

芍药苷干预阿尔茨海默病作用机制研究进展

邢敏¹, 毛敬洁^{1,2*}, 陈文列^{1,2}, 林炜^{1,2}, 王静楠³

1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122

2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122

3. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

摘要: 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是造成老龄人口认知能力减退的主要疾病之一。芍药苷是毛茛科 (Ranunculaceae) 植物芍药 *Paeonia lactiflora* 或牡丹 *Paeonia suffruticosa* 根皮中提取出的水溶性单萜苷, 具有改善认知能力、镇静、抗炎、镇痛、解痉等作用, 可以有效调节 AD 动物及细胞模型异常磷酸化的 Tau 蛋白和过度沉积的 β -淀粉样蛋白 (A β) 水平, 恢复乙酰胆碱、神经生长因子、Ca²⁺、 α 7 烟碱样乙酰胆碱受体和腺苷受体等神经递质及神经受体的平衡状态, 降低组织炎症反应和氧化应激反应并减少细胞凋亡的发生。对近 10 年来国内外有关芍药苷干预 AD 的研究进展进行综述, 为探索中药防治 AD 研究提供理论依据。

关键词: 阿尔茨海默病; 芍药苷; 中药单体; β -淀粉样蛋白; Tau 蛋白

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)04-1022-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.034

Progress in interventional mechanism of paeoniflorin on Alzheimer's disease

XING Min¹, MAO Jing-jie^{1,2}, CHEN Wen-lie^{1,2}, LIN Wei^{1,2}, WANG Jing-nan³

1. Academy of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, China

3. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is one of the main pathogenics of the cognitive decline in aging population. Paeoniflorin is a water-soluble monoterpene isolated from the roots of *Paeonia lactiflora* or *P. suffruticosa*, which are both in the family Ranunculaceae. Paeoniflorin has the effect of improving the cognitive ability, sedative, anti-inflammatory, analgesic, and spasmolytic activities. It could also regulate hyperphosphorylation of Tau and A β proteins; Paeoniflorin can restore the balance of neurotransmitter and neurotransmitter receptors including acetylcholine, nerve growth factor, calcium ion, α 7 nicotinic acetylcholine receptor and adenosine receptors, and reduce inflammation, oxidative stress and neuron apoptosis in AD animal and cell models. This paper reviewed relevant research in the past decade about the effect of paeoniflorin on AD, which may provide theoretical basis to use agent from Chinese medicine for AD prevention and treatment.

Key words: Alzheimer's disease; paeoniflorin; Chinese materia medica monomer; amyloid β -protein; Tau protein

随着人口老龄化进程的推进, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 已经成为当今世界亟需解决的重大难题。AD 是一种常见于老年期的中枢神经系统渐进性退行性疾病, 在 65~74 岁老年人中的发病率为 3%, 在 75~84 岁老年人中的发病率为

17%, 而在 85 岁以上老年人中的发病率高达 32%^[1]。AD 的病因与导致神经退化的因素密切相关, 但病因和病程尚未明确, 目前仍缺乏有效预防和治疗的药物及方法^[2-3]。

芍药苷 (paeoniflorin) 是毛茛科 (Ranunculaceae)

收稿日期: 2018-12-10

基金项目: 福建省科技厅自然科学基金项目 (2017J01847)

作者简介: 邢敏 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治阿尔茨海默病。E-mail: yiyaaaha@163.com

*通信作者 毛敬洁, 硕士生导师, 副研究员, 主要从事中西医结合防治阿尔茨海默病研究。

Tel: (0591)22861255 E-mail: maojingjie@fjtc.edu.cn

植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的根皮中提取出的水溶性单萜苷, 其在芍药属植物根中的质量分数为 1.40%~7.78%^[4]。芍药苷具有改善认知能力、镇静、抗炎、镇痛、解痉等作用, 广泛应用于神经系统疾病及神经退行性疾病如老年痴呆、脑卒中、抑郁、癫痫等的临床治疗和基础研究^[5]。以芍药或牡丹皮为主要组分的方剂如当归芍药散、小续命汤、补肾益智方等可以有效改善 AD 患者和动物模型的学习记忆能力及特征性病理变化^[6-8]。本文对近 10 年来国内外有关芍药苷干预 AD 作用机制的研究进展进行综述, 为芍药苷防治 AD 提供理论依据。

