

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217( 2015) 02 - 0103 - 04

## 芝麻素对自发性高血压大鼠心肌氧化应激损伤的保护作用

李 伟 杨解人 李文星 张俊秀 唐丽娟 杨 慧 熊 莺

( 皖南医学院 药理学教研室 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 观察芝麻素对自发性高血压大鼠( spontaneously hypertensive rat SHR) 心肌 iNOS 和 c-fos 蛋白表达来探讨其可能保护机制。方法: SHR 35 只 随机分为 SHR 模型组、芝麻素 [40、80、160 mg/( kg · d) ] 组、卡托普利 [30 mg/( kg · d) ] 组及 WKY 阴性组 每天灌胃给药 1 次 连续 16 周。末次给药后 称体质量 ,HE 染色观察心肌病理变化; 化学比色法测心肌组织中 T-SOD 的含量; 免疫组化法检测心肌诱导型一氧化氮合酶( inducible nitric oxide synthase iNOS) 和原癌基因( cellular oncogene fos c-fos) 阳性蛋白表达。结果: SHR 组心肌细胞增生肥大且排列紊乱 组织中可见大量炎性细胞和脂肪组织浸润 ,心肌 T-SOD 的含量明显减少 (  $P < 0. 01$  ) ,心肌 iNOS 和 c-fos 蛋白表达显著增加 (  $P < 0. 01$  ) 芝麻素和卡托普利组上述病理变化则有不同程度的改善; 心肌 T-SOD 明显增加 (  $P < 0. 01$  ) ,iNOS 和 c-fos 蛋白表达明显下调 (  $P < 0. 01$  ) 。结论: 芝麻素具有下调 SHR 心肌 iNOS 和 c-fos 蛋白表达 增强 T-SOD 能力 保护心肌损伤的作用。

**【关键词】**芝麻素; 自发性高血压大鼠; 心肌; T-SOD; iNOS; c-fos

**【中图分类号】**R 285. 5 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 02. 001

## Effect of sesamin on the protein iNOS and c-fos expression in myocardia of spontaneously hypertensive rats

LI Wei ,YANG Jieren ,LI Wenxing ,ZHANG Junxiu ,TANG Lijuan ,YANG Hui ,XIONG Yin

Department of Pharmacology ,Wannan Medical College ,Wuhu 241002 ,China

**【Abstract】Objective:** To observe the effects of sesamin on the protein iNOS and c-fos expression in myocardia of spontaneously hypertensive rats( SHR) , and explore the potential protective mechanisms. **Methods:** Thirty-five SHRs were randomly divided into group of SHR model ,sesamin treatment in diverse dosage [40 ,80 and 160 mg/( kg · d) ] and captopril intervention [30 mg/( kg · d) ] ,and 7 Wistar-Kyoto rats( WKY) were included as negative controls. All rats were intragastrically administrated with the drugs once a day for consecutive 16 weeks. After the final intervention ,the body weight ( BW) was measured and histopathological changes of the myocardia were observed by HE staining. Colorimetric analysis was performed to measure the contents of myocardial T-SOD ,and immunohistochemical method was used to determine the expression of inducible nitric oxide synthase( iNOS) and c-fos. **Results:** SHR group demonstrated hypertrophied myocardia with disordered arrangement. Large quantity of inflammatory cells and adipose tissue infiltration were seen in the myocardial tissues ,and the expression of T-SOD was significantly reduced (  $P < 0. 01$  ) ,whereas the protein iNOS and c-fos expression in myocardia was significantly up-regulated (  $P < 0. 01$  ) . Myocardial pathological lesions were improved to a certain degree in the rats treated with sesamin and captopril ,and T-SOD content was significantly increased (  $P < 0. 01$  ) ,whereas the expression of iNOS and c-fos was notably reduced in dose-dependent manner (  $P < 0. 01$  ) . **Conclusion:** Sesamin could decrease the expression of iNOS and c-fos protein and enhance the ability of T-SOD ,suggesting that it can be protective effect on myocardial injury in spontaneously hypertensive rats.

