

单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu转染内皮祖细胞后移植治疗缺血性股骨头坏死的实验研究

齐 鑫 刘丹平* 赵 辉 张解元

(辽宁医学院附属第一医院, 锦州 121001)

摘要 将构建的单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu转染到诱导的兔骨髓源性内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)后移植到股骨头缺血坏死(avascular necrosis of the femoral head, ANFH)局部, 检测其促进坏死区局部成血管和成骨能力。密度梯度离心法获取兔骨髓单个核细胞(mononuclear cells, MNCs), 用M199培养基诱导MNCs为EPCs; 通过细胞形态、特殊表面标记、摄取能力方面鉴定EPCs; 将Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu载体转染到EPCs, 再将其移植入ANFH模型局部; 分别于术后2周、4周处死模型, 行坏死区成血管和成骨指标检测。结果显示: 与对照组(B组)和空白组(C组)相比, 实验组(A组)有较多新血管生成($P<0.05$), B组与C组比较有统计学差异($P<0.05$); 组织学及BMP-2免疫组化检测, A组与B组和C组之间差异具有统计学意义($P<0.05$), B组与C组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。综上所述, 该实验提示移植转染Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu的EPCs具有较强的成血管及成骨能力。

关键词 单载体双基因; 内皮祖细胞; 股骨头缺血坏死; 血管形成; 骨形成蛋白-2

Experimental Study of Transplantation of Rabbit Endothelial Progenitor Cells Transfected by Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu for Treatment of Avascular necrosis of the Femoral Head

Qi Xin, Liu Danping*, Zhao Hui, Zhang Jieyuan

(The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

Abstract The induced EPCs were transfected by Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu, and then transplanted into femoral head necrotic zone, the effect on osteogenesis and angiogenesis of necrosis zone was detected. MNCs were obtained by density gradient centrifugation method, and were induced into EPCs by M199 medium; EPCs were identified through cell morphology, specific surface markers and uptake ability. EPCs were transfected by Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu, and then were transplanted into partial of ANFH. The model were euthanized at 2 and 4 weeks after operation, effect on osteogenesis and angiogenesis of necrotic zone was detected. The results showed that there were more angiogenesis in group A than that in group B and C ($P<0.05$), the statistical difference was found between group B and C. The detection of histology and immunohistochemistry of BMP-2 showed that there was statistical difference between group A and B, group A and C ($P<0.05$). There was no statistical difference between group B and C ($P>0.05$). To sum up, there was an effect on osteogenesis and angiogenesis in EPCs after transfected by Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu.

Key words Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu; Ad-CMV-IRES-hrGFP-1; EPCs; avascular necrosis of the femoral head; angiogenesis; BMP-2

收稿日期: 2013-04-02 接受日期: 2013-04-23

辽宁省卫生厅“百千万人才工程”(批准号: 2010921045)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0416-4197576, E-mail: liudanping2009@sohu.com

Received: April 2, 2013 Accepted: April 23, 2013

This work was supported by the “Millions of Talents Project” of Liaoning Province (Grant No.2010921045)

*Corresponding author. Tel: +86-416-4197576, E-mail: liudanping2009@sohu.com

网络出版时间: 2013-06-27 15:16 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130627.1516.003.html

股骨头缺血坏死(avascular necrosis of the femoral head, ANFH)通常称为骨坏死, 其典型的特征是微循环血供受到损伤后引起骨的细胞发生死亡, 一旦发生这样的血管损伤后, 骨坏死修复能力特别弱, 并且预后也较差^[1]。骨组织的损伤严重程度和损伤后的修复程度主要取决于其局部的血管损伤程度以及是否建立了有效的侧枝血液循环^[2]。目前, 对于ANFH患者血管损伤的修复和血管新生的研究仅局限于成熟血管内皮细胞的改变^[3]。但是, 越来越多的研究表明, 骨髓来源的EPCs参与了血管修复和血管的新生, 却不是成熟的内皮细胞参与修复的过程^[4]。同时, 本科题组已经成功构建了单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu, 并且证实了其具有较强的成血管和成骨双重作用^[5], 因此本实验初步探讨单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu转染到内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)后移植入股骨头坏死局部治疗骨坏死的这一新的临床方法。

