

他莫昔芬诱发非酒精性脂肪性肝病的研究进展

赵 斐^{1,2}, 展玉涛^{1*}

1. 首都医科大学附属北京同仁医院 消化科, 北京 100730

2. 北京大学首钢医院 超声医学科, 北京 100144

摘 要: 他莫昔芬是一种广泛应用于治疗激素敏感型乳腺癌的抗雌激素类药物。临床研究和动物实验已经证实他莫昔芬可以诱发非酒精性脂肪性肝病 (NALFD)。目前认为他莫昔芬诱发 NALFD 的机制主要包括脂肪酸的合成、脂肪酸的 β 氧化、三酰甘油转运异常以及雌激素拮抗作用。对他莫昔芬诱发 NAFLD 及其发病机制的研究现状进行了综述。

关键词: 他莫昔芬; 非酒精性脂肪性肝病; 发病机制

中图分类号: R977.1; R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)08-1041-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.08.031

Research progress on nonalcoholic fatty liver disease induced by tamoxifen

ZHAO Fei^{1,2}, ZHAN Yu-tao¹

1. Department of Gastroenterology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

2. Department of Ultrasonography, Peking University Shougang Hospital, Beijing 100144, China

Abstract: Tamoxifen is an anti-estrogen drug widely used for the treatment of hormone-sensitive breast cancer. Clinical research and animal studies have confirmed that tamoxifen can induce nonalcoholic fatty liver disease (NALFD). So far, the pathogenesis of NALFD induced by tamoxifen include synthesis of aliphatic acid, β -oxidation of aliphatic acid, abnormal export of triacylglycerol, and inhibition of estrogens. The NAFLD induced by tamoxifen and its pathogenesis are reviewed in this paper.

Key words: tamoxifen; nonalcoholic fatty liver disease; pathogenesis

乳腺癌是世界上女性最常见的恶性肿瘤^[1], 主要分为雌激素受体阳性和雌激素受体阴性两种类型, 约 75% 的乳腺癌为雌激素受体阳性^[2]。他莫昔芬是治疗雌激素受体阳性乳腺癌的“金标准”药物^[3], 对于雌激素敏感的乳腺癌患者, 无论是绝经前还是绝经后, 他莫昔芬均可以改善其预后, 因此, 其在临床上应用十分广泛。然而, 长期使用他莫昔芬会产生一系列的副作用, 其中非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 最常见^[4], 部分患者逐渐发展最终可进展为肝硬化^[5]。因此, 明确他莫昔芬诱发 NAFLD 的机制对于防治他莫昔芬引起的 NAFLD 具有重要意义。本文就他莫昔芬引起 NAFLD 的流行病学、动物实验研究以及其发病机制的研究现状进行了综述。

1 他莫昔芬诱发 NAFLD 的流行病学研究

近年来国内外陆续进行了一些大规模的临床试

验及回顾性分析研究, 证实服用他莫昔芬的乳腺癌患者 NAFLD 的发病率明显增高, 并对其相关的危险因素进行了探讨。

1.1 国外研究

他莫昔芬的标准服用时间和方法为连续服用 5 年, 2 次/d, 10 mg/次。有资料显示, 他莫昔芬治疗的女性乳腺癌患者有 43% 在治疗的前 2 年内出现 NAFLD, 尤其是一些超重的女性, 甚至会出现非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 和肝硬化^[5]。Bruno 等^[6]对 5 408 名子宫切除术后女性进行随机双盲临床试验, 分别给予他莫昔芬和安慰剂 20 mg/d, 治疗 5 年, 通过随访符合标准条件的患者中有 52 例发展为 NAFLD (他莫昔芬组 34 例, 安慰剂组 18 例), 他莫昔芬的危害比为 2.0, 并且发现超重、肥胖以及具有代谢综合征表现 (高胆固醇血症、高血压) 的女

收稿日期: 2015-05-27

基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划面上项目 (KM201510025017)

