

## 호두의 혈중 지질 수준 및 혈관 건강 개선 기능성 평가: 메타분석\*

곽진숙<sup>1,2</sup> · 박민영<sup>2</sup> · 권오란<sup>2,3†</sup>

주식회사 바이오푸드씨알오,<sup>1</sup> 이화여자대학교 식품영양학과,<sup>2</sup> 이화여자대학교 바이오푸드네트워크<sup>3</sup>

## The effect of walnut (*Juglans regia* L.) intake on improvement of blood lipid levels and vascular health: A meta-analysis\*

Kwak, Jin Sook<sup>1,2</sup> · Park, Min young<sup>2</sup> · Kwon, Oran<sup>2,3†</sup>

<sup>1</sup>BrofoodCRO Co., Ltd, Seoul 120-160, Korea

<sup>2</sup>Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

<sup>3</sup>Biofood Network Center, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

### ABSTRACT

**Purpose:** Walnut is known to have unique favorable fatty acids, phytochemicals, and other nutrient profiles. As a result, there has been growing interest in evaluation of its health benefit related to cardiovascular disease (CVD). Although inverse associations of nut consumption and risk factors of cardiovascular disease have been reported in many epidemiological studies and qualitative reviews, few meta-analysis studies have been reported. This meta-analysis was conducted in order to evaluate the effect of a walnut-enhanced diet on CVD risk factors. **Methods:** We searched Pubmed, Cochrane, Science Direct, and KISS (Korean studies Information Service System) through July 2014. A random-effects meta-analysis was conducted on 17 trials reporting total cholesterol (TC), 14 trials reporting LDL cholesterol (LDL-C), 15 trials reporting HDL cholesterol (HDL-C), 17 trials reporting triglyceride (TG), and four trials reporting flow-mediated dilation (FMD). **Results:** In meta-analysis, intake of a walnut-enhanced diet resulted in significantly lowered TC, LDL-C, and TG by  $-0.124$  mmol/l (95% CI,  $-0.209$ ,  $-0.039$ ;  $p = 0.004$ ),  $-0.085$  mmol/L (95% CI,  $-0.167$ ,  $-0.004$ ;  $p = 0.039$ ), and  $-0.080$  mmol/l (95% CI,  $-0.155$ ,  $-0.004$ ;  $p = 0.039$ ), respectively. The overall pooled estimate of the effect on FMD was  $+1.313\%$  (95% CI,  $0.744$ ,  $1.882$ ,  $p = 0.000$ ). HDL-C was not affected by walnut intake. No statistical heterogeneity was observed for any analysis. Results of funnel plots and Egger's regression suggested a low likelihood of publication bias in all biomarkers ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** Findings of this meta-analysis provide consistent evidence that walnut-enhanced diet intake reduces the CVD risk factors.

**KEY WORDS:** Meta-analysis, walnut, *Juglans regia*, blood lipid level, flow-mediated dilation.

## 서 론

심혈관계 질환은 지단백 대사 이상, 산화 스트레스, 만성적인 염증 등 복합적인 요인에 의하여 발생하는 질병으로,<sup>1</sup> 특히 우리나라에서는 심장질환이 사망 원인의 2위를 차지하고 있어<sup>2</sup> 이에 대한 적극적인 관리가 필요하다. 심혈관계 질환은 조절할 수 없는 요인인 유전적 요인이 중요한 발병원인으로 알려져 있으나 식생활, 생활 습관 등 조절할 수 있는 인자 (modi-

fiable factors)인 환경적 요인도 큰 영향을 미친다고 보고되고 있어,<sup>3</sup> 심혈관계 질환을 개선시키는 다양한 식이 인자에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.

견과류 (nuts)는 불포화지방산, 비타민 E, 엽산 등 다양한 영양 성분<sup>4</sup>과 시아니딘, 프로안토시아니딘, 미리세틴과 같은 플라보노이드를 포함한 피토케미컬 (phytochemicals)을 다량 함유<sup>4,5</sup> 한 건강 식품으로 알려져 있으며, 다양한 인체 연구에서도 심혈관계 관련 위험 인자들을 개선시키는 것으로 보고되고 있다. 미국에서 수행된 다수의 역학연구들에서는 견과

Received: Jul 20, 2014 / Revised: Aug 13, 2014 / Accepted: Aug 15, 2014

\*This work was supported by the Rural Development Administration in 2014 (PJ008450022014).

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-3277-6860, e-mail: orank@ewha.ac.kr

© 2014 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

류 섭취와 심혈관계 질환간에 역의 상관관계가 보고되었고, 성별, 연령, 대상자와 상관없이 일관적인 결과를 나타냈다.<sup>6,7</sup> 체계적 고찰 연구에 의하면 50~100 g의 견과류를 일주일에 5회 섭취 시 혈중 총 콜레스테롤과 저밀도 콜레스테롤 수준을 개선시켰고,<sup>8</sup> 아몬드 섭취와 관련된 5건의 인체연구에 대한 메타 분석 결과에 의하면 아몬드 하루 25~168 g의 섭취는 혈중 콜레스테롤 수준을 유의하게 개선시키는 것으로 분석되었다.<sup>9</sup>

견과류 중 호두 (walnut)는 미국 식품의약국 (Food and Drug Administration, FDA)로부터 하루 약 45 g을 저 포화지방산, 저 콜레스테롤 식이와 함께 섭취할 경우 열량 섭취 증가 없이 관상 심장 질환의 위험을 낮출 수 있다는 제한적 건강강조표시 (Qualified health claim)를 인정받았고,<sup>10</sup> 유럽 식품안전청 (European Food Safety Authority, EFSA)에서도 호두 30 g 섭취는 혈관의 탄력성 개선에 도움을 준다는 기능성 표시를 인정하고 있다.<sup>11</sup> 또한 호두 섭취와 총 콜레스테롤 수준간의 관계를 13건의 인체 중재 연구로 분석한 2009년도의 메타분석 연구에서도 에너지 섭취량의 10~24% 수준으로 호두를 섭취한 경우 대조군에 비해 총 콜레스테롤 및 저밀도 콜레스테롤 수준을 유의하게 감소시켰음이 확인되었다.<sup>12</sup>

하지만 호두 섭취와 심혈관계 건강 개선간의 상관성 평가는 질적 연구가 주를 이루고 있고 메타 분석 결과는 2009년에 이루어진 단 1건에 불과하다.<sup>12</sup> 2009년도에 실시한 호두의 메타분석 연구에서는 호두의 섭취 형태가 다양한 가공물을 모두 포함하고 있어 일상적인 호두 섭취로 얻을 수 있는 이점에 초점을 맞추고 있지 않고 있다. 미국 식품의약국의 기능성 검토 결과에서도 호두 섭취와 관상 심장 질환 발생 위험 감소와의 관계를 입증하는 과학적 근거가 제한적이라고 결론을 내리고 있어 검토 시점인 2004년 이후에 발표된 연구 결과들을 포함한 검토가 필요하다고 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 호두를 가공하지 않고 섭취한 연구만을 선별하여 연도의 제한을 두지 않고 2014년 7월 현재까지 연구된 인체시험 결과들을 모두 고찰하고 메타 분석 기법을 사용하여 호두의 섭취가 심혈관계 건강에 미치는 요인 중 지질 및 혈관 건강에 미치는 영향을 평가하였다.

