

花粉粒의 營養生化學的 研究*

3. Chloroform에 의한 Rat의 肝 및 腎臟 障害에 미치는 影響

權貞淑·尹水弘*

安東大學 家政學科

*曉星女子大學校 藥學大學

(1986년 4월 20일 접수)

Nutritional and Biochemical Studies on the Pollen Load.

3. The Effect of Pollen Load on the Chloroform-induced Hepatic and Renal Damage in Rats.

Chöng-Suk Kwön, Soon-Hong Yoon*

Dept. of Home Economics, Andong National College

**Lab. of Hygiene, College of Pharmacy, Hyosung Women's University*

(Received April, 20, 1986)

Abstract

The present experiment was intended to determine the effect of pollen load on chloroform-induced hepatic and renal damage in rats. The subjects were administered with the graded concentration of chloroform and an additional amount of pollen to some groups, and the result of which was:

1. The content of total lipid in liver and kidney increased in proportion to the chloroform concentration, but decreased in the chloroform and pollen administration groups.
2. The amount of total cholesterol in serum, liver and kidney of the chloroform administration group was higher than that of the control group, and it decreased gradually with pollen administration.
3. The activity of sGOT, sGPT, and LDH increased in proportion to the chloroform concentration, but decreased in the pollen-treated groups.
4. It is not significant that the cellulose acetate electrophoresis of LDH isozymes showed the increased of LDH₅ in liver of the pollen administration group. LDH isozymes in kidney are not significantly changed, too.

* 본 연구는 1985년도 문교부 학술연구조성비의 지원에 의한 연구의 일부임.

緒 論

花粉粒(Pollen Load)은 벌의 먹이로 주어지는 유일한 단백질원으로 이의 영양효과, 성장효과 및 신경장해, 동맥경화증, 빈혈, 노인병, 급만성 전립선염 등에 대한 효과가 알려지면서 그 일반 성분^{1~8)} 및 임상학적 약리효과^{9,10)}에 대한 많은 연구가 행해졌다.

CHCl₃, CCl₄ 등의 Chlorinated Hydrocarbons은 肝과 腎臟에 fatty changes, necrosis를 일으키며 심할 경우에는 Central nervous system에 까지도 影響을 미쳐 치사케 하는 유독물질로 널리 알려져 있으며^{11~22)}, Opie 등은 CHCl₃의 毒性은 고당질 고단백食餌로 막을 수 있으나 고지방食餌는 아무런 保護作用이 없음을 보고한 바 있다.^{23~27)}

고당질 고단백 營養物質인 花粉粒의 alcoholic fatty liver에 대한 影響을 연구한 前報²⁸⁾에 이어

CHCl₃로 인한 肝 및 腎臟障害에도 有効할 것으로 思料되어 본 研究를 시행하였던 바 그 結果를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗 動物

200±10g의 male sprague-Dawley rat 42마리를 6마리씩 7개 食餌群으로 나누어 固形 配合飼料(제일사료Co.)를 基本飼料로 하여 Table 1과 같이 약물을 7일간 Stomach tube feeding method (No3. Catheter)로 投與한 후 ether마취, 屠殺하여 복부대동맥에서 採血하고 肝 및 腎臟組織을 抽出하였다.

본 實驗에서 사용한 花粉粒은 대구시중 한약방에서 구입하였다.

Table 1. The administration formula by the stomach tube feeding method to rats for 7 days. (1ml/100g of body weight/day)

Groups	Chloroform	Pollen*	20% Sucrose
Control	0	0	1.0
I (0.1% chloroform)	1.0	0	0
II (0.5% chloroform)	1.0	0	0
III (1.0% chloroform)	1.0	0	0
I -P(0.1% chloroform+pollen)	1.0	1.0	0
II -P(0.5% chloroform+pollen)	1.0	1.0	0
III -P(1.0% chloroform+pollen)	1.0	1.0	0

* 200mg pollen/1ml.