1 调节蛋白质

1.1 抑制 Tau 蛋白的异常磷酸化

Tau 蛋白主要分布于神经元轴突, 可促进微管蛋白聚合形成微管, 并维持微管结构的稳定。在 AD 患者脑组织中, 神经元胞内 Tau 蛋白会发生异常磷酸化, 其聚集后会诱导 AD 的主要病变之一即神经纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT) 的形成^[9]。芍药苷可以通过降低胞内 Ca^{2+} 的含量, 抑制钙蛋白酶的活化, 进而拮抗钙蛋白酶/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 信号通路, 最终减少冈田酸诱导的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中过度磷酸化的 Tau 蛋白; 还可以通过提高微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein-2, MAP-2)、 β III-微管蛋白和正常的 Tau 蛋白的量维持 SH-SY5Y 细胞微管结构的稳定^[10]。

过度磷酸化的 Tau 蛋白的成因之一即细胞自噬的失调^[11]。芍药苷可以通过减少磷酸化的 GSK-3 β , 使异常磷酸化 Tau 蛋白含量下降, 降低自噬相关蛋白 LC3 II 的表达, 进而对冈田酸诱导的 SH-SY5Y 细胞中的自噬活动发挥明显的抑制作用^[10]。

1.2 减少 β -淀粉样蛋白 (A β) 的过度沉积

异常折叠的 A β 多肽在神经细胞外堆积可形成 AD 患者大脑中另一个主要病变即老年斑 (senile plaque, SP)^[2]。芍药苷可通过抑制有毒性的 A β 多肽生成, 降低 APP/PS1 小鼠海马区及皮质区 A β 斑块面积^[12-13]。在 AD 啮齿类动物脑组织中金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 的量增加, 可能是因为它参与了 A β 的生成过程, 具体作用机制仍有待进一步的研究^[3]。芍药苷可降低 A β ₁₋₄₂ 诱导的 SD 大鼠海马区 MMP-9 的表达, 并提高其内源

性清除剂底蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue-inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP1) 的表达水平^[14]。

A β 寡聚物可被热休克蛋白-16.2 (heat shock protein-16.2, hsp-16.2) 降解, 芍药苷可通过增加 A β ₁₋₄₂ 诱导的秀丽线虫 AD 模型中 hsp-16.2 的表达, 显著延缓毒性 A β 寡聚物引起的线虫瘫痪^[15]。

2 调节神经递质

2.1 提高神经递质含量

2.1.1 调节乙酰胆碱相关酶类 在胆碱能系统中, 胆碱乙酰转移酶 (acetylcholine acetyl transferase, ChAT) 和乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 分别参与乙酰胆碱合成与水解过程。研究发现 AD 患者脑中残存的胆碱能神经元 ChAT 转运显著下降, 导致乙酰胆碱活性下降和痴呆症状加重, 而 AChE 的增多则促进了淀粉样斑块和淀粉原纤维形成^[16]。芍药苷可以提高 A β ₁₋₄₂ 诱导的 AD 大鼠海马区 ChAT 活性, 并降低 AChE 活性, 使胆碱能系统恢复正常生理功能^[14]。

2.1.2 调节神经生长因子的平衡状态 在 AD 患者大脑皮层或海马区, 异常沉积的 A β 使神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 结合位点即酪氨酸激酶 A (tyrosine kinase A, TrkA) 受体的表达水平降低, 同时, 因 NGF 可被病理性增加的 MMP-9 迅速降解, 而使 NGF 的含量在 AD 患者脑组织中呈现出一种假性的平衡状态^[17-18]。芍药苷可提高 A β ₁₋₄₂ 诱导的 AD 大鼠海马区 TrkA 受体的表达, 降低 MMP-9 的活性, 恢复神经生长因子的代谢与作用途径, 从而对胆碱能神经元发挥正常的保护作用^[14]。

2.1.3 降低胞内 Ca^{2+} 超载 家族性 AD 最主要的病因是早老素蛋白基因 (presenilin, PS) 突变, 这种突变会导致 Ca^{2+} 内流过多和细胞内 Ca^{2+} 释放通道活性增加, 进而引起细胞内 Ca^{2+} 超载, 导致 AD 的典型病变包括线粒体功能紊乱、突触缺失、细胞凋亡等的发生^[19]。芍药苷可降低 A β ₁₋₄₂ 和 A β ₁₋₄₀ 诱导的 AD 大鼠海马区和肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞中 Ca^{2+} 含量, 减少因 Ca^{2+} 超载造成的细胞活性下降^[20-21]。