## 연구방법

### 문헌수집

문헌검색은 연도의 제한을 두지 않고 2014년 7월 9일 현재까지 출판된 문헌을 대상으로 실시하였다. 국외 문헌 검색은 Pubmed, Cochrane, Science Direct를 이용하였고, 국내 문헌은 KISS (Korean studies Information Service System)를 이용하여 검색하였다. 사용된 검색어는 호두 관련 검색어인

호두, Juglans regia, walnut과 기능성 관련 검색어인 cholesterol, endothelium, vascular, vasodilation, flow-mediated dilation를 조합하여 사용하였다.

이번 체계적 문헌고찰에 포함된 문헌 선정 기준은 다음과 같다: 1) 인체를 대상으로 한 인체연구, 2) 호두 비가공물의 혈중 지질 수준 또는 혈관 건강 개선효과를 평가한 연구, 3) 호두를 경구로 섭취한 연구. 연구 제외기준은 다음과 같다: 1) 시험관시험 및 동물시험, 2) 경구 섭취 연구가 아닌 연구, 3) 섭취량, 섭취기간 등의 시험 관련 정보가 부재한 연구, 4) 호두를 다른 성분과 함께 복합물로 섭취한 연구, 5) 호두를 추출하거나 오일로 제조하여 기능성을 평가한 연구, 6) 초록이나 총설, 7) 한국어, 영어, 일본어 이외의 언어로 게재된 문헌. 자료는 초록 혹은 전문을 보고 선정하였으며, 체계적 문헌 고찰의 경험이 많은 영양학 전문가가 각기 시행하여 Endnote와 Excel에 정리하여 중복된 문헌을 검색하여 제외하였다 (Fig. 1).

### 문헌의 평가 방법

선정된 각각의 개별 연구에 대한 질은 출판된 문헌에 제시된 정보만을 활용하여 평가하였다. 연구의 질 평가 방법은 식품의약품안전처의 기능성평가 질평가 도구,<sup>13</sup> 미국 FDA 평가 가이드라인,<sup>14</sup> 유럽 EFSA 질평가 시스템<sup>15</sup>을 참조하여 인체 중재 연구에 적합하도록 변형된 것을 이용하였다.<sup>16-18</sup> 질 평가를 위한 항목은 시험물질, 표준화 여부, 연구설계, 피험자, 피험자에 대한 기본 정보 제공 여부, 피험자 수 산출 방법의 적절성, 피험자 선정 및 제외 기준에 대한 설명, 시험기간, 섭취량, 섭취 방법, 기초식이 조절, 생활습관의 조절, 탈락률, 통계분석,

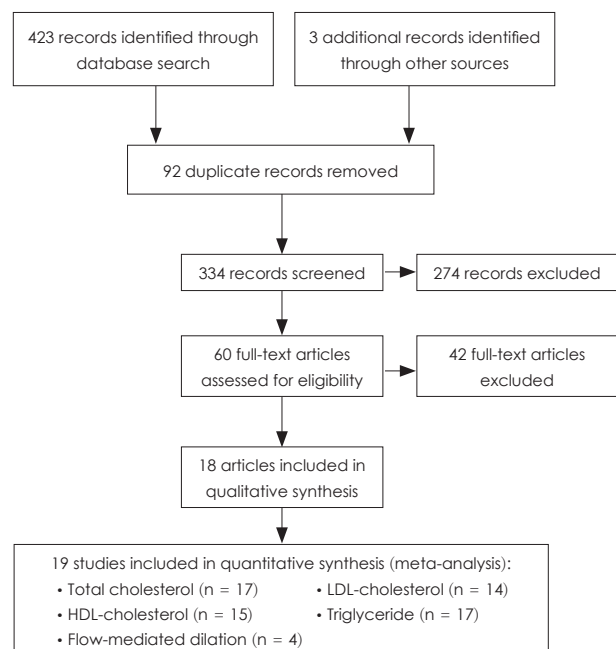


Fig. 1. Flow diagram of included and excluded studies.

결과 해석, 혼동요인 보정 여부 등으로 분류되고 총 27개 문항으로 되어 있으며 각 항목당 질평가 점수는 -1점에서 1점 사이로 산출된다.

### 통계 방법

호두 섭취가 심혈관계 관련 지표에 미치는 전체 효과 크기 (overall effect size) 산출은 코크란 핸드북<sup>19</sup>에서 제시한 방법을 사용하였다. 해당 지표들의 평균 변화량 (mean difference)으로 각 연구의 호두 섭취군과 대조군 사이의 효과 크기를 병합하였고, 호두 섭취군과 대조군에서 실험물질 섭취 전후의 평균 및 표준편차의 변화량을 계산하여 대조군 대비 호두 섭취군의 평균 변화량을 산출하였다. 전체 효과 크기 평가 시 랜덤 효과 모델 (random-effect model)을 적용하였다.

수집된 효과 크기에 대한 연구간 이질성 (heterogeneity)은  $I^2$ 값으로 평가하였고  $I^2$ 값이 25% 미만이면 이질성이 낮고, 75% 초과시 이질성이 높은 것으로 판단하였다.<sup>19</sup> 학술지로 보고되지 않은 연구들에 대한 편향 여부를 판단하기 위하여, 출판편향 (publication bias)은 깔대기 그림 (funnel plot)을 통해 시각적으로 확인하고, Egger's regression을 사용하여 통계적인 유의성을 검정하였다.

메타 회귀 분석 (meta-regression)을 이용하여 호두의 하루 섭취량, 섭취 기간, 연구의 질, 섭취 전 각 지표의 기저 수준과 효과 크기와의 상관 관계를 분석하였다. 하위그룹분석 (sub-group analysis)은 호두의 하루 섭취량 및 섭취 기간, 연구 대상에 대하여 수행하였고, 섭취량, 섭취 기간과 같은 연속 변수는 중앙값을 기준으로 그룹을 구분하였으며, 연구 대상은 모집 기준에 따라 건강인 또는 심혈관계질환 위험인 (당뇨, 고콜레스테롤혈증, 비만)으로 하위 그룹을 나누었다. 민감도 분석 (sensitivity test)을 위하여 한 연구 제외 분석 (one-study omitted analysis) 및 제한 분석 (limited analysis)을 수행하였는데, 제한 분석은 맹검 연구, 양질의 연구, 최신의 연구, 기초 식이를 조절한 연구, 각 지표에 있어 경계치 이상의 위험군 대상 연구만을 포함시켜 분석하였고, 이 중 양질의 연구는 질 평가 점수 (quality score)가 중앙값 이상인 것, 최신의 연구는 가장 최근 메타 분석 결과가 발표된 2009년 이후에 게재된 것, 기초 식이 조절 연구는 지중해식, 저지방 또는 저 콜레스테롤 식이와 같이 심혈관계 개선 식이를 대조군과 시험군에 동일하게 제공하면서 일부 지방 급원 또는 열량을 호두로 대체한 것을 대상으로 하였다.

