysyl oxidase 활성화에 영향을 주는 것으로 인하여, collagen 성숙 단계를 조절하고 있을 가능성을 강하게 시사하고 있다.

요 약

본 연구에서는 스테로이드 호르몬의 분비가 저해되었을 때 나타나는 골기질의 감소를 검토하기 위하여, 흰쥐를 사용하여 난소절제 수술을 한 후 간조직내의 AsA 함량, 연골 및 골조직내의 collagen과 collagen 가교물질인 pyridinoline의 함량을 조사하였다. 그 결과, 난소절제 후 4주간 호르몬 투여군의 간조직중의 AsA 함량은 대조군과 비교해서 차이가 나타나지 않았고, 8주간 호르몬 투여군에서도 유사한 경향을 나타내었다. 그러나, 연골, 골조직내 collagen 함량은 대조군에 비해 절제 후 4주간 호르몬 투여군에서 증가하는 경향이 보였고, sham 군과의 비교에서도 sham군 중의 collagen 함량이 유의하게 증가하였다. 난소 절제 후 8주간 estrogen을 투여한 군에서도 대조군에 비해 유의하게 collagen 함량이 증가하였다. 또한, collagen 중의 pyridinoline 함량은 난소절제 후 4주간 estrogen 투여에 의하여 유의하게 증가하였고, 8주간 투여군에 있어서도 비슷한 경향을 나타내었다. 이러한 제반결과로부터, 난소절제 후 호르몬을 투여하지 않았을 때 연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen이 감소하였고, collagen의 가교물질인 pyridinoline의 생성량에도 변화를 주는 것으로 미루어 보아, estrogen은 collagen 생합성에 관여하고 있으며 골단백질의 성숙을 조절하고 있는 것으로 사료된다.

문헌

1. 松本俊夫 : 骨粗鬆症. 羊土社, p.16(1996)
2. Siegel, R. C. : Collagen cross-linking effect of D-penicillamine on cross-linking *in vitro*. *J. Biologic Chem.*, **252**, 254(1977)
3. Robins, S. P. and Baily, A. J. : The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem. J.*, **163**, 339(1977)
4. 藤本大三郎 : コラーゲン分子の變化とエシシング-老化をくいとめる方法はみつかるか. 現代化学, **8**, 10(1982)
5. Fujimoto, D. : Aging and cross-linking in human aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1264(1982)
6. Robins, S. P. : Turnover and cross-linking of collagen. *Collagen in Health and Disease*, **9**, 160(1982)
7. Kuboki, Y. and Mechanic, G. L. : Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. *Calcif. Tissue Int.*, **34**, 306(1982)
8. Yamauchi, M., Woodley, D. T. and Mechanic, G. L. : Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 898(1988)
9. Eyre, D. R., Dickson, I. R. and Ness, K. V. : Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem. J.*, **252**, 495(1988)
10. 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)
11. Albright, F., Smith, P. H. and Richardson, A. M. : Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. *J. Am. Med. Ass.*, **116**, 2465(1941)
12. Hdund, L. R. and Gallagher, J. C. : The effect of age and menopause on one mineral density of the proximal femur. *J. Bone. Mineral Res.*, **4**, 639(1989)
13. Yanaguchi, A., Katagiri, T. and Ikeda, S. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. *J. Cell Biol.*, **113**, 681(1991)
14. Noda, M. and Rodon, G. A. : Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J. Cell Biol.*, **103**, 713(1989)
15. 永井 裕, 藤本大三郎 : コラーゲン代謝と疾患. 講談社, p.155(1982)
16. Beardsworth, L. J., Eyre, D. R. and Dickson, I. R. : Changes with age in the urinary excretion of lysyl- and hydroxylysylpyridinoline, two new markers of bone collagen turnover. *J. Bone Min. Res.*, **5**, 671(1981)
17. Black, D., Farquharson, C. and Robins, S. P. : Excretion of pyridinium cross-links of collagen in ovariectomized rats as urinary markers for increased bone resorption. *Calcif. Tissue Int.*, **44**, 343(1989)
18. Uebelhart, D., Gineyts, E., Chapuy, M. C. and Delmas, P. D. : Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone and Mineral*, **18**, 87(1990)
19. Preedy, V. R., Sherwood, R. A., Akpoguma, C. I. O. and Black, D. : The urinary excretion of the collagen degradation markers pyridinoline and deoxypyridinoline in an experimental rat model of alcoholic bone disease. *Alcohol Alcohol.*, **26**, 191(1991)
20. Uebelhart, D., Schemmer, A., Johansen, J. S., Gineyts, E., Christiansen, C. and Delmas, P. D. : Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **72**, 367(1991)
21. Fujimoto, D., Suzuki, M., Uchiyama, A., Miyamoto, S. and Inove, T. : Analysis of pyridinoline, a cross-linking compound of collagen fibers, in human urine. *J. Biochem.*, **94**, 1133(1983)
22. Gunja-Smith, Z. and Boucek, R. J. : Collagen cross-linking compounds in human urine. *Biochem. J.*, **197**, 759(1981)
23. Murad, S., Sivarajah, A. and Pinnel, S. R. : Regulation of prolyl and lysyl hydroxylase activities in cultured human skin fibroblasts by ascorbic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 868(1981)
24. Yu, R., Kurata, T., Kim, M. and Arakawa, N. : The behavior of L-ascorbic acid in the healing process of dorsal wounds in guinea pigs. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**, 207(1991)
25. Kim, M., Otsuka, M., Yu, R., Kurata, T. and Arakawa, N. : The distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid during tissue regeneration in wounded dorsal skin of guinea pigs. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **64**, 56(1994)
26. Fujimoto, D. and Moriguchi, T. : Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. *J. Biochem.*, **83**, 863(1978)
27. Woessner, J. F. : The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 440(1961)
28. 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)
29. 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)
30. Moriguchi, T. and Fujimoto, D. : Age-related changes in the content of collagen crosslink, pyridinoline. *J. Biochem.*, **84**, 933(1978)
31. Fujimoto, D., Moriguchi, T. and Hayashi, H. : The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 52(1978)
32. Barber, M., Bordoli, R., Elliott, G. J., Fujimoto, D. and Scott, S. E. : The structures of pyridinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1041(1982)
33. Tsuda, M., Ogawa, T. and Kawamishi, Y. : Pyridinoline is a real moiety of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1407(1982)