**【Key words】**sesamin; spontaneously hypertensive rats; myocardium; T-SOD; iNOS; c-fos

高血压病是一种危害人类健康的常见病 ,长期高血压可导致重要靶器官损伤 ,尤其对心脏损伤更为严重 ,可引起心肌细胞肥大、间质纤维化、细胞外基质增加、心肌细胞凋亡、心脏扩大 ,最终导致心脏衰竭。故临床上对高血压的治疗不仅需要降压 ,同时要考虑保护靶器官。芝麻素( sesamin ,Ses) 是从芝麻中提取的活性有效成分 ,具有抗氧化、降血脂、

降血压等<sup>[1-3]</sup>作用。国外报道芝麻素不仅可以降低血压 ,还能改善去氧皮质酮-盐敏感性高血压及两肾一夹肾性高血压大鼠的心肌和血管的肥厚<sup>[4-5]</sup> ,我们前期研究表明 ,芝麻素可以逆转肾性高血压、肾性高血压伴高脂高糖饮食大鼠及 SHR 心肌肥厚的作用<sup>[6-8]</sup>。但芝麻素对 SHR 心肌保护作用机制是否与 iNOS 和 c-fos 表达有关未见报道 ,因此本研究以

基金项目: 安徽省自然科学基金项目( 1308085QH145) ; 安徽省高校青年教师科研资助计划( 2008jq1151)

收稿日期: 2014-07-23

作者简介: 李 伟( 1989-) ,男 ,2013 级硕士研究生 ( 电话) 15155366063 ( 电子信箱) 254410919@ qq. com;

杨解人 ,女 ,教授 ,硕士生导师 ( 电子信箱) wnmeyaoli@ sina. com ,通讯作者。

SHR 为研究对象,通过检测 iNOS 和 c-fos 蛋白表达来探讨芝麻素对 SHR 心肌氧化应激损伤的保护作用及可能机制。

### 1 材料与方 法

1.1 实验动物 16 周龄雄性 SHR 35 只和 WKY 7 只,体质量(340 ± 20) g,许可证号:SCXK(沪)2007-0005,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。分笼饲养,每笼一只,保持温度 22 ~ 25 °C,相对湿度 60% ~ 70%,自然光照,定时进食(饲料购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场)和饮水。

1.2 药品和试剂 芝麻素纯度 93.7%,分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>;分子量 354.34,北京兴百祥科贸有限公司。卡托普利(captopril, Cap),25 mg/片,批准文号:国药准字 H32023731,生产批号:09102411,常州制药有限公司。总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)试剂盒购于南京建成生物工程研究所。iNOS 和 c-fos 一抗,SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 分组及给药 SHR 35 只随机分成:SHR 组 [0.5% 羧甲基纤维素钠 5 mL/(kg · d)],Ses 低、中、高组 [40、80、160 mg/(kg · d)],Cap 阳性对照组 [30 mg/(kg · d)],另设 WKY 正常对照组 [0.5% 羧甲基纤维素钠 5 mL/(kg · d)],每组 7 只,按上述设定剂量每日灌胃 1 次,连续给药 16 周。

1.4 心脏标本采集 实验结束,称大鼠体质量,3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉。取左心室心肌同一部位约 2 g,按质量体积比 1:9 加冷生理盐水,制成 10% 的心肌组织匀浆,3 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清液, - 20 °C 保存,用于生化测定。取心尖组织,PBS 清洗,滤纸吸干,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,常规脱水、浸蜡、包埋。制成 5 μm 心肌切片用于 HE 染色及免疫组化。

1.5 HE 染色 将各组大鼠心肌切成 5 μm 薄片,常规脱蜡复水,苏木精染色 5 min;水洗去多余染液,0.5% 盐酸酒精分化 10 s;流水冲洗 5 min;蒸馏水短洗;伊红染色 2 min;依次 70%、85%、95%、100% 酒精脱水;二甲苯透明,中性树脂封片;光镜下观察心肌病理学变化。

1.6 心肌 T-SOD 的测定 比色法测定心肌匀浆中 T-SOD 含量(U/mgprot),具体步骤按试剂盒说明书操作。用 DNM-9602 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司)测定,波长 550 nm。组织匀浆总蛋白含量测定采用 BCA 法。