통계분석은 Comprehensive Meta-analysis 2.2 (Biostat, Englewood, NJ, USA) 프로그램을 사용하여 수행되었고, 각 통계량의 신뢰구간은 95%를 기준으로 제시하고, 통계적 유의 수준은 5%로 정하였다.

## 결 과

### 문헌검색 결과

문헌검색을 통해서 검색된 논문은 총 334건이었다. 호두의 혈중 지질 수준 또는 혈관 건강 개선과 관련이 없는 문헌 275건, 시험관시험이나 동물시험 등의 기반연구 12건, 복합물의 기능성을 확인한 연구 7건, 주요 정보가 제시되지 않은 경우 1건, 초록 등의 2차 문헌 20건, 한국어, 일본어, 영어 이외의 언어로 작성된 문헌 1건의 총 316건의 문헌을 검토에서 제외하였다. 결과적으로 총 18편 (한 개 논문에서 2건의 연구를 수행하여 연구 건수로는 총 19건)의 문헌이 호두 섭취의 심혈관계 건강 개선 기능성 검토에 사용되었다 (Fig. 1).

최종 선별된 19건<sup>20-37</sup>은 모두 무작위배정 대조군 연구 (randomized controlled trial, RCT)로 진행된 중재시험이었고, 이중 14건<sup>20-28,30,34,36,37</sup>이 교차설계, 5건<sup>29,31-33,35</sup>이 평행설계로 수행되었으며, 맹검으로 진행되지 않은 연구는 12건<sup>20,21,23,28-34,36,37</sup>이었다. 연구 대상자는 모집 기준에 따라 건강인을 대상으로 한 연구는 7건,<sup>22-25,34,36</sup> 고콜레스테롤혈증 위험군 (총 콜레스테롤 5.2 mmol/l 이상 또는 저밀도 콜레스테롤 3.36 mmol/l 이상) 대상 연구는 5건,<sup>20,21,28,30,37</sup> 대사증후군 위험군 또는 비만인 대상 연구 4건,<sup>26,29,31,35</sup> 제 2형 당뇨병 대상 연구 3건<sup>27,32,33</sup>으로 분류되었다. 호두는 대부분 식이의 일부를 대체하도록 제공되었고, 특정 종류의 지방 급원이나 열량 섭취량의 20~30% 또는 일정량을 호두로 대체하여 섭취하도록 교육하고 있었다.<sup>20,21,25,27-37</sup> 그 중 일상 식이를 유지하도록 하거나 해당 국가의 일반적인 식이를 섭취하도록 한 연구가 13건,<sup>21-27,29,31,34-36</sup> 지중해식이나 저지방/저콜레스테롤 식이 등 심혈관계 건강에 도움을 되는 식이를 섭취하도록 한 연구가 6건<sup>20,28,30,32,33,37</sup>이었다. 연구의 질은 -6~3점으로 중등도 이상인 것으로 평가되었다 (Table 1).

### 호두 섭취가 심혈관계 위험인자에 미치는 영향

호두 섭취가 총 콜레스테롤 수준에 미치는 영향을 평가한 연구가 17건 (n = 948),<sup>20,22-30,32-37</sup> 저밀도 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤 및 중성지방 개선 효과를 평가한 연구는 각각 14건 (n = 892),<sup>20,22,23,26-30,32-37</sup> 15건 (n = 960),<sup>20,22,23,26-37</sup> 17건 (n = 980)<sup>20,22,24-37</sup>이었다 (Fig. 2). 호두 섭취 시 총 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 및 중성지방 수준이 대조군 대비하여 유의하게 감소하였고, 효과 크기는 각각 -0.124 mmol/l (95% 신뢰구간, -0.209, -0.039; p = 0.004), -0.085 mmol/l (95% 신뢰구간, -0.167, -0.004; p = 0.039), -0.080 mmol/l (95% 신뢰구간, -0.155, -0.004; p = 0.039)이었으며, 이 때의 호두의 하

**Table 1.** Details of randomized controlled trials included in this meta-analysis

Design	Location	Subject	Population size	Dosage (g/day)	Duration (days)	Background diet	Quality score					Researcher
							TC <sup>3)</sup>	LDL-C	HDL-C	TG	FMD	
CO <sup>1)</sup>	New Zealand	HC <sup>2)</sup>	21	78	28	Controlled	-2	-2	-2	-3	-	Chisholm A et al., 1998 <sup>20</sup>
CO	Spain	HC	24	40	Acute	Habitual	-	-	-	-	-2	Cortés B et al., 2006 <sup>21</sup>
SB, CO	UK	Healthy	30	15	28	Habitual	-6	-6	-6	-6	-	Din JN et al., 2011 <sup>22</sup>
CO	USA	Healthy	36	30	28-30	Habitual	-5	-5	-5	-	-	Flitschen PJ et al., 2011 <sup>23</sup>
SB, CO	USA	Healthy	16	90	Acute	Habitual	-4	-	-	-3	-	Haddad EH et al., 2014 <sup>24</sup>
SB, CO	Japan	Healthy	20	44-54	28	Habitual	-2	-	-	-3	-	Iwamoto M et al., 2002-female <sup>25</sup>
SB, CO	Japan	Healthy	20	44-54	28	Habitual	-2	-	-	-3	-	Iwamoto M et al., 2002-male <sup>25</sup>
SB, CO	USA	Obese, MetS	46	56	56	Habitual	0	0	0	0	1	Katz DL et al., 2012 <sup>26</sup>
SB, CO	USA	Type II DM	24	56	56	Habitual	1	1	1	1	2	Ma Y et al., 2010 <sup>27</sup>
CO	USA	HC	49	64	42	Controlled	-1	-1	-1	0	-	Morgan JM et al., 2002 <sup>28</sup>
Parallel	South Africa	MetS	68	63-108	56	Habitual	1	1	1	1	-	Mukuddem-Petersen J et al., 2007 <sup>29</sup>
CO	Spain	HC	21	8-13	28	Controlled	0	0	-1	-1	0	Ros E et al., 2004 <sup>30</sup>
Parallel	South Africa	MetS	68	63-108	56	Habitual	-	-	0	0	-	Schutte AE et al., 2006 <sup>31</sup>
Parallel	Australia	Type II DM	58	30	180	Controlled	-2	-2	-3	-3	-	Tapsell LC et al., 2004 <sup>32</sup>
Parallel	Australia	Type II DM	50	30	365	Controlled	3	3	3	2	-	Tapsell LC et al., 2009 <sup>33</sup>
CO	USA	Healthy	94	28-68	180	Habitual	-2	-3	-3	-2	-	Torabian S et al., 2010 <sup>34</sup>
DB, parallel	China	MetS	283	30	84	Habitual	1	1	1	1	-	Wu H et al., 2010 <sup>35</sup>
CO	German	Healthy	57	43	56	Habitual	-4	-4	-4	-4	-	Wu L et al., 2014 <sup>36</sup>
CO	Spain	HC	55	8-11	42	Controlled	2	2	1	1	-	Zambon D et al., 2000 <sup>37</sup>