1 材料与方法

3~5月龄新西兰大白兔36只, 雌性、雄性分别为18只, 体重2.5~3 kg, 来自辽宁医学院动物实验中心。单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu和Ad-CMV-IRES-hrGFP-1均由辽宁医学院附属第一医院中心实验室提供; 10%的胎牛血清(Hyclone公司); M199培养液、EDTA-胰蛋白酶(Gibco公司); VEGF(血管内皮生长因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)、ECGS(内皮细胞生长添加剂)(Peprotech公司); 磷酸盐缓冲液(PBS)、FITC标记的荆豆凝集(FITC-UEA-I)(Sigma公司); DiI标记的乙酰低密度脂蛋白(DiI-acLDL)(Vector公司); 人纤维连接蛋白(Chemicon公司); 淋巴细胞分离液(天津灏洋生物有限公司); anti-CD133/PE、anti-CD34/PE(Becton Dickinson公司); SABC免疫组织化学试剂盒、BMP-2单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.1 兔骨髓EPCs的分离、培养

用50 mg/kg氯氨酮经兔耳缘静脉进行麻醉, 无菌条件下, 从所选新西兰白兔双侧髂骨用骨穿针抽取骨髓, 通过密度梯度离心法获取单个核细胞(mononuclear cells, MNCs), 然后将其重悬在M199培养基中(含有10%胎牛血清、10 μ g/L VEGF、2 μ g/L bFGF、150 μ g/mL ECGS、青霉素 10^5 U/L、链霉素

100 mg/L), 以 1×10^6 密度将细胞接种在预先包被有人纤维连接蛋白(HFN)的培养瓶中, 然后在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的湿度培养箱中培养。

1.2 以最佳转染指数转染Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu及Ad-CMV-IRES-hrGFP-1到EPCs

根据本课题之前的研究结果, 选取培养的第三代细胞为转染的种子细胞, 实验组(A组)以MOI值为200、空白组(C组)以MOI值为100进行转染, 再加入2 mL无血清培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温细胞培养箱中孵育3 h, 之后每孔再补充含10% FBS的M199培养基2 mL继续培养2~3 d。倒置荧光显微镜观察转染后的细胞形态, 以不引起明显细胞病变为转染成功。

1.3 兔ANFH动物模型的制作(激素型)

从兔耳缘静脉内注射马血清2 mL, 从第二天起于臀肌注射甲强龙(4 mg/kg), 每周2次, 共6周。然后行相关检查证实造模是否成功。

1.4 将转染的EPCs植入兔ANFH动物模型局部

1.4.1 实验分组 共3组, 每组雌、雄各6只。A组即实验组(12只): 移植转染Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu的EPCs悬液; 对照组(B组)即对照组(12只): 转染Ad-CMV-IRES-hrGFP-1(空腺病毒载体)的EPCs悬液组; C组即空白组(12只): 只是加入细胞悬液。

1.4.2 制备细胞悬液及移植 将各组细胞计数, 每个模型移植细胞数量为 2×10^4 /(g体重), 用培养基配置成2 mL细胞悬液, 在造模成功后的第二周(考虑是股骨头坏死的早期), 在C型臂, 用3.5 mm钻头从大转子下向股骨头表面侧钻入约5 mm, 到达股骨头软骨表面下方, 共钻入3条孔道, 将各组兔子进行相应处理, 用1 mL注射器将0.5 mL细胞悬液沿着每条孔道注入到股骨头软骨下面, 然后将孔道开口用骨蜡封上防止悬液流出, 其余各组操作相同。

1.5 指标检测

1.5.1 诱导培养的兔骨髓源EPCs的鉴定 (1)在培养箱中静置孵育5 d后观察其细胞形态, 培养到14 d左右再次观察细胞形态。(2)将诱导培养的第三代细胞制成细胞悬液使其浓度为 1×10^6 /mL, 然后分别将10 μ L FITC标记的CD34抗体、R-PE标记的VEGFR2抗体加入到悬液中, 并且避光孵育25 min。进行流式细胞技术分析EPCs表面特有的标志, 细胞以同型的R-PE或IgG1-FITC染色作为阴性对照。(3)以 5×10^4 /cm²密度将诱导培养的细胞接种到放有预先制备好细胞爬片的6孔板中, 5 μ g/mL DiI-ac-LDL、37 $^{\circ}$ C

