

## 홍삼 산성다당체의 생리활성 연구(II)- 알코올성 고지혈증에 미치는 영향

이정규 · 최종원\* · 김혜경 · 한용남\*

경성대학교 약학대학, 서울대학교 천연물과학연구소  
(1998년 8월 11일 접수)

### Biological Activities of Acidic Polysaccharide of Korean Red Ginseng.II.-Effects on Hyperlipidemia induced by Alcohol

Chung Kyu Lee, Jong-Won Choi,\* Hyekyung Kim and Yong Nam Han\*

College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736 and

\*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

(Received August 11, 1998)

**Abstract :** Acidic polysaccharide of Korean red ginseng (AcPS) was subjected to alcohol-intoxicated rats to check the effects on the growth factors and lipid metabolism. Administration of AcPS showed prevent effects on the body weight, the increased contents of total cholesterol, HDL-cholesterol and neutral glyceride in the serum and total lipid, total cholesterol and neutral glyceride in the liver of alcohol intoxicated rats were significantly normalized. And all of the effects were proportionally increased with the duration of treatments.

**Key words :** Red ginseng, acidic polysaccharide, alcoholic lipidemia, lipid content.

## 서 론

당뇨병, 고지방혈증, 고혈압등 식이성 성인병의 발병율은 급격히 높아지고 있어 그 치료 및 예방을 위한 방법들이 다각적으로 연구되고 있는 가운데 식이성 섬유질(dietary fiber)을 다량 함유한 식품의 연구와 개발이 우리나라에서도 활발히 진행되고 있다.<sup>1-3)</sup> 일반적으로 가용성 식이섬유는 사람이나 기타 동물의 고지혈증과 동맥경화증등의 예방 혹은 개선에 효과가 있는 것으로 알려지고 있으며 펙틴질의 섭취는 임상 및 동물실험에서 모두 혈장 콜레스테롤의 저하

와 관계가 깊다고 알려져 있으며<sup>4)</sup> 양질의 식이섬유를 함유한 인삼에 관해서는 그 함량과 조성, 펙틴질의 이화학적 성상이 알려져 있다.<sup>5,6)</sup>

저자 등은 홍삼 산성다당류(AcPS)가 고지혈증 실험동물 모델에 있어서 free radical생성계, 해독효소계 및 알코올 대사효소계에 미치는 영향을 검토하여 알코올 아급성중독으로 유도되는 간장중의 효소 변화상태를 개선시키며 이러한 현상은 알코올 및 acetaldehyde를 분해하는 효소계를 조절하므로써 나타나는 결과로 보고한 바 있다.<sup>7)</sup> 본 연구에서는 간장 조직 중 에탄올중독에 의해 증가된 총지질, 총콜레스테롤 그리고 중성지질의 양이 AcPS의 투여로 유의적인 억제효과를 나타냄으로써 고지혈증 상태를 개선할 수 있음을 보고한다.

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 051-620-4883; (팩스) 051-628-6540

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료의 조제

홍삼산성다당체의 분리는 한 등<sup>8)</sup>의 방법에 따라 홍삼을 원료로 하여 에탄올추출물을 만들고 이로부터 투석과 DEAE Cellulose 칼럼 이온교환 크로마토그라피 과정을 거쳐 총다당체(total polysaccharide)와 산성다당체를 분리하고 alcian blue 색소법으로 확인하였다.\*)

### 2. 실험동물

실험동물은 한국실험동물개발로부터 분양받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도: 20±2°C, 습도: 40~60%, 조명: 12시간 밤낮 주기)으로 2주 동안 적응시킨 체중 150 g 내외의 Sprague-Dawley계 웅성(雄性) 흰쥐를 사용하였다.

