

P-糖蛋白的生理作用及中药对其影响的研究进展

★ 叶靖宇¹ 黄玉芳² (1.南京中医药大学硕士研究生 南京 210029;2.南京中医药大学病理教研室 南京 210029)

关键词:P-糖蛋白;血脑屏障;中药;综述

中图分类号:R 739.4 文献标识码:A

P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是与肿瘤多药耐药(Multidrug Resistance, MDR)密切相关的糖蛋白,属于能量依赖型药物外排泵。P-gp的主要作用是将药物或其它化学物质排出细胞外。P-gp首先在肿瘤细胞中被发现了,1989年首次在血脑屏障上发现它的表达。近年来,许多人研究发现某些中药能对P-gp的表达产生影响从而达到逆转多药耐药的作用。现综述P-GP的结构、功能及其在血脑屏障上的作用以及一些中药对它的影响。

1 P-gp 生理功能

Kimura Y等^[1]发现:在真核生物中ABC转运子(ATP-binding cassette transporter)具有运输、调节、通道功能,而P-gp是ABC转运子超家族中最主要的成员。它在药物的体内处置(disposition)过程中发挥着重要作用。P-gp在肾上腺皮质、肝胆管细胞腔面、肠粘膜细胞和肾近端小管等中有高表达,其生理功能是将细胞内的毒性代谢产物泵出细胞,对细胞起保护作用。在脑毛细血管内皮细胞中,P-gp对维持血脑屏障起重要作用,可将内皮细胞中的异物(药物、致癌物等)转运到毛细血管腔而保护脑组织。在胎盘、妊娠子宫内膜等组织中则从事甾类化合物的转运;而在肿瘤细胞中,可将长春新碱、秋水仙素等药物泵出细胞外,导致肿瘤细胞耐药。P-gp是能量依赖型药泵,可形成转运蛋白-通道-受体复合物,调节ATP的产生,使P-gp利用ATP水解的能量将疏水亲脂性药物泵出胞外。P-gp也能转运其他外源性化合物,包括地高辛、多环芳烃、阿片制剂、calcein和罗丹明123等。

P-gp的药物外排作用主要有4大特点:(1)P-gp的作用底物广泛;(2)2种P-gp底物可以与P-gp竞争性结合;(3)P-gp的药物外排作用具有ATP依

赖性;(4)P-gp的药物外排作用具有饱和性。

2 P-gp 与血脑屏障

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)由脑毛细血管内皮细胞(brain capillary endothelial cells, BCECs)、基膜和胶质细胞足突3部分构成。BBB是将脑与血液循环分开的屏障,它是机体防止外源性化合物进入脑内的自身防护机制。BBB的解剖学基础是脑毛细血管内皮细胞紧密连接,从而形成物理学屏障。它可以阻止水溶性、大分子药物通过。亲脂性药物能够横跨毛细血管内皮细胞经被动扩散方式进入BBB。但是近年来却发现一些脂溶性大的物质在脑内的浓度非常低,特别是尼莫地平在脑组织内的浓度只有血液中浓度的1/10~1/20^[2]。相反一些水溶性的营养物质却很容易进入脑内,这些矛盾的结果说明了物质的脂溶性的大小不全是物质能否通过血脑屏障的决定性的因素,在脑毛细血管内皮细胞膜上可能存着多种物质转运机制^[3]。一直到20世纪90年代发现脑毛细血管具有高度表达的P-gp后才将其原因与P-gp泵出功能联系起来。研究证明,存在于脑毛细血管内皮细胞上的P-gp参与了这一作用。Schinkel等^[4]建立了缺失mdrla基因(类似人mdrl)[mdrla(-/-)小鼠]小鼠模型,正常的小鼠去掉mdrla后,脑毛细血管内皮细胞即无P-gp表达,BBB则缺失,对伊维菌素相当敏感。用安全量的伊维菌素喷洒,许多mdrla(-/-)小鼠死亡,而mdrla(+ / +)小鼠和mdrla(+ / -)小鼠没有死亡。^[3H]伊维菌素在mdrla(-/-)小鼠脑浓度比mdrla(+ / +)小鼠脑浓度高87倍。当BBB上不存在P-gp时,伊维菌素和环孢霉素A(Acyclosporin CsA)在脑中的浓度增加,即可通过BBB。BBB处的P-gp具有多种生理功能,包括外排、分泌、脂质转运和氯离