2. 營養生化學的 測定

(1) 組織의 total lipid 含量

肝 및 腎臟을 일정량 취하여 마쇄한 후 CHCl₃:CH₃OH=2:1 혼합용액을 용매로 한 Soxhlet method로 抽出 定量하였다.

(2) 혈청 및 組織의 total cholesterol 含量

혈청 및 肝, 腎臟의 total cholesterol 含量은 효소법을 이용하는 Cholestenzyme V kit(榮研 Co. Japan)를 사용하여 生成된 적색 quinone을 500nm에서 比色定量하였다.

(3) 혈청 및 組織의 酵素 活性

① Serum Glutamate Oxaloacetate Transaminase(以下 sGOT) 및 Serum Glutamate Pyruvate Transaminase(以下 sGPT) 活性; Reitman-Frankel method²⁹⁾에 따른 transaminase 측정용 kit(榮研 Co. Japan)를 사용하여, dinitrophenyl hydrazin에 의한 發色을 505nm에서 比色定量(Bausch & Lomb Spectronic 20)하여, Karmen unit로 나타내었다.

② Lactate dehydrogenase(以下 LDH) 活性; Lactic acid를 기질로, NAD⁺를 조효소로 하여

phenazinmethosulfate로 nitrotetrazoliumblue를 환원하여 生成된 diformazan의 청자색을 570nm에서 比色定量하는 LDH측정용 kit(LDH nease) 榮研Co. Japan)를 사용하였으며 Wroblewski Unit로 나타내었다.

(4) Cellulose acetate eletrophoresis에 의한 組織의 LDH isozyme 分離

Kohn method^{30~32)}에 따라 Cellulose acetate strip(Selecta. Code No. EPI-14)에 시료를 spotting하고 barbital buffer를 전개액으로 하여 electrophoresis(100V, 0.8mA/cm, 50min) 한 후 nitrotetrazoliumblue로 염색하고 고정시켜 densitometer(Gelman Sci. Inc.)로써 그 분포상태를 백분율로 나타내었다.

3. 統計處理

모든 data는 평균치와 표준편차를 계산하였으며 각 群의 평균치간의 有意性 檢定은 $\alpha=0.05$ 수

준에서 F-test 및 Turhey method를 행하였다.

結果 및 考察

1. 體重 및 臟器의 重量

肝 및 腎臟의 重量에 있어서는 Table 2에 나타난 바와 같이 肝은 II群에서 腎臟은 I-P群에서 對照群보다 더 무거운 것으로 나타났으나 상호간의 有意性은 없었다.

2. 組織의 total lipid 含量

肝 및 腎臟의 total lipid含量 변화를 Table 3과 같이 Chloroform投與 농도의 증가와 함께 肝 및 腎臟의 脂質含量이 증가하는 것으로 봐서 이들 組織에 脂肪浸潤이 되고 있음을 알 수 있으며 花粉粒을 함께 投與함으로써 脂質含量의 증가가 있는 하나 Chloroform만 投與한 群보다는 크게

Table 2. The relative liver size(RLS) and the weight of body, liver, and kidney.

Groups	Boby(g)	Liver(g)	Kidney(g)	RLS*
Control	217.13±13.03 ¹⁾	6.96±1.03 ^{N-S-2)}	1.53±0.13 ^{N-S}	3.19±0.42 ^{N-S}
I	198.55±15.92	6.40±0.85	1.41±0.12	3.23±0.40
II	205.00±19.52	7.03±1.19	1.47±0.18	3.41±0.28
III	197.11±19.85	6.24±1.12	1.43±0.14	3.19±0.35
I-P	210.60±15.66	6.80±1.18	1.61±0.15	3.22±0.43
II-P	201.44±19.14	6.40±1.07	1.43±0.15	3.25±0.37
III-P	202.10±24.21	6.37±1.10	1.46±0.16	3.14±0.28

*Relative liver size(RLS)=liver weight 100/body weight.