1.7 免疫组化法表达 iNOS 和 c-fos 阳性蛋白 各

组心肌切成 5 μm 薄片,常规脱蜡至水,免疫组化步骤如下:0.01 mol/L 枸橼酸盐微波抗原修复,室温冷却,PBS 洗涤 3 次;滴加 3% 过氧化氢室温孵育 15 min 灭活内源性过氧化物酶,PBS 洗 3 次;滴加 5% BSA 封闭液 37 °C,30 min,甩去多余液体,不洗;滴加 iNOS、c-fos 一抗(1:200),4 °C 冰箱过夜,37 °C 复温 45 min,PBS 洗涤 3 次;滴加生物素化山羊抗兔的二抗,置 37 °C,30 min,PBS 漂洗 3 次;滴加 SABC,37 °C,30 min,PBS 漂洗 4 次;DAB 显色 5 min,蒸馏水洗涤;苏木素复染 2 min,自来水冲洗,分色液分色 6 ~ 7 s,自来水冲洗;无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

结果判定:采用 Olympus BX51 显微镜 400 倍观察,PBS 代替一抗作为空白对照,结果为阴性,阳性细胞心肌细胞的胞浆及胞膜呈黄至棕黄色;所有染色切片在同一条件下采用 Image-pro plus 图像分析软件进行半定量分析,测定其平均积分光密度值(AIOD),阳性表达水平用 AIOD( $\bar{x} \pm s$ )表示,AIOD 越大其阳性表达水平愈高,反之则表达水平愈低。

1.8 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,多组均数间两两比较,方差齐时用 *t* 检验,方差不齐时则用 *t* 检验;*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

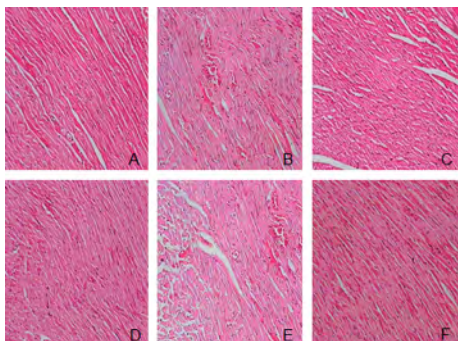
### 2 结果

2.1 芝麻素对 SHR 心肌 HE 染色的影响 光镜下观察到 WKY 组心肌细胞间隙、组织形态正常,呈长梭形,心肌纤维结构清晰排列整齐。SHR 组心肌细胞增生肥大,心肌纤维增粗且排列紊乱,细胞核增大,组织中可见炎性细胞和脂肪组织浸润,提示心肌细胞出现病理损伤。当给予不同剂量的 Ses 和 Cap 后,心肌细胞的形态及增生均有不同程度的改善,心肌纤维排列较为整齐,炎性细胞和脂肪组织浸润均有所减少,说明心肌细胞的病理损伤均有不同程度的好转。提示 Ses 和 Cap 对 SHR 心肌细胞损伤具有一定的保护作用(图 1)。

2.2 芝麻素对 SHR 心肌 T-SOD 的影响 与 WKY 比较,SHR 心肌 T-SOD 含量显著减少,具有显著统计学意义(*P* < 0.01);与 SHR 比较,Ses 各剂量组和 Cap 组心肌 T-SOD 不同程度的增加,具有显著统计学意义(*P* < 0.01),且芝麻素各剂量组呈明显的剂量依赖关系(*r* = 0.963 7, *R*<sup>2</sup> = 0.928 7)。显示芝麻素对 SHR 有一定的抗氧化能力(表 1)。

2.3 芝麻素对 SHR 心肌 iNOS 和 c-fos 蛋白表达的影响 与 WKY 比较,SHR 心肌 iNOS 和 c-fos 蛋白

表达显著增多,具有显著统计学意义( $P < 0.01$ );与SHR比较,Ses 160、80 mg/kg 剂量组和Cap组心肌iNOS和c-fos表达明显减少,具有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),说明芝麻素可下调SHR心肌iNOS和c-fos蛋白的表达(表2、图2、3)。



A. WKY ,B. SHR ,C. Ses160 mg/kg ,D. Ses80 mg/kg ,E. Ses40 mg/kg , F. Cap30 mg/kg

图1 芝麻素对SHR心肌HE染色的影响(200×)

Fig 1 Effect of sesamin on the myocardium of SHR ( HE , 200 × )

表1 芝麻素对自发性高血压大鼠心肌T-SOD的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n = 7$ )