2.2 调节神经递质相关受体

2.2.1 增加 α 7 烟碱样乙酰胆碱受体 α 7 烟碱样乙酰胆碱受体 (α 7 nicotinic acetylcholine receptor, α 7 nAChR) 对突触形成、生长和可塑性有重要作用, 是学习记忆能力的结构基础之一, 与神经退行性疾

病如 AD 的发病密切相关^[22]。芍药苷可以减少或抑制 $A\beta_{1-40}$ 引起的 PC12 细胞中 $\alpha 7$ nAChR 的破坏或阻滞^[20]。

2.2.2 缓解腺苷受体的失衡 位于脑组织神经元突触上的腺苷 A1 和 A2a 受体控制着包括谷氨酸和乙酰胆碱等参与学习和认知过程的神经递质的释放, 调节这 2 种受体可减缓神经退化和认知缺陷病程的进展^[23]。芍药苷可以激动 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SAMP 小鼠大脑皮层和海马中的 A1 受体、拮抗 A2a 受体, 缓解因腺苷受体失衡导致的 A1 受体介导的抑制作用减弱和 A2a 受体介导的兴奋作用的增强^[24]。

3 保护神经元

3.1 抑制炎症反应

在 AD 中, 中枢神经系统具有免疫功能的小胶质细胞和星形胶质细胞会过度活化, 并向淀粉样斑块周围聚集, 引起炎症反应^[25]。芍药苷可显著减少家族性 AD 模型 APP/PS1 转基因小鼠皮质和海马区中异常活化的胶质细胞数量^[26]。

在 APP/PS1 转基因小鼠、PS2 转基因小鼠脑组织和 $A\beta_{1-42}$ 诱导的小胶质细胞中, 芍药苷可降低 $A\beta$ 诱导产生的过量白细胞介素-1 β (interleukin 1-beta, IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 和 IL-6 等神经炎症因子^[26-28]。同时, 芍药苷能够有效抑制由炎症因子的增多而激活的糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 信号通路及其上游的核转录因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号通路, 以及 NF- κ B 信号通路激活的嗜中性白细胞碱性磷酸酶-3 (neutrophilic alkaline phosphatase 3, NALP3) 炎症复合物, 并减轻其促炎症作用^[26-28]。抑制小胶质细胞向淀粉样斑块周围的聚集亦可降低炎症反应, 芍药苷可降低 $A\beta_{1-42}$ 诱发的小胶质细胞的趋化, 并使其减少分泌 CXC 趋化因子配体 1 (chemokine C-X-C motif ligand 1, CXCL1) 和 CC 趋化因子配体 2 (chemokine C-C motif ligand 2, CCL-2) 等因子, 这种抑制作用的发生可能是通过降低血管内皮生长因子及血管内皮生长因子受体 1 的表达实现的^[28]。

3.2 抗氧化应激损伤

$A\beta$ 的聚集会导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 进而导致神经细胞膜上的脂质、核酸、蛋白质 (包括具有清除 $A\beta$ 功能的脂蛋白受体相关蛋白) 被氧化, 使膜的完整性遭到破坏^[29]。芍药苷可有效抑制 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{25-35}$ 诱导的

AD 大鼠海马区和 AD 细胞模型内的 ROS 水平和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性, 使脂质被氧化而产生的乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、蛋白质被氧化而产生的羰基蛋白 (carbonyl protein, CP) 和可损伤 DNA 的一氧化氮的含量下降, 并使超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 等抗氧化酶含量上升, 显著抑制 $A\beta$ 诱发的氧化应激反应^[14,21,30-31]。芍药苷还可通过增加 $A\beta_{35-45}$ 诱导的 PC12 细胞中对氧化损伤具有保护作用的血红素氧化酶 1 (heme oxygenase1, HO-1) 的表达水平, 抑制茴香霉素诱导的 SH-SY5Y 细胞中与氧化和衰老密切相关的衔接蛋白 p66shc (p66shc adaptor protein) 的表达, 提高 AD 细胞模型的抗氧化能力^[30,32]。