1) Mean±S.D. of 5 rats. 2) none significant.

Table 3. Contents of total lipid in liver and kidney. (mg/g)

Organs \ Groups	Control	I	II	III	I-P	II-P	III-P
Liver	24.3 ^{1) a2)} ± 4.82	26.2 ^{b c f} ± 5.03	27.7 ^c ± 4.32	35.4 ^d ± 7.21	22.8 ^e ± 3.37	26.3 ^{b f} ± 4.18	31.3 ^g ± 5.24
Kidney	5.6 ^{a e} ± 0.41	6.7 ^{b f} ± 1.39	7.4 ^c ± 1.52	15.8 ^d ± 1.13	5.5 ^{a e} ± 0.73	6.4 ^{b f} ± 1.20	8.7 ^g ± 0.95

¹⁾ Mean±S.D. of 5 rats.

²⁾ Value within the row not followed by the same letter are significantly different at $\alpha=0.05$ level by Turkey's test.

감소한 것으로 나타났으며, 이들 群間의 脂質含量 변화는 $\alpha=0.05$ 수준에서 有意性이 있는 것으로 나타났다. I-P群은 肝과 腎臟의 脂質含量이 對照群보다도 낮았으며, III-P群은 對照群보다는 높았으나 같은 농도의 Chloroform만을 投與한 III群에 비하면 저질함량이 매우 낮았는데 이는 花粉粒이 조직의 total lipid함량을 저하시키는 것으로 思料된다.

Rosenfeld^{33~34)} 등은 Chloroform이 肝 glycogen

의 감소와 아울러 肝에 脂肪浸潤을 일으킨다고 하였으며, Addis^{35~38)} 등은 糖質이 liver necrosis를 막아준다고 한 바 있다. 또, Best^{39~44)} 등에 의하면 lecithin, cholin 등의 lipotropic factors가 결핍되므로서 脂肪肝 發生이 촉진된다고 한 바, 花粉粒은 이들 物質을 함유한 phospholipids含量이 클뿐 아니라 高蛋白, 高糖質 營養物質로 보고³⁸⁾ 되고 있어, 花粉粒의 脂肪肝 發生억제 효과는 클 것으로 思料되며, 본 연구 結果와 일치한다.

Table 4. Contents of total cholesterol in serum, liver and kidney.

Samples \ Groups	Control	I	II	III	I-P	II-P	III-P
Serum (mg/dl)	41.25 ^{1)bg2)} ± 7.5	43.75 ^c ± 7.66	42.5 ^{df} ± 5.0	53.75 ^e ± 13.77	35.0 ^a ± 4.08	41.25 ^{fd} ± 7.5	42.5 ^{gb} ± 10.4
Liver (mg/g)	368.75 ^a ± 100.8	375.0 ^{bc} ± 0.0	455.0 ^{de} ± 85.5	593.75 ^e ± 31.45	425.0 ^{de} ± 43.0	430.0 ^{bc} ± 57.0	512.5 ^f ± 101.0
Kidney (mg/g)	406.25 ^{ae} ± 37.5	455.0 ^b ± 107.15	545.0 ^{cfg} ± 48.1	630.0 ^d ± 20.9	428.35 ^{ae} ± 57.75	512.5 ^{cfg} ± 41.1	554.0 ^{cfg} ± 48.1

¹⁾ Mean ± S.D. of 5 rats.

²⁾ Values within the row not followed by the same letter are significantly different at $\alpha=0.05$ level by Turkey's test.

