

文章编号: 1672-3384(2010)-04-0004-05

非胰岛素类降糖药物的应用研究

【作者】 胡红琳 王长江

安徽医科大学第一附属医院内分泌科 (合肥市 230022)

【摘要】 新型抗糖尿病药物通过不同于传统药物的作用机制,针对某些特殊的靶点进行干预,为糖尿病的药物治疗提供了新的途径。应根据其不同作用机制,合理选择适用范围,最大程度发挥其降糖作用,降低不良反应的发生。本文根据降糖药物的作用机制和结构,对非胰岛素类降糖药物如胰岛素促泌药、双胍类、噻唑烷二酮类、 α -糖苷酶抑制药、胰高血糖素样肽-1类似物和受体激动药、二肽基肽酶-4抑制药、胰淀素、钠-葡萄糖转运体抑制药等的现状和进展进行综述。

【关键词】 糖尿病;非胰岛素类降糖药物

【中图分类号】 R587.1;R977.15

【文献标识码】 A

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是由于胰岛素分泌不足和(或)胰岛素作用缺陷所致的一种以慢性高血糖为主要表现的临床综合征,其主要临床表现为多饮、多尿及多食和体重降低,但多数患者可能没有任何症状。DM的危害主要为其慢性高血糖而导致的血管和神经的损伤,机体重要器官的功能障碍,最终导致患者残疾或寿命缩短。DM不仅给患者带来生理和心理的痛苦,也令患者家庭和社会背负沉重的经济负担。然而,我国DM的患病率正逐年上升,新近研究表明,我国>20岁成年人DM患病率已达9.7%,估计全国DM患病总人数高达0.924亿之多,DM前期人群达1.428亿,可能使我国成为全球DM患病人数最多的国家^[1]。DM治疗的方法包括生活方式干预(饮食控制与运动)、降糖药物(或抗糖尿病药物)的使用、病情监测和教育等综合措施。生活方式的干预只能使很少一部分DM患者的血糖控制在理想范围,绝大多数患者需要在生活方式干预的同时,加用合适的药物治疗,才能将血糖控制达标。近年来DM药物治疗领域有较多进展,包括新型作用途径的降糖药物开发及传统降糖药物作用途径的研究,为临床能更好地控制DM提供了有效的方法。现就非胰岛素类降糖药物的研究进展进行综述。

1 口服降糖药物

1.1 促胰岛素分泌药

1.1.1 磺酰脲类药物(SUs) SUs是最早应用的口服降糖药物之一,此类药物通过调节胰岛素 β 细胞膜上ATP依赖性 K^+ 通道的活性而促进胰岛素分泌。SUs与胰岛 β 细胞膜上特异性受体结合,抑制ATP敏感的 K^+ 通道,开放电压依赖性 Ca^{2+} 通道使 Ca^{2+} 内流,胞内 Ca^{2+} 浓度增加,胰岛素释放。SUs化学结构如下: R_1 -苯环-SO₂-NH-CO-NH- R_2 。其中,磺酰脲母核决定了其降糖作用, R_1 及 R_2 决定降糖作用的强度和长短。其通过刺激胰腺 β 细胞分泌胰岛素(不刺激其合成),且增强组织对胰岛素的敏感性和对葡萄糖的摄取,从而降低血糖。甲苯磺丁脲(D860)属于第一代磺酰脲类药物,其降糖作用较弱,适用于单用饮食控制疗效不满意的轻、中度2型糖尿病(T2DM),近年来已逐渐被第二代磺酰脲类药物格列奇特、格列吡嗪、格列美脲等所取代,临床上用于胰岛功能尚存的T2DM且单用饮食控制无效者。低血糖是SUs常见的不良反应,其他不良反应有胃肠道反应、皮肤过敏、肝功能异常、白细胞减少及神经系统反应等^[2],开始治疗时宜小剂量给药,缓慢增加剂量,原则上SUs不联合使用。格列美脲为长效SUs制剂,可每日服用1次,患者依从性好。缓释或控释剂型SUs也可起到与长效SUs类似效果,每日使用1次,改善患者依从性,如格列奇特及格列吡嗪的缓释或者控释剂型。