### 3. 고지혈증의 유발 및 시료투여

Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(150±10 g)를 Liu 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 알코올성 고지혈증을 유발시킨 후 실험에 사용하였다. 고지혈증유발군(Ethanol)은 25% 알코올용액을 물대신 임의피로 6주간 섭취케 하였으며 홍삼산성배당체의 투여는 체중 kg당 50 mg을 1일 1회씩 1~4주 경구투여하였으며, 대조군은 알코올과 동일한 용량의 sucrose용액을 임의로 섭취시켰다. 실험동물은 마지막 24시간 동안 절식시킨 후 다음 조작을 진행하였다. 측정용 혈청 및 조직은 전처리한 동물을 CO<sub>2</sub> gas로 가법계 마취시킨 후 복부 정중선을 따라 절개하고 복부 대동맥에서 혈액을 채취하고 실험치사 한 후, 간장을 적출하여 일반적인 방법으로 간장을 적출하여 조직내 혈액을 제거하고 여지로 혈액 및 기타 이물질을 제거한 후 총중량을 잰 다음, 일부분을 취해 조직 1 g당 4배량의 0.1M 인산완충액(pH 7.4)으로 마쇄하고 간의 지질성분 농도를 측정하였다.

### 4. 지방조직 양 측정

지방조직은 고환을 둘러싼 주위의 지방조직을 해부학적으로 적출하여 그 무게를 재었다.

### 5. 혈중 총콜레스테롤 측정

Richmond<sup>10)</sup> 등의 효소법에 준하여 시중에서 구입한 kit(Eiken Chem Co.)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙육 상에서 효소시약(cholesterol esterase 20.5 KU/L, cholesterol oxidase 10.7 KU/L, NaOH 1.81 g/L 함유)을 완충액(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.6 g/L, phenol 1.88 g/L 함유)에 용해한 후 혈청 0.02 ml에 조제한 효소시액 3.0

ml을 첨가한 후 37°C에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선에 준해 그 함량을 ml/dl로 표시하였다(표준액중 cholesterol 300 mg/dl 함유).

### 6. 혈중 고밀도 lipoprotein-cholesterol(HDL-C) 측정

Noma 등<sup>11,12)</sup>의 방법에 준하여 시중에서 구입한 kit(Eiken Chem. Co.)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙냉상에서 혈청 0.2 ml, 분리시약 0.2 ml(NaWO<sub>4</sub> 5 g/L, MgCl<sub>2</sub> 10 g/L 함유)를 취해 원심분리(3000 rpm, 10분)한 후 상징액 0.1 ml를 취해 효소시약(cholesterol esterase 20.5 KU/L, cholesterol oxidase 10.7 KU/L, NaOH 1.81 g/L 함유)을 완충액(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.6 g/L, phenol 1.88 g/L 함유)에 용해한 후 조제한 효소시액 3.0 ml을 첨가하여 후 37°C에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선에 준해 그 함량을 ml/dl로 표시하였다(표준액중 cholesterol 50 mg/dl 함유).

### 7. 혈중 저밀도 lipoprotein-cholesterol(LDL-C) 측정

Low density lipoprotein-cholesterol(LDL-C)의 양은 Friedwald 등<sup>13)</sup>에 따라 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$LDL-C = [\text{총콜레스테롤양} - (\text{HDL-C} + \text{Triglyceride양}/5)]$$

### 8. 혈중 인지질 측정

Chen 등<sup>14)</sup>의 효소법에 준하여 시중에서 구입한 kit(Iatron Chem. Co.)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙육 중에서 효소시약(phospholipase 3.9 U, choline oxidase 5.6 U, peroxidase 3.6U, 4-aminoantipyrine 0.3252 mg 함유)을 효소시약 용해액[tris (hydroxymethyl)-aminomethane 6.057 mg 함유]에 용해한 후 혈청 0.02 ml에 조제한 효소시액 3.0 ml을 첨가한 후 37°C에서 20분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선에 준해 그 함량을 ml/dl로 표시하였다(표준액중 인산지질 300 mg/dl 함유).