培养3 h后, PBS漂洗、4%多聚甲醛固定20 min, 加入10 μ g/mL FITC-UEA-1, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h后荧光显微镜观察, 进行EPCs摄取能力的检测。

1.5.2 动物模型检测 2周、4周后行X射线正位摄片(摄片条件相同)及组织学观察, 检测各组实验动物造模是否成功。

1.5.3 坏死区血管形成情况检测 在术后2周和4周, CD34染色进行免疫组织化学检测, 通过光学显微镜在200倍视野下观察新生毛细血管形成情况, 然后计数CD34 $^{+}$ 毛细血管数量。每张切片选择最多的区域进行计数并且选择3处, 每例标本各计数6个视野, 然后再取平均值。

1.5.4 免疫组织化学染色检测BMP-2表达 取转染后4周的A、B、C组坏死区局部组织, 消化后以 3×10^4 /孔密度接种至6孔板的盖玻片上, 待细胞基本爬满盖玻片后, 吸取上清液, 4%多聚甲醛固定30 min, 按SABC免疫组织化学试剂盒说明进行染色, 倒置相差显微镜下观察, 细胞质中有棕黄色颗粒表示BMP-2表达阳性。各组随机选取5个视野, 采用人工计数法计数阳性细胞数, 然后再取平均值。

1.5.5 组织学检测移植后股骨头坏死情况 分别在移植后的第2周、4周和8周对每组实验动物进行组织学检测, 比较各组之间是否有差异。

1.6 统计学分析

以上所有实验的数据采用SPSS17.0软件进行统计分析, 数据用均数 $\pm$ 标准差来表示, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

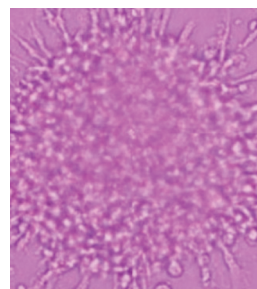
2 结果

2.1 EPCs的鉴定

2.1.1 细胞形态 兔骨髓单个核细胞经诱导培养48 h后开始出现贴壁生长的现象。第4~6 d贴壁细胞形态发生变化, 变成梭形的形状, 第7~9 d细胞的形态开始由长梭型变成多角形并逐渐融合为片状, 第15 d左右表现出典型的“铺路石”样外观(图1)。

2.1.2 EPCs表面特异标记检测 流式细胞仪检测EPCs表面特异标记CD34、CD133、VEGFR-2阳性率分别为 $56.61\%\pm 6.24\%$ 、 $49.36\%\pm 5.16\%$ 和 $54.70\%\pm 4.28\%$ (图2)。