1.1.2 格列奈类降糖药 又称餐时血糖调节药,是非磺酰脲类促胰岛素分泌药,与磺酰脲类受体结合,但结合位点不同,其有以下优点:能模拟人胰岛素的生理分泌模式,刺激餐后快时相胰岛素分泌,抑制餐后游离脂肪酸水平、有利于改善 β 细胞脂毒性。格列奈类药物起效快,低血糖发生少,在餐前服用,仅在进餐时刺激胰岛素分泌,避免了在空腹时对 β 细胞的不恰当刺激,有节省体内胰岛素之说,目前有瑞格列奈、那格列奈和米格列奈等,主要的不良反应为低血糖、头痛、恶心、呕吐、腹泻、消化不良等,罕见肝功能受损^[3]。

1.2 双胍类药物

双胍类降糖药由两个胍基和一条侧链组成,目前临床使用的主要是二甲双胍。自20世纪50年代上市以来,二甲双胍已经成为临床应用最广泛的降糖药物。二甲双胍可促进周围组织中糖的无氧酵解,抑制或延缓葡萄糖在胃肠道的吸收,抑制肝和肾的糖异生作用,并可抑制脂肪组织分解,降低非酯化脂肪酸水平,减轻其对 β 细胞的脂毒性,改善胰岛素抵抗;能增强胰岛素与其受体的结合及作用,即具有一定的胰岛素增敏作用。二甲双胍的优势在于它是目前唯一有证据表明可以降低肥胖性T2DM患者心血管并发症的降糖药物,其心血管保护作用可能是独立于降糖作用^[4]。DPP研究表明二甲双胍可预防肥胖伴有DM倾向者发生DM。Cochrane荟萃分析结果显示,与 α -糖苷酶抑制药、二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制药和噻唑烷二酮类药物相比,二甲双胍能更有效降低糖化血红蛋白(HbA_{1c})水平。常见不良反应有消化道反应,如食欲不振、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等;少见不良反应包括乳酸酸中毒,多见于使用苯乙双胍的患者,且在肝肾功能不全或伴有缺氧状态时容易发生。因为二甲双胍本身并不增加肝肾功能正常和非缺氧状态下体内乳酸浓度,组织缺氧状态是发生乳酸酸中毒的始动因素,肝肾功能不全时乳酸代谢存在障碍。因此要严格掌握适应证,在一些有风险的人群中使用应从小剂量开始,如老年患者,初始剂量及最

大剂量可为一般人群的1/3,并注意监测乳酸水平和肾功能,如血浆乳酸 $>3\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 应停药,如此对老年患者依然可以取得良好的降糖效果,且较为安全。

1.3 α -糖苷酶抑制药

作用机制是抑制小肠上段的 α -葡萄糖苷酶,阻断糖类分解成葡萄糖,延缓吸收,能改善餐后血糖的高峰;还具有增加外周组织对胰岛素的敏感性、减轻胰岛素抵抗的作用^[5]。 α -糖苷酶抑制药适用于各型DM患者,尤其是餐后血糖增高者。此类药物有阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇。国外的研究显示 α -糖苷酶抑制药降糖效果较弱,但由于国人饮食习惯与欧美人群有较大差异, α -糖苷酶抑制药对我国DM患者的疗效较为显著。不良反应主要为消化道反应,如腹部不适、胀气、排气增多等。坚持服用或减量可减轻这些症状。 α -糖苷酶抑制药单独使用不会发生低血糖,但在和磺酰脲类药物或胰岛素降糖药合用时例外。如出现低血糖,应口服葡萄糖或静脉注射葡萄糖。 <18 岁、妊娠及哺乳者禁用。

1.4 噻唑烷二酮类药物(TZDs)

