

[文章编号] 1000-4718(2008)06-1069-05

## 阿托伐他汀对自发性高血压大鼠 心肌组织 PPARs 表达的影响\*

陈红娟, 陈君柱<sup>△</sup>, 王兴祥, 余敏  
(浙江大学医学院第一附属医院心内科, 浙江 杭州 310003)

**[摘要]** 目的: 探讨阿托伐他汀对自发性高血压大鼠心肌组织 PPARs(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)表达的影响及其对心肌肥厚的逆转作用与可能机制。方法: 自发性高血压大鼠分为阿托伐他汀灌胃治疗组(SHR-A, 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)及模型组(SHR), 治疗 8 周, 同周龄 Wistar-Kyoto 鼠为正常血压对照组。治疗前及治疗后 2、4、8 周测量大鼠尾动脉血压。治疗后测血浆血脂水平, 以心脏组织病理分析判断心肌肥厚, Western blotting 检测心肌组织 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  的表达水平。结果: 经过 8 周治疗, SHR-A 组及 SHR 组血压及血脂水平无明显差异( $P > 0.05$ )。SHR-A 组左室重量指数低于 SHR 组( $P < 0.01$ )。在 SHR-A 组, PPAR $\alpha$  及 PPAR $\gamma$  表达高于 SHR 组( $P < 0.01$ )。结论: 阿托伐他汀显著改善自发性高血压大鼠心肌组织 PPARs 表达, 有效逆转左室肥厚, 可能与其降压及降脂作用无关。

**[关键词]** 阿托伐他汀; 肥大, 左心室; 过氧化酶体增殖剂活化受体

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Effects of atorvastatin on myocardium expression of peroxisome proliferator-activated receptors in spontaneously hypertensive rats

CHEN Hong-juan, CHEN Jun-zhu, WANG Xing-xiang, YU Min

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China. E-mail: cch87019@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effects of atorvastatin on myocardium peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) expression, regression of left ventricular hypertrophy, and the possible mechanisms in spontaneously hypertensive rats (SHR). **METHODS:** 16 nine-week-old male spontaneously hypertensive rats were randomly divided into two groups: SHR received atorvastatin at dose of 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> by oral gavage once daily for 8 weeks (SHR-A,  $n = 8$ ), and SHR received vehicle (0.9% saline) as controls (SHR,  $n = 8$ ). Age-matched Wistar-kyoto rats received vehicle for 8 weeks were served as normaltensive controls (WKY,  $n = 8$ ). Systolic blood pressure was measured at the beginning, 2, 4 and 8 weeks of the experiment. At the end of the experiment, plasma lipid levels were measured. Left ventricular hypertrophy was accessed by pathological analysis. The expressions of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  were investigated by the method of Western blotting. **RESULTS:** There was not much difference of systolic blood pressure and plasma lipid levels between SHR-A and SHR group ( $P > 0.05$ ). Compared with SHR group, left ventricular weight mass index decreased significantly in SHR-A group ( $P < 0.01$ ). The myocardium PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  expression increased significantly ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION:** Atorvastatin regresses left ventricular hypertrophy and increases myocardium PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  expression in spontaneously hypertensive rats, which is independent of its lipid-lowering activity.

**[KEY WORDS]** Atorvastatin; Hypertrophy, left ventricular; Peroxisome proliferator-activated receptor

流行病学研究表明高血压左室肥厚是增加心血管病发病率和死亡率显著的预测因素。随着对过氧化物酶体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator

-activated receptors, PPARs)研究的深入, 肥厚心肌发生的能量代谢改变及相应的 PPARs 所起的调节作用也逐渐被揭示。PPARs 是一类由配体激活的核转

[收稿日期] 2006-12-28 [修回日期] 2007-09-17

\* [基金项目] 浙江省科技厅研究基金资助项目(No. 021107613)