### 9. 혈중 중성지질 측정

Bucolo와 David<sup>15)</sup>의 효소법에 준하여 시중에서 구입한 kit(Eiken Chem. Co.)를 사용하여 실험하였다.

**Table 1.** Effect of acidic polysaccharide from Korean red ginseng (AcPS) on growth factors in normal and alcohol-induced hyperlipidemic rats after four weeks treatments

Treatments <sup>1)</sup>	Initial weight (g)	Body weights after four weeks (g)	Adipose tissue (g)	Liver weight (g/100 g b.w)
Control	125.9±3.34 <sup>a</sup>	157.9±8.72 <sup>a</sup>	4.12±0.23 <sup>a</sup>	3.41±0.20 <sup>a</sup>
Ethanol	126.4±4.59 <sup>a</sup>	115.7±11.51 <sup>b</sup>	4.92±0.52 <sup>b</sup>	3.91±0.26 <sup>b</sup>
AcPS 1	125.0±3.23 <sup>a</sup>	124.7±13.71 <sup>b</sup>	4.75±0.57 <sup>c</sup>	3.83±0.26 <sup>bc</sup>
AcPS 2	124.6±6.40 <sup>a</sup>	138.5±8.95 <sup>c</sup>	4.93±0.27 <sup>b</sup>	3.60±0.31 <sup>ac</sup>
AcPS 3	122.9±8.96 <sup>a</sup>	144.8±8.29 <sup>c</sup>	4.89±0.32 <sup>b</sup>	3.59±0.28 <sup>ac</sup>
AcPS 4	125.1±3.96 <sup>a</sup>	142.5±11.40 <sup>c</sup>	4.77±0.37 <sup>b</sup>	3.66±0.36 <sup>abc</sup>

<sup>1)</sup> Rats were orally administered 25% alcohol (v/v) *ad. lid.* for six weeks and AcPS (50 mg/kg, po) once a day for 1, 2, 3 and 4 week(s) each group and sacrificed 24 hrs after the final treatment of AcPS (1~4). Values are mean S.D.(n=8), and of which has same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test.

즉, 병육 중에서 효소시약(lipoprotein lipase 450U, glycerol kinase 0.225 U, peroxidase 6.6 U 함유)을 효소시약 용해액 [N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminomethane sulfonate buffer 0.427 g/dl 함유]에 용해한 후 혈청 0.02 ml에 조제한 효소시액 3.0 ml을 첨가한 후 37°C에서 10분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선에 준해 그 함량을 ml/dl로 표시하였다(표준액 중 triglyceride 300 mg/dl 함유).

### 10. 간조직중 지질의 측정

Folch 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 조제한 간조직균질액을 중량건조법에 따라 총지질량을 측정하거나 Ichida<sup>17)</sup>의 방법에 따라 total cholesterol을, 그리고 Bucolo와 David<sup>36)</sup>의 효소법에 준하여 시중에서 구입한 kit (Eiken Chem. Co.)를 사용하여 triglyceride양을 측정하였다.

### 11. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test<sup>18)</sup>로 한다.

## 결과 및 고찰

### 1. 홍삼 산성다당류가 알코올성 고지혈증 쥐의 성장에 미치는 영향

알코올로 유도된 고지혈증에 대하여 AcPS의 투여가 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 즉 대조군에서 보는 바와 같이 4주간의 성장과정에서 평균 체중은 125.9 g에서 157.9 g으로 약 25.4%의 증가를 나타내었다. 에탄올에 중독된 동

물의 경우 126.4 g에서 115.7 g으로 오히려 약 8.5%의 감소를 보였다. 이것은 심한 알코올의 중독시에 나타나는 영양 및 대사의 교란에서 오는 일반적인 현상으로 사람의 경우에도 나타난다. 홍삼 산성다당류 50 mg/kg을 1~4 주간 경구투여한 결과 체중감소가 거의 없거나(125.0 g → 124.7 g), 13.9% 증가(125.1 g → 142.5 g) 현상을 보여 체중감소현상은 크게 개선되었음을 알 수 있다. 지방조직의 양은 대조군이 4.12 g인 반면 알코올중독군의 경우 4.92 g으로 약 19.4% 정도 증가하였다. 또한 간장의 체중에 대한 비율은 대조군의 3.41에서 알코올중독군의 3.91로 커진데 비해 AcPS 투여군의 경우 3.66(4주 투여) 내지 3.83 (1주 투여)으로 간장비대 상태를 크게 호전시켰다.