1.4.1 PPAR- γ 激动药 主要作用机制为激活PPAR- γ ,从而调节胰岛素应答基因的转录,控制血糖的生成、转运和利用。能增强组织摄取和氧化葡萄糖,增加糖原和脂肪的合成,减少糖原分解和肝糖的输出,而降低血糖和血浆游离脂肪酸,减轻对 β 细胞的“糖毒性”和“脂毒性”作用。在多个环节降低机体胰岛素抵抗,增强胰岛素的敏感性,故又称胰岛素增敏药。目前临床上使用的TZDs有罗格列酮(rosiglitazone)和吡格列酮(pioglitazone)。ADOPT研究评估了未经治疗的新诊断T2DM患者接受罗格列酮、二甲双胍或磺酰脲类单一药物治疗的长期血糖控制。经过平均4年的治疗,罗格列酮组、二甲双胍组及格列本脲组发生单药失效率分别为15%、21%和34%。与二甲双胍或格列本脲相比,罗格列酮能延缓单药失效的进展,更能使HbA_{1c}水平长期维持 $<7\%$,改善胰岛素敏感性及 β 细胞功能。RECORD研究也证实罗格列酮可持久

控制血糖。TZDs 常见不良反应是体重增加和水肿,这种不良反应在与胰岛素联合使用时表现更加明显。由于存在体液潴留的不良反应,已经有潜在心力衰竭危险的患者应用该类药物可以导致心力衰竭加重。文献报道,罗格列酮具有潜在的安全性问题,可能大幅度增加心脏病风险,导致死亡率增加。RECORD 研究显示,与二甲双胍或磺酰脲类药物相比,罗格列酮并不增加总体心血管住院或心血管死亡风险,而心肌梗死、卒中或任何类型死亡的次要终点事件,两组无显著差异。BARI-2D 研究在明确患有冠心病的 T2DM 患者(心血管疾病高危人群)中,评估罗格列酮与胰岛素治疗对死亡率和心血管事件发生率的影响,结果显示,两组全因死亡和主要不良心脏事件(MACE)发生率亦无显著差异。对于既往已有缺血性心脏病的 T2DM 患者,应谨慎应用罗格列酮,心功能Ⅱ级以上患者禁用,以免增加其充血性心力衰竭发生风险。TZDs 单独使用时不导致低血糖,但与胰岛素或促胰岛素分泌药联合使用时可增加发生低血糖的风险。在使用 TZDs 之前应检查肝功能并在使用过程中注意肝功能的监测。近期,RECORD 研究提示此类药物可能增加女性患者骨折的风险,故骨折高危人群应慎用 TZDs,以避免增加骨折发生概率。

1.4.2 无 PPAR- γ 亲和力的 BLX1002 为无 PPAR 亲和力的新型 TZDs,它具有酪氨酸和噻唑烷二酮部分,但对 PPAR- α 、 β 、 γ 无亲和力。在高血糖时通过 PIK3 相关的方式增强腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)活性,提高细胞内 Ca^{2+} 的浓度,刺激胰岛素释放,而不引起低血糖^[6]。

1.4.3 PPAR- α/γ 双重激动药 目前 PPAR- α/γ 双重激动药还处于临床研究中,它不但具有 TZDs 减少胰岛素抵抗的作用,而且还能改善脂质代谢过程,包括降低甘油三酯水平,改善脂蛋白比例。目前 PPAR- α/γ 双重激动药有 nateglitazar、奈格列酮(netoglitazone)、莫格列扎(muraglitazar)、拉格列扎(ragaglitazar)、替格列扎(tesaglitazar)、伊格列扎(imiglitazar)、MK767、LY929、aleglitazar 等。虽然此

类药物在临床前研究可以改善糖、脂代谢,但是部分药物在临床Ⅱ、Ⅲ期研究中因为不良反应而不得不中止,如莫格列扎高度诱发水肿和心力衰竭,替格列扎会升高血肌酐水平、降低肾小球滤过率。SYNCHRONY 研究发现 aloglitazar 与安慰剂相比,显著改善 HbA_{1c} 水平,而且与剂量呈相关性,剂量 < 300 μg ,发生水肿、心力衰竭与安慰剂无显著差别,与吡格列酮相比,水肿、体重增加显著低于后者^[7]。