3.3 减少细胞凋亡

AD 早期即可发生线粒体功能紊乱, 导致新陈代谢减低、 Ca^{2+} 平衡失调、氧化应激反应增多及细胞凋亡的发生, 而这些病变也会加重线粒体损伤^[33]。芍药苷可以通过降低活性氧和 Ca^{2+} 生成, 拮抗磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路, 抑制线粒体膜上与细胞凋亡密切相关的促凋亡蛋白 Bcl-2/抗凋亡蛋白 Bax 信号通路, 提高线粒体膜电位; 这一系列反应会降低线粒体膜的通透性, 从而抑制线粒体内膜释放细胞色素 C (cytochrome C), 并减少细胞色素 C 激活半胱天冬酶 9 前体 (procaspase-9) 的可能, 进而降低半胱天冬酶 9 (Caspase-9) 对直接促凋亡的 Caspase-3 的活化, 最终抑制 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{25-35}$ 和谷氨酸等引起的细胞凋亡^[21,31,34]。

4 结语

芍药苷可以有效干预多种 AD 动物及细胞模型, 显著减少 AD 的主要病理蛋白即过度沉积的 $A\beta$ 多肽和异常磷酸化 Tau 蛋白的含量, 并通过保护神经递质及其受体缓解 AD 认知功能下降, 也可以通过降低氧化应激、炎症反应和减少细胞凋亡等机制发挥治疗 AD 的作用。另外, 尽管基础实验研究已从多方面阐明芍药苷可以有效干预 AD, 但却鲜有相关的临床报道。将芍药苷作为抗 AD 药物任重道远, 需要进一步实验研究和更深入的机制探讨, 本文为今后能更广泛地开展芍药苷的临床实验研究, 探索传统中医药的开发与应用提供新线索。