1) CO: cross-over, SB: single-blind, DB: double-blind 2) HC: hypercholesterolemia, MetS: metabolic syndrome, DM: diabetes 3) TC: total cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, TG: triglyceride, FMD: flow-mediated dilation

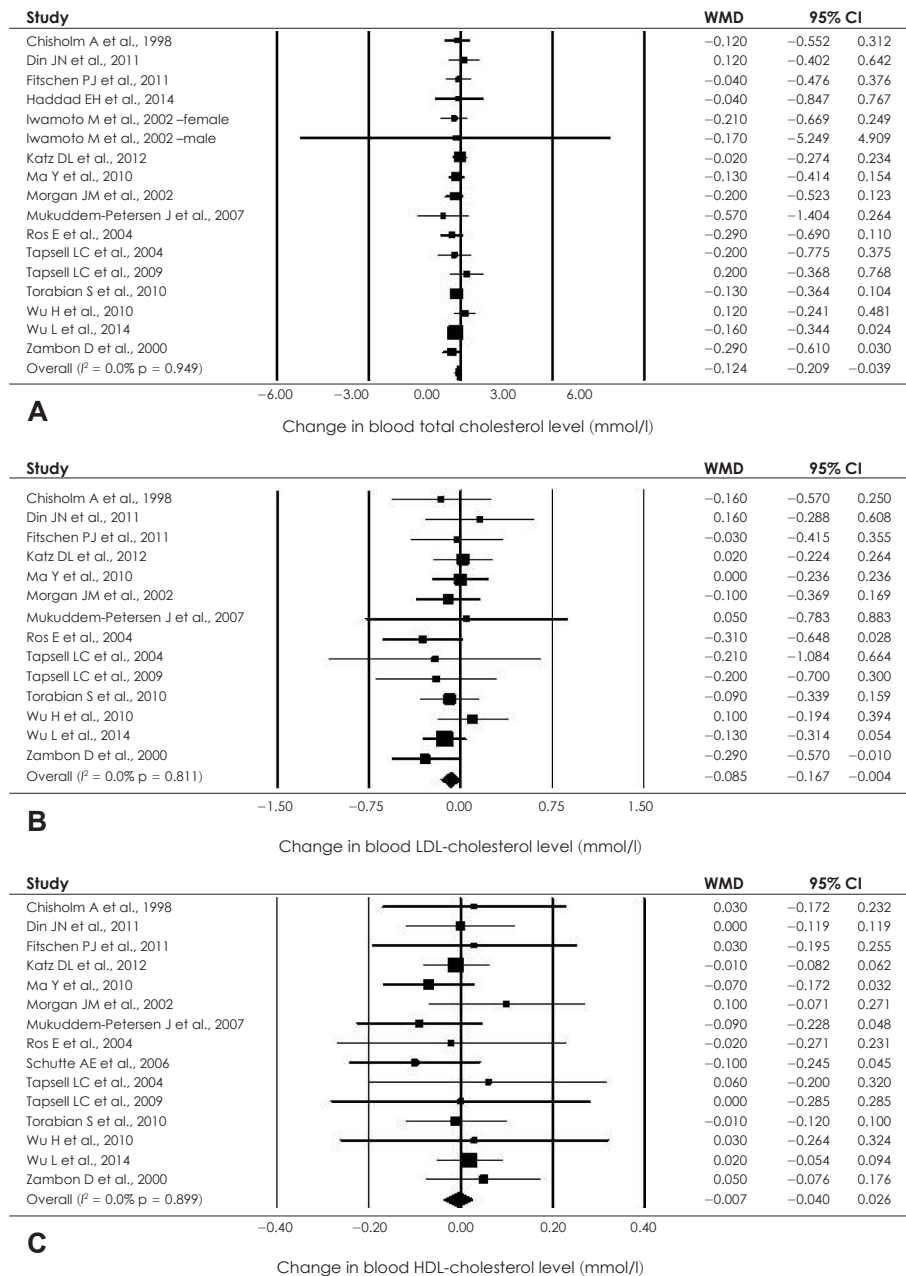
루 섭취량은 8~90 g이었다. 그러나 고밀도 콜레스테롤 수준은 호두 섭취에 따라 유의적 변화를 보이지 않았다 ( $p = 0.680$ ). 연구간 이질성을 평가한 결과, 네 가지 지표에서 모두  $I^2$ 값이 0.0%로 이질성이 낮았다.

혈관 건강을 반영하는 지표 중 혈류 매개 혈관 확장능은 4 건<sup>21,26,27,30</sup> ( $n = 115$ )에서 평가되었고, 메타 분석 결과 호두 섭취군에서 대조군 대비 1.313% (95% 신뢰구간 0.744, 1.882) 수준으로 유의하게 개선되었다 ( $p = 0.000$ ). 효과를 나타낸 호두의 하루 섭취량은 8~56 g이었고,  $I^2$ 값은 3.9%로 연구간 이질성

이 낮았다.

### 메타회귀분석

효과크기에 미치는 요인을 탐색하기 위하여 호두의 하루 섭취량, 섭취 기간, 연구의 질, 섭취 전 각 지표의 기저 수준과 같은 조절 변수 (moderator)와 효과크기에 대한 메타회귀 분석을 수행한 결과, 모든 조절 변수가 각 지표의 효과 크기에 유의한 영향을 미치지 않았다 (data not shown).



**Fig. 2.** Forest plot results of the effect of walnut intake on A: total cholesterol, B: LDL-cholesterol, C: HDL-cholesterol, D: Triglyceride, E: Flow-mediated dilation.



## 민감도 분석

연구 결과에 영향을 미치는 요인 또는 특정 연구가 전체 연

구의 결과에 영향을 미치는지 여부를 탐색하기 위하여 하위

그룹 분석, 제한분석, 한 연구씩 제외한 분석을 실시하였다.

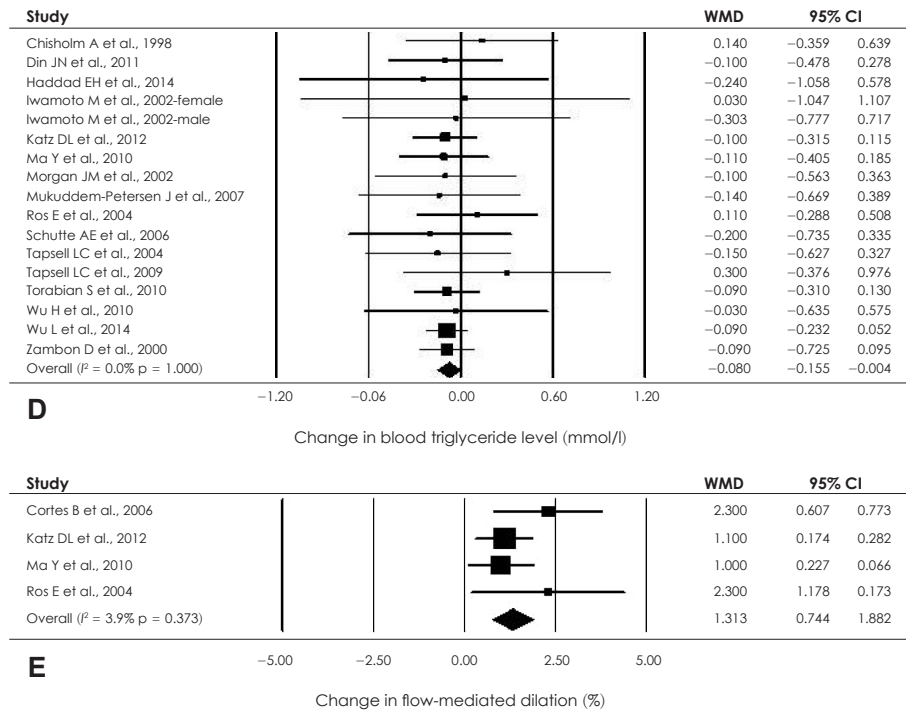


Fig. 2. Continued.