2 基于肠促胰岛素的降糖药物

2.1 胰高血糖素样肽-1 (glucagons-like peptide-1, GLP-1) 受体激动药和类似物

GLP-1 是一种强降血糖肽,是前胰高血糖素原的片段,由小肠上皮 L 细胞分泌。GLP-1 可刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素和抑制餐后胰高血糖素过度分泌,减少肝糖生成,刺激胰岛 β 细胞增殖和分化,抑制食欲,增加饱食感,延缓胃内容物排空等。研究发现,T2DM 患者持续皮下注射 6 周 GLP-1 能明显增加胰岛素的分泌。这种促胰岛素分泌作用是血糖依赖性的,即血糖浓度越高作用越强,低血糖发生少。短时间内使用 GLP-1 治疗 T2DM 的价值和安全性已经得到证实,但是内源性 GLP-1 的血浆半衰期仅 1 min。exendin-4,是一种源自大毒蛇唾液的 GLP-1 类似物,与人 GLP-1 有 53% 的同源性,具有极强的 GLP-1 受体激动作用。由于其缺乏 DPP-4 酶解的位点,不是 DPP-4 的底物,能够对抗 DPP-4 的降解,因而半衰期较长。艾塞那肽是美国 Amylin 和礼来制药公司共同开发人工合成的 exendin-4,商品名 Byetta,主要适用于 T2DM 的治疗,其在体内的半衰期达到 4h 左右,目前批准的制剂为皮下注射, bid。T2DM 患者治疗后,能降低餐前、餐后血糖水平和 HbA_{1c} 水平,对 β 细胞具有明显的保护作用。艾塞那肽还能降低 β 细胞的凋亡率、增加胰岛素敏感性,并能延迟胃排空和抑制食欲,表明其治疗作用的多重性。目前研发并在临床使用的 GLP-1 类似物较多,诺和诺德公司研制的利拉鲁肽,是一种酰胺化修饰的 GLP-1 类似物。利拉鲁肽经皮下注射后逐渐被机体吸收,在 9 ~ 12h 后达到峰值,其半

衰期为 12h。LEAD 研究结果显示,每天注射 1 次,利拉鲁肽具有优异的降糖效果,无论其单独应用还是与其他口服降糖药联用,均能迅速、高效和持久地降低血糖及 HbA_{1c} 水平。有研究表明在二甲双胍控制不佳的 T2DM 患者,加用利拉鲁肽较加用西格列汀能更好的降低 HbA_{1c} 水平^[8]。此类药物目前临床已有长效剂型,如瑞士罗氏公司研制的长效 GLP-1 类似物 *tasoglutide*,每周使用 1 次,现已在国内进入 III 期临床试验。加拿大 ConjuChem 公司研发的 CJC-1131 也是 GLP-1 化学修饰后的物质,其与清蛋白共价结合的共价复合物,既有与清蛋白同样的半衰期,也具有 GLP-1 生理活性。GLP-1 受体激动药和 GLP-1 类似物不良反应:注射部位反应、味觉改变、失眠、与华法林合用时国际比值 (INR) 延长、过敏反应和胃肠道反应。

2.2 二肽基肽酶-4 抑制药

GLP-1 皮下注射后很快被 DPP-4 降解,半衰期极短。DPP-4 抑制药则能抑制 GLP-1 和葡萄糖依赖性促胰岛素激素 (GIP) 的降解,保护内源性 GLP-1 免受 DPP-4 的迅速破坏,从而使血清 GLP-1 水平升高,致使葡萄糖刺激的胰岛素分泌增加。而且此类药物不增加 DM 患者体重,刺激胰岛素的作用与血糖相关,致低血糖风险小,又能保护胰岛,促进胰岛再生,此类药物有西格列汀 (*januvia*, *sitagliptin*), 维格列汀 (*vildagliptin*) 和沙格列汀 (*saxagliptin*) 等。西格列汀为默克公司产品,于 2006 年 10 月和 2007 年 3 月相继获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 及欧洲药品管理局 (EMA) 批准上市,2009 年 9 月,西格列汀单药治疗 T2DM 获得中国国家食品药品监督管理局 (SFDA) 批准,成为首个登陆中国的口服 DPP-4 抑制药。西格列汀能够有效地降低血糖,没有水肿和体重增加的不良反应。Aschner 等比较了西格列汀单药与二甲双胍单药治疗初治 T2DM 患者的疗效和安全性,研究共纳入 1050 例初治的 T2DM 患者,发现西格列汀组 HbA_{1c} 水平的改善同二甲双胍组相当,耐受良好,西格列汀组胃肠道相关不良反应发生率^[9]。Seck 等对二甲双胍单药无效 (每日 $\geq 1500\text{mg}$,持续 ≥ 8 周) 的 172 例