**Table 2.** Effect of acidic polysaccharide from Korean red ginseng (AcPS) on the serum cholesterol levels in alcohol-induced hyperlipidemic rats

Treatments <sup>1)</sup>	Cholesterol (mg/dl)		
	Total	HDL-	LDL-
Control	86.3±7.92 <sup>a</sup>	19.9±1.56 <sup>a</sup>	24.3±2.88 <sup>a</sup>
Ethanol	134.1±15.58 <sup>b</sup>	10.6±1.25 <sup>b</sup>	41.2±4.58 <sup>b</sup>
AcPS 1	128.5±15.26 <sup>bc</sup>	12.4±1.62 <sup>c</sup>	41.8±4.52 <sup>b</sup>
AcPS 2	115.6±12.57 <sup>d</sup>	13.0±1.35 <sup>cd</sup>	40.9±4.74 <sup>b</sup>
AcPS 3	112.1±9.80 <sup>d</sup>	14.4±1.26 <sup>d</sup>	40.3±2.08 <sup>b</sup>
AcPS 4	117.4±11.80 <sup>cd</sup>	17.0±1.71 <sup>e</sup>	38.9±3.72 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Rats were orally administered 25% alcohol (v/v) *ad. lid.* for six weeks and AcPS (50 mg/kg, po) once a day for 1, 2, 3 and 4 week(s) each group and sacrificed 24 hrs after the final treatment of AcPS(1~4). Values are mean±S.D. (n=8) and of which has same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test.

**Table 3.** Effect of acidic polysaccharide from Korean red ginseng(AcPS) on the serum lipid levels in alcohol-induced hyperlipidemic rats

Treatments <sup>1)</sup>	Phospholipid (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Control	121.0±13.93 <sup>a</sup>	113.2±15.47 <sup>a</sup>
Ethanol	125.9±13.53 <sup>a</sup>	204.4±27.47 <sup>b</sup>
AcPS 1	119.0±13.15 <sup>a</sup>	192.2±26.43 <sup>b,c</sup>
AcPS 2	114.5±14.76 <sup>a</sup>	170.4±25.11 <sup>c,d</sup>
AcPS 3	117.0±14.54 <sup>a</sup>	161.5±20.88 <sup>d</sup>
AcPS 4	118.1±11.62 <sup>a</sup>	157.9±22.46 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup> Rats were orally administered 25% alcohol (v/v) *ad. lid.* for six weeks and AcPS (50 mg/kg, p.o.) once a day for 1, 2, 3 and 4 week(s) each group and sacrificed 24 hrs after the final treatment of AcPS (1~4). Values are mean±S.D. (n=8) and of which has same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test.