Table 2. Results of subgroup analysis by dosage, duration and, subject

Variables		Dose (g/day)		Duration (day)		Subject	
		< 48	≥ 48	< 42	≥ 42	Healthy	Patient
TC <sup>1)</sup> (mmol/l)	No. of studies	8	9	7	10	7	10
	Sample size	590	358	164	784	273	675
	Effect size	-0.121	-0.127*	-0.124	-0.124*	-0.126*	-0.122*
	95% CI <sup>2)</sup>	-0.241, 0.000	-0.248, -0.006	-0.316, 0.068	-0.219, -0.029	-0.252, -0.001	-0.238, -0.005
	$I^2$ (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LDL-C (mmol/l)	No. of studies	8	6	4	10	4	10
	Sample size	590	302	108	784	217	675
	Effect size	-0.120*	-0.047	-0.116	-0.079	-0.082	-0.087
	95% CI	-0.232, -0.008	-0.165, 0.071	-0.311, 0.078	-0.168, 0.010	-0.214, 0.050	-0.190, 0.015
	$I^2$ (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
HDL-C (mmol/l)	No. of studies	8	7	4	11	4	11
	Sample size	590	370	108	852	217	743
	Effect size	0.021	-0.028	0.008	-0.009	0.010	-0.018
	95% CI	-0.029, 0.072	-0.072, 0.016	-0.080, 0.095	-0.045, 0.026	-0.043, 0.063	-0.060, 0.025
	$I^2$ (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TG (mmol/l)	No. of studies	7	10	6	11	6	11
	Sample size	554	426	128	852	237	743
	Effect size	-0.071	-0.092	0.008	-0.092*	-0.091	-0.070
	95% CI	-0.170, 0.028	-0.208, 0.025	-0.208, 0.224	-0.173, -0.011	-0.202, 0.020	-0.173, 0.033
	$I^2$ (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

1) TC: total cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, TG: triglyceride

2) CI: confidence interval

\*:  $p < 0.05$

**Table 3.** Restriction sensitivity and heterogeneity analysis

Variables <sup>1)</sup>		Blinding	High quality	Recently published	Controlled background diet	Subject with borderline or higher baseline value
TC <sup>1)</sup> (mmol/l)	No. of studies	8	13	9	6	9
	Sample size	488	809	636	254	662
	Effect size	-0.064	-0.128*	-0.076	-0.194*	-0.130*
	95% CI <sup>2)</sup>	-0.199, 0.071	-0.229, -0.026	-0.177, 0.025	-0.358, -0.030	-0.227, -0.034
	I <sup>2</sup> (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LDL-C (mmol/l)	No. of studies	5	10	8	6	6
	Sample size	432	675	620	254	486
	Effect size	0.014	-0.087	-0.037	-0.211*	-0.139*
	95% CI	-0.110, 0.138	-0.19, 0.015	-0.134, 0.059	-0.357, -0.064	-0.249, -0.029
	I <sup>2</sup> (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
HDL-C (mmol/l)	No. of studies	5	10	8	6	12
	Sample size	432	685	620	254	846
	Effect size	-0.012	-0.020	-0.007	0.048	-0.015
	95% CI	-0.062, 0.038	-0.062, 0.023	-0.046, 0.031	-0.03, 0.126	-0.053, 0.023
	I <sup>2</sup> (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TG (mmol/l)	No. of studies	8	10	8	6	10
	Sample size	488	758	600	254	679
	Effect size	-0.098	-0.078	-0.088	-0.036	-0.075
	95% CI	-0.237, 0.041	-0.176, 0.019	-0.180, 0.005	-0.177, 0.104	-0.217, 0.066
	I <sup>2</sup> (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

1) TC: total cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, TG: triglyceride

2) CI: confidence interval

\*: p &lt; 0.05

호두의 하루 섭취량, 섭취 기간, 연구 대상에 대한 하위그룹 분석 결과는 Table 2에 제시하였다. 하위 그룹 중 호두 섭취량, 섭취 기간과 같은 연속 변수는 중앙값을 기준으로 구분하여 각각 48 g 또는 42일 이상인 그룹과 미만인 그룹으로 나누었다. 총 콜레스테롤 수준은 호두를 48 g 이상 섭취한 하위 그룹, 42일 이상 섭취한 하위 그룹에서 각각 -0.127, -0.124 mmol/l로 대조군 대비 유의하게 낮았고 (각 p = 0.039, p = 0.011), 건강인과 심혈관계 질환 위험 요인 (당뇨, 고콜레스테롤혈증, 비만)이 있는 대상자 그룹에서 모두 유의한 효과를 나타냈다 (각 p = 0.048, p = 0.040). 저밀도 콜레스테롤은 호두 섭취량이 하루 48g 미만인 그룹에서 -0.120 mmol/l (p = 0.035), 중성지방은 42일 이상 섭취한 하위 그룹에서 -0.092 mmol/l (p = 0.025)의 효과 크기로 유의한 감소 효과를 나타냈다. 고밀도 콜레스테롤 수준은 전체 연구의 분석 결과와 마찬가지로 모든 하위 그룹에서도 유의적 변화가 없었다.