作者简介: 赵 斐 (1987—), 女, 硕士, 主要从事非酒精性脂肪性肝病的发病机制研究。E-mail: zhaofei419@126.com

*通信作者 展玉涛 (1963—), 男, 博士, 主任医师。E-mail: yutaozhan@263.net

性更易发展为 NAFLD。伊朗一项回顾性报道分析了 2006—2008 年 70 例乳腺癌患者 NAFLD 的发病率及危险因素, 结果显示标准服用他莫昔芬治疗后 35% 患者出现了 NAFLD, 其中高胆固醇血症、空腹血糖增高及高密度脂蛋白水平下降为其危险因素^[7]。有一些研究证实, 他莫昔芬停药后 NAFLD 可以恢复, 提示这些患者的 NAFLD 主要是由他莫昔芬引起的。Saphner 等^[8]回顾性分析了 1992—2000 年 1 105 名合并 NAFLD 的乳腺癌患者, 其中 2.2% 患者与服用他莫昔芬有关, NAFLD 可于停药后好转, 16 例肝功能异常的患者中, 14 例于停药后转氨酶水平降至正常。Nishino 等^[9]报道 79.3% 他莫昔芬所致 NAFLD 患者于停药后 1~2 年内恢复正常, 而 NAFLD 的严重程度和复原时间无直接联系。

1.2 国内研究

国内也有一些相关的研究。张培宇等^[10]对因他莫昔芬副作用而非医源性停药的 67 例患者进行分析, 发现其中因 NAFLD 停药的有 23 例(占 34.3%)、肝功能异常的有 17 例(占 25.4%)。闫永红等^[11]对 217 例乳腺癌术后服用他莫昔芬患者进行肝脏彩色多普勒超声检查随访, 发现他莫昔芬治疗后, 有 136 例(66%) 患者出现 NAFLD, 且不同年龄组间他莫昔芬治疗致 NAFLD 患病率存在明显差异, 41~60 岁年龄组脂肪肝患病率明显高于 30 岁以下年龄组, 推测与 30 岁以后随年龄增加雌激素水平的下降及他莫昔芬的雌激素拮抗作用有关, 此外与患者饮食习惯、运动起居等生活习惯也有一定关系。宋涛等^[12]对 36 例乳腺癌术后口服他莫昔芬致 NAFLD 患者的 CT 及临床资料进行了回顾性分析, 发现他莫昔芬所致的 NAFLD 中以轻度弥漫性脂肪肝最为多见(占 47.2%), 8 例患者停药并于 3 个月~1 年后复查, 其中 6 例好转, 2 例恢复正常, 提示这些患者的 NAFLD 主要是由他莫昔芬引起的。

总之, 国内外的流行病学研究均证实, 长期服用他莫昔芬可诱发 NAFLD, 但其患病率及病变程度有所不同, 可能与他莫昔芬所致 NAFLD 的危险因素不同有关。目前报道较多的危险因素包括体质量、年龄、高胆固醇血症、空腹血糖增高以及高密度脂蛋白水平下降等代谢综合征表现, 因此, 对具有这些危险因素的乳腺癌患者在服用他莫昔芬的过程中应注意预防及监测 NAFLD 的情况。

2 他莫昔芬诱发 NAFLD 的动物实验研究

动物实验研究证实, 他莫昔芬可引起 NAFLD。

Cole 等^[5]选取 C57BL/6J 小鼠, 分别用他莫昔芬(0.5 mg/kg) 及溶剂对照连续注射 5 d, 结果显示与对照组相比, 他莫昔芬组肝脏三酰甘油的量增加了 72%, 短期他莫昔芬处理可诱导小鼠肝脏脂肪变性。Lelliott 等^[13]同样用连续 5 d 注射他莫昔芬的短期干预法, 用 Wistar 大鼠进行造模, 病理学分析证实他莫昔芬干预组 83% 的大鼠出现中度微泡性肝脂肪变性, 明显高于对照组, 但并未观察到炎症性改变。Gudbrandsen 等^[14]选用 SD 雌性大鼠, 用 40 mg/d 他莫昔芬 ig 14 d, 造模, 结果显示大鼠肝脏三酰甘油的量增加大于 50%, 且血清转氨酶水平也有一定程度的升高。目前的动物实验造模时间多在 5~14 d, 与临床上需长期口服他莫昔芬仍有很大差距, 可考虑适当延长造模时间等方式完善实验方法以进一步研究他莫昔芬诱发的 NAFLD, 包括是否可诱发 NASH 和肝硬化等。

3 他莫昔芬诱发 NAFLD 的机制

关于 NAFLD 的发病机制, 目前国内外普遍认可的是 Day 和 James 提出的“二次打击”学说^[15]。第一次打击即各种原因引起的肝脏内脂肪的过量积聚, 形成单纯性脂肪肝; 致炎因子与抗炎因子平衡失常, 触发氧化应激和脂质过氧化, 形成“二次打击”, 该过程中氧化应激及细胞因子网络失常最终导致非酒精性脂肪性肝炎并进一步形成肝纤维化。许多机制可能会导致肝脏中的脂肪积聚^[16-17]: (1) 内脏或皮下脂肪组织的脂解作用增强或高脂饮食使游离脂肪酸供应增多; (2) 肝脏从头合成脂肪酸的增加; (3) 脂肪酸的氧化受阻; (4) 肝脏极低密度脂蛋白(VLDL) 的合成以及三酰甘油输出受阻。因此, 当外周脂肪组织脂解增加或饮食脂肪酸增加、肝细胞内脂肪酸合成增加、肝细胞内脂肪酸 β 氧化减少以及三酰甘油向肝细胞外运出减少均可引起 NAFLD。