△通讯作者 Tel: 0571-86022618; E-mail: cch87019@163.com

录因子,属于核受体超家族成员之一<sup>[1]</sup>。现已分离出3种亚型:PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$ 和PPAR $\gamma$ 。它们调节脂肪酸和糖代谢,对细胞生长、分化、心血管氧化应激和炎症反应都有调控作用<sup>[2]</sup>。目前对自发性高血压大鼠肥厚心肌PPARs表达的研究很有限。他汀类药物是3-羟-3-甲戊二酰辅酶A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)还原酶抑制剂,具有降低总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯及升高高密度脂蛋白胆固醇等作用。他汀类药物的调脂外作用也越来越受到关注,如抗炎作用、稳定动脉粥样硬化斑块、保护血管内皮等。但关于他汀类药物影响自发性高血压大鼠心肌组织PPARs表达的报道有限,本研究拟观察阿托伐他汀长期治疗对自发性高血压大鼠左室肥厚及心肌组织PPARs的影响,并探讨其可能机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物分组

9周龄雄性SHR 16只(体重240-265g),同周龄雄性WKY大鼠8只(体重240-255g),均购自中国科学院上海实验动物中心。SHR随机分为阿托伐他汀治疗组(SHR-A组,辉瑞制药有限公司,30mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)及模型组(SHR组)。灌胃给药,每天1次,连续用药8周。SHR模型组及WKY正常对照组仅灌生理盐水。每周测量体重1次,调整药物剂量,饮食水不限。

### 2 血压测量

以袖带式尾动脉测压法测量各组大鼠尾动脉血压,于治疗前及治疗后2、4、8周各测血压1次,观察血压变化。大鼠尾动脉血压测量采用MedLab(V6.0)生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司)。

### 3 标本留置

治疗结束大鼠称体重后,以苯巴比妥钠(50mg/kg)腹腔内注射,麻醉后经颈动脉抽血6mL,分置于含依地酸抗凝剂试管中,3000r/min离心10min,取血浆-80℃保存。处死大鼠,取出心脏并用冰生理盐水洗净,剪除左右心房、大血管及附着的结缔组织,称重计算左心室重量,以左心室重量指数(左心室重量与体重的比值,LVW/BW)反映心肌肥厚的程度,单位为g·kg<sup>-1</sup>。垂直于心脏左室长轴对称中点上下切取厚度为2-3mm的左室截面,放入10%中性甲醛内,24h后石蜡包埋。其余心底以及心尖部分放入冻存管中-80℃保存。

### 4 大鼠血脂水平的测定

用全自动生化分析仪Hitachi7170测定血脂水

平,包括血浆总胆固醇(Tch)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-ch)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-ch)和甘油三酯(TG)。

### 5 形态学检测

石蜡包埋的心室标本切成5 $\mu$ m的切片行HE染色。观察心肌细胞形态学改变。

### 6 Western印迹法检测大鼠左心室心肌组织PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 蛋白表达

**6.1 心肌组织蛋白的提取** 取心肌标本100mg置玻璃匀浆器中,按100g/L的比例加入裂解缓冲液,其组成为:Tris-HCl 50mmol·L<sup>-1</sup>(pH 8.0), NaCl 150mmol·L<sup>-1</sup>, 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetra-acetic acid, EDTA) 0.5mmol·L<sup>-1</sup>, 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT) 1mmol·L<sup>-1</sup>, NP-40 1%, 脱氧胆酸钠 0.5%, 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 0.1%, 钒酸钠 100 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, PMSF 100mg·L<sup>-1</sup>, 抑肽酶 1mg·L<sup>-1</sup>, 亮肽素 2mg·L<sup>-1</sup>, 冰浴条件下进行组织匀浆,手工研磨10-15min至肉眼看不到组织碎片,置离心管中于4℃低温离心机以12000r/min离心15min,取上清液,用Bradford比色法测定蛋白浓度后分装保存在-80℃低温冰箱备用。

**6.2 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳** 取15 $\mu$ g心肌组织蛋白测PPAR $\alpha$ 表达水平,取50 $\mu$ g心肌组织蛋白测PPAR $\gamma$ 表达水平,加入上样缓冲液煮沸3min变性,经十二烷基硫酸钠/聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,然后电转移至PVDF膜上,封闭后与I抗(小鼠抗大鼠PPAR $\alpha$ 单克隆抗体,ABR公司,稀释浓度为1:4000;兔抗大鼠PPAR $\gamma$ 多克隆抗体,BioVision公司,稀释浓度为1:1000)4℃孵育过夜,与1:5000稀释的II抗室温孵育1h,再与ECL(enhanced chemiluminescent, Beit Haemek公司)温浴1min后曝光、显影和定影,最后对结果进行光密度扫描分析,设GADPH为内对照,同一胶上被测蛋白与内对照所测灰度值的比值(相对灰度值)代表蛋白的相对表达量。

