

壹期煤工尘肺患者血清氧化应激指标水平变化

袁宝军¹, 廉玉兰², 李超¹, 王冬梅¹, 邹吉敏¹, 高利常¹, 佟艳艳¹

(1. 开滦总医院检验科, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 探讨壹期煤工尘肺 (CWP) 患者血清氧化应激指标血红素氧合酶-1 (HO-1)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、总抗氧化能力 (T-AOC)、8-异前列腺素 F2 α (8-iso-PGF2 α) 及脂质过氧化产物 (LPO) 水平变化及意义。方法 采用酶联免疫吸附法检测 33 名井上健康工人 (对照组), 40 名井下健康接尘矿工 (接尘组) 及 91 例壹期 CWP 患者 (CWP 组) 血清中 HO-1、Nrf2 和 8-iso-PGF2 α 水平; 化学比色法检测血清 T-AOC 和 LPO 水平。结果 与对照组比较, 接尘组 Nrf2、T-AOC 和 LPO 水平升高, CWP 组 LPO 水平升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), CWP 组 T-AOC 水平低于接尘组 ($P < 0.01$), CWP 组饮酒患者血清中 HO-1、Nrf2 和 8-iso-PGF2 α 水平低于非饮酒者 ($P < 0.05$)。CWP 组 HO-1 和 Nrf2、8-iso-PGF2 α , Nrf2 和 8-iso-PGF2 α 水平呈明显正相关 (r_s 值分别为 0.840、0.882、0.885, $P < 0.01$)。结论 氧化应激反应与壹期 CWP 发生发展有关; 饮酒可影响 CWP 患者氧化应激水平; 检测 T-AOC 水平有助于 CWP 的早期筛检。

关键词: 煤工尘肺 (CWP); 血红素氧合酶-1 (HO-1); 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2); 8-异前列腺素 F2 α (8-iso-PGF2 α); 总抗氧化能力 (T-AOC)

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2014)06-0410-04 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2014.06.003

Changes of serum oxidative stress indexes in patients with stage I coal worker's pneumoconiosis

YUAN Bao-jun*, LIAN Yu-lan, LI Chao, WANG Dong-mei, ZOU Ji-min, GAO Li-chang, TONG Yan-yan

(* . Department of Clinical Laboratory, Kai-luan General Hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** To explore the change and its significances of serum oxidative stress indexes such as heme oxygenase-1 (HO-1), nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α), total antioxidant capacity (T-AOC) and lipid peroxide (LPO) in patients with stage I coal worker's pneumoconiosis (CWP). **Methods** Thirty-three ground healthy workers, 40 healthy miners and 91 stage I coal worker's pneumoconiosis (CWP) patients were selected as control group, dust-exposed group and CWP group, taking their serum for detecting the levels of serum HO-1, Nrf2 and 8-iso-PGF2 α by enzyme-linked immunosorbent assays and the levels of T-AOC and LPO by chemistry colorimetric method. **Results** The result showed that compared with control group, the levels of Nrf2, T-AOC and LPO in dust-exposed group and LPO in CWP group significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the level of T-AOC was significantly lower in CWP group than that of dust exposed-group ($P < 0.01$); and drinking patients in CWP, the levels of HO-1, Nrf2 and 8-iso-PGF2 α were significantly lower compared with non-drinking patients (all $P < 0.05$). Additionally, there were significant positive correlations between HO-1 and Nrf2, 8-iso-PGF2 α or Nrf2 and 8-iso-PGF2 α in CWP ($r_s = 0.840$, 0.882 and 0.885 , respectively, all $P < 0.01$). **Conclusion** The results suggested that the oxidative stress reaction may play a major role in the occurrence and development of CWP, and drinking may affect the levels of serum oxidative stress indexes, and the detection of T-AOC may be beneficial to the early screening of CWP.

Key words: coal worker's pneumoconiosis (CWP); heme oxygenase-1 (HO-1); nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2); 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α); total antioxidant capacity (T-AOC)

暴露煤尘或煤矽尘可导致煤工尘肺 (CWP) 发生并进展为肺纤维化, 氧化/抗氧化反应失衡是 CWP 肺部炎症和纤维化发病机制之一^[1], 血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2) 与抗氧化作用密切相关, 8-异前列腺素 F2 α (8-iso-prostaglandin