T2DM 患者,随机双盲接受西格列汀或格列吡嗪治疗的 2 年研究观察,结果显示两组降糖效果相当,西格列汀组低血糖的发生更少,不增加体重,更好地保护 β 细胞功能^[10]。另有研究用于考察西格列汀和其他降血糖药 (二甲双胍) 联合用药,结果表明作为 DM 的初始治疗,二甲双胍和西格列汀联合同样有效^[11]。2007 年 3 月 30 日,西格列汀与二甲双胍复方制剂——*Janumet*[®] 也通过了 FDA 的审批,成为第一个由 DPP-4 抑制药和其他降血糖药组成的复方制剂。诺华公司生产的维格列汀也在欧洲于 2007 年批准上市,临床研究表明其不仅可以有效降低空腹和餐后血糖、HbA_{1c} 水平,还可以显著下调空腹和餐后胰高血糖素的水平。该药耐受性良好,最常见不良反应是轻度头痛和鼻咽炎,无明显低血糖发生,但在动物实验中出现皮肤坏死和肾损伤的不良反应,而临床试验未观察到。百时美施贵宝与阿斯利康公司联合开发的 DPP-4 抑制药沙格列汀在美国已经批准上市,在亚洲 (包括中国) 已完成 III 期临床研究。武田公司生产的 *alogliptin* 和勃林格殷格翰开发的 *linagliptin* (*Ondero*), 临床试验进展顺利,已经向 FDA 提出审批申请。DPP-4 除了降解 GLP-1、GIP 和垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP) 外,还可能降解其他肽类,如神经肽 Y、P 物质和趋化因子等。故 DPP-4 抑制药不良反应包括:鼻塞、流涕、咽喉痛等上呼吸道感染样症状、腹泻、头晕、皮疹、血管性水肿、荨麻疹等,低血糖反应少见。1 型糖尿病患者 (T1DM) 和 DM 酮症酸中毒时禁用此类药物。

3 胰淀素

胰淀素 (胰岛淀粉样多肽) 是由 37 个氨基酸残基组成的一种调解血糖的肽类激素,与胰岛素一起贮存于 β 细胞中,具有减慢胃排空、延缓葡萄糖的吸收、抑制餐后胰高血糖素的分泌、减少餐后肝糖原释放的作用。T2DM 患者胰淀素相对不足。天然人胰淀素易形成沉积物,不适用于临床治疗,但其类似物普兰林肽 (*pramlintide*) 将胰淀素 25 位的丙氨酸、28 位和 29 位的丝氨酸用脯氨酸代替形成稳定的、可溶性物质,但其胰淀素样作用不改变。

临床试验证实,在 T1DM 或 T2DM 患者中,普兰林肽与胰岛素联合应用,能够使餐后血糖下降 $3.4 \sim 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, HbA_{1c} 水平下降 $0.2\% \sim 0.7\%$,并减少血糖波动,还能有效降低体重,但对空腹血糖无效。2005 年 3 月获美国 FDA 批准,可用于 T1DM 和 T2DM。主要的不良反应是恶心和低血糖。