参考文献

- [1] Hebert L E, Weuve J, Scherr P A, *et al.* Alzheimer disease in the United States (2010—2050) estimated using the 2010 census [J]. *Neurology*, 2013, 80(19): 1778-1783.
- [2] Nelson P T, Alafuzoff I, Bigi E H, *et al.* Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature [J]. *J Neuropathol Exper Neurol*, 2012, 71(5): 362-381.
- [3] Rempe R G, Hartz A M S, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers [J]. *J Cerebr Blood F Met*, 2016, 36(9): 1481-1507.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 张东方, 税丕先, 高红莉, 等. 生药学 [M]. 北京: 中国医药科学出版社, 2016.
- [6] Fu X, Wang Q H, Wang Z B, *et al.* Danggui-Shaoyao-San: New hope for Alzheimer's disease [J]. *Aging Disease*, 2016, 7(4): 502-513.
- [7] 毛敬洁, 陈亚萍, 林如辉, 等. 小续命汤对 APP/PS1 转基因鼠海马区 A β 、GFAP 蛋白的影响及其行为学分析 [J]. *康复学报*, 2016, 26(4): 28-33.
- [8] Hou X Q, Wu D W, Zhang C X, *et al.* Bushen-Yizhi formula ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress-related neuronal apoptosis in scopolamine-induced senescence in mice [J]. *Inter J Mol Med*, 2014, 34(2): 429-439.
- [9] Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology [J]. *Nate Rev Neur*, 2016, 17(1): 5-21.
- [10] Ma X H, Duan W J, Mo Y S, *et al.* Neuroprotective effect of paeoniflorin on okadaic acid-induced tau hyperphosphorylation via calpain/Akt/GSK-3 β pathway in SH-SY5Y cells [J]. *Brain Res*, 2018, doi: 10.1016/j.brainres.2018.03.022.
- [11] Jiang T, Yu J T, Zhu X C, *et al.* Temsirolimus attenuates tauopathy *in vitro* and *in vivo* by targeting tau hyperphosphorylation and autophagic clearance [J]. *Neuropharmacology*, 2014, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.032.
- [12] 朱 燃, 黄田喜, 赵雪梅, 等. 10 种中草药成分对体外过表达 A β 的影响及机制探讨 [J]. *药理学学报*, 2014, 49(6): 800-806.
- [13] 周楠楠, 朱 燃, 赵雪梅, 等. 天麻素、黄芪总皂苷和芍药苷对阿尔茨海默病模型小鼠脑内 β 淀粉样多肽表达的影响及其机制 [J]. *中华病理学杂志*, 2016, 45(11): 780-784.
- [14] Zhou L, Chen L, Fu Q, *et al.* Paeoniflorin attenuates amyloid- β peptide-induced neurotoxicity by ameliorating oxidative stress and regulating the NGF-mediated signaling in rats [J]. *Brain Res*, 2013, doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.040.
- [15] Li A P, Yang F, Song J, *et al.* Inhibition of A β proteotoxicity by paeoniflorin in *Caenorhabditis elegans* through regulation of oxidative and heat shock stress responses [J]. *Rejuv Res*, 2018, 21(4): 304-312.
- [16] Ferreira-Vieira T H, Guimaraes I M, Silva F R, *et al.* Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2016, doi: 10.2174/1570159X13666150716165726.
- [17] Niewiadomska G, Mietelska-Porowska A, Mazurkiewicz M. The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(2): 515-526.
- [18] Williams B J, Eriksdotter-Jonhagen M, Granholm A C. The intersection of NGF/TrkA signaling and amyloid precursor protein processing in Alzheimer's disease neuropathology [J]. *Inter J Mol Sci*, 2017, doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03181.x.
- [19] Popugaeva E, Pchitskaya E, Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease—a therapeutic opportunity? [J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 2017, 483(4): 998-1004.
- [20] 马 伟, 马卫东, 苗珍花, 等. 芍药苷神经保护作用的实验研究 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2011, 33(2): 132-135.
- [21] Zhong S Z, Ge Q H, Li Q, *et al.* Paeoniflorin attenuates A β ₁₋₄₂-mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats [J]. *J Neurol Sci*, 2009, 280(1/2): 71-78.
- [22] Yakel J L. Nicotinic Ach receptors in the hippocampal circuit; functional expression and role in synaptic plasticity [J]. *J Physiol*, 2014, 592(19): 4147-4153.
- [23] Gomes C V, Kaster M P, Tomé A R, *et al.* Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration [J]. *BBA-Biomembranes*, 2011, 1808(5): 1380-1399.
- [24] 闫 蓉. JD-30 主要成分芍药苷和芍药内酯苷的神经保护作用及机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [25] Laurent C, Buée L, Blum D. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's disease and tauopathies? [J]. *Biomed J*, 2018, 41(1): 21-33.
- [26] Zhang H R, Peng J H, Cheng X B, *et al.* Paeoniflorin attenuates amyloidogenesis and the inflammatory responses in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(8): 1583-1592.
- [27] Gu X Y, Cai Z X, Cai M, *et al.* Protective effect of

- paeoniflorin on inflammation and apoptosis in the cerebral cortex of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2247-2252.
- [28] Liu H Y, Wang J Y, Wang J, *et al.* Paeoniflorin attenuates A β ₁₋₄₂-induced inflammation and chemotaxis of microglia *in vitro* and inhibits NF- κ B and VEGF/Flt-1 signaling pathways [J]. *Brain Res*, 2015, doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.035.
- [29] Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, *et al.* Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease [J]. *Redox Biol*, 2018, doi: 10.1016/j.redox.2017.10.014.
- [30] 郭春燕, 罗 强, 孙 黎, 等. 芍药苷对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 神经细胞损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2013, 44(20): 2864-2871.
- [31] Wang K, Zhu L, Zhu X, *et al.* Protective effect of paeoniflorin on A β ₂₅₋₃₅-induced SH-SY5Y cell injury by preventing mitochondrial dysfunction [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(2): 227-234.
- [32] Wang Y, Liu T, Pan W, *et al.* Small molecule compounds alleviate anisomycin-induced oxidative stress injury in SH-SY5Y cells via downregulation of p66shc and A β ₁₋₄₂ expression [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(2): 593-600.
- [33] Shoshan-Barmatz V, Nahon-Crystal E, Shteiinfer-Kuzmine A, *et al.* VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease [J]. *Pharm Res*, 2018, doi: 10.1016/j.phrs.2018.03.010.
- [34] Sun R, Wang K, Wu D D, *et al.* Protective effect of paeoniflorin against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells via Bcl-2/Bax signal pathway [J]. *Folia Neuropathol*, 2012, 50(3): 270-276.