他莫昔芬诱发 NAFLD 的机制尚不明确, 目前针对其发病机制的研究主要是基于动物实验, 而且结果不一。本文仅从导致肝脏中脂肪积聚几个途径的角度分析。

3.1 脂肪酸的合成

固醇调节元件结合蛋白(SREBPs) 是属于碱性螺旋-环-螺旋(bHLH-Zip) 家族的转录因子^[18]。SREBPs 有 3 个成员: SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2, 其中 SREBP-1c 是调控肝脏脂肪酸合成的主要亚型(90%)^[19]。SREBP-1c 可转录激活脂肪酸合成的关键酶基因^[20-21], 包括 ATP 柠檬酸裂解

酶 (ACL)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、脂肪酸合成酶 (FAS)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (SCD) 和甘油-3-磷酸酰基转移酶 (GPAT) 等^[22-23]。目前, 在他莫昔芬诱发 NAFLD 的动物实验中, 关于他莫昔芬对 SREBP-1c 及其下游基因表达的研究结果不同。Cole 等^[5]报道在对照组和他莫昔芬处理组的小鼠肝脏中 SREBP1 和 ACC 的 mRNA 表达水平无明显差异, 但他莫昔芬处理组小鼠肝脏 FAS mRNA 水平增加 200%, 且增加了 ACC 的活化, 肝脏从头合成脂肪酸水平明显升高 ($P < 0.05$), 因此, 他们认为他莫昔芬主要是通过增加脂肪酸的合成导致小鼠 NAFLD。Gudbrandsen 等^[14]研究发现他莫昔芬并不影响大鼠肝脏中 SCD1 的活性和 mRNA 水平, 但他莫昔芬可以使 ACC、FAS 的活性下降, 并且下调 FAS 的 mRNA 表达, 而 GPAT 和二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 的活性增加, 他们认为 ACC、FAS 活性的下降可能是肝内三酰甘油水平增加的一种代偿反应, GPAT、DGAT 活性的提高可导致甘油酯类合成的增加, 因此, 推测三酰甘油合成的增加是导致肝脏脂质积聚的原因。Lelliott 等^[13]则认为在他莫昔芬处理过的大鼠肝脏和对照组大鼠肝脏中 SREBP1 的 mRNA 表达水平无差异, 而 FAS、SCD、ACC 的 mRNA 表达水平下降, 导致肝脏从头合成脂肪酸下降。应用细胞培养探索了他莫昔芬诱发肝细胞脂肪变性的机制, 发现他莫昔芬在 mRNA 和蛋白水平均可增加 SREBP-1c、FAS、SCD 和 ACC 在 HepG2 细胞中的表达, 因此, 推测他莫昔芬可能是通过提高 SREBP-1c 的转录活性并进一步上调其下游脂肪生成基因的表达, 从而造成肝细胞内三酰甘油的积聚^[24]。

3.2 脂肪酸的 β 氧化

CPT1 是线粒体脂肪酸 β 氧化途径的限速酶^[25-26]。Cole 等^[5]研究发现, 他莫昔芬对小鼠肝脏 CPT1 的 mRNA 表达没有影响。Gudbrandsen 等^[14]报道他莫昔芬不影响大鼠肝脏 CPT1 的活性及 mRNA 水平, 并且不改变肝脏 β 氧化降解物乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A 的量。然而, Lelliott 等^[13]研究发现他莫昔芬能显著下调 FAS 的表达和活性, 从而引起丙二酰辅酶 A 的聚集, 而丙二酰辅酶 A 是已知的线粒体脂肪酸 β 氧化的抑制剂, 它可以抑制 CPT1 的活性, 从而抑制脂肪酸的 β 氧化。因此, 推测丙二酰辅酶 A 增加所致的脂肪酸氧化受阻可能是他莫昔芬所致肝脏脂肪变性的主要因素。

