

## D-Galactosamine으로 유발된 흰쥐의 간손상에 대한 치자와 두시 추출액이 미치는 영향

김정상<sup>†</sup> · 정종길<sup>\*</sup>

동신대학교 한의과대학 해부학교실<sup>†</sup>, 동신대학교 한의과대학 본초학교실<sup>\*</sup>

### Effect of the *Gardenia jsaminodes* and *Glycine max* on Hepatotoxicity of D-Galactosamine in Rats

Jeong-Sang Kim<sup>†</sup> · Jong-Kil Jeong<sup>\*</sup>

Dept. of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dong-Shin University<sup>†</sup>

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Dong-Shin university<sup>\*</sup>

---

#### Abstract

**Aim :** To investigate the hepatotective effect of *Gardenia jsaminodes* and *Glycine max* aqueous extract against D-galactosamine (d-GalN, 300mg/kg body weight) was administered to the male Sprague Dawley (SD) rats.

**Materials and Methods :** The study was carried out on male SD rats (age matched, weight 250±10 g). Experimental groups divided four: Normal group (Nor) was administered saline, Control (Con) group was administered saline after d-GalN treatment. Experimental group (Exp) was administered *Gardenia jsaminodes* (200 mg/kg; Ga group), *Glycine max* (700 mg/kg; GI group), and *Gardenia jsaminodes*+*Glycine max* (200 mg/kg+700 mg/kg, GG group) during 14 days(n=5).

**Results :** d-GalN administration induced hepatotoxicity in rats which was manifested by increased levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase but decreased total cholesterol and triglyceride. Treatment with *Gardenia jsaminodes* extract significantly protected the liver in d-GalN administered rats.

**Conclusion :** *Gardenia jsaminodes* aqueous extract and *Gardenia jsaminodes*+*Glycine max* extract possesses hepatoprotective potential, thus validating its use in alleviating toxic effects of d-GalN.

**Key Words :** D-galactosamine, *Gardenia jsaminodes*, *Glycine max*, hepatotective

---

\* 교신저자 : 정종길, 전남 나주시 대호동 252 동신대학교 한의과대학 본초학교실 Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dong Shin University, Daeho-dong, Naju, Cheollanam-do, Korea. jgj3523@naver.com 82-61-330-3502

## I. 서론

간질환은 일반적으로 간조직의 섬유화되고 간경화 진행된 다음 최종적으로 간암으로 발전되는 일련의 과정을 거치게 된다. 그 원인으로는 바이러스를 원인으로 하는 간질환, 알코올성 간질환, 약물 독성에 의한 간질환, 간 조직에 지방이 축적되는 지방간, 인체 면역계통의 이상으로 인한 자가 면역성간질환, 독성물질의 과대한 축적에 의한 대사성간질환 등 다양한 원인에 의해서 나타난다.<sup>1)</sup>

D-galactosamine(이하 GalN)은 galactose의 대사장애를 통해 uridine triphosphate(UTP), uridine diphosphate(UDP) 및 uridine monophosphate(UMP) 등의 농도 감소로 인하여 RNA의 합성을 저해하고 지질의 축적을 유도하며, 세포막 성분중 탄수화물의 조성과 세포내 Ca<sup>++</sup>의 농도를 변화시켜 간 조직의 손상을 유발한다.<sup>2,3)</sup> GalN의 투여는 소엽성 국소 간세포 괴사, 염증세포의 침윤, 대식세포의 증가 등 사람의 바이러스성 간염과 유사한 증상을 초래한다<sup>4)</sup> GalN의 급성 중독 일 경우는 간조직의 괴사가, 만성 중독일 경우는 간경화와 간세포성 종양이 유발된다고 하였다.<sup>5)</sup>

꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매인 치자(*Gardenia Fructus*)는 한방에서 염증, 황달, 부종, 간질환, 고혈압등의 치료를 목적으로 사용되어져 왔다. 간질환에 관한연구<sup>6,7)</sup> 항암효과<sup>8-10)</sup>, 항염증 효과<sup>11-12)</sup> 항산화효과<sup>13-15)</sup> 등에 관한 연구가 주로 수행되어 보고 되었으며, 그 밖에 우울증과 신경퇴행성 질환에 효과<sup>16)</sup>, 망막의 손상으로부터 보호<sup>17)</sup>, 수면의질을 높여주는 효과<sup>18)</sup>가 있음이 연구 보고 되었다. 콩(*Glycine*

*max*)의 면역세포의 활성화<sup>19)</sup>, 알코올성 간독성 해독작용<sup>20)</sup> 신장독성에 관한 연구<sup>21)</sup>, 간기능 활성화<sup>22,23)</sup>, 항산화작용<sup>24,25)</sup> 등에 관한 연구가 있었다. 그러나 콩을 발효한 두시(豆豉)에 관한 연구는 아직 미약하기에, 본 연구에서는 치자, 두시, 치자와 두시를 혼합한 추출액이 galactosamine으로 유발된 간 독성에 대한 효과를 규명하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 실험동물

체중 200±10 g 내외의 7주령 흰쥐(Sprague Dawley)를 샘타고(주, 오산)로부터 구입하였다. 실험동물은 동신대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 : 21±2 °C, 습도 : 50-60%, 12시간 주기 명/암)하에서 일반 고형사료(샘타고, 흰쥐 용)와 물을 충분히 공급하면서 1주 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

### 약물 추출

실험에 사용한 약재인 치자와 두시는 동신대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 치자 18g와 두시 40g를 각각 물 600mL에 넣고 약탕기로 3시간 동안 가열한 다음 농축한 후 저온순환수조(COOL ACE CA-1500)에서 1차 동결한 다음 동결건조기(Samwon, SFDSMO06, 한국)로 동결 건조하여 각각 3g와 4g의 건조 분말을 얻었다.

### 간손상 유발

정상군을 제외한 모든 실험동물은 간손상

약물인 galactosamine(Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 300mg/kg을 0.9% 식염수 0.5 mL에 용해하여 1회 구강투여 하였다.

#### 실험군 설정 및 약물 투여

정상군(Nor)은 통상적인 사료와 물을 공급하였으며, 대조군(Con)의 실험동물은 galactosamine을 투여하여 간 손상을 유발 후부터 생리식염수 0.5 mL을 10 동안 매일 구강 투여하였다. 실험군은 galactosamine을 투여한 48시간 후부터 치자(*Gardenia jasminodes* 200 mg/kg; Ga군), 두시(*Glycine max* 700 mg/kg; GI군), 치자(200 mg/kg)+두시(700 mg/kg)를 혼합(GG군)을 각각 생리식염수 0.5 mL에 용해하여 14 일 동안 구강 투여 하였다. 모든 실험군은 각각 6마리씩 사용하였다.

#### Total cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride 함량 측정

약물 투여 10일 후 흰쥐를 Pentobarbital sodium(Entobal, 한림제약)으로 마취(50mg/kg/body weight, i.p.)한 다음 복부의 정중선을 따라 절개하고 심장 채혈을 시행하였다. 혈액은 시험관에 넣어 실온에서 30분간 방치하여 혈액을 응고시킨 다음 3,000rpm에서 원심분리하여 혈청을 얻었다. Total cholesterol은 Allain<sup>26)</sup>의 방법에 따라 546 nm 파장에서, HDL cholesterol은 Warnick와 Albers<sup>27)</sup>의 방법에 따라 546nm 파장에서, Triglyceride는 McGowan<sup>28)</sup>의 방법 505nm 파장에서 측정하였으며, 모든 시약은 Kit (ELITECH, France)를 사용하였다.