맹검 연구, 양질의 연구, 2009년 이후에 게재된 최신의 연구, 기초 식이를 조절한 연구, 각 지표에 있어 경제치 이상의 위험군 대상 연구만을 제한하여 분석한 결과는 Table 3에 제시하였다. 총 콜레스테롤 수준은 양질의 연구, 식이를 조절한 연구, 위험군 대상 연구에서 각각 -0.128, -0.194, -0.130 mmol/l으

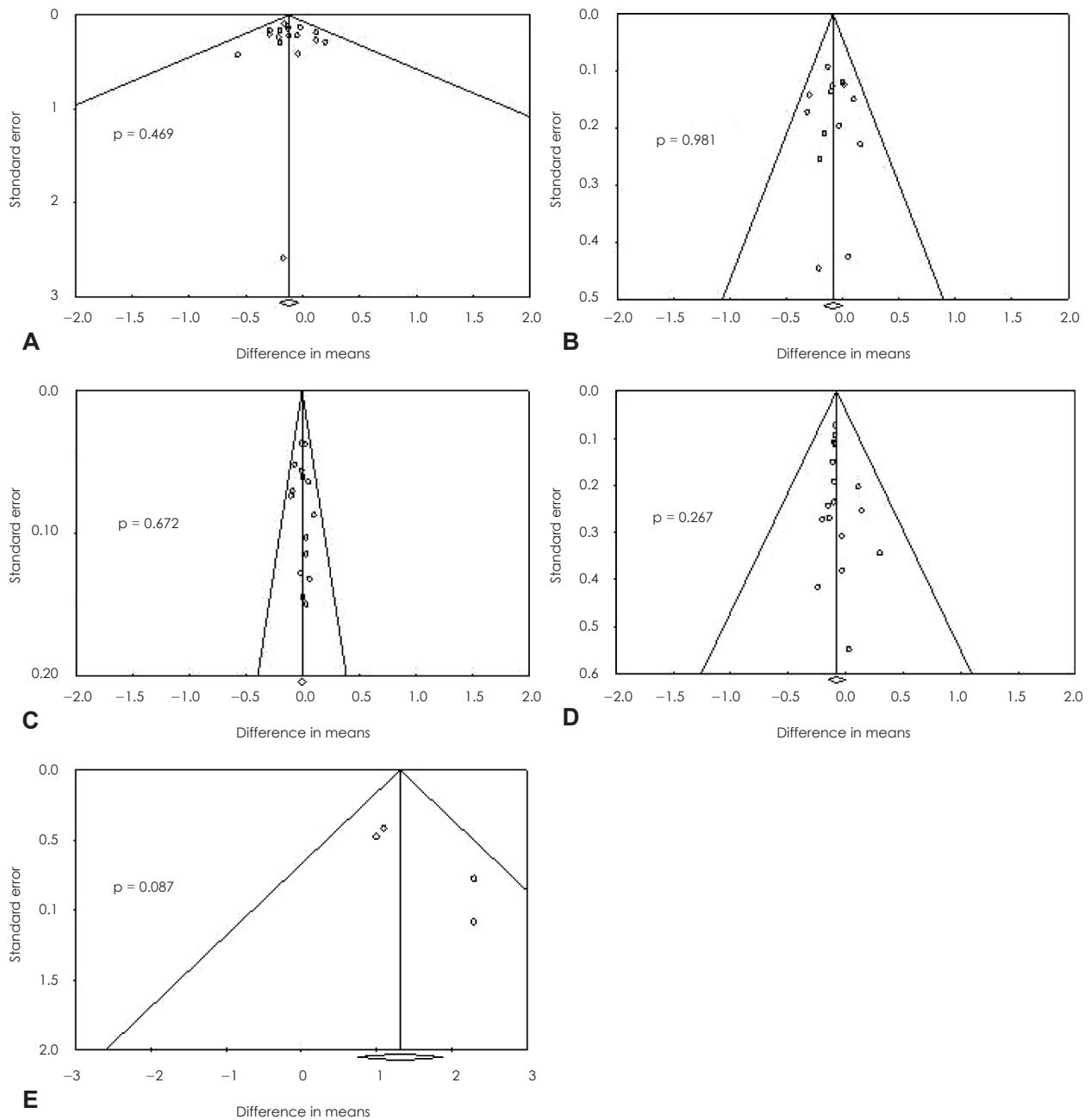
로 유의하게 감소하였고 (각 p = 0.014, p = 0.021, p = 0.008), 저밀도 콜레스테롤 수준은 식이를 조절한 연구, 위험군 대상 연구에서 각각 -0.211, -0.139 mmol/l 수준으로 대조군 대비 유의하게 개선되었다 (각 p = 0.005, p = 0.014). 반면, 중성지방의 경우 전체 대상 분석에서는 유의한 개선을 보인 반면, 모든 제한 분석에서 대조군 대비 유의한 변화를 나타내지 않았다. 또한 고밀도 콜레스테롤 수준은 전체 분석 결과와 마찬가지로 모든 제한 분석 결과에서도 유의적 차이가 없었다.

혈류 매개 혈관 확장능은 분석에 포함된 총 연구수가 4건 이므로 하위 분석 및 제한분석을 수행하지 않았다.

이 밖에 한 건의 연구가 전체적인 연구 결과에 지배적인 영향을 미치는지를 검증하기 위하여 각 연구를 한 건씩 순차적으로 제외하며 메타분석을 수행한 결과, 각 지표에서 모두 전체 연구 분석 결과와 일관된 결과를 보여 어느 한 건의 연구에 의해 결과가 달라지지 않음을 확인하였다 (data not shown).

### 출판편향

혈중 지질 수준을 평가한 연구들은 funnel plot이 전형적인 대칭 형태를 보였고 (Fig. 3) Egger's regression을 통한 검정에서도 유의한 출판편향이 나타나지 않았다 (p > 0.05). 혈류 매



**Fig. 3.** Funnel plot showing the effect of the walnut intake on changes in A: Total cholesterol, B: LDL-cholesterol, C: HDL-cholesterol, D: Triglyceride, E: Flow-mediated dilation.

개 혈관 확장능 연구들은 funnel plot에서 약간의 비대칭을 보였으나 Egger's regression를 통해 편향 정도가 유의하지 않은 것으로 확인되었다 ( $p = 0.087$ ).

## 고 찰

본 연구에서는 19건의 중재 연구를 메타 분석하여 호두의 일상적인 섭취가 혈중 지질 및 혈관 건강에 미치는 영향에 대

한 평가를 수행하였다. 호두의 심혈관계 개선 효과를 평가한 인체 연구는 2000년대 이후 본격적으로 수행되어 왔지만 연구 결과들을 통계 기법으로 통합적으로 평가한 메타 분석 연구는 거의 없었으며, 특히 호두의 혈관 건강에 대한 메타 분석은 전무하였다. 본 연구에서는 최초로 호두를 특별히 가공하지 않고 일상적으로 섭취시킨 연구에 초점을 맞추어 메타 분석 기법을 사용하여 지질 수준 개선 및 혈류 매개 혈관 확장 기능성을 평가하였다.



연구 결과, 호두를 빵이나 샐러드, 간식 등으로 섭취하였을 때 혈중 총 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지방 및 혈류 매개 혈관 확장능이 연구간 이질성 및 출판편향 없이 유의하게 개선되는 것으로 분석되었다. 비록 고밀도 콜레스테롤 수준에는 유의적 개선 효과를 미치지 않았지만 자료를 종합적으로 판단하였을 때 호두의 심혈관계 건강에 대한 개선 효과를 뒷받침할 수 있을 것으로 판단되었다.