3.3 三酰甘油的转运异常

Kwak 等^[27]研究报道, 他莫昔芬处理后肝脏三酰甘油水平升高会伴随着血清三酰甘油水平的下降, 因此怀疑他莫昔芬可能会抑制肝脏 VLDL 的组装或分泌。VLDL 是将肝内三酰甘油运输到肝外的主要形式, 是一种包含载脂蛋白 B (ApoB) 及多种脂类 (三酰甘油、游离胆固醇和胆固醇酯等) 的大微粒, 在肝细胞内质网中组装而成^[28]。ApoB 是 VLDL 最重要的蛋白组分^[29]。一些学者应用动物实验对其进行了研究。Gudbrandsen 等^[14]在他莫昔芬诱发大鼠 NAFLD 的实验中发现, 他莫昔芬处理后大鼠肝脏内三酰甘油水平升高, 血清三酰甘油、非酯化脂肪酸、胆固醇酯及磷脂等水平下降, 而肝脏 ApoB 的水平不变, 低密度脂蛋白 (LDL) 受体和 VLDL 受体等表达水平也不发生改变, 说明他莫昔芬并不影响 VLDL 的分泌及脂肪摄取。目前, 尚没有明确证据表明他莫昔芬所致的 NAFLD 与 VLDL 的组装、分泌及三酰甘油转运有关。

3.4 雌激素拮抗作用

他莫昔芬是一种雌激素受体拮抗剂, 不仅可抑制雌激素受体, 而且可降低患者的雌激素水平, 因此, 推断他莫昔芬诱发的 NAFLD 可能会与雌激素作用的抑制有关。研究发现, 芳香酶基因缺失 (ArKO) 的小鼠缺乏内源性雌激素, 会发育为严重的 NAFLD, 芳香酶基因敲除小鼠与野生型小鼠相比, 其肝脏脂肪的量明显增加, 而补充外源性雌激素后, 可终止肝脏脂肪积聚, 使脂肪变性减轻, 因此推测雌激素参与了基本的肝脏脂质代谢, 雌激素受体介导途径被抑制可导致严重的 NAFLD^[30-32]。细胞色素 P450 17 α 酶 (CYP17) 是参与雌激素合成的重要酶, CYP17 活性的降低可使雌激素合成受阻, 且 CYP17 活性下降与肝脏脂肪变呈正相关^[33]。Ohnishi 等^[34]研究发现, CYP17 基因的多态性与他莫昔芬诱发 NAFLD 的敏感性相关, 他莫昔芬可能会通过抑制雌激素的作用而诱发 NAFLD。

4 结语

他莫昔芬可诱发 NAFLD 的副作用在临床研究及动物实验中已得到证实, 然而由于他莫昔芬价格便宜且患者耐受性好等优势, 它仍广泛应用于雌激素受体阳性乳腺癌患者的治疗。在 2009 年美国国立综合癌症网络 (NCCN) 指南中强调, 在没有明确绝经且没有采用有效的卵巢功能抑制时, 他莫昔芬仍然是治疗的首选药物。因此, 对他莫昔芬诱发

NAFLD 的防治显得尤为重要。如何防治他莫昔芬引起的 NAFLD 是目前临床上一个悬而未决的常见难题, 尽管目前对他莫昔芬引起 NAFLD 的机制进行了一些研究, 但其详细机制不明, 这仍是防治困难的关键。所以, 深入系统研究他莫昔芬引起 NAFLD 的机制并根据相关机制进行针对性的防治具有重要的理论意义和临床应用价值。