4 其他

钠-葡萄糖转运体(SGLT)抑制药,葡萄糖在肠道的吸收和肾脏的重吸收是通过 SGLT 进行调节的^[12]。目前已经发现有 2 种人体内参与葡萄糖转运的主要蛋白,分别是 SGLT1 和 SGLT2^[13-14]。SGLT1 在胃肠道、心脏、骨骼肌、肝脏、肺脏和肾脏表达,而 SGLT2 几乎是在肾脏表达。SGLT1 在肾脏的表达局限于近端肾小管的 S3 段,担负 $<10\%$ 滤过葡萄糖的重吸收。SGLT2 的表达则局限于近端肾小管的 S1 段, $>90\%$ 的肾脏葡萄糖重吸收发生于此^[15]。SGLT2 抑制药通过抑制肾近端小管葡萄糖的重吸收,增加尿葡萄糖的排泄,改善高血糖,因此为 DM 治疗的一个新途径。dapagliflozin 是目前临床数据最多的 SGLT2 抑制药,由阿斯特拉、百时美-施贵宝公司联合研制,Ⅱ期临床试验表明每天 1 次口服 dapagliflozin,可以有效降低 HbA_{1c} 水平、空腹血糖、餐后血糖,而且不增加体重,无严重的低血糖发生。由于其导致肾排糖增加,热量丢失增加,使用后体重有所下降。由于有利尿作用,其有利于控制血压。观察到的不良反应主要为泌尿生殖系统的感染,但耐受性良好。

dapagliflozin 和二甲双胍的复方制剂也在研制中。

新型降糖药物不断问世,为有效控制 DM 提供了更多的手段,但使用半个多世纪的传统药物二甲双胍和磺酰脲类降糖药在治疗 T2DM 中的地位仍不可动摇。与新型降糖药相比,这两类药物降糖作用更强,尤其是二甲双胍伴有明显的降糖以外获益。新型降糖药仍需更长时间的临床经验积累,这样才可正确评价其治疗 DM 中的真正地位。

【参考文献】

[1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and

women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362: 1090-1101.

[2] 杨文英. 磺脲类药物应用专家共识[J]. 国外医学内分泌学分册, 2004, 24: 255-259.

[3] Jaiswal S, Mehta R, Musuku M, et al. Repaglinide induced acute hepatotoxicity[J]. JNMA J Nepal Med Assoc, 2009, 48: 162-164.

[4] UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulphonylurea or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UK-PDS 33). Lancet, 1998, 352: 837-853.

[5] 苏青, 邢惠莉, 左静南. 阿卡波糖对糖耐量异常者 B 细胞功能和胰岛素敏感性的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 2005, 25: 68-69.

[6] Zhang F, Dey D, Robert Bränström, et al. BLX-1002, a novel thiazolidinedione with no PPAR affinity, stimulates AMP-activated protein kinase activity, raises cytosolic Ca^{2+} , and enhances glucose-stimulated insulin secretion in a PI3K-dependent manner[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296: 346-354.

[7] Henry RR, Lincoff AM, Mudaliar S, et al. Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor- α/γ agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study[J]. Lancet, 2009, 374: 96-98.

[8] Pratley RE, Nauck M, Bailey T, et al. Liraglutide versus sitagliptin for patients with type 2 diabetes who did not have adequate glycaemic control with metformin: a 26-week, randomised, parallel-group, open-label trial[J]. Lancet, 2010, 375: 1447-1456.

[9] Aschner P, Katzeff HL, Guo H, et al. Efficacy and safety of monotherapy of sitagliptin compared with metformin in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2010, 12: 252-261.

[10] Seck T, Nauck M, Sheng D, et al. Safety and efficacy of treatment with sitagliptin or glipizide in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin: a 2-year study[J]. Int J Clin Pract, 2010, 64: 562-576.

[11] Scott R, Loeys T, Davies MJ, et al. Efficacy and safety of sitagliptin when added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2008, 10: 959-969.

[12] Silverman M. Structure and function of hexose transporters[J]. Annu Rev Biochem, 1991, 60: 757-794.

[13] Wright EM. Renal Na^{+} -glucose cotransporters[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 280: F10-F18.

[14] Thomson AB, Wild G. Adaptation of intestinal nutrient transport in health and disease[J]. Dig Dis Sci, 1997, 42: 453-488.

[15] Deetjen P, von Baeyer H, Drexel H. Renal glucose transport. In: Sel-din DW and Giebish G, eds. The Kidney: Physiology and Pathophysiology, 2nd edition. New York: Raven Press Ltd, 1992: 2873-2888.