## 2. 홍삼 산성다당류가 알코올성 고지혈증 흰쥐의 혈중 콜레스테롤 및 지질에 미치는 영향

성장에 미치는 영향에서 나타난 바와 같은 현상이 동물의 생화학적 현상에는 어떻게 반영되는가를 검토하기 위하여 혈중 및 간장조직의 각종 인자를 분석한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 우선 혈중 지질대사 요소를 비교해 본 결과 알코올중독으로 인해 증가된 혈중 총콜레스테롤의 농도는 현저히 감소시켰으며, HDL-cholesterol의 농도는 알코올중독에 의하여 대조군에 비해 감소되던 것이 증가되었다. 즉 총콜레스테롤의 경우 정상군은 평균 86.3 mg/dl이며 알코올중독군은 134.1 mg/dl로 55.4% 증가되어 고지혈증상을 나타내었다. AcPS의 투여에 의하여 48.9% (1주 투여) 내지 36.0%(4주간 투여)의 증가로 유의적인 개선효과를 확인할 수 있었으며, 고밀도지질-콜레스테롤의 경우도 알코올중독군에서 나타난 증가치보다는 유의적인 감소효과를 확인할 수 있었다. 반면 저밀도 지질의 경우에는 유의적인 개선효과를 확인할 수 없었다. HDL-cholesterol은 말초조직 및 혈관벽에 축적된 cholesterol을 이화, 제거하여 cholesterol ester를 만들어 간장으로 운반하여 담즙산으로 배설시킴으로서 혈중 cholesterol 농도를 저하시킨다는 보고<sup>10)</sup>와 연관시켜 볼 때 본 실험에서 알코올성 고지혈증 유도시 홍삼산성다당체의 투여로 인하여 혈청 총 cholesterol, LDL-cholesterol 농도의 저하는 HDL-cholesterol농도의 상승에 의한 영향으로

**Table 4.** Effect of acidic polysaccharide from Korean red ginseng (AcPS) on the level of hepatic lipid composition in alcohol-induced hyperlipidemic rats

Treatments <sup>1)</sup>	Total lipid (mg/g of tissue)	Cholesterol (mg/g of tissue)	Triglyceride (mg/g of tissue)
Control	13.4±1.63 <sup>a</sup>	2.28±0.19 <sup>a</sup>	9.00±0.52 <sup>a</sup>
Ethanol	19.3±2.08 <sup>b</sup>	3.49±0.36 <sup>b</sup>	16.86±1.29 <sup>b</sup>
AcPS 1	17.3±1.79 <sup>c</sup>	3.32±0.31 <sup>b</sup>	15.83±1.33 <sup>b,c</sup>
AcPS 2	15.5±2.06 <sup>c,d</sup>	2.92±0.24 <sup>c</sup>	14.88±1.18 <sup>c,d</sup>
AcPS 3	14.3±1.71 <sup>a,d</sup>	2.64±0.28 <sup>c,d</sup>	14.52±1.02 <sup>d,e</sup>
AcPS 4	14.6±1.85 <sup>a,d</sup>	2.58±0.25 <sup>d</sup>	13.71±1.13 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup> Rats were orally administered 25% alcohol (v/v) *ad. lid.* for six weeks and AcPS (50 mg/kg, po) once a day for 1, 2, 3 and 4 week(s) each group and sacrificed 24 hrs after the final treatment of AcPS (1~4). Values are mean±S.D.(n=8) and of which has same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test.

생각된다.

앞의 지질-콜레스테롤에 미치는 효과를 검토한 실험에 이어서 인지질 및 중성지질에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 인지질의 경우는 유의적인 개선효과를 확인할 수 없었으나 중성지질의 양은 알코올 중독군에 비하여 감소되었다. 즉 알코올중독군에서 80.6%의 증가현상을 보였으나 AcPS의 투여로 69.8%(1주 투여) 내지 39.5%(4주간 투여)의 증가에 그쳐 크게 개선되었음을 알 수 있고, 이러한 효과는 투여기간에 비례함도 알 수 있었다.

## 3. 홍삼 산성다당류가 알코올성 고지혈증 흰쥐의 간장 지질에 미치는 영향

혈중 지질성분에 미치는 일련의 실험결과가 간장조직 중에서는 어떠한 현상으로 나타날 지를 검토한 실험의 결과는 Table 4와 같다. 간의 총지질, 총cholesterol 및 중성지질의 양도 정상치에 가깝게 호전시켰다. 즉 에탄올중독에 의해 총지질은 44% 증가(13.4 → 19.3), 총콜레스테롤은 53.1% 증가(2.28 → 3.49) 그리고 중성지질은 87.3% 증가(9.00 → 16.86)하였으나, AcPS의 투여로 총지질은 29.1% (1주 투여) 내지 9.0%(4주간 투여), 총콜레스테롤은 45.6%(1주 투여) 내지 13.2%(4주간 투여) 그리고 중성지질은 75.9%(1주 투여) 내지 52.3%(4주간 투여)의 증가에 그쳐 유의적인 증가억제효과를 나타내