이러한 호두의 심혈관계 건강 개선 효과는 함유 성분과 관련이 있는데, 지방산 조성에서 불포화지방산 비율이 높고, 다른 견과류와는 달리 다가불포화지방산, 특히 리놀레산 (linoleic acid), 알파리놀렌산 ( $\alpha$ -linolenic acid)이 특이적으로 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.<sup>38</sup> 다가불포화지방산 섭취는 심혈관계 건강 개선에 도움을 준다는 많은 연구 결과가 보고되고 있는데, 고콜레스테롤혈증을 보이는 사람들을 대상으로 한 무작위배정 대조군 연구에서 에이코사펜타엔산 (eicosapentaenoic acid, EPA)을 하루 1,800 mg씩 5년 동안 섭취하였을 때 주요 심혈관계 관련 증상 발생이 19% 감소하였고,<sup>39</sup> n-3 불포화지방산 섭취는 관상동맥질환, 허혈성 뇌졸중 등 심혈관계 질환의 발생률 및 사망률을 유의하게 감소시키는 것으로 메타 분석에서 보고되었다.<sup>40-42</sup> 이밖에 호두는 혈관 건강에 도움을 주는 아르기닌 (arginine)이 풍부한 단백질 공급원이고, 항산화 물질인 비타민 E와 안토시아닌 등 폴리페놀류가 다량 함유되어 있다.<sup>4</sup>

본 연구의 메타분석 결과에 의하면 호두 섭취는 대조군에 대비하여 총 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지방을 각각  $-0.124$ ,  $-0.085$ ,  $-0.080$  mmol/l 수준으로 유의하게 개선시키고, 고밀도 콜레스테롤에는 영향이 없는 것으로 나타났다. Banel과 Frank<sup>12</sup>가 수행한 메타분석에서 총 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤이 각각  $-0.26$ ,  $-0.239$  mmol/l씩 유의하게 감소하고, 고밀도 콜레스테롤에는 유의적 차이가 없어 본 연구와 일관된 결과가 도출되었으나, 본 연구에서 다소 효과 크기가 감소하였다. 2009년 이후의 최신 연구로만 제한하여 분석하였을 때, 총 콜레스테롤 및 저밀도 콜레스테롤의 유의한 개선 효과가 관찰되지 않아, 본 연구에서 효과 크기가 감소된 결과를 뒷받침하였다. 중성지방의 경우 최신 연구에 대한 제한 분석 결과에서 유의적 개선 효과가 없었음에도 전체 연구 분석 결과에서는 Banel 등의 연구<sup>12</sup>와는 달리 유의한 효과를 보였는데, 이는 호두의 제조공정에 따른 효과 차이에 기인한 것으로 사료된다.

또한 혈류 매개 혈관 확장능을 평가한 연구는 4건으로 제한적이지만, 연구간 이질성을 보이지 않으면서 유의한 개선 효과가 관찰되었다. 혈류 매개 혈관 확장능은 내피 세포의 기능을 비침습적으로 측정할 수 있는 지표로서 심혈관계 질환

발생 위험율과 유의한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있고,<sup>43,44</sup> 혈관 질환의 초기 단계에서 변화하므로 심혈관계 발생 가능성을 예측할 수 있는 의미 있는 지표라 할 수 있겠다. 혈관 이완의 기전 중 산화 질소를 경유하는 경로가 있는데, 산화 질소를 생성시키는 내피의존성 산화질소 합성 효소 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)의 기질로 사용되는 것이 아르기닌이다.<sup>45</sup> 위에서 언급한대로 호두는 아르기닌이 풍부하게 함유된 단백질 공급원으로서 혈관 이완에 기여할 수 있을 것으로 예상된다.

본 메타분석연구로 호두가 심혈관계 위험을 낮출 수 있을 것이라는 긍정적인 효과가 관찰되었음에도 불구하고, 몇 가지 제한점이 있다. 먼저 분석에 포함된 대부분의 문헌이 대상자 수가 60명 이하인 소규모 연구였고, 일부 연구에서 제공된 호두가 껍질 (shell)이 포함되었는지 여부에 대한 정보가 충분하지 않아 실제 섭취량 정보가 정확하지 않았다. 이에 따라 저밀도 콜레스테롤 개선 효과에 대한 하위그룹 분석 결과에서 저용량의 호두를 섭취하였을 때만 통계적으로 유의하게 개선된 결과에 대한 해석이 명확히 이루어질 수 없었다. 또한 혈류 매개 혈관 확장능을 평가한 연구수가 4건으로 결론을 도출하기에 다소 제한적일 수 있다.

현재까지의 연구를 종합하면 하루 1~2알 정도의 일상적인 호두 섭취는 혈관 지질 수준 및 혈관 건강 지표를 유의하게 개선시키는 것으로 분석되었다. 그러나 최근의 연구 결과가 개선 효과에 대한 일관성을 약화시키는 것으로 나타나 향후 연구 추이를 지켜볼 필요가 있다.

## 요 약

호두의 혈중 지질 수준 및 혈관 건강 개선 기능성을 평가하기 위하여 메타 분석을 실시하였다. 2014년 7월 9일 기준으로 DB 검색을 통해 426건의 자료를 수집하여, 선정/제외 기준에 따라 선별한 결과 총 19건 ( $n = 1,040$ )의 연구가 분석에 포함되었다. 호두를 일상 식사에서 일부 지방 공급원 또는 열량을 대체하여 섭취하였을 때, 총 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지방 수준 및 혈류 매개 혈관 확장능을 각각  $-0.124$  mmol/l,  $-0.085$  mmol/l,  $-0.080$  mmol/l,  $+1.313$  % 수준으로 대조군 대비 유의하게 개선시키는 것으로 분석되었다.

## References

1. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352(16): 1685-1695.
2. Statistics Korea. 2012 statistics on causes of death. Daejeon: Sta-