子通道功能,其中外排作用对药物的脑部转运具有重要意义。给 *mdrla*(-/-) 小鼠尾静脉注射 CsA,剂量为 1mg/kg,4、8 和 24 h 后,脑内 CsA 的浓度分别是正常小鼠的 17.0、26.3 和 55.2 倍,血浆浓度分别是正常小鼠的 1.4、1.7 和 1.9 倍。静脉注射地高辛,剂量为 1 mg/kg,4 h 后的脑内浓度是正常小鼠的 35 倍,而血浆、小肠和肝脏组织浓度增加 1 倍^[5]。动脉注射司帕沙星(*sparfloxacin*),4 h 后脑内浓度增加了 3 倍,而血浆浓度无改变^[6]。

P-gp 主要定位在脑毛细血管内皮细胞与血液循环接触的腔膜面上(即毛细血管内皮细胞的顶端面上)^[7],而脑实质和血管周围星形胶质细胞表达较弱^[8]。自从 1989 年 Cordon-Cardo 等用免疫组织化学技术首次发现脑毛细血管内皮细胞(BCECs)表达 P-gp 后,许多学者用不同实验方法证明在正常脑皮质、海马、小脑的毛细血管内皮细胞上都有 P-gp 的表达,而没有 BBB 的脉络膜丛却没有 P-gp 的表达。Tatsuta 等^[9]建立了 9 个小鼠 BCEC 细胞系,观察抗肿瘤药在单层小鼠 BCEC 的转运。通过免疫印迹分析发现,所有 9 种小鼠 BCEC 均有 P-gp 表达。Virgintino 等^[10]采用免疫标记法在激光共聚焦显微镜下观察人脑组织样本的荧光染色发现,P-gp 主要集中在皮质微血管内皮细胞的腔膜面。在紧密包绕血管内皮的微血管外膜细胞上也发现有 P-gp 的活性。在原代培养的牛脑毛细血管内皮细胞的研究显示,当给予 P-gp 抑制剂维拉帕米 500 $\mu\text{mol/L}$ 后,BCECs 摄取^[3H]CsA 大约增加 3 倍。当静脉给予 P-gp 抑制剂维拉帕米 1 mg/kg 时,长春新碱在脑细胞的摄取增加 9.08 倍,而在脉络膜丛的分布没有影响^[11,12]。

由于脑毛细血管内皮细胞上的 P-gp 是呈 ATP 依赖性的,降低脑内 ATP 的含量亦能改变脑内皮细胞膜上的 P-gp 的外排功能。包金凤用脑缺血模型进行的研究发现^[13],当前脑缺血 20 min 后,脑 ATP 含量从 $(1.43 \pm 0.21) \mu\text{mol/g}$ 降到 $(0.04 \pm 0.017) \mu\text{mol/g}$,多柔比星和 CsA 在 BBB 通透性大约分别增加 17 和 3 倍。用 2,4-二硝基苯酚和叠氮钠耗竭脑细胞的 ATP,长春新碱的摄取量大约增加 4 倍。其可能原因是,脑内的 ATP 含量降低,脑内细胞膜上的 P-gp 药物外排功能减弱,使药物在脑内蓄积增加。实验结果提示,由 *mdrl* 基因编码的 P-gp 是一种 ATP 依赖性的主动外排泵。即在 ATP 供应充足的条件下,P-gp 将与之结合的药物从细胞内泵出。

3 P-gp 抑制剂

P-gp 底物和/或抑制剂多为大分子物质。目前

发现的 P-gp 底物和/或抑制剂迄今已发展到第三代。第一代 P-gp 抑制剂包括维拉帕米、环孢素 A、他莫昔芬和一些钙调节蛋白拮抗剂。钙通道阻滞剂维拉帕米和免疫抑制剂环孢素 A 是其中的代表。第二代 P-gp 抑制剂主要是通过对第一代 P-gp 抑制剂进行结构改造而合成,主要包括右维拉帕米(*dexverapamil*)、右尼古地平(*dexniguldipine*)、伐司朴达(*valsopodar*,PSC 833)、比立考达(*biricodar*,VX-710)等。其中比较具有代表性的是伐司朴达和比立考达。第三代 P-gp 抑制剂通过构效关系和组合化学技术来弥补第二代 P-gp 抑制剂的不足,主要有:*tariquidar* (XR9576)、*zosuquidar* (LY335979)、S9788、ONT-093 (OC144-093)、粉防己碱(*tetrandrine*)、*lani-quidar*(R101933)和 *elacridar*(GF120918)等。*tariquidar* 和 *zosuquidar* 是其中的代表性药物。另外,中药也可以通过多种途径抑制 P-gp 的表达和功能,从而逆转 MDR。