### 7 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用SPSS11.5统计软件,多组间比较采用ANOVA和LSD分析,治疗前后比较采用配对t检验。

## 结 果

### 1 阿托伐他汀对血压的影响

在治疗开始,SHR-A及SHR组血压均高于

WKY 组( $P < 0.01$ )。SHR 组血压随周龄增加,不断升高,治疗 8 周时血压高于基础血压( $P < 0.05$ )。治疗 8 周时,SHR - A 组血压呈下降趋势,略低于 SHR

组血压,但仍显著高于基础血压( $P < 0.05$ )。WKY 组血压在治疗过程无明显改变,见表 1。

表 1 阿托伐他汀对自发性高血压大鼠血压的影响

Tab 1 Changes of systolic blood pressure in rats treated with atorvastatin ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

Group	Baseline (mmHg)	2 weeks (mmHg)	4 weeks (mmHg)	8 weeks (mmHg)
WKY	131 ± 11	133 ± 10	134 ± 12	137 ± 10
SHR	172 ± 9 <sup>**</sup>	180 ± 8 <sup>**</sup>	186 ± 12 <sup>**</sup>	195 ± 17 <sup>**#</sup>
SHR - A	177 ± 8 <sup>**</sup>	182 ± 9 <sup>**</sup>	191 ± 12 <sup>**#</sup>	191 ± 9 <sup>**#</sup>

<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs WKY group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$  vs baseline measurement in the same group. WKY: Wistar Kyoto rats; SHR: spontaneously hypertensive rats; SHR - A: SHR treated with atorvastatin ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

### 2 左室重量指数及血脂水平测定

治疗结束时,SHR 组左室重量指数(LVW/BW)高于 WKY 组( $P < 0.01$ )。在阿托伐他汀治疗后,SHR - A 组 LVW/BW 低于 SHR 组( $P < 0.01$ )。SHR - A 及 SHR 组血浆胆固醇水平、高密度脂蛋白水平

低于 WKY 组( $P < 0.01$ ),血浆甘油三酯及低密度脂蛋白水平与 WKY 组无明显差异。在阿托伐他汀治疗前后,SHR 组与 SHR - A 组血脂水平无明显差异( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 阿托伐他汀对左室重量指数及血脂水平的影响

Tab 2 Influence of atorvastatin on LVW/BW and plasma lipid levels ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

Group	LVW/BW (mg/g)	Tch (mmol/L)	HDL - ch (mmol/L)	LDL - ch (mmol/L)	TG (mmol/L)
WKY	2.63 ± 0.28	1.79 ± 0.17	1.16 ± 0.09	0.18 ± 0.02	0.58 ± 0.23
SHR	3.58 ± 0.48 <sup>**</sup>	1.29 ± 0.24 <sup>**</sup>	0.67 ± 0.05 <sup>**</sup>	0.16 ± 0.03	0.82 ± 0.44
SHR - A	2.77 ± 0.16 <sup>**#</sup>	1.16 ± 0.12 <sup>**</sup>	0.70 ± 0.08 <sup>**</sup>	0.11 ± 0.03	0.62 ± 0.25

<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs WKY group; <sup>#</sup>  $P < 0.01$  vs SHR group. LVW/BW: left ventricular weight/body weight; Tch: plasma total cholesterol; HDL - ch: plasma high - density lipoprotein cholesterol; LDL - ch: plasma low - density lipoprotein cholesterol; TG: plasma Triglyceride. WKY: Wistar Kyoto rats; SHR: spontaneously hypertensive rats; SHR - A: SHR treated with atorvastatin ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

### 3 心肌病理形态学改变

心肌组织 HE 染色可见,与 WKY 组相比,SHR 组大鼠心肌细胞明显肥大。经过长期阿托伐他汀治疗,SHR - A 组无心肌细胞肥大,心肌细胞排列规则,与 WKY 组相仿,见图 1。