3. 血清 및 組織의 total cholesterol含量

total cholesterol含量的 變化를 Table 4에서 보면, chloroform의 投與 농도가 증가할수록 total cholesterol含量이 증가함을 볼 수 있는데, 이는 chloroform이 組織의 cholesterol合成을 증가시킨다는 Popper⁴⁵⁾ 등의 보고와 일치한다. 花粉粒을 함께 投與한群에서는 chloroform단독 투여群보다 total cholesterol含量的 증가가 적었으며, 血清의 경우, I-P群은 對照群보다도 오히려 그 含量이 적었으며, II-P, III-P群은 對照群과 비슷한 수치를 보였고, chloroform만 投與한 I, II, III群보다 모두 그 含量이 매우 적은 것으로 나타났다. 肝 및 腎臟도 血清과 비슷한 樣相을 보여서 chloroform의 농도가 증가할수록 total cholesterol量도 증가하였으며, 花粉粒을 投與함으로써 그 量이 감소한 것으로 나타났으며 total cholesterol含量的 變化는 모두 $\alpha=0.05$ 水準에서

有意性이 있는 것으로 나타났다. Mc Grandy^{46~49)} 등은 고당질食餌를 投與하면 血清內 cholesterol含量이 감소한다고 하였으며, Munro^{50~52)} 등은 食餌中 蛋白質含量과 종류가 혈청 및 肝組織의 cholesterol함량에 많은 影響을 주며, 植物性蛋白質 섭취群이 動物性蛋白質 섭취군보다 肝 및 血清 cholesterol치가 낮았음을 보고한 바 있다.

本 실험의 結果, 花粉粒을 投與한 群에서 血清 및 肝, 腎臟의 cholesterol含量이 저하한 것은 Ann⁵³⁾ 등의 보고에서 처럼 植物性蛋白質이 풍부한 物質인 것이 그 原因이 아닌가 思料되나, 花粉粒의 어떤 成分이 主要原因인지를 앞으로 연구할 과제라고 思料된다.

4. 血清 및 組織의 酵素活性 變化

Table 5에서 酵素活性의 變化를 보면 sGOT, sGPT, 그리고 LDH 모두 chloroform을 投與함으로써 活性이 증가함을 보였고, 그 증가정도도

Table 5. Activity of sGOT, sGPT and LDH in serum, liver and kidney.

Enzymes	Samples	Groups						
		Control	I	II	III	I -P	II -P	III -P
sGOT (Karmen Unit)	Serum	48.0 ^{1)2b)} ± 3.27	51.6 ^b ± 3.51	63.0 ^c ± 4.0	80.0 ^{dg} ± 12.94	48.5 ^e ± 8.49	60.0 ^f ± 4.0	75.5 ^{dg} ± 14.45
	Liver (×10 ³)	35.2 ^{ae} ± 14.95	37.0 ^{be} ± 8.58	54.3 ^{cdf} ± 3.08	55.0 ^{cdfg} ± 8.87	36.8 ^{abe} ± 8.26	46.6 ^{cdfg} ± 18.24	50.2 ^{dfg} ± 8.14
	Kidney (×10 ³)	39.2 ^{acef} ± 4.57	33.5 ^b ± 3.42	45.0 ^{acf} ± 7.44	48.0 ^d ± 9.87	38.5 ^{acf} ± 7.36	42.0 ^{acef} ± 6.28	46.5 ^e ± 22.11
	Serum	28.5 ^{abe} ± 1.0	28.5 ^{abe} ± 3.54	35.0 ^{cg} ± 6.38	43.3 ^{dg} ± 10.28	28.2 ^{abe} ± 4.57	32.0 ^f ± 13.44	40.3 ^{cdg} ± 3.9
	Liver (×10 ³)	30.0 ^a ± 2.0	32.3 ^{bcefg} ± 8.67	44.4 ^{befg} ± 15.93	47.8 ^d ± 15.43	31.3 ^{bef} ± 12.91	37.8 ^{bcefg} ± 5.5	46.8 ^{befg} ± 6.35
	Kidney (×10 ³)	10.0 ^{N.S.} ± 2.31	13.8 ± 8.61	13.8 ± 8.34	14.0 ± 9.12	9.5 ± 2.61	15.5 ± 8.46	16.5 ± 7.89
LDH (Wroblewski Unit)	Serum	255.0 ^{ae} ± 68.68	355.0 ^b ± 169.6	361.5 ^{cdfg} ± 162.96	480.0 ^{cdf} ± 181.7	252.5 ^{ae} ± 79.0	377.1 ^{cdfg} ± 98.4	378.5 ^{cefg} ± 121.75
	Liver (×10 ³)	90.0 ^{ab} ± 65.57	98.0 ^{ab} ± 35.46	123.8 ^c ± 79.42	155.3 ^{dg} ± 57.3	102.8 ^{ef} ± 29.55	118.3 ^{ef} ± 13.51	143.8 ^{dg} ± 10.31