4 中药对 P-gp 的影响

4.1 中药抑制 P-gp 功能的机制 梁文杰等^[14]研究发现中药可以通过多种途径抑制 P-gp 的表达和功能,从而逆转 MDR。许多中药成分既可以从转录和翻译水平抑制 P-gp 的表达,还可以通过与抗肿瘤药物竞争 P-gp 的药物或 ATP 结合位点、或通过对肿瘤细胞膜或 Ca^{2+} 浓度的影响等而抑制 P-gp 的功能。另外,有的中药可以通过增强细胞免疫功能而拮抗 P-gp 介导的多药耐药。

4.2 单味中药对 P-gp 的影响 田晖等^[15]研究发现防己、北豆根等的有效成分之一汉防己甲素(*tetrandrine* 粉防己碱)具有钙拮抗作用和膜调节作用,可以干扰 P-gp 的药物外排机制,在体内外均能逆转 P-gp 介导的 MDR。Choi 等^[16]发现 $3 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 粉防己碱可使紫杉醇(*paclitaxel*)对 P-gp 阳性肠癌细胞 HCT15 的半数抑制浓度下降 3 100 倍,多柔比星(*doxorubicin*,DOX)的半数抑制浓度下降 36 倍;但对 P-gp 阴性的人卵巢癌细胞 SK-OV-3,粉防己碱不能增加上述药物的细胞毒性。上述资料提示粉防己碱可通过调节 P-gp 增强 MDR 相关性药物的细胞毒性。

姜晓峰等^[17]研究表明大黄素增加罗丹明 123 在人乳腺癌细胞 MCF-7/Adr 中的蓄积并减少其外排,减少 P-gp 的表达,说明抑制 P-gp 的表达和功能从而提高细胞内药物浓度是大黄素逆转 MDR 的机理之一。

中药 R3 为补骨脂的提取剂,刘叙仪等^[18]研究发现在无细胞毒浓度(1:30、1:60、1:90)使耐阿霉素

(Adriamycin, ADR)100 倍的 MCF-7/Adr 细胞对 ADR 的敏感性增加 720 倍、292 倍及 10.4 倍。流式细胞检测显示 R3 可增加 MCF-7/Adr 细胞内罗丹明 123 的含量,免疫组化染色发现 R3 处理 MCF-7/Adr 后,P-gp 表达随时间延长而逐渐减少,48 h 后表达完全消失,表明 R3 是通过抑制 P-gp 表达,增加细胞内药物浓度而达到其耐药逆转作用的。

常宏宇^[19]用 MTT 比色法测定姜黄素能增强多种化疗药物对白血病多药耐药细胞系 K562/A02 细胞的毒性作用;用流式细胞仪测定姜黄素能明显提高 K562/A02 细胞内柔红霉素(DNR)的浓度($P < 0.01$);用 RT-PCR 法检测出不同浓度的姜黄素作用后,K562/A02 细胞中 *mdr-1* mRNA 的表达逐渐降低。以上结果提示姜黄素可抑制 K562/A02 细胞表面 P-gp 的表达或抑制其功能。

陈艳明^[20]制备含冰片的家兔血清,以维拉帕米作为阳性对照药,用 MTT 法观察发现在 MDCK(犬肾)和 HeLa(人子宫癌)细胞系上,冰片均能明显地增强长春新碱所致的细胞毒性,作用与维拉帕米相似。从而说明了冰片对 P-gp 的表达有明显的抑制作用。

苦参是中医常用的药物,其化学成分主要为生物碱,主要包括苦参碱和氧化苦参碱等。研究表明氧化苦参碱对 P-gp 的表达有抑制作用。王驰^[21]等用 MTT 法检测长春新碱、维拉帕米、氧化苦参碱对放射前鼻咽癌 HNE-1 细胞、放射后 HNE-1(200)细胞生长抑制情况,然后用免疫化学法检测氧化苦参碱、维拉帕米对 HNE-1(200)细胞 P-gp 表达的影响。结果显示长春新碱、维拉帕米、氧化苦参碱对放射前、后细胞生长均有抑制作用,呈浓度依赖关系。免疫组化检测细胞 P-gp 表达,结果为 HNE-1 阴性,HNE-1(200)阳性,维拉帕米、氧化苦参碱分别作用于 HNE-1(200)细胞后 P-gp 表达弱阳性。因此可以说明氧化苦参碱与维拉帕米有相似的作用,可以抑制 P-gp 的表达。