F2 α , 8-iso-PGF2 α) 则是脂质过氧化的终末产物之一。最近研究显示, 氧化应激指标 HO-1、Nrf2 和 8-iso-PGF2 α 与鼠肺部纤维化进程有关^[2], 总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 反映各种抗氧化物质总的抗氧化水平, 脂质过氧化物 (lipid peroxide, LPO) 反映脂质过氧化水平, 也可间接反映机体自由基水平。本实验通过检测 HO-1、Nrf2、8-iso-PGF2 α 、T-AOC 和 LPO 等氧化/抗氧化指标水平, 观察其在壹期 CWP 患者体内引起的氧化应激状态, 为探讨 CWP 发病机制提供依据。

收稿日期: 2014-06-16

作者简介: 袁宝军 (1966—), 男, 主任技师, 教授, 主要从事临床免疫学实验诊断与研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2012—2013 年在开滦职业病防治院住院患者及查体人员,分如下几组:(1) CWP 组,91 例壹期 CWP 患者,其中包括单纯壹期 CWP 患者 17 例、并发性阻塞性肺疾病 (COPD) 15 例、并发肺气肿 59 例;工种分布为井下采煤工 22 例、掘进工 57 例、开拓工 10 例、瓦斯监测工 1 例和地质测量工 1 例;年龄 53 ~ 69 岁,平均 (60.09 ± 3.73) 岁;接尘工龄 8 ~ 38 年,平均 (27.18 ± 7.32) 年。均经开滦职业病防治院按照 2009 年国家尘肺诊断标准 (GBZ70—2009) 确诊。(2) 接尘组,40 名具备与病例组相同接尘条件的健康井下接尘矿工,年龄 53 ~ 70 岁,平均 (59.40 ± 5.57) 岁;接尘工龄 7 ~ 37 年,平均 (29.30 ± 7.00) 年。(3) 对照组,33 名非接尘井上健康查体人员,年龄 50 ~ 79 岁,平均 (60.55 ± 9.31) 岁。所选对象均为男性,且无心、脑、肝、肾等脏器疾病及糖尿病、自身免疫性疾病以及近期明显肺部感染史。经统计学分析,各组年龄及接尘年限差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。研究对象均已签署知情同意书并得到开滦总医院医疗伦理委员会批准。

1.2 标本采集

研究对象均于早晨空腹采集肘静脉血 4 ml,室温状态下静置 1 h,放在低温离心机中,3000 r/min (离心半径 17.5 cm) 低温离心 10 min,取血清放入 EP 管中,储存于 -70℃ 的冰箱中,待统一测定。

1.3 主要试剂与仪器

人血清 HO-1 酶联免疫试剂盒、Nrf2 酶联免疫试剂盒、8-iso-PGF2 α 酶联免疫试剂盒、T-AOC 比色法试剂盒和 LPO 比色法试剂盒均购自南京建成生物研

究所;美国 Awareness 公司生产的 Stat Fax-2100 酶标仪和 Stat Fax-2600 洗板机以及上海第三分析仪器厂生产的 722 型光栅分光光度计。所用试剂使用前均平衡至室温,测定严格按操作说明书执行。

1.4 统计学处理

运用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。计量资料进行正态性检验,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两均数比较采用 t 检验;偏态分布的计量资料以中位数 (M)、四分位数间距 (Q) 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,多组间的两两比较采用 Nemenyi 检验, Mann-Whitney U 检验用于两组间的比较,采用 Spearman 方法进行相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2 α 和 LPO 水平变化

检验结果显示, Nrf2、T-AOC 和 LPO 各组间差异有统计学意义,而 HO-1 和 8-iso-PGF2 α 无明显差异。与对照组比较,接尘组 Nrf2、T-AOC 和 LPO 水平明显增高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中 T-AOC 升高 3.94 倍, LPO 升高 13.5 倍, HO-1 和 8-iso-PGF2 α 水平虽也升高但无统计学意义 ($P > 0.05$); CWP 组只有 LPO 增高明显, LPO 升高 8.54 倍,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), Nrf2 和 T-AOC 水平升高、HO-1 和 8-iso-PGF2 α 呈下降趋势,但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 CWP 组与接尘组比较, HO-1、Nrf2、8-iso-PGF2 α 、T-AOC 和 LPO 水平均降低, T-AOC 降低具有统计学意义 ($P < 0.01$),其他指标变化均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 血清 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2 α 和 LPO 水平变化 (以 M 和 Q 表示)