Tab 1 Effect of sesamin on content of T-SOD in myocardium of SHR( $\bar{x} \pm s$   $n = 7$ )

Group	dose( mg/kg)	n	T-SOD( U/mgprot)
WKY	-	7	95.21 ± 2.73
SHR	-	7	57.07 ± 6.72**
Sesamin	160	7	91.81 ± 7.62##
Sesamin	80	7	83.62 ± 6.25***
Sesamin	40	7	60.3 ± 7.44**
Captopril	30	7	92.34 ± 4.84##

\*  $P < 0.05$  ,\* \*  $P < 0.01$  vs WKY; ##  $P < 0.05$  ###  $P < 0.01$  vs SHR

表2 芝麻素对SHR心肌iNOS和c-fos蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n = 7$ )

Tab 2 Effect of sesamin on iNOS and c-fos expression in myocardium of SHR( $\bar{x} \pm s$   $n = 7$ )

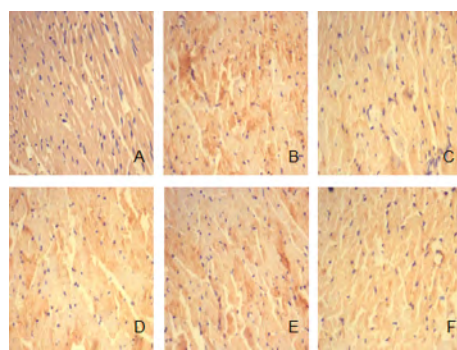
Group	dose ( mg/kg)	n	iNOS( AIOD)	c-fos( AIOD)
WKY	-	7	0.43 ± 0.08	0.42 ± 0.10
SHR	-	7	0.96 ± 0.16**	0.79 ± 0.15**
Sesamin	160	7	0.51 ± 0.12##	0.47 ± 0.07##
Sesamin	80	7	0.69 ± 0.12***	0.64 ± 0.10***
Sesamin	40	7	0.92 ± 0.15**	0.74 ± 0.10**
Captopril	30	7	0.46 ± 0.10##	0.44 ± 0.09##

\*  $P < 0.05$  ,\* \*  $P < 0.01$  vs WKY; ##  $P < 0.05$  ###  $P < 0.01$  vs SHR

### 3 讨论

形态学实验结果显示,SHR心肌细胞增生肥厚,形态异常,心肌纤维增粗及排列紊乱,出现大量炎性细胞和脂肪组织浸润,证明SHR的心肌细胞出现病理性损伤。给予芝麻素治疗16周后,心肌细胞及纤维有不同程度的改善,炎性浸润有所减轻,说明

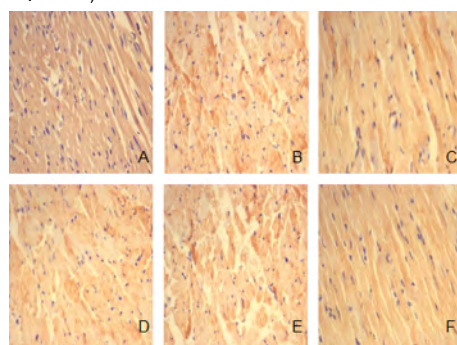
芝麻素对心肌细胞的损伤有一定的保护作用。但通过何种途径发挥保护作用值得进行探讨和研究。



A. WKY ,B. SHR ,C. Ses160 mg/kg ,D. Ses80 mg/kg ,E. Ses40 mg/kg , F. Cap30 mg/kg

图2 芝麻素对SHR心肌iNOS蛋白表达的影响( HE , 400 × )

Fig 2 Effect of sesamin on iNOS expression in myocardium of SHR( HE 400 × )



A. WKY ,B. SHR ,C. Ses160 mg/kg ,D. Ses80 mg/kg ,E. Ses40 mg/kg , F. Cap30 mg/kg

图3 芝麻素对SHR心肌c-fos表达的影响( HE 400 × )

Fig 3 Effect of sesamin on c-fos expression in myocardium of SHR( HE 400 × )