¹⁾ Meag ± S.D. of 5 rats.

²⁾ Values within the row not followed by the same letter are significantly different at $\alpha=0.05$ level by Turkey's test.

chloroform의 投與濃도가 높을수록 더 큰 것으로 나타났으며, III群의 경우는 그 증가정도가 매우 컸으며 花粉粒을 함께 投與하여도 그다지 감소되지 않았으나, I-P群의 경우는 거의 모든 수치에 있어서 對照群보다 낮거나 거의 비슷한 수치를 나타내는 것으로부터 花粉粒이 이들 酵素의 活性을 저하시킴을 알 수가 있다. sGPT의 신장에서의 活性을 제외한 모든 data는 $\alpha=0.05$ 수준에서 서로간에 有意性이 있었다.

5. Electrophoresis에 의한 組織 LDH isozyme Pattern의 變化

肝 및 腎臟의 LDH isozyme pattern 變化가 Table 6에 나타나 있다. LDH는 單一酵素體가 아니라 수개의 isozyme의 混合體로 構成되어 있음

을 Niellands^{57,58}가 보고한 바 있으며, 전기영동으로 이들을 分離한 많은 研究^{54,56}들이 있다. Wieland⁵⁷등은 動物組織에서 5種의 LDH isozyme의 존재를 확인하였고, 대개 이 5種中 1種以上の isozyme이 있음을 지적하였다. 또 Kreutzer⁵⁹등은 病的狀態에서 LDH isozyme Pattern이 변한다고 밝힌 바 있다. 本實驗에서 LDH isozyme의 명칭은 Wieland법⁵⁷에 의하여 陽極쪽으로 가장 멀리 이동한 isozyme부터 순서대로 LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ 및 LDH₅로 하였다.

實驗結果, 肝組織에서는 LDH₄와 LDH₅가 分離되었으며 Chloroform만 投與한 群에서 Chloroform 投與濃도가 높아질수록 LDH₅의 比率이 증가하는 것으로 나타났고, 肝障害時 LDH₅의 증가가 현저하다는 보고⁵⁹와 일치하며 花粉粒을 함께 投

Table 6. LDH isozyme pattern in liver and kidney of rats. (%)

Samples	Isozymes	Groups						
		Control	I	II	III	I-P	II-P	III-P
Liver	LDH ₄	35.6 ¹⁾ ± 4.64	26.75 ± 2.82	23.27 ± 1.50	20.38 ± 2.92	35.30 ± 5.32	31.38 ± 3.19	33.70 ± 2.85
	LDH ₅	64.4 ± 5.07	73.25 ± 8.55	76.73 ± 12.38	79.62 ± 6.30	64.70 ± 7.56	68.62 ± 5.85	66.30 ± 4.23
Kidney	LDH ₁	10.1 ^{N.S.2)} ± 3.91	5.75 ± 4.51	24.8 ± 2.64	30.55 ± 2.68	31.80 ± 6.11	25.50 ± 5.32	20.95 ± 2.85
	LDH ₂	30.5 ^{N.S.} ± 2.85	53.75 ± 1.27	27.05 ± 2.23	14.70 ± 1.00	28.70 ± 2.35	22.40 ± 4.64	20.65 ± 2.82
	LDH ₃	10.1 ^{N.S.} ± 1.48	21.70 ± 2.33	25.75 ± 2.26	25.75 ± 3.64	7.60 ± 1.74	17.50 ± 2.06	15.65 ± 1.49
	LDH ₄	28.1 ^{N.S.} ± 0.95	6.20 ± 1.21	6.85 ± 1.50	10.15 ± 1.27	11.10 ± 2.85	16.70 ± 0.77	21.95 ± 2.19
	LDH ₅	21.2 ^{N.S.} ± 1.13	12.60 ± 3.26	16.35 ± 6.11	18.85 ± 5.32	20.80 ± 2.73	17.90 ± 1.96	20.80 ± 0.97