2.1.3 EPCs结合能力检测 在荧光显微镜下观察显现出双荧光的阳性细胞数目约占贴壁细胞数的50%左右(图3)。

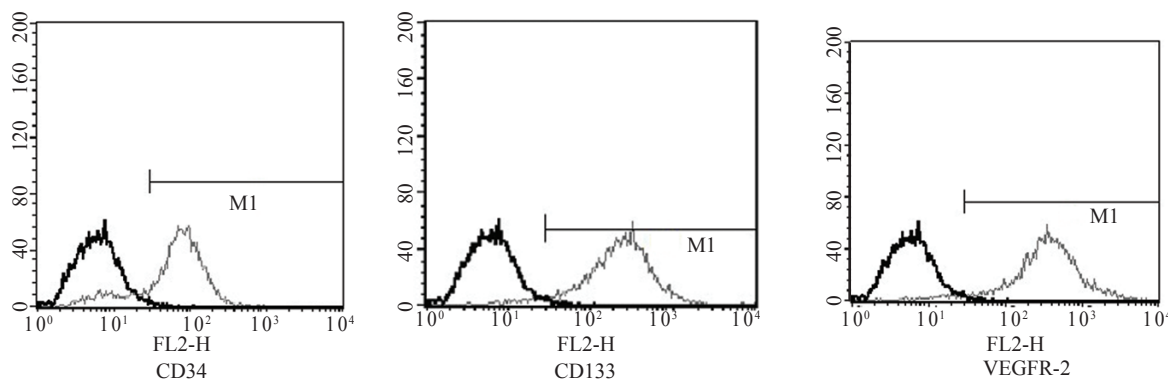


倒置显微镜下观察, 诱导培养的贴壁细胞第15 d表现出典型的“铺路石”的样外观(400 $\times$)。

The anchorage-dependent cells showed typical crazy-paving pattern under the inverted microscope at 15 days after induction culture(400 $\times$).

图1 培养的EPCs的形态

Fig.1 Cellular morphology of EPCs



流式细胞仪检测结果显示, CD34阳性率为 $56.61\%\pm 6.24\%$, CD133阳性率为 $49.36\%\pm 5.16\%$, VEGFR-2阳性率为 $54.70\%\pm 4.28\%$ 。

The positive rates of EPCs specific surface markers determined by the flow cytometry method were as following: CD34: $56.61\%\pm 6.24\%$, CD133: $49.36\%\pm 5.16\%$, VEGFR-2: $54.70\%\pm 4.28\%$ 。

图2 流式细胞仪检测EPCs表面标记

Fig.2 EPCs specific surface markers were determined by the flow cytometry

2.2 病毒液转染效果观察

倒置荧光显微镜观察示, A、B组分别在MOI值为200、100时转染的效果, 无明显细胞病变效应(图4)。

2.3 动物模型结果指标检测

X射线检查结果显示, 造模4周后股骨头出现坏死性变化(图5A)。2周后组织学观察显示成骨细胞等组织细胞变少, 骨小梁变细, 骨陷凹空虚(图5B)。

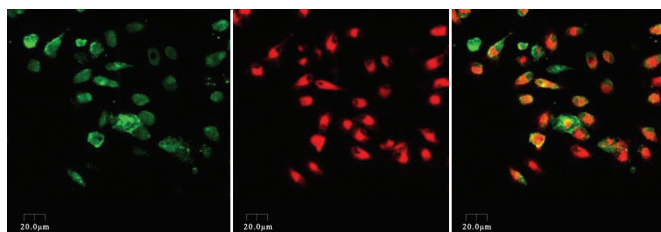
2.4 新生血管检测结果

CD34免疫组织化学结果显示, 200倍个视野范

围内移植后2周新生血管平均数: A组为 (10.96 ± 1.34) , B组为 (6.42 ± 0.84) , C组为 (2.72 ± 0.78) 。移植后4周A组为 (16.84 ± 1.76) , B组为 (9.28 ± 1.14) , C组为 (3.72 ± 1.32) (图6)。

2.5 免疫组织化学染色检测BMP-2表达

倒置相差显微镜观察显示, A组转染细胞阳性表达BMP-2, 阳性细胞数为 (15.40 ± 1.85) ; B、C组微表达BMP-2, 阳性细胞数分别为 (6.40 ± 1.36) 、 (5.80 ± 1.44) (图7)。

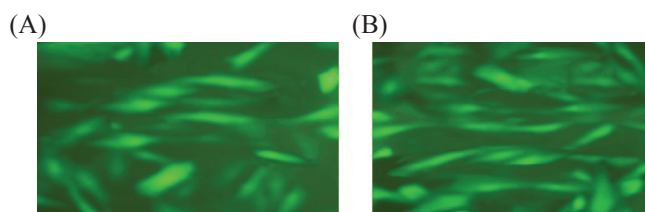


荧光显微镜下显示两种荧光颜色的细胞为内皮祖细胞, 其阳性率为50%左右。

The cells which showed two fluorescence colors under the fluorescence microscope were endothelial progenitor cells, the positive rates of which was about 50%.