国内外研究表明SHR引起的心肌损伤与氧化应激有关<sup>[10-12]</sup>。而我们前期在代谢综合征大鼠、肾性高血压大鼠和肾性伴高血脂症大鼠中,均发现芝麻素可以提高心肌抗氧化能力来改善心肌肥厚及损伤<sup>[6-7,9]</sup>。本研究发现,32周龄SHR心肌出现氧化应激,引起氧自由基过量产生,T-SOD可以对抗和阻止因氧自由基而造成的细胞损伤,并及时修复受损细胞,反映机体清除自由基的能力,尤其反映清除超氧阴离子的能力。SHR心肌中T-SOD明显降低,当给予芝麻素治疗后,各组大鼠的T-SOD均有不同程度的提高,尤其芝麻素高剂量更为明显,其结果与文献报道相一致<sup>[1,13-14]</sup>。提示芝麻素保护SHR心肌损伤作用与提高SHR心肌中T-SOD活力有关。已有研究表明心肌病理状态下iNOS可催化L-精氨酸产生大量的NO,NO进一步与O<sub>2</sub><sup>-</sup>形成ONOO<sup>-</sup>,进而损伤细胞内的蛋白质、线粒体、DNA等细胞器<sup>[15-16]</sup>,从而导致心肌细胞损伤<sup>[9,12]</sup>,但ONOO<sup>-</sup>不稳定无法检测,所以通过检测代谢终产物硝基酪氨

酸来反映其毒性。我们前期研究发现 SHR 心肌中硝基酪氨酸明显增加,而芝麻素各组有不同程度的减少,但未检测 iNOS 的表达<sup>[8]</sup>。为了进一步证实芝麻素抗氧化作用的具体分子机制,本研究以 iNOS 为靶点,采用免疫组化法检测 iNOS 阳性表达,分析是否有相关性。结果发现,SHR 心肌组织中 iNOS 阳性颗粒表达明显增强,证明 iNOS 蛋白过度表达,与文献报道相一致<sup>[12]</sup>。本次实验给予芝麻素治疗 16 周后,各组 SHR 大鼠心肌 iNOS 蛋白表达均有不同程度下调,芝麻素高剂量尤为明显,说明芝麻素保护 SHR 心肌细胞损伤机制可能部分与下调 iNOS 表达有关。

SHR 心肌出现氧化应激,活性氧诱导原癌基因 c-fos 的表达增强,心肌细胞蛋白由胎儿型向合成型转换,蛋白合成增加,触发和调节心肌肥厚的发展,被众多学者认为是 Ang II 心肌肥厚的标志物<sup>[17-19]</sup>。前期研究表明<sup>[8]</sup>,SHR 心肌全心湿质量,左心湿质量及左心湿质量指数明显增加,而心肌纤维和胶原也有不同程度增加,细胞超微结构显示心肌细胞浊肿,空泡样变化,胶原纤维明显增生,线粒体肿胀,基质密度降低,部分空泡变性,而芝麻素各组有不同的好转,说明 SHR 心肌出现肥厚及损伤,但对于标志物 c-fos 并未检测。因此本研究采用免疫组化法,观察 SHR 心肌中 c-fos 表达是否有改变,结果证明 SHR 心肌组织中 c-fos 蛋白表达明显增强,与文献报道相一致<sup>[12,20]</sup>,说明 SHR 心肌损伤可能与心肌 c-fos 表达上调有关。而 SHR 心肌损伤大鼠经芝麻素治疗后,心肌组织中 c-fos 蛋白表达不同程度减少,说明芝麻素改善 SHR 心肌细胞损伤的作用机制可能与下调 c-fos 蛋白表达有关。

综上所述,芝麻素具有保护 SHR 心肌细胞损伤的作用,其机制可能与提高心肌细胞中 T-SOD 能力,下调 iNOS 和 c-fos 的蛋白表达有关,其确切机制有待进一步研究。

**【参考文献】**

[1] SU Suwen,LI Qian,LIU Yi *et al.* Sesamin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity: involvement of Sirt1 and Mn-SOD pathway[J]. *Toxicology Letters* 2014 224( 2) : 257 - 263.

[2] Tsuruoka N,Kidokoro A,Matsumoto I *et al.* Modulating effect of sesamin a functional lignan in sesame seeds, on the transcription levels of lipid-and alcohol-metabolizing enzymes in rat liver: a DNA microarray study [J]. *Bioscience,biotechnology, and biochemistry* 2005 69( 1) : 179 - 188.