었다. 따라서 혈중농도와 마찬가지로 간장조직중 농도에 미치는 영향도 신뢰성있는 개선효과를 인정할 수 있었으며, 이러한 효과는 산성다당류의 투여기간(1~4주)에 비례하는 것으로 나타났다. 따라서 투여량과 기간을 증가하면 그 효과도 커 질것으로 판단된다.

## 요 약

알코올에 중독된 실험동물에 홍삼 산성다당류(AcPS)를 4주간 투여하며 성장지표를 비교해 본 결과, 알코올 중독시에 나타나는 영양 및 대사의 파괴를 막아주거나 경감시켜 지방간 및 간장비대 상태를 크게 호전시켰다. 혈중 지질대사 요소인 혈중 총콜레스테롤, HDL-cholesterol 및 중성지질의 농도는 정상치에 가깝게 낮추어 고지혈증상을 유의적으로 개선시킴을 확인할 수 있었으며, 혈중농도와 마찬가지로 간장조직중 농도에 미치는 영향도 신뢰성있는 개선효과를 인정할 수 있었으며, 이러한 효과는 AcPS의 투여기간(1~4주)에 비례하는 것으로 나타났다.

## 감사의 말씀

이 연구는 1996년도 한국담배인삼공사의 출연연구 결과이며 이에 감사드린다.

## 인 용 문 헌

1. 이경숙, 이서래 : *Korean J. Food Sci. Technol.*, **25**, 225 (1993).
2. 홍재식, 김명곤, 윤 숙, 유남수 : *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **36**, 73 (1993).
3. 이서래 : 식이성 섬유유의 영양학적 의의, 식품과 영양, **5**, 14 (1984).
4. Southgate, D. A. T., Waldrom, K., Johnson, I. T. and Fenwick, G. R.(Eds) : *Dietary Fiber: Chemical and Biological Aspects*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, England. (1990).
5. 민경찬, 조재선 : *Korean J. Ginseng Sci.*, **8**, 91 (1984).
6. 민경찬, 조재선, 김은수 : *Korean J. Ginseng Sci.*, **8**, 105 (1984).
7. 이정규, 최종원, 김석환, 김혜경, 한용남 : *J. Ginseng. Res.*, **22**, 260 (1998).
8. 한용남, 김선영, 이희주, 황우익, 한병훈 : *Korean J. Ginseng Sci.*, **16**, 105 (1992).
9. Liu, S. J., Ramsey, R. K. and Fallon, H. J. : *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 369 (1975).
10. Richmond, W. : *Clin. Chem.*, **22**, 1579 (1976).
11. Noma, A., Nakayama, K. N., Kota, M. and Okabe, H. : *Clin. Chem.*, **24**, 1504 (1978).
12. Noma, A. Okabe, H., Nakayama, K. N., Ueno, Y. and Shinohara, H. : *Ibid*, **25**, 1480 (1979).
13. Fridewald, W. T., Levy, R. I. and Fedreicson, D. S. : *Clin. Chem.*, **18**, 499 (1979).
14. Chen, P. S., Toribara, T. Y. and Warner H. : *Anal. Chem.* **28**, 1756 (1956).
15. Bucolo, G. and David, H. : *Clin. Chem.*, **19**, 476 (1965).
16. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
17. Ichida, T. : *Hokkaido J. Med. Sci.*, **38**, 67 (1963).
18. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Book Co., New York (1980).
19. Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. W. F. Abbott, R. D., Kalousdian, S. and Kannel, W. B. : *JAMA*, **256**, 2835 (1986).