图3 内皮祖细胞结合FITC-UEA-1和DiI-ac-LDL的能力(200×)

Fig.3 The ability of EPCs combining FITC-UEA-1 and DiI-ac-LDL(200×)

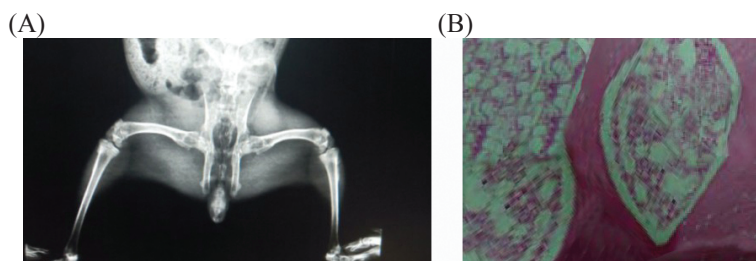


转染后3 d, 倒置显微镜下免疫荧光观察(200×)。A: MOI为200; B: MOI为100。

Transfection result was observed by the immunofluorescence microscopy at 3 days after transfection(200×). A: the value of MOI was 200; B: the value of MOI was 100.

图4 转染后倒置显微镜下免疫荧光观察

Fig.4 Transfection result observed by the immunofluorescence microscopy



A: X射线检查结果显示, 造模4周后股骨头出现坏死性变化; B: 2周后组织学检查显示成骨细胞等组织细胞变少, 骨小梁变细, 骨陷凹空虚(40×)。

A: necrotic changes of caput femoris were determined by the X-rays at 4 weeks after models establishment; B: the count of osteoblast was reduced, the bone trabecula was diminution and bone pouch was hollow was showed according to the histological examination at 2 weeks after models establishment (40×).

图5 动物模型指标检测结果

Fig.5 The determination of animal model index

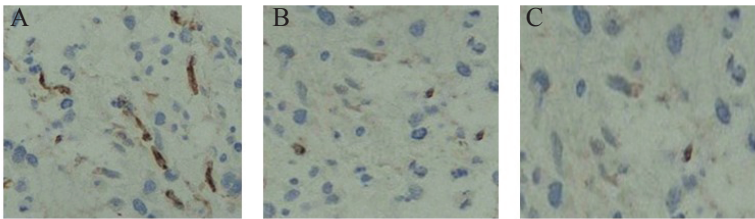


图6 A、B、C三组CD34免疫组织化学结果(200 $\times$)

Fig.6 Immunohistochemical results of CD34 in groups A, B and C(200 $\times$)

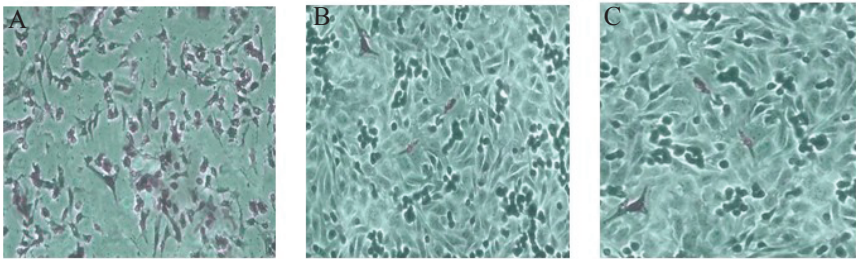


图7 A、B、C三组 MBP-2免疫组织化学结果

Fig.7 Immunohistochemical results of MBP-2 in groups A, B and C

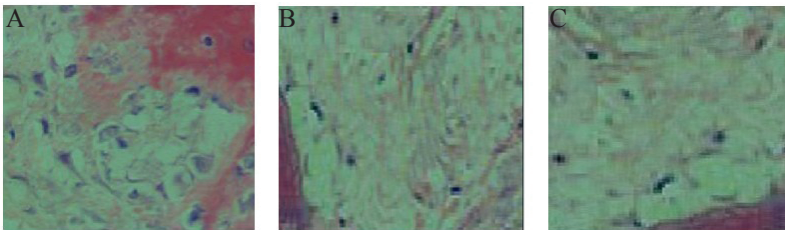


图8 A、B、C三组组织学检测坏死区修复情况

Fig.8 Repairation of necrotic zone according to the histological detection in groups A, B and C