组别	例数	HO-1 (ng/ml)	Nrf2 (ng/ml)	T-AOC (U/ml)	8-iso-PGF2 α (pg/ml)	LPO (μ mol/L)
CWP 组	91	8.24, 9.15	1.94, 3.43	4.19, 3.08*	29.82, 54.88	6.24, 3.77 $\blacktriangle\blacktriangle$
接尘组	40	12.24, 16.69	3.89, 6.24 \blacktriangle	8.76, 4.75 $\blacktriangle\blacktriangle$	44.96, 81.10	9.60, 9.02 $\blacktriangle\blacktriangle$
对照组	33	8.30, 13.58	1.52, 3.03	2.22, 5.86	39.80, 65.16	0.73, 1.13
χ^2 值		2.657	8.809	34.075	2.705	55.462
P 值		0.265	0.012	0.000	0.259	0.000

注:与对照组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与接尘组比较, $\star P < 0.01$ 。

2.2 壹期 CWP 及其并发症以及不同接尘年限患者血清中 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2 α 和 LPO 水平变化

检验结果显示,单纯壹期 CWP 组、CWP 并发 COPD 组及 CWP 并发肺气肿组血清 HO-1、Nrf2、T-

AOC、8-iso-PGF2 α 和 LPO 水平无明显变化,差异无统计学意义 (χ^2 值分别为 1.940、1.864、4.356、1.290 和 3.498; P 值分别为 0.379、0.394、0.113、0.525 和 0.174)。接尘年限 < 25 年、25 ~ 30 年和 > 30 年 3 组结果显示,壹期 CWP 患者血清 HO-1、Nrf2、

T-AOC、8-iso-PGF2α 和 LPO 水平均无明显改变, 差异无统计学意义(χ^2 值分别为 2.024、3.769、1.216、1.671 和 2.530, P 值分别为 0.363、0.152、0.544、0.434 和 0.282), 见表 2。

表 2 单纯壹期 CWP 及其并发症、不同接尘年限患者血清中 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2α 和 LPO 水平变化 (以 M 和 Q 表示)

组别	例数	HO-1 (ng/ml)	Nrf2 (ng/ml)	T-AOC (U/ml)	8-iso-PGF2α (pg/ml)	LPO (μmol/L)
单纯 CWP 组	17	8.24, 7.22	2.09, 2.31	3.70, 2.28	27.11, 38.39	5.49, 5.26
并发症						
CWP 并发 COPD 组	15	6.75, 6.92	1.42, 2.84	4.19, 5.18	21.79, 38.76	6.30, 3.22
CWP 并发肺气肿组	59	8.82, 11.20	2.19, 3.85	4.69, 3.70	35.68, 61.06	7.10, 3.81
接尘时间 (年)						
<25	26	7.84, 16.29	2.17, 6.16	5.00, 4.47	32.20, 84.79	6.15, 3.48
25~30	26	9.76, 16.99	1.91, 6.07	4.13, 2.44	35.52, 83.91	5.05, 5.87
>30	39	7.68, 6.23	1.66, 2.36	4.19, 3.20	26.13, 40.44	6.49, 4.53

2.3 壹期 CWP 饮酒与非饮酒患者血清 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2α 和 LPO 水平变化

结果显示, 饮酒的壹期 CWP 患者血清中 HO-1、Nrf2 和 8-iso-PGF2α 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), T-AOC 和 LPO 水平也有降低趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 饮酒对壹期 CWP 患者血清中 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2α 和 LPO 水平的影响 (以 M 和 Q 表示)

组别	例数	HO-1 (ng/ml)	Nrf2 (ng/ml)	T-AOC (U/ml)	8-iso-PGF2α (pg/ml)	LPO (μmol/L)
饮酒组	41	7.29, 4.30*	1.57, 1.68*	4.19, 3.82	25.05, 28.88*	6.14, 7.62
非饮酒组	50	9.95, 15.68	2.40, 5.21	4.26, 2.77	35.97, 77.41	6.49, 3.15
Z 值		-2.122	-2.138	-0.582	-2.253	-0.311
P 值		0.034	0.033	0.560	0.024	0.756

注: 与非饮酒组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 壹期 CWP 患者血清 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2α 和 LPO 的相关性分析

相关分析结果显示, 壹期 CWP 组 HO-1 与 Nrf2、HO-1 与 8-iso-PGF2α、Nrf2 与 8-iso-PGF2α、T-AOC 与 LPO、8-iso-PGF2α 与 LPO 均呈正相关 (r_s 值分别为 0.840、0.882、0.885、0.316 和 0.292, P 值分别为 0.000、0.000、0.000、0.016 和 0.026), 其余各指标之间均不相关 ($P > 0.05$)。