王利^[22]等在观察葛根素注射液对人胃癌耐药细胞系 SGC7901/VCR 的影响,用免疫细胞化学染色法显示耐药细胞中多药耐药相关蛋白(MRP)和 P-gp 的分布。结果表明 SGC7901/VCR 的细胞膜和浆膜内均有 P-gp 和 MRP 表达,为强阳性(+++)染色,加入葛根素后 SGC7901/VCR 细胞也存在 P-gp 和 MRP 表达,但为+或++。提示了葛根素可抑制 P-gp 和 MRP 表达。

解霞^[23]等以人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞为对象,用 MTT 法和流式细胞术测出非细胞毒性剂量

(320 $\mu\text{g/ml}$)和低毒剂量(1 250 $\mu\text{g/ml}$)的川芎嗪(TMP)均能显著降低 MCF-7/ADM 细胞的 IC₅₀($P < 0.01$),逆转倍数分别为 2.14 和 2.80 倍;并使该细胞 P-gp 的表达率由(90.60 $\pm$ 0.40)%分别降低至(69.10 $\pm$ 1.65)%和(60.30 $\pm$ 1.25)%。提示 TMP 能显著抑制 MCF-7/ADM 细胞 P-gp 的表达($P < 0.01$)。

绞股蓝总皂苷(GP)是从葫芦科绞股蓝属植物中提出的皂苷类混合物,近年来研究发现 GP 对 P-gp 的表达有一定的抑制作用。范莉^[24]采用 S-P 免疫组化法和 MTT 比色分析法,观察 GP 对 P-gp 高表达急性粒系白血病(AML)细胞药物敏感性的影响。结果 16.67% 初治患者和 58.33% 难治或复发 AML 患者 P-gp 表达增高($P < 0.05$);P-gp 高表达的 AML 细胞对阿糖胞苷(AraC)和柔红霉素(DNR)药物敏感性低于低水平表达者($P < 0.01$)。无细胞毒剂量 GP 显著增强 AraC 和 DNR 对 P-gp 高表达 AML 细胞增殖的抑制作用($P < 0.01$)。GP 能有效的逆转 P-gp 过度表达的耐药白血病细胞对 AraC 和 DNR 的抗药性。

胡凯文等^[25]首次发现从浙贝母总生物碱中分离得到的贝母碱甲素(PM1)、贝母碱乙素(PM2)在无细胞毒剂量下,具有明显多药耐药逆转活性。说明 PM1 和 PM2 可以抑制 P-gp 表达。

伍倩^[26]研究发现多种引经药均可抑制 P-gp 的外排作用。通过 MTT 法,观察含药血清对长春新碱所致宫颈癌细胞 HeLa 和犬肾细胞 MDCK 毒性的影响。结果在所选取的受试药物中,柴胡、升麻、川芎、丹皮、黄连、黄柏、知母等多种药物均能增强长春新碱所致细胞毒性,并呈一定的时间和剂量依赖关系。

4.3 中药方剂对 P-gp 的影响 中药方剂(由川芎、莪术、鸡血藤等活血化瘀药组成)提取液 R1 本身具有抑制细胞增殖效应,而低杀伤或无杀伤浓度的 R1 则具有使 MCF-7/Adr 细胞的 P-gp 表达减少,细胞内药物浓度增加的耐药逆转作用。联合应用 ADR,低浓度 R1 可完全克服 MCF-7/Adr 对 ADR 的耐受,而 MCF-7 受影响较小^[27]。

日本学者渡边由香^[28]以维拉帕米为基质,通过三磷酸腺苷酶(ATPase)分析法探讨芍药甘草汤对 P-gp 的抑制活性。结果芍药甘草汤及其组成生药甘草对维拉帕米的 ATPase 活性呈剂量依赖性抑制,其抑制模式为非竞争性,Ki 值分别为 0.65 mg/mL 和 0.34 mg/mL。表明,芍药甘草汤非竞争性抑制 P-gp,其作用主体为甘草。