### 4 心肌组织 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 蛋白表达

SHR 组左室心肌组织 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  表达下调,与 WKY 组有显著差异( $P < 0.01$ )。阿托伐他汀治疗后,SHR - A 组心肌组织 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  表达上调,与 SHR 组比较有显著差异( $P < 0.01$ ),见图 2。

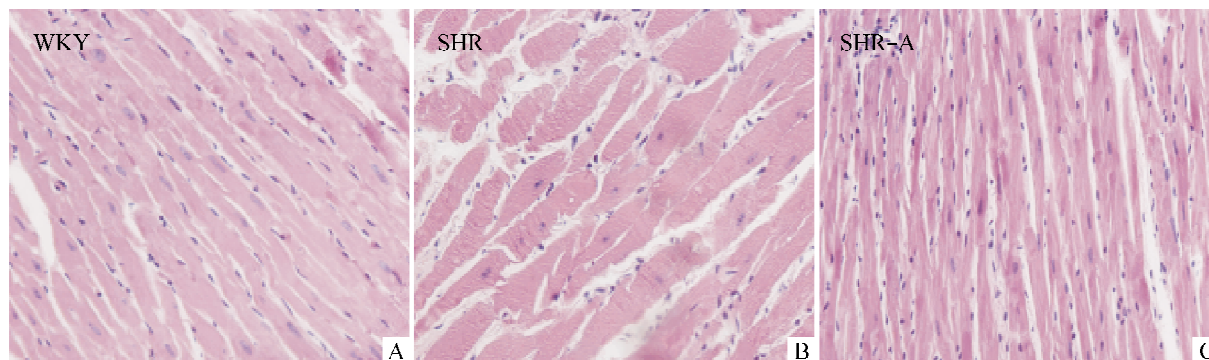


Fig 1 Hispathology changes of left ventricular myocardium in different groups (HE staining,  $\times 200$ ). WKY: Wistar Kyoto rats; SHR: spontaneously hypertensive rats; SHR - A: SHR treated with atorvastatin ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