2.6 组织学检测移植后股骨头坏死修复情况

移植4周及8周后组织学检测, A组可见新生骨小梁、毛细血管及成骨细胞等细胞成分。B组见有血管新生, 成骨细胞等组织细胞较少, 骨小梁变少, 骨陷凹空虚、C组未见明显变化(图8)。

3 讨论

股骨头缺血性坏死是骨科最常见的疾病之一, 患者数量较大, 西方发达国家每年有50万以上的患者因ANFH而进行人工髋关节、人工膝关节置换^[6]。股骨头发生缺血坏死后, 不仅骨的结构遭到破坏, 而且骨的强度也会降低, 所以发生骨坏死以后致残率也非常高。本课题选择马血清-激素的方式进行模型制作, 该方法操作简单、效果明显^[7], 并且通过X射线检查、组织学检查证明造模成功, 考虑造模中会有一些动物死亡等原因, 本实验共选取的实验动物为

50只, 其中造模过程中死亡5只, 造模后死亡4只, 再在剩余动物中随机选取36只分组。

目前, 干细胞移植治疗软组织缺血坏死已取得了明显的疗效^[8], 但在治疗骨缺血坏死方面的研究较少, 还需进一步探索。近年来的研究表明, 起关键作用的是血管内皮祖细胞, 其在治疗骨坏死成血管方面比其他干细胞具有更大的优越性^[9]。EPCs是当前医学领域研究的重要的原始细胞。最初在1997年由Asahara等^[10]成功分离出内皮祖细胞并在体内证明EPCs具有血管生成的能力, 是原始的内皮细胞。在众多骨生长因子中, BMP-2促进骨缺损修复和骨折愈合的效果最显著。目前, 大部分研究均采用腺病毒携带BMP-2基因来转染种子细胞促使其向成骨细胞分化, 用于修复骨缺损^[11]。HIF-1为DNA结合蛋白, 能促进VEGF内源性表达, 产生内源性VEGF及其受体, 促进毛细血管生成, 并且诱导的新生血管

具有不渗漏、炎症反应小、无组织水肿、无血管曲折和囊性血管形成等优点^[12]。因此, 本实验利用构建的单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu转染EPCs, 并且在倒置显微镜下免疫荧光观察转染成功。

近年来, 随着对EPCs生物学特性不断深入的研究以及分离、纯化等手段的不断改进, 目前认为EPCs的特殊表面标记为CD34、CD133、VEGFR-2^[13]。所以本实验进行这些表面标记的鉴定, 以检测诱导培养的细胞是否是EPCs, 结果表明阳性率较高。诱导培养的贴壁细胞能特异性结合DiI-ac-LDL和FITC-UEA-1, 其荧光染色结果表明阳性的细胞较多, 说明可以通过兔骨髓诱导培养MNC为EPCs。

本实验转染的EPCs制成细胞悬液移植入坏死局部, CD34免疫组织化学结果显示, 移植后2周新生血管平均每200倍视野A组为(10.96 $\pm$ 1.34), B组为(6.42 $\pm$ 0.84); C组为(2.72 $\pm$ 0.78); 移植后4周A组为(16.84 $\pm$ 1.76), B组为(9.28 $\pm$ 1.14), C组为(3.72 $\pm$ 1.32), 各时段新生血管情况A组与B组和C组比较都有统计学意义($P < 0.05$), B组与C组之间也有统计学差异($P < 0.05$)。BMP-2染色显示: A组转染细胞阳性表达BMP-2阳性细胞数为(15.40 $\pm$ 1.85), B、C组微表达BMP-2阳性细胞数分别为(6.40 $\pm$ 1.36)、(5.80 $\pm$ 1.44)。A组明显高于B、C组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。B组与C组差异无统计学意义($P > 0.05$)。移植4周及8周后组织学检测, A组可见新生骨小梁、毛细血管及成骨细胞等细胞成分; B组见有血管新生, 成骨细胞等组织细胞较少, 骨小梁变少, 骨陷凹空虚; C组未见明显变化。上述结果表明, 在血管形成方面实验组和对照组都与空白组有统计学意义, 而实验组与对照组相比也有统计学意义, 说明EPCs具有成血管作用, 但是转染单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu后的EPCs其成血管作用更强, 坏死区成骨检测结果表明, 实验组与对照组和空白组之间具有显著差异性, 而对照组与空白组之间没有统计学差异。初步证明移植转染单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu的EPCs具有较强地成血管能力及成骨作用, 可以更强的改善坏死局部血管的新生, 增加毛细血管密度, 促进新骨形成, 进而有助于延缓股骨头坏死甚至有利于股骨头坏死的修复。