#### 혈청 Transaminase 활성 측정

혈중 중 aspartate aminotransferase(AST, GOT)와 alanine aminotransferase (ALT, GPT)의 활성 측정은 Reitman-Frankel<sup>29)</sup>의 방법에 따라 kit 시약(FUJIFILM, JAPAN)을 사용하여 측정하였다. 505 nm에서 흡광도(FUJIFILM DRI-CHEM 4000i, JAPAN)의 변화를 측정하였다.

#### 통계처리

결과 대한 통계처리는 SAS(statistical analysis system)program에 의하여 각 실험군 별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, p-value가 최소한 0.05이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 총 콜레스테롤 함량

GalN에 의한 총 콜레스테롤 함량의 변화에는 큰 변화가 없다고 하였다.<sup>1-5)</sup> 본 실험의 결과에서도 치료 약물을 구강 투여한 14일 후 정상군(72±3.21 mg/dL)에 비하여 대조군(69±0.73 mg/dL)에서 다소 감소하였다. Ga군(73±5.79 mg/dL)은 정상군보다 약간 높게 나타났으며, 대조군에 비하여 다소 증가하였다. GI군(68±2.75 mg/dL), GG군(67±3.70 mg/dL) 또한 정상군에 비하여 감소하였으나 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 1). 이와 같은 결과로 보아 GalN의 투여로 유발된 간 손상 흰쥐에서는 총 콜레스테롤 함량의 변화에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

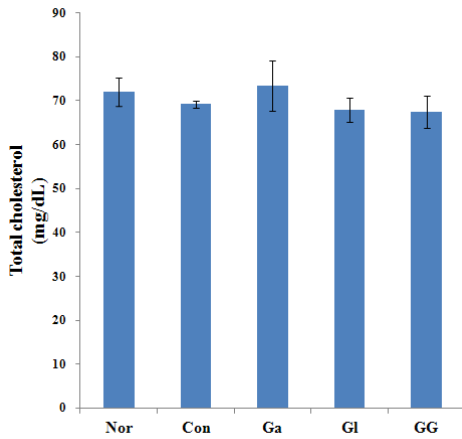


Fig. 1. The changes of cholesterol concentration, Nor, administrated saline; Con, control group administrated saline after galactosamine treatment; Ga group administrated *Gardenia jasminoides* 200 mg/kg/day, Gl group administrated Glycine max 700 mg/kg/day, GG group administrated *Gardenia jasminoides*(200 mg/kg/day) + Glycine max 700 mg/kg/day), All values are mean  $\pm$  S.E.(n=6). Significant differences were compared with normal at \*p<0.05 or control at #p<0.05.

#### Triglyceride의 함량

GalN에 의한 중성지방 함량은 다소 낮아진다고 하였다.<sup>1-5)</sup> 본 실험 결과 치료 약물을 구강 투여한 14일 후 측정된 결과 정상군(89 $\pm$ 7.76 mg/dL)에 비하여 대조군(67 $\pm$ 2.77 mg/dL), Gl군(57 $\pm$ 7.32 mg/dL), GG군(67 $\pm$ 6.65 mg/dL) 모두 통계적으로 유의성(\*p<0.05)있게 감소하였다. Ga군(83 $\pm$ 4.45 mg/dL)은 정상군 비하여 감소하였으나 대조군에 비하여 통계적으로 유의성(#p<0.05)있게 증가하였다(Fig. 2). 이와 같은 결과로 보아 치자 추출물의 투여가 간 손상으로부터 보호 효과가 가장 높았으며, 두시 추출물은 효과 없는 것으로 사료되었다.