¹⁾ Mean±S.D. of 5 rats.²⁾ none significant.

與한 群에서는 LDH₅의 比率이 다소 감소하는 것으로 나타났으나, 이들 data간에 有意性은 없었다.

腎臟組織에는 5種類의 LDH isozyme이 모두 分離되었으나 역시 實驗群間的 有意性은 나타나지 않았다.

要 約

chloroform으로 인한 肝 및 腎臟障害에 미치는 花粉粒의 影響을 알기 위해 rat에 농도별로 Chloroform을 投與하고, 또 이들에 花粉粒을 함께 投與한 結果는 다음과 같다.

1. 肝 및 腎臟의 total lipid含量이 chloroform만 投與한 實驗群에서는 그 投與농도가 높아질수록 증가하였으며, chloroform과 花粉粒을 함께 投與한 群에서는 chloroform의 投與농도가 낮을수록 對照群과 비슷한 含量을 나타내었다.

2. total cholesterol含量은 血清, 肝 및 腎臟 모두 chloroform만 投與한 實驗群에서는 對照群보다 많았으나, 花粉粒을 함께 投與함으로써 그 含量이 감소하는 경향을 보였으며, I-P群의 血清은 對照群보다도 더 낮은 수치를 나타내기도 했다.

3. sGOT, sGPT 및 LDH 모두 chloroform의 投與농도 증가에 비례하여 活性의 증가를 나타냈으며, 花粉粒을 함께 投與한 群에서는 對照群과 거의 비슷한 活性으로의 저하가 보였으나, Chloroform 投與농도가 클수록 活性 저하 정도는 감소하였다.

4. LDH isozyme의 Cellulose acetate electrophoresis結果, 肝에서는 chloroform을 投與함으로써 LDH₅의 증가가, 花粉粒을 함께 投與함으로써 LDH₅의 감소가 나타났으나 有意性은 없었으며, 腎臟에서도 isozyme 상호간의 有意的인 變化는 나타나지 않았다.