综上所述, 本实验证明移植的转染单载体双基因Ad-BMP-2-IRES-HIF-1 α mu的EPCs在骨坏死区部位具有较强的成血管和成骨的双重能力, 为临床上

治疗股骨头缺血坏死提供了新的思路。

参考文献 (References)

- Huang ZG, Zhang XZ, Wang W. Avascular necrosis of the femoral head: Correlation of imaging and pathological findings. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010; 90(39): 2745-9.
- Feng Y, Yang SH, Xiao BJ. Decreased in the number and function of circulation endothelial progenitor cells in patients with avascular necrosis of the femoral head. *Bone* 2010; 46(1): 32-40.
- Xie W, Zhao M, Zhou W, Guo L, Huang L, Yu W, *et al.* Targeting of integrin-linked kinase with small interfering RNA inhibits VEGF-induced angiogenesis in retinal endothelial cells. *Ophthalmic Res* 2012; 49(3): 139-49.
- Kanzler I, Tuchscheerer N, Steffens G, Simsekylmaz S, Konchalla S, Kroh A, *et al.* Differential roles of angiogenic chemokines in endothelial progenitor cell-induced angiogenesis. *Basic Res Cardiol* 2013; 108(1): 310.
- 张解元, 袁虹, 李湛, 李全营, 郭威, 刘丹平. 腺病毒介导BMP-2联合低氧诱导因子1 α 突变型与单基因BMP-2分别转染BMSCs后成骨效应的比较研究. *中国修复重建外科杂志* (Zhang Jieyuan, Yuan Hong, Li Chen, Li Quanying, Guo Wei, Liu Danping. Comparative study on osteogenic effect of bone marrow mesenchymal stem cells transfected by adenovirus-bone morphogenetic protein 2-internal ribosome entry site-hypoxia inducible factor 1 α (mu) and by bone morphogenetic protein 2 single gene. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*) 2012; 26(9): 1105-9.
- Min BW, Lee KJ, Song KS, Bae KC, Cho CH. Highly cross-linked polyethylene in total hip arthroplasty for osteonecrosis of the femoral head: A minimum 5-year follow-up study. *J Arthroplasty* 2012; 28(3): 526-30.
- Wu X, Yang S, Duan D, Zhang Y, Wang J. Experimental osteonecrosis induced by a combination of low-dose lipopolysaccharide and high-dose methylprednisolone in rabbits. *Joint Bone Spine* 2008; 75(5): 573-8.
- Teng M, Geng Z, Huang L, Zhao X. Stem cell transplantation in cardiovascular disease: An update. *J Int Med Res* 2012; 40(3): 833-8.
- Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* 2007; 12(19/20): 853-9.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5230): 964-7.
- 林在俊, 朱振安, 汤婷婷, 戴冠戎, 楼觉人, 孟凡琳. HA复合rhBMP-2转染的BMSCs对羊胫骨延长骨愈合的影响. *中国修复重建外科杂志* (Lin Zaijun, Zhu Zhen'an, Tang Tingting, Dai Kerong, Lou Jueren, Meng Fanlin. The effect of HA mixed with adenovirus mediated rhBMP-2 transferred BMSCs of goats on distraction osteogenesis. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*) 2008; 22(2): 134-8.
- Wang JS, Liu X, Xue ZY, Alderman L, Tilan JU, Adenika R, *et al.* Effects of aging on time course of neovascularization-related gene expression following acute hind limb ischemia in mice. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124(7): 1075-81.
- Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: Mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1185-9.