参考文献

- [1] Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(suppl 6): vi7-vi12.
- [2] Harrell J C, Dye W W, Harvell D M, *et al*. Estrogen insensitivity in a model of estrogen receptor-positive breast cancer lymph node metastasis [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10582-10591.
- [3] Tomao F, Spinelli G, Vici P, *et al*. Current role and safety profile of aromatase inhibitors in early breast cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(8): 1253-1263.
- [4] Lee M H, Kim J W, Kim J H, *et al*. Gene expression profiling of murine hepatic steatosis induced by tamoxifen [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 199(3): 416-424.
- [5] Cole L K, Jacobs R L, Vance D E. Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty acid synthesis [J]. *Hepatology*, 2010, 52(4): 1258-1265.
- [6] Bruno S, Maisonneuve P, Castellana P, *et al*. Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis: prospective study of 5408 women enrolled in Italian tamoxifen chemoprevention trial [J]. *BMJ*, 2005, 330(7497): 932.
- [7] Akhondi-Meybodi M, Mortazavy-Zadah M R, Hashemian Z, *et al*. Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis in females treated with tamoxifen for breast cancer [J]. *Arab J Gastroenterol*, 2011, 12(1): 34-36.
- [8] Saphner T, Triest-Robertson S, Li H, *et al*. The association of nonalcoholic steatohepatitis and tamoxifen in patients with breast cancer [J]. *Cancer*, 2009, 115(14): 3189-3195.
- [9] Nishino M, Hayakawa K, Nakamura Y, *et al*. Effects of tamoxifen on hepatic fat content and the development of hepatic steatosis in patients with breast cancer: high frequency of involvement and rapid reversal after completion of tamoxifen therapy [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2003, 180(1): 129-134.
- [10] 张培宇. 乳腺癌患者非医嘱停用三苯氧胺原因及中药疗效 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2005, 11(6): 493-494.
- [11] 闫永红, 党欢, 宋光辉, 等. 乳腺癌术后他莫昔芬治疗致脂肪肝 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(21): 2016-2018.
- [12] 宋涛, 李辛, 胡鸿涛, 等. 乳腺癌术后三苯氧胺致脂肪肝 36 例分析 [J]. 实用医学杂志, 2010(13): 2362-2364.
- [13] Lelliott C J, López M, Curtis R K, *et al*. Transcript and metabolite analysis of the effects of tamoxifen in rat liver reveals inhibition of fatty acid synthesis in the presence of hepatic steatosis [J]. *FASEB J*, 2005, 19(9): 1108-1119.
- [14] Gudbrandsen O A, Rost T H, Berge R K. Causes and prevention of tamoxifen-induced accumulation of triacylglycerol in rat liver [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(10): 2223-2232.
- [15] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.
- [16] Tilg H, Moschen A R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis [J]. *Hepatology*, 2010, 52(5): 1836-1846.
- [17] Anstee Q M, Goldin R D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research [J]. *Int J Exp Pathol*, 2006, 87(1): 1-16.
- [18] Brown M S, Goldstein J L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor [J]. *Cell*, 1997, 89(3): 331-340.
- [19] Pettinelli P, Obregón A M, Videla L A. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nutr Hosp*, 2011, 26(3): 441-450.
- [20] Horton J D, Goldstein J L, Brown M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125-1131.
- [21] Horton J D, Shah N A, Warrington J A, *et al*. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(21): 12027-12032.
- [22] Chow J D, Jones M E, Prella K, *et al*. A selective estrogen receptor α agonist ameliorates hepatic steatosis in the male aromatase knockout mouse [J]. *J Endocrinol*, 2011, 210(3): 323-334.
- [23] Strable M S, Ntambi J M. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010, 45(3): 199-214.
- [24] Zhao F, Xie P, Jiang J, *et al*. The Effect and mechanism of tamoxifen-induced hepatocyte steatosis *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(3): 4019-4030.
- [25] Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, *et al*.

- Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(22): 14809-14818.
- [26] Serviddio G, Giudetti A M, Bellanti F, *et al.* Oxidation of hepatic carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) impairs fatty acid beta-oxidation in rats fed a methionine-choline deficient diet [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24084.
- [27] Kwak D H, Lee J H, Kim D G, *et al.* Inhibitory effects of hwangryunhaedok-tang in 3T3-L1 adipogenesis by regulation of Raf/MEK1/ERK1/2 pathway and PDK1/Akt phosphorylation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 413906.
- [28] Higashi Y, Itabe H, Fukase H, *et al.* Transmembrane lipid transfer is crucial for providing neutral lipids during very low density lipoprotein assembly in endoplasmic reticulum [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21450-21458.
- [29] Liang J S, Kim T, Fang S, *et al.* Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor Gp78, a ubiquitin protein ligase, results in increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in HepG2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(26): 23984-23988.
- [30] Moro L, Arbini A A, Hsieh J T, *et al.* Aromatase deficiency inhibits the permeability transition in mouse liver mitochondria [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(4): 1643-1652.
- [31] Hewitt K N, Pratis K, Jones M E, *et al.* Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(4): 1842-1848.
- [32] Nemoto Y, Toda K, Ono M, *et al.* Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(12): 1819-1825.
- [33] Nemoto Y, Saibara T, Ogawa Y, *et al.* Tamoxifen-induced nonalcoholic steatohepatitis in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen [J]. *Intern Med*, 2002, 41(5): 345-350.
- [34] Ohnishi T, Ogawa Y, Saibara T, *et al.* CYP17 polymorphism and tamoxifen-induced hepatic steatosis [J]. *Hepatol Res*, 2005, 33(2): 178-180.