3 讨论

氧化应激反应在 CWP 肺部炎症及纤维化形成中具有重要作用, 表现为肺部吞噬细胞激活的氧化物超过抗氧化物的抵抗, 引起脂质过氧化、蛋白亚硝基化、细胞损伤及肺部瘢痕^[1]。

HO-1 是血红素氧合酶同工酶之一, 为诱导型血红素氧合酶, 可被多种能够产生氧化应激的因素激活, 以减少细胞损伤、蛋白质氧化及脂质过氧化。研究证实, HO-1 参与矽尘引起的氧化应激, 发挥抗氧化保护作用^[3], 也可抑制矽尘暴露后引起的急性肺炎^[4]。Nrf2 在生理条件下, 通过胞浆中的不断降解以维持细胞内平衡。当受到氧化应激刺激时, 其稳定性增加并被激活, 转移入核后与相应蛋白形成二聚体并激活 HO-1 基因转录^[5], 研究发现, Nrf2 可通过调节抗氧化酶对博莱霉素诱导的纤维化起保护作用

用^[6]。8-iso-PGF2α 是自由基催化细胞膜上的花生四烯酸发生脂质过氧化后的稳定终末产物, 可促进细胞分裂, 趋化单核细胞和中性粒细胞粘附于内皮细胞, 形成慢性炎症反应和氧化应激。而 T-AOC 代表体内酶类少数小分子量抗氧化物质和非酶类抗氧化物质的总和, 反映各抗氧化物之间相互联系、协同保护作用的关系。LPO 是脂类中不饱和脂肪酸和自由基过氧化产物对细胞起破坏作用时产生物的总称, 为脂质氧化的主要产物。

本次研究显示, 与对照组比较, 接尘组 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2α 和 LPO 水平均升高, 而且 T-AOC、Nrf2 和 LPO 升高明显, 认为接尘工人体内煤尘破坏巨噬细胞引起细胞膜发生脂质过氧化反应, 同时导致抗氧化物水平反应性升高, 发挥抗氧化保护作用。而 CWP 组 Nrf2、T-AOC 和 LPO 水平也升高, 但 Nrf2 和 T-AOC 水平升高不明显、HO-1 和 8-iso-PGF2α 水平呈下降趋势, 氧化应激反应异常, 而且在与接尘组比较中发现, CWP 组 5 项检测指标水平均下降, 可能 CWP 患者机体抗氧化水平随患病时间延长及病情发展不断损伤消耗, HO-1 低表达可能与细胞内促进纤维化的微环境有关^[7], 而 8-iso-PGF2α 的降低则可能是因其形成被超氧化物歧化酶和二甲基苯基抑制所致^[8]。本次研究还发现,

CWP 组和接尘组 LPO 升高程度远高于 T-AOC, 认为两组间氧化应激反应中, 总体自由基氧化强度强于抗氧化能力, 体内氧化作用占优势。而 CWP 组 T-AOC 水平明显低于接尘组, 可能对早期筛查 CWP 具有一定意义, 以 T-AOC 早期发现 CWP 灵敏度达 70.5%, 特异度达 68.1%^[9]。

对壹期 CWP 患者不同接尘年限及肺部并发症的研究发现, HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2 α 和 LPO 水平变化不大, 接尘年限和肺部并发症在 CWP 发生发展中对氧化应激指标可能无明显影响。而在对 CWP 饮酒与非饮酒患者血清氧化应激指标进行分析时发现, 饮酒患者血清 HO-1、Nrf2 和 8-iso-PGF2 α 水平显著降低, 提示饮酒可影响体内氧化应激指标水平变化, 致氧化/抗氧化水平下降而失衡。于洪志等^[10]研究发现, 慢性饮酒大鼠肺组织羟脯氨酸和结缔组织生长因子含量均升高, 谷胱甘肽含量降低, 认为慢性饮酒可使抗氧化物质减少, 抗氧化功能受损, 所致氧化应激反应可能是导致肺纤维化的因素之一。