渡边由香^[29]用人 P-gp 膜(人的 P-gp cDNA 通过空泡病毒掺入到昆虫细胞生成的膜组成)进行研究发现在维拉帕米存在下,大黄甘草汤显著抑制 ATPase 活性。大黄的 IC₅₀小于大黄甘草汤,甘草的 IC₅₀则大于大黄甘草汤及大黄。由于大黄甘草汤中大黄与甘草的比例为 2:1,因此认为大黄甘草汤抑制 ATPase 活性主要是大黄的作用。

5 总结

P-gp 可在许多组织中表达,它在药物的细胞摄取、细胞内分布、代谢与排泄过程中发挥重要作用。P-gp 对药物通过血脑屏障转运具有重要意义,降低脑毛细血管内皮细胞膜上的 P-gp 的活性,减少药物外排可以增加药物在脑内的浓度。反之,增加 P-gp 的活性可以加速药物的外排,减少药物在脑内的累积,防止有害的物质更多进入脑内,降低中枢神经系统的毒副作用。目前关于 P-gp 的活性和确切作用机制尚未完全清楚,但是 P-gp 的实际作用要比目前研究所了解的复杂得多。然而对 P-gp 的进一步研究可以深入揭示许多药物的摄取、代谢和排泄机制,将进一步了解物质在正常组织和细胞的基本转运过程,理解 P-gp 在 BBB 上的作用,可以帮助设计新药和防止在治疗感染性疾病和脑肿瘤时发生的耐药问题,并且对于增加和减少药物进入脑内,增加疗效和减少中枢神经系统的毒副作用都具有理论意义和实际应用价值。同时,中药及其有效成分对 P-gp 的影响也日益受到人们的关注。而这一领域我们目前尚只略知一二,因而具有广阔前景,我们应当进行更深的研究。

参考文献

- [1] Kimura Y, Matsuo M, Takahashi K, et al. ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter: MDR1/P-glycoprotein[J]. *Curr Drug Metab*, 2004, 5(1): 1-10.
- [2] Akria T, Kumi T. Blood-brain barrier function of p-glycoprotein[J]. *Drug Delivery Reviews*, 1997, 25: 297.
- [3] Lkumi T, Akira T. Drug delivery through the blood-brain barrier[J]. *Advanced Drug Delivery Review*, 1996, 19: 401.
- [4] Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, et al. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(11): 2517-2524.
- [5] Schinkel AH, Wagenaar E, Deemter LV, et al. Absence of the mdrla P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporin A[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(4): 1698.
- [6] De Lange EC, Marchand S, Van Den Berg D, et al. In vitro and in vivo investigations on fluoroquinolones, effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 12(2): 85.
- [7] Erik J, Hegmann HC, Bauger RO. Expression and function activity of

- p-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells[J]. *Cancer Research*, 1992, 52: 6969.
- [8] Loscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family[J]. *NeuroRx*, 2005, 2: 86-98.
- [9] Tatsuta T, Naito M, Oh-hara T, et al. Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 20383-20391.
- [10] Virgintino D, Robertson D, Errede M, et al. Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels[J]. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50: 1671-1676.
- [11] Evrard PA, Ragusi C, Boschi G, et al. Simultaneous microdialysis in brain and blood of the mouse: extracellular and intracellular brain-colchicine disposition[J]. *Brain Res*, 1998, 786(1/2): 122-127.
- [12] Drion N, Lemaire M, Lefauconnier JM, et al. Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine[J]. *J Neurochem*, 1996, 67(4): 1688-1693.
- [13] 包金凤. 血脑屏障上的 P-GP[J]. *国外医学药学分册*, 2000, 27(3): 154-158.
- [14] 梁文杰, 单保恩. 中药拮抗 P-GP 介导的肿瘤细胞 MDR 机制的研究进展[J]. *中草药*, 2004, 34(4): 466-469.
- [15] 潘启超, 田晖. 多种中药单体逆转肿瘤多药耐药性[J]. *科学通报*, 1995, 40(20): 1901-1904.
- [16] Choi SU, Park SH, Kim KH, et al. The bisbenzylisoquinoline alkaloids, tetrandine and fangchinoline, enhance the cytotoxicity of multidrug resistance-related drugs via modulation of P-glycoprotein[J]. *Anticancer Drugs*, 1998, 9(3): 255-261.
- [17] 姜晓峰, 甄永苏. 大黄素逆转肿瘤细胞的多药耐药[