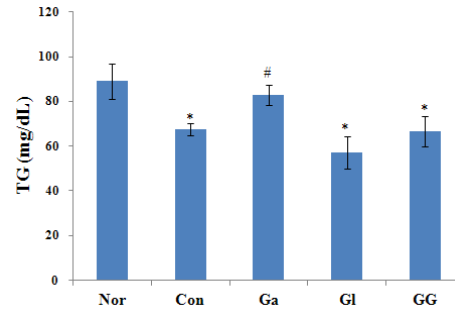


Fig. 2. The changes of triglyceride concentration, Nor, administrated saline; Con, control group administrated saline after galactosamine treatment; Ga group administrated *Gardenia jasminoides* 200 mg/kg/day, Gl group administrated Glycine max 700 mg/kg/day, GG group administrated *Gardenia jasminoides*(200 mg/kg/day) + Glycine max 700 mg/kg/day), All values are mean  $\pm$  S.E.(n=6). Significant differences were compared with normal at \*p<0.05 or control at #p<0.05.

#### HDL-콜레스테롤 함량

실험동물에 GalN을 투여하면 혈중 HDL은 다소 낮아진다고 하였다.<sup>1-5)</sup> 본 실험 결과에서도 HDL은 함량은 치료 약물을 구강 투여한 14일 후 정상군(46 $\pm$ 1.38 mg/dL)에 비하여 Gl군(39 $\pm$ 2.17 mg/dL)은 통계적으로 유의성(#p<0.05)있게 감소하였다. 또한 대조군(41 $\pm$ 1.93 mg/dL), GG군(41 $\pm$ 3.06 mg/dL)모두 정상군에 비하여 감소하였으나 통계적으로 유의성(p<0.05)은 없었으며, Ga군(46 $\pm$ 2.15 mg/dL)은 정상군과 비슷하였다(Fig. 3). 이와 같은 결과로 보아 두시는 GalN 투여 결과 낮아진 실험동물의 HDL 함량 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다.

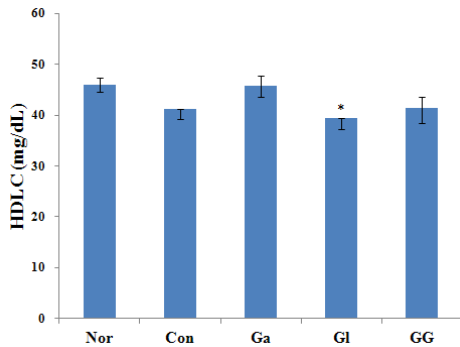


Fig. 3. The changes of HDL concentration. Nor, administrated saline; Con, control group administrated saline after galactosamine treatment; Ga group administrated Gardenia jasminoides 200 mg/kg/day, GI group administrated Glycine max 700 mg/kg/day, GG group administrated Gardenia jasminoides(200 mg/kg/day) + Glycine max 700 mg/kg/day, All values are mean  $\pm$  S.E.(n=6). Significant differences were compared with normal at \*p<0.05 or control at #p<0.05.

#### Aspartate aminotransferase 활성

GalN에 의한 간 손상으로 간경화가 나타나면 transaminase가 다소 증가 한다고 하였다.<sup>1-5)</sup>

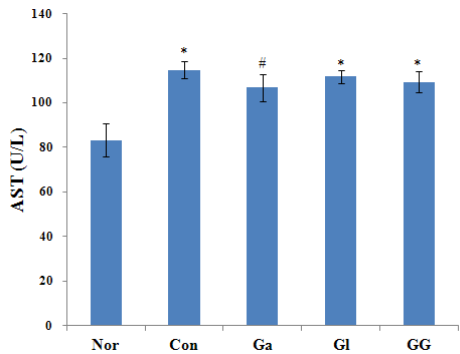


Fig. 4. The changes of AST activities. Nor, administrated saline; Con, control group administrated saline after galactosamine treatment; Ga group administrated Gardenia jasminoides 200 mg/kg/day, GI group administrated Glycine max 700 mg/kg/day, GG group administrated Gardenia jasminoides(200 mg/kg/day) + Glycine max 700 mg/kg/day, All values are mean  $\pm$  S.E.(n=6). Significant differences were compared with normal at \*p<0.05 or control at #p<0.05.