참 고 문 헌

1. 金丙鎬: 신양봉학(선진문화사, 서울), 242 (1982)
2. McIlwain, D.L.: *Biochem.* **512**, 4054(1966)
3. Chung, H.K.: *The Seoul J. of Med.* **18**(2), 125(1977)
4. Taich, O.: *Yakugaku Zasshi*, **94**(3), 362 (1974)
5. Taich, O.: *Yakugaku Zasshi*, **94**(3), 367 (1974)
6. Anelli, G.: *Agrochem.*, **15**(6), 539(1971)
7. Echigo, T.: *Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku*, **11**, 37(1971)
8. Chung, Y.K.: *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **13**(2), 169(1984)
9. 古川敏議, *東邦醫會誌*, **15**(2), 190(1968)
10. 古川敏議, *東邦醫會誌*, **15**(2), 201(1968)
11. Kutob, S.D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **135**, 245(1962)
12. Cormish, H.H.: *Arch. Environ. Health*, **14**, 447(1967)
13. Klassen, C.D.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **10**, 119(1967)
14. Traiger, C.J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **20**, 105(1971)
15. Hasumura, Y.: *Gastroenterology*, **66**, 415 (1974)
16. Maling, H.M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 291(1975)
17. Strubelt, O.: *Toxicol.*, **10**, 261(1978)
18. Sato, A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **60**, 8(1981)
19. Robbins, C.: *Pathologic Basis of Disease.*, **450**, Saunders(1984)
20. Scholler, K.L.: *Arzneimittel-Forch.*, **20**, 289(1970)
21. Ilett, K.F.: *Exp. Molec. Path.*, **19**, 212 (1973)
22. Cornish, H.H.: *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **25**, 57(1966)
23. Opie, E.L.: *J. Am. M.A.*, **62**, 895(1974)
24. Opie, E.L.: *J. Exper. Med.*, **21**, 1(1915)
25. Opie, E.L.: *J. Exper. Med.*, **21**, 21(1915)
26. Davis, N.C.: *Arch. Int. Med.*, **23**, 612 (1919)
27. Graham, E.A.: *J. Exper. Med.*, **21**, 185 (1919)
28. Yoon, S.H.: *Korean. Soc. Food. Nutr.*, **14**(1), 27(1985)
29. LaDue, L.S.: *Circulation*, **11**, 871(1955)
30. Kohn, J.: *Clin. Chem. Acta.*, **2**, 297(1957)
31. Kohn, J.: *Clin. Chem. Acta.*, **3**, 450(1959)
32. Kohn, J.: *Chromatographic and Electrophoretic techniques*, Vol.2, 2nd ed., 81 (1968)
33. Rosenfeld, G.: *Physiol.*, **2**, 50(1903)
34. Rosenfeld, G.: *Berlin Klin. Wochnschr.*, **43**, 978(1906)
35. Addis, T.: *T. Biol. Chem.*, **111**, 117 (1936)
36. Addis, T.: *J. Biol. Chem.*, **115**, 117 (1936)
37. Daft, F.S.: *J. Biol. Chem.*, **113**, 391 (1936)
38. Davis, N.C.: *Arch. Int. Med.*, **23**, 689 (1919)
39. Best, C.H.: *Vitamins and Hormones*, Academic Press, Inc. New York, **1**, 1 (1943)
40. Heppel, L.A.: *Arch. Biochem.*, **15**, 436 (1947)
41. McHenry, E.W.: *Physiol. Rev.*, **24**, 128 (1944)
42. Hartrift, W.S.: Transactions of the second Conference of Connective Tissues, Josiah Maey Jr. Foundation, New York(1952)
43. Morrione, T.G.: *Amer. J. Path.*, **25**, 273(1949)
44. Sellers, E.A.: *Brit. Med. J.*, **1**, 1061 (1948)
45. Popper, H.: Drug-induced Hepatic Injury. *Ann. Int. Med.*, **51**, 1230(1959)
46. McGrandy, R.B.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **18**, 237(1966)
47. Houges, R.E.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **17**,

- 334(1965)
48. Lopez, A.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **18**, 149 (1966)
49. Groen, J.J.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **17**, 296 (1965)
50. Munro, H.N.: *Proc. Nutr. Soc.*, **23**, 12 (1964)
51. Prather, E.S.: *J. Am. Dietetic Ass.*, **47**, 187(1965)
52. Ann, J.Y.: *Kor. J. Nutr.*, **2**, 4, 143 (1952)
53. Nieland, J.B.: *Science*, **115**, 143(1952)
54. Nieland, J. B.: *J. Biol. Chem.*, **199**, 373 (1952)
55. Charpentier, J.: *Nature*, **201**, 1325(1964)
56. Barnett, H.J.: *Clin. Path.* **17**, 567(1964)
57. Wieland, T.: *Biochem. Z.*, **329**, 122 (1953)
58. Krutzer, H.H.: *Clinica, Chimica. Acta.*, **11**, 159(1965)
59. Bauer, J.D.: *Clinical Laboratory Methods*, Mosby, 577(1982)