图 1 心肌组织病理形态学改变

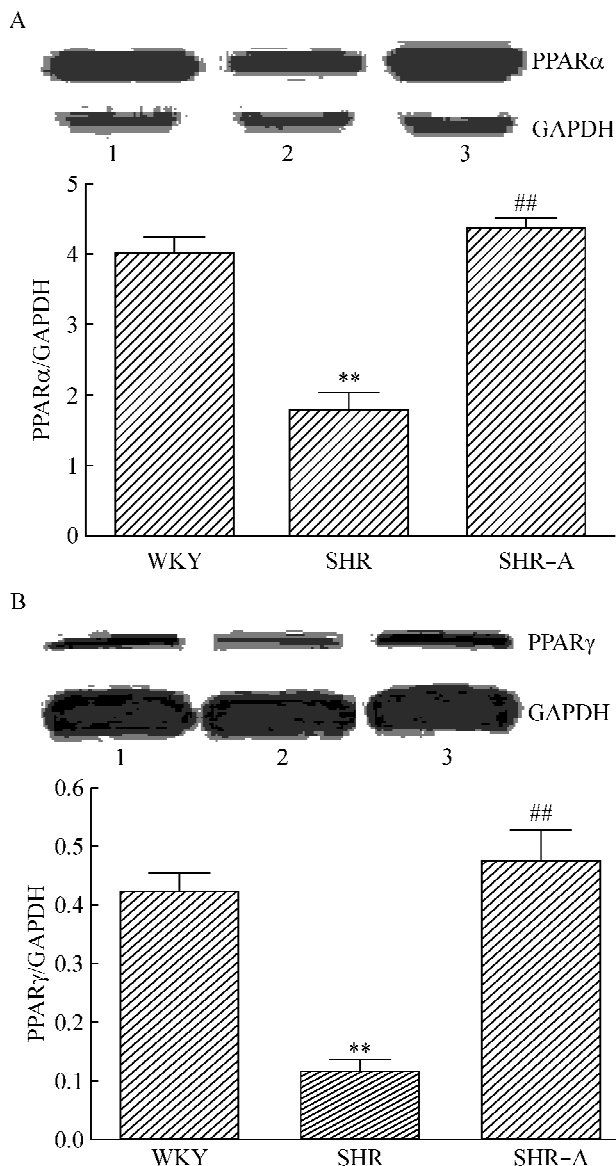


Fig 2 Representative immunoblotting of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  in samples from (1) WKY, (2) SHR, and (3) SHR - A groups. \*\*  $P < 0.01$  vs WKY group; ##  $P < 0.01$  vs SHR group. A: Western blotting and densitometric quantification of immunoblotting band intensities for PPAR $\alpha$ ; B: Western blotting and densitometric quantification of immunoblotting band intensities for PPAR $\gamma$ . WKY: Wistar Kyoto rats; SHR: spontaneously hypertensive rats; SHR - A: SHR treated with atorvastatin ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

图2 阿托伐他汀对心肌组织 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  表达的影响

### 讨 论

心肌肥厚往往合并能量代谢的改变,近年来这一领域的研究也在不断深入。在正常成人心脏,ATP的产生量是由调控细胞脂肪酸利用及葡萄糖氧化基因之间的协调来实现的。在肥厚心肌,常伴随脂肪酸氧化能力的降低,以及向葡萄糖代谢的转移,类似

胚胎期的能量代谢形式<sup>[3]</sup>,PPARs 在转录水平调控这一途径基因的表达。

在本研究中,自发性高血压大鼠存在左室肥厚。肥厚心肌中存在 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  表达的下调。经过阿托伐他汀长期治疗后,SHR - A 组大鼠左室肥厚得到逆转,SHR - A 组心肌组织 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  表达上调。本研究提示在心肌肥厚的发展过程中,PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  蛋白表达的减低可能参与了能量代谢中减低 PPARs 目的基因表达的过程,使脂肪酸代谢中 PPARs 目的基因表达减少。阿托伐他汀治疗对该途径有抑制作用,其改善了心肌组织 PPARs 的表达,阻止了心肌肥厚的发展。

研究表明,PPARs 都参与了心肌肥厚的发展过程。在生理情况下糖和脂肪的代谢中,PPAR $\alpha$  和 PPAR $\beta/\delta$  在心肌肥厚的发展中都有保护作用<sup>[4,5]</sup>。压力负荷引起的心肌肥厚病人,心肌细胞胞浆及细胞核 PPAR $\alpha$  蛋白的水平下降。同时肥厚心肌中存在代谢异常,如脂肪酸氧化的下调及伴随的葡萄糖利用的增加。缺乏 PPAR $\alpha$  鼠对心脏长链脂肪酸的  $\beta$  氧化能力减弱,对炎性刺激和年龄相关的心肌纤维化有持续反应<sup>[6]</sup>。最近一项关于基因的研究揭示 PPAR $\alpha$  基因多态性与人类生理及病理性心肌肥厚之间存在联系<sup>[7]</sup>。虽然 PPAR $\gamma$  在心脏的表达远远低于 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\beta/\delta$ ,但研究结果表明,在肥厚反应及阻止心肌肥厚发展中涉及了 PPAR $\gamma$  途径,与致心肌肥厚信号途径有相反的作用,PPAR $\gamma$  拮抗 NF -  $\kappa$ B、活化蛋白(activated protein - 1, AP - 1)、STAT3 及 GATA4 等转录因子的活性从而抑制心肌肥厚的发展<sup>[8]</sup>。

羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂(HMG - CoA reductase inhibitors,简称他汀类药物)是临床常用的降血脂药物,近年发现除可有效降低血脂外,还可抑制病理性心肌肥厚,改善心室重塑<sup>[9]</sup>。有研究表明他汀类药物能够抑制羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMG - CoA reductase)的活性,减少异戊二烯类化合物的生成,抑制小 G 蛋白 Rho 的信号转导,上调 PPAR $\alpha$  的表达,增加脂肪酸  $\beta$  氧化,改善心肌细胞能量代谢,从而抑制心肌肥厚<sup>[10]</sup>。近十多年来 PPARs 在调控代谢和治疗方面所起的广泛作用已经成为药物开发和基因研究领域的焦点<sup>[11,12]</sup>。临床上,PPAR $\gamma$  配体显示出改善胰岛素抵抗及高甘油三酯血症的有效性;而 PPAR $\alpha$  激动剂也有显著的治疗血脂异常、抗动脉粥样硬化及降低心血管疾病危险