본 실험 결과에서도 정상군에(83 $\pm$ 7.35 U/L) 비하여 대조군(116 $\pm$ 3.69 U/L), GI군(112 $\pm$ 2.89 U/L), GG군(109 $\pm$ 4.82 U/L)은 모두 정상군에 비하여 통계적으로 유의성(\*p<0.05)있게 증가하였으나, Ga군(107 $\pm$ 6.16U/L)은 대조군에 비하여 통계적으로 유의성(#p<0.05)있게 감소하였다(Fig. 4). 이와 같은 결과로 보아 치자 추출물의 투여가 GalN에 의한 간독성으로부터 보호 효과가 가장 높은 것으로 사료되었다.

#### Alanine aminotransferase 활성

AST와 같이 ALT의 활성 또한 GalN의 투여로 상승하였다. 본 실험 결과 정상군(25 $\pm$ 1.38 U/L)에 비하여 대조군(36 $\pm$ 1.60 U/L), Ga군(31 $\pm$ 1.33 U/L), GI군(31 $\pm$ 1.83 U/L) GG군(31 $\pm$ 1.46 U/L) 통계적으로 유의성(\*p<0.05)있게 활성이 증가

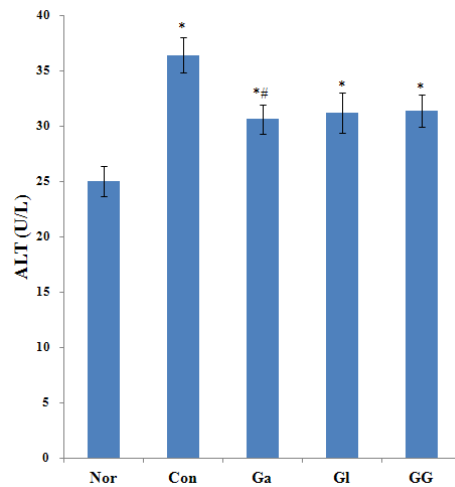


Fig. 5. The changes of GPT activities. Nor, administrated saline; Con, control group administrated saline after galactosamine treatment; Ga group administrated Gardenia jasminoides 200 mg/kg/day, GI group administrated Glycine max 700 mg/kg/day, GG group administrated Gardenia jasminoides(200 mg/kg/day) + Glycine max 700 mg/kg/day, All values are mean  $\pm$  S.E.(n=6). Significant differences were compared with normal at \*p<0.05 or control at #p<0.05.

하였다. 그러나 Ga군은 대조군에 비하여 유의성( $p < 0.05$ )있게 감소하였다(Fig. 5). 이와 같은 결과 또한 치자 추출물의 투여가 간 독성으로부터 가장 보호 효과가 높은 것으로 사료되었다.

#### Alkaline phosphatase(ALP) 활성

알칼리성 포스파타제 만성간염이나 간경변증에서도 올라갈 수 있으나, 만들어진 담즙이 간세포에서 잘 배출되지 못하거나 담도가 막혔을 때 현저히 증가한다.<sup>1-5)</sup> 본 연구에서 ALP의 활성은 정상군( $438 \pm 30.95$  U/L) 비하여 대조군( $799 \pm 48.31$  U/L), Ga군( $711 \pm 35.55$  U/L), GI군( $631 \pm 21.97$  U/L), GG군( $662 \pm 22.83$  U/L), 모두 통계적으로 유의성( $p < 0.05$ )있게 활성이 증가하였다. 그러나 GI군과 GG군은 대조군은 대조군에 비하여 통계적으로 유의성( $p < 0.05$ )있게 감소하였다(Fig. 6). 이와 같은 결과로 보아 GalN에 의한 간독성으로 증가하는 ALP에 대

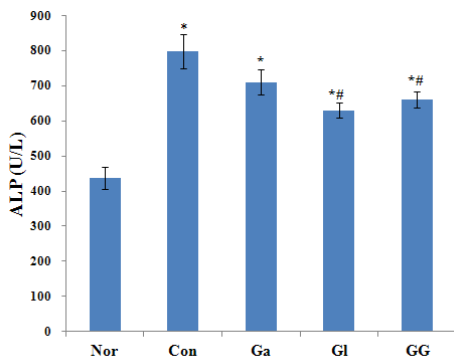


Fig. 6. The changes of Alkaline phosphatase activities.