- tistics Korea; 2013.
3. Mozaffarian D, Wilson PW, Kannel WB. Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117(23): 3031-3038.
4. National Academy of Agricultural Science. Food composition table [Internet]. Wanju: National Academy of Agricultural Science; 2006 [cited 2014 Jul 16]. Available from: [http://koreanfood.rda.go.kr/fct/Fct\\_Intro.aspx](http://koreanfood.rda.go.kr/fct/Fct_Intro.aspx).
5. United States Department of Agriculture. USDA national nutrient database for standard reference, Release 26 [Internet]. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture; 2013 [cited 2014 Jul 16]. Available from: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.
6. Sabaté J, Ang Y. Nuts and health outcomes: new epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(5): 1643S-1648S.
7. Li TY, Brennan AM, Wedick NM, Mantzoros C, Rifai N, Hu FB. Regular consumption of nuts is associated with a lower risk of cardiovascular disease in women with type 2 diabetes. *J Nutr* 2009; 139(7): 1333-1338.
8. Mukuddem-Petersen J, Oosthuizen W, Jerling JC. A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans. *J Nutr* 2005; 135(9): 2082-2089.
9. Phung OJ, Makanji SS, White CM, Coleman CI. Almonds have a neutral effect on serum lipid profiles: a meta-analysis of randomized trials. *J Am Diet Assoc* 2009; 109(5): 865-873.
10. Taylor SE. Qualified health claims: letter of enforcement discretion - Walnuts and Coronary Heart Disease (Docket No 02P-0292) [Internet]. Silver Spring (MD): U.S. Food and Drug Administration; 2004 [cited 2014 Jul 16]. Available from: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/LabelingNutrition/ucm072910.htm>.
11. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to walnuts and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1156, 1158) and improvement of endothelium-dependent vasodilation (ID 1155, 1157) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J* 2011; 9(4): 2074.
12. Banel DK, Hu FB. Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: a meta-analysis and systematic review. *Am J Clin Nutr* 2009; 90(1): 56-63.
13. Ministry of Food and Drug Safety. Guidance for the evaluation on the functionality of health functional food. Cheongju: Ministry of Food and Drug Safety; 2008.
14. United States Food and Drug Administration. Guidance for industry: evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims. Silver Spring (MD): United States Food and Drug Administration; 2009 [cited 2014 Jul 16]. Available from: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocuments-RegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm073332.htm>.
15. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of an application for authorisation of a health claim (revision 1). *EFSA J* [Internet]. 2011 [cited 2014 Jul 16]; 9(5): 2170. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2170.htm>.
16. Kim JY, Jeong S, Paek JE, Kim J, Kwak JS, Lee YJ, Kang TS, Kwon O. Systematic review of the effect of coenzyme Q10 on antioxidant capacity while focused on evaluation of claims for health functional food. *J Nutr Health* 2013; 46(3): 218-225.
17. Jeong S, Kim JY, Paek JE, Kim J, Kwak JS, Kwon O. Systematic review of the effect of omega-3 fatty acids on improvement of blood flow while focused on evaluation of claims for health functional food. *J Nutr Health* 2013; 46(3): 226-238.
18. Kim JY, Kwon O. Garlic intake and cancer risk: an analysis using the Food and Drug Administration's evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(1): 257-264.
19. Higgins JP, Green S. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions* version 5.1.0. Oxford: The Cochrane Collaboration; 2011.
20. Chisholm A, Mann J, Skeaff M, Frampton C, Sutherland W, Duncan A, Tiszavari S. A diet rich in walnuts favourably influences plasma fatty acid profile in moderately hyperlipidaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52(1): 12-16.
21. Cortés B, Núñez I, Cofán M, Gilabert R, Pérez-Heras A, Casals E, Deulofeu R, Ros E. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(8): 1666-1671.
22. Din JN, Aftab SM, Jubb AW, Carnegy FH, Lyall K, Sarma J, Newby DE, Flapan AD. Effect of moderate walnut consumption on lipid profile, arterial stiffness and platelet activation in humans. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65(2): 234-239.
23. Fitschen PJ, Rolfhus KR, Winfrey MR, Allen BK, Manzy M, Maher MA. Cardiovascular effects of consumption of black versus English walnuts. *J Med Food* 2011; 14(9): 890-898.
24. Haddad EH, Gaban-Chong N, Oda K, Sabaté J. Effect of a walnut meal on postprandial oxidative stress and antioxidants in healthy individuals. *Nutr J* 2014; 13: 4.
25. Iwamoto M, Imaizumi K, Sato M, Hirooka Y, Sakai K, Takeshita A, Kono M. Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(7): 629-637.
26. Katz DL, Davidhi A, Ma Y, Kavak Y, Bifulco L, Njike VY. Effects of walnuts on endothelial function in overweight adults with visceral obesity: a randomized, controlled, crossover trial. *J Am Coll Nutr* 2012; 31(6): 415-423.
27. Ma Y, Njike VY, Millet J, Dutta S, Doughty K, Treu JA, Katz DL. Effects of walnut consumption on endothelial function in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled crossover trial. *Diabetes Care* 2010; 33(2): 227-232.
28. Morgan JM, Horton K, Reese D, Carey C, Walker K, Capuzzi DM. Effects of walnut consumption as part of a low-fat, low-cholesterol diet on serum cardiovascular risk factors. *Int J Vitam Nutr Res* 2002; 72(5): 341-347.
29. Mukuddem-Petersen J, Stonehouse Oosthuizen W, Jerling JC, Hanekom SM, White Z. Effects of a high walnut and high cashew nut diet on selected markers of the metabolic syndrome: a controlled feeding trial. *Br J Nutr* 2007; 97(6): 1144-1153.
30. Ros E, Núñez I, Pérez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation* 2004; 109(13): 1609-1614.
31. Schutte AE, Van Rooyen JM, Huisman HW, Mukuddem-Petersen J, Oosthuizen W, Hanekom SM, Jerling JC. Modulation of baroreflex sensitivity by walnuts versus cashew nuts in subjects with metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2006; 19(6): 629-636.
32. Tapsell LC, Gillen LJ, Patch CS, Batterham M, Owen A, Baré M, Kennedy M. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(12): 2777-2783.
33. Tapsell LC, Batterham MJ, Teuss G, Tan SY, Dalton S, Quick CJ, Gillen LJ, Charlton KE. Long-term effects of increased dietary polyunsaturated fat from walnuts on metabolic parameters in type II diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63(8): 1008-1015.
34. Torabian S, Haddad E, Cordero-MacIntyre Z, Tanzman J, Fernandez ML, Sabate J. Long-term walnut supplementation without dietary advice induces favorable serum lipid changes in free-living individuals. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64(3): 274-279.

35. Wu H, Pan A, Yu Z, Qi Q, Lu L, Zhang G, Yu D, Zong G, Zhou Y, Chen X, Tang L, Feng Y, Zhou H, Chen X, Li H, Demark-Wahnefried W, Hu FB, Lin X. Lifestyle counseling and supplementation with flaxseed or walnuts influence the management of metabolic syndrome. *J Nutr* 2010; 140(11): 1937-1942.
36. Wu L, Piotrowski K, Rau T, Waldmann E, Broedl UC, Demmel-mair H, Koletzko B, Stark RG, Nagel JM, Mantzoros CS, Parhofer KG. Walnut-enriched diet reduces fasting non-HDL-cholesterol and apolipoprotein B in healthy Caucasian subjects: a randomized controlled cross-over clinical trial. *Metabolism* 2014; 63(3): 382-391.
37. Zambón D, Sabaté J, Muñoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, Laguna JC, Ros E. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial. *Ann Intern Med* 2000; 132(7): 538-546.
38. Feldman EB. The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *J Nutr* 2002; 132(5): 1062S-1101S.
39. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K; Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 2007; 369(9567): 1090-1098.
40. Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, Meier G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 2002; 112(4): 298-304.
41. Whelton SP, He J, Whelton PK, Muntner P. Meta-analysis of observational studies on fish intake and coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2004; 93(9): 1119-1123.
42. Xun P, Qin B, Song Y, Nakamura Y, Kurth T, Yaemsiri S, Djousse L, He K. Fish consumption and risk of stroke and its subtypes: accumulative evidence from a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66(11): 1199-1207.
43. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging* 2010; 26(6): 631-640.
44. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, Zock PL. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cardiol* 2013; 168(1): 344-351.
45. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329(27): 2002-2012.
46. Pongrojapaw D, Somprasit C, Chanthasenanont A. A randomized comparison of ginger and dimenhydrinate in the treatment of nausea and vomiting in pregnancy. *J Med Assoc Thai* 2007; 90(9): 1703-1709.