有研究发现, Nrf2 缺乏可使鼠肺中 HO-1 等解毒酶的表达下降, HO-1 蛋白的表达受 Nrf2 调控^[11]。致纤维化药物可使 Nrf2 缺陷鼠生存率降低, 肺纤维化评分及氧化应激指标 8-异前列腺素水平升高, HO-1 mRNA 表达水平显著降低, Th1/Th2 平衡向 Th2 方向移动, 认为 Nrf2 可能影响 T 细胞的分化和细胞因子产生, 并通过调节细胞氧化还原水平及 Th1/Th2 平衡对抗肺纤维化进程^[2]。本实验对壹期 CWP 患者血清 5 项检测指标相关性分析结果显示, HO-1 与 Nrf2、HO-1 与 8-iso-PGF2 α 、Nrf2 与 8-iso-PGF2 α 、8-iso-PGF2 α 与 LPO、T-AOC 与 LPO 均呈正相关, 且 HO-1、Nrf2 和 8-iso-PGF2 α 三者间相关性均较强, 说明三者关系密切, 寻找这 3 项指标间及与其他关键因子确切的作用方式尤为重要, 但各种氧化抗氧化相关因子可能相互作用或受其他系统因子影响, 导致了氧化抗氧化机制的复杂性。

综上所述, CWP 组氧化应激反应异常, 氧化应激程度弱于接尘组, 可能与 CWP 发生发展有关, 且以氧化作用占优势。由于贰期和叁期 CWP 患者例数较少, 我们将在今后的研究中继续扩大相关病例, 以明确 HO-1、Nrf2、T-AOC、8-iso-PGF2 α 和 LPO 在 CWP 不同期别中的变化。

参考文献:

- [1] Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108 (4): 675-684.
- [2] Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, et al. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance [J]. *Respir Res*, 2010, 11 (1): 31-42.
- [3] 张海英, 邹伟明, 李慧祺, 等. 染尘巨噬细胞上清液对人胚肺成纤维细胞应激蛋白诱导表达 [J]. *中国职业医学*, 2008, 35 (2): 105-107.
- [4] Sato T, Takeno M, Honma K, et al. Heme oxygenase-1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2006, 174 (8): 906-914.
- [5] Miyazaki T, Kirino Y, Takeno M, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor Bach1 [J]. *Cancer Science*, 2010, 101 (6): 1409-1416.
- [6] Cho H Y, Reddy S, Yamamoto M, et al. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis [J]. *The FASEB Journal*, 2004, 18 (11): 1258-1260.
- [7] Ye Q, Dalavanga Y, Poulakis N, et al. Decreased expression of heme oxygenase-1 by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *European Respiratory Journal*, 2008, 31 (5): 1030-1036.
- [8] 牟海英, 马静. 8-异前列腺素 F2 α 与氧化应激损伤性疾病的研究进展 [J]. *国外医学·卫生学分册*, 2007, 34 (6): 377-381.
- [9] 范红敏, 袁聚祥, 秦天榜, 等. 8 项氧化损伤指标筛检煤工尘肺患者作用比较 [J]. *中国职业医学*, 2011, 38 (4): 298-301.
- [10] 于洪志, 吴琦, 杜钟珍, 等. 慢性饮酒引起大鼠肺组织损伤及肺纤维化 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2012, 11 (4): 367-370.
- [11] Chan K, Kan Y W. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96 (22): 12731-12736.

(上接第 409 页)

- [8] 黄丽蓉, 陈朝东, 李敏, 等. 某五金制品厂手臂振动病调查分析 [J]. *职业卫生与应急救援*, 2011, 29 (2): 73-75.
- [9] 谢谦怀. 手传振动作业工人暴露水平及手臂损伤影响因素分析 [J]. *职业卫生与应急救援*, 2013, 31 (4): 175-178.
- [10] 刘谔, 赵琴平, 董惠芬, 等. TGF- β 信号转导通路及其生物学功能 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9 (1): 77-82.
- [11] 任敏. 芩丹胶囊对血管外膜成纤维细胞 TGF- β /Smad 信号转导通路影响的研究 [D]. 山东大学. 2011: 38-39.
- [12] Tu X, Zhang H, Zhang J, et al. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF- β signalling pathway [J]. *Pathology*,

2014, 234 (1): 46-59.

- [13] 王海燕, 何创, 肖建斌, 等. 转化生长因子- β 1 抗体对肺损伤纤维化大鼠细胞外基质重建紊乱的调控 [J]. *医学研究生学报*, 2014, 27 (4): 368-372.
- [14] 张国华. TGF- β /Smad 信号通路在高血压心肌纤维化中的调控机制研究进展 [J]. *山东医药*, 2014, 34 (7): 85-87.
- [15] Painemal P, Acuna M J, Riquelme C. Transforming growth factor type beta 1 increases the expression of angiotensin II receptor type 2 by a SMAD-and P38 MAPK-dependent mechanism in skeletal muscle [J]. *Biofactors*, 2013, 39 (4): 467-475.