Nor, administrated saline; Con, control group administrated saline after galactosamine treatment; Ga group administrated Gardenia jasminoides 200 mg/kg/day, GI group administrated Glycine max 700 mg/kg/day, GG group administered Gardenia jasminoides(200 mg/kg/day) + Glycine max 700 mg/kg/day, All values are mean ± S.E.(n=6). Significant differences were compared with normal at \* $p < 0.05$  or control at # $p < 0.05$ .

하여 두시 추출물의 효능이 가장 우수 하다고 할 수 있을 것이다.

이상의 결과로 보아 GalN의 투여로 유발된 간 손상에 대한 보호 효과는 치자 추출물이 가장 높은 것으로 나타났으며, 두시 추출물은 다소 낮았다. 또한 치자와 두시를 혼합하여 투여한 실험군에서는 치자 투여군에 비하여 다소 낮은 효과를 나타냈으나 전반적으로 간 보호 효과가 있는 것으로 사료 되었다. 앞으로 투여 약물의 용량, 투여 기간, 치자와 두시의 혼합 비율에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료되었다.

## 결 론

**목적:** 본 연구에서는 GalN으로 유발된 흰쥐의 간손상에 대한 치자, 두시, 치자와 두시 혼합물의 투여 효과를 구명하고자 시행하였다.

**재료 및 방법:** 실험군은 정상군(Nor), GalN을 투여 후 생리식염수를 투여한 대조군(Con), 유발후 치자추출물을 투여한 실험군(Ga군), 두시 추출물 투여군(GI군), 치자와 두시 혼합 투여군(GG군)으로 구분하였다.

**결과:** Triglyceride와 HDL은 정상군에 비하여 대조군에서 가장 낮았으며, 실험군은 대조군에 비하여 증가하였다. AST와 ALT의 활성은 대조군이 통계적으로 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 정상군에 비하여 증가하였으며, 실험군에서는 대조군에 비하여 감소하였다. ALP의 활성 또한 대조군에서 가장 높게 나타났으며, 실험군에서 감소하였다.

**결론:** 이와 같은 결과로 보아 치자와 치자와 두시 혼합물의 투여가 GalN으로 유발된 간손

상을 완화시키는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

### 참고문헌

- Murakmi T, Kim T, Nakamura H. 1998. Hepatitis, cirrhosis and hepatoma. *J Magn Reson Imaging* 8: 346-358.
- Decker K, Keppler D. 1974. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 71: 77-106.
- Wang J, Wendel A. 1990. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver. *Biochem Pharmacol* 39: 267-270.
- Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. 1968. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 9: 279-290.
- Farber JL, Gill G, Konishi Y. 1973. Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. *Am J Pathol* 72: 53-62.
- Kim SJ, Kim JK, Lee DU, Kwak JH, Lee SM. 2010. Genipin protects lipopolysaccharide-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine sensitized mice. *Eur J Pharmacol*. 10;635(1-3):188-93.
- Lee SJ, Oh PS, Lim KT. 2006. Hepatoprotective and hypolipidaemic effects of glycoprotein isolated from *Gardenia jasminoides* ellis in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 33(10):925-33.
- Tseng TH, Chu CY, Huang JM, Shioh SJ, Wang CJ. 1995. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Lett* 97: 61-67.
- Hwang SM, Lee YJ, Yoon JJ, Lee SM, Kang DG, Lee HS. 2010. *Gardenia jasminoides* inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced vascular inflammation in endothelial cells. *Phytother Res*. 24(2):S214-9.
- Kim ES, Jeong CS, Moon A. 2012. Genipin, a constituent of *Gardenia jasminoides* Ellis, induces apoptosis and inhibits invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncol Rep*. 27(2):567-72.
- Fuy Y, Liu B, Liu J, Liu ZX, Liang D, Li F, Li D, Cao Y, Zhang X, Zhang N, Yang Z. 2012. Geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models. *Int Immunopharmacol*. 14(4):792-8.
- Lee J, Lim KT. 2011. Preventive effect of phytoglycoprotein (27 kDa) on inflammatory factors at liver injury in cadmium chloride-exposed ICR mice. *J Cell Biochem*. 112(2):694-703.
- Han YN, Oh HK, Hwang KH, Lee MS. 1994. Antioxidant components of gardenia fruit. *Korean J pharmacogn*. 25: 226-232.
- Kim ML. 2006. Antioxidative activity of extracts from *Gardenia jasminoides* and quality characteristics of noodle added *Gardenia jasminoides* powder. *Korean J Food Cookery Sci*. 22: 237-243.
- Pham TQ, Cormier F, Farnworth E, Tong VH, Van Calsteren MR. 2000. Antioxidant properties of rocin from *Gardenia jasminoides*

- Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen. *J Agric Food Chem* 48: 1455-1461.
16. Kim JH, Kim GH, Hwang KH. 2012. Monoamine Oxidase and Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase Inhibitors from the Fruits of *Gardenia jasminoides* *Biomol Ther* 20(2), 214-219.
17. Yamauchi M, Tsuruma KJ, Imai S, Nakahishi T, Umigai N, Shimaxawa M, Hara H. 2011. Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity. *Eur J Pharmacol.* 10;650(1):110-9.
18. Juratsune H, Umigai N, Takeno R, Kajimoto Y, Nakano T, 2010. Effect of crocetin from *Gardenia jasminoides* Ellis on sleep: a pilot study. *Phytomedicine.* 17(11):840-3.
19. Shabat Y, Lichtenstein Y, Zolotarov L, Ben Ya'acov A, Ilan Y. 2012. Hepatoprotective effect of DT56a is associated with changes in natural killer T cells and regulatory T cells. *J Dig Dis.* 24(10):1751-2980.
20. Shivashankara AR, Axmidah A, Haniadka R, Rai MP, Baliga MS. 2012. Dietary agents in the prevention of alcohol-induced hepatotoxicity: preclinical observations. *Food Funct.* 3(2):101-9.
21. Ekor M, Emerole GO, Farombi EO. 2010. Phenolic extract of soybean (*Glycine max*) attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 48(4):1005-1012.
22. Ronis MJ, Chen Y, Jo CH, Simpson P, Badger TM. 2004. Diets containing soy protein isolate increase hepatic CYP3A expression and inducibility in weanling male rats exposed during early development. *J Nutr. Dec.* 134(12):3270-3276.
23. Anderson GD, Rositkl G, Mohustsy MA, Elmer GW. 2003. Drug interaction potential of soy extract and Panax ginseng. *J Clin Pharmacol.* 43(6):643-648.
24. Jeon HY, Seo DB, Shin HJ, Lee SJ. Effect of *Aspergillus oryzae*-challenged germination on soybean isoflavone content and antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2012 Mar 21;60(11):2807-14
25. Jang EH, Ko JH, Ahn CW, Lee HH, Shin JK, Chang SJ, Park CS, Kang JH. In vivo and in vitro application of black soybean peptides in the amelioration of endoplasmic reticulum stress and improvement of insulin resistance. *Life Sci.* 2010 Feb 13;86(7-8): 267-74.
26. Allain CC, Poon LS, Chan CSG. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20:470-475.
27. Warnick RG, Albers JJ. 1978. A comprehensive evaluation of the heparin-manganese precipitation procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. *J, Lipid Res.* 19:65-76.
28. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 29:538-542.
29. Reitman S, Frankel AS, A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol,* 28:56-63. 1957.