性的作用<sup>[13,14]</sup>。进一步的研究将更深入阐述调控 PPARs 在生理学、药理学及遗传学方面的益处及不良反应<sup>[15]</sup>。我们的研究发现阿托伐他汀能上调心肌组织 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  表达,这一作用可能是阿托伐他汀改善心肌肥厚的机制之一,也提示他汀类药物可能存在更多调脂以外的作用。

在本研究中,我们证实了阿托伐他汀能够抑制自发性高血压大鼠心肌肥厚的形成,且独立于降血压与调脂作用之外。虽然文献报道长期应用他汀有降压及改善血脂作用,但本研究未出现显著的降压及改善血脂的效果,考虑与本研究观察期较短及 SHR 大鼠血脂水平相对较低有关。除了传统的血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素 II 受体 1 拮抗剂、 $\beta$ -受体阻滞剂、Ca<sup>2+</sup>拮抗剂等,本研究表明他汀类药物通过改善心肌组织 PPARs 的表达,从而改善心肌能量代谢,显著抑制自发性高血压大鼠心肌肥厚的发展,在高血压心肌肥厚的治疗上又提出了新的理论依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] Berger J, Wagner JA. Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferators - activated receptors [J]. *Diabetes Technol Ther*, 2002, 4(2):163 - 174.
- [2] Gilde AJ, Van Der Lee KA, Willemsen PH, et al. PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$ , but not PPAR $\gamma$  modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism [J]. *Circ Res*, 2003, 92(5):518 - 524.
- [3] Goffart S, Von Kleist - Retzow JC, Wiesner RJ. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power - plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64(2):198 - 207.
- [4] Barger PM, Brandt JM, Leone TC, et al. Deactivation of peroxisome proliferators - activated receptor - alpha during cardiac hypertrophic growth [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(12):1723 - 1730.
- [5] Takano H, Hasegawa H, Nagai T, et al. The role of PPAR gamma - dependent pathway in the development of cardiac hypertrophy [J]. *Drugs Today (Bare)*, 2003, 39(5):347 - 357.
- [6] Watanabe K, Fujii H, Takahashi T, et al. Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator - activated receptor  $\alpha$  associated with age - dependent cardiac toxicity [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(29):22293 - 22299.
- [7] Jamshidi Y, Montgomery HE, Hense HW, et al. Peroxisome proliferators - activated receptor  $\alpha$  gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension [J]. *Circulation*, 2002, 105(12):950 - 955.
- [8] Asakawa M, Takano H, Nagai T, et al. Peroxisome proliferators - activated receptor  $\gamma$  plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy *in vitro* and *in vivo* [J]. *Circulation*, 2002, 105(10):1240 - 1246.
- [9] Hasegawa H, Yamamoto R, Takano H, et al. 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors prevent the development of cardiac hypertrophy and heart failure in rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(8):953 - 960.
- [10] Martin G, Duez H, Blanquart C, et al. Statin - induced inhibition of the Rho - signaling pathway activates PPAR $\alpha$  and induces HDL apoA - I [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(11):1423 - 1432.
- [11] Lee CH, Olson P, Hevener A, et al. PPAR $\delta$  regulates glucose metabolism and insulin sensitivity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(9):3444 - 3449.
- [12] Andrulionyte L, Kuulasmaa T, Chiasson JL, et al. STOPNIDDM Study group: SNPs of the PPAR $\alpha$  gene influence the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP - NIDDM trial [J]. *Diabetes*, 2007, 56(4):1181 - 1186.
- [13] Kuusisto J, Andrulionyte L, Laakso M. Atherosclerosis and cardiovascular risk reduction with PPAR agonists [J]. *Current Atherosclerosis Reports*, 2007, 9(4):274 - 280.
- [14] Keech A, Simes RJ, Barter P, et al. Effects of long - term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomized controlled trial [J]. *Lancet*, 2005, 366(9500):1849 - 1861.
- [15] 胡 琴, 张 运, 张 宪 军, 等. PPAR $\gamma$  在不同周龄 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉斑块表达及在斑块成份的相互关系 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(12):2289 - 2295.