[3] ZHANG Junxiu,YANG Jieren,CHEN Guoxiang *et al.* Sesamin ameliorates arterial dysfunction in spontaneously hypertensive rats via downregulation of NADPH oxidase subunits and upregulation of eNOS expression [J]. *Acta Pharmacologica Sinica* 2013 34( 7) :

912 - 920.

[4] Matsumura Y,Kita S,Morimoto S *et al.* Antihypertensive effect of sesamin. I. Protection against deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension and cardiovascular hypertrophy [J]. *Biological & pharmaceutical bulletin* ,1995 18( 7) : 1016 - 1019.

[5] Kita SI,Matsumura Y,Morimoto S *et al.* Antihypertensive effect of sesamin. II. Protection against two-kidney one-clip renal hypertension and cardiovascular hypertrophy [J]. *Biological & pharmaceutical bulletin* ,1995 18( 9) : 1283 - 1285.

[6] 孔祥 杨解人,郭莉群,等. 芝麻素对肾性高血压伴高血脂大鼠心肌肥厚的影响[J]. *中国实验方剂学杂志* 2008 14( 12) : 44 - 47.

[7] 李先伟 杨解人,熊克仁,等. 芝麻素对肾性高血压大鼠心肌重构的影响[J]. *中国实验方剂学杂志* 2008 14( 6) : 37 - 40.

[8] LI Wenxing,KONG Xiang,ZHANG Junxiu *et al.* Long-term intake of sesamin improves left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats [J]. *Food & function* 2013 4( 3) : 453 - 460.

[9] 黄凯 杨解人,周勇,等. L-芝麻素对代谢综合征大鼠心肌损伤的抑制作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志* 2008 22( 5) : 341 - 347.

[10] Purushothaman S,Nair R R,Harikrishnan V S *et al.* Temporal relation of cardiac hypertrophy,oxidative stress and fatty acid metabolism in spontaneously hypertensive rat [J]. *Molecular and cellular biochemistry* 2011 351( 1 - 2) : 59 - 64.

[11] Thandapilly S J,Wojciechowski P,Behbahani J *et al.* Resveratrol prevents the development of pathological cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in the SHR without lowering blood pressure [J]. *American journal of hypertension* 2010 23( 2) : 192 - 196.

[12] 郝伟 杨解人,张俊秀,等. 复方山菊对自发性高血压大鼠心脏的保护作用[J]. *皖南医学院学报* 2013 32( 1) : 16 - 19.

[13] LIU Chanmin,ZHENG Guihong,MING Qinglei *et al.* Sesamin protects mouse liver against nickel-induced oxidative DNA damage and apoptosis by the PI3K-Akt pathway [J]. *Journal of agricultural and food chemistry* 2013 61( 5) : 1146 - 1154.

[14] WU Xiangqi,KONG Xiang,ZHOU Yong *et al.* Sesamin exerts renoprotective effects by enhancing NO bioactivity in renovascular hypertensive rats fed with high-fat-sucrose diet [J]. *European journal of pharmacology* 2012 683( 1 - 3) : 231 - 237.

[15] Ohtani H,Katoh H,Tanaka T *et al.* Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in cardiac myocytes [J]. *Nitric Oxide* 2012 26( 2) : 95 - 101.

[16] Lonkar P,Dedon P C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates [J]. *International Journal of Cancer* 2011 128( 9) : 1999 - 2009.

[17] Aoki H,Richmond M,Izumo S *et al.* Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro [J]. *Biochem J* 2000 347( 1) : 275 - 284.

[18] ZHOU Daixing,LIANG Qiansheng,HE Xuexin *et al.* Changes of c-fos and c-jun mRNA expression in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and effects of sodium tanshinone IIA sulfonate [J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]* 2008 28: 531 - 534.

[19] Papaharalambus CA,Griendling KK. Basic Mechanisms of Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury Trends in Cardiovascular [J]. *Trends in cardiovascular medicine* , 2007 2( 17) : 48 - 54.

[20] 符德玉,王世红,周瑞,等. 活血潜阳方对自发性高血压大鼠心肌肥厚组织原癌基因 c-fos 和 c-myc 表达的影响[J]. *中西医结合学报* 2008 6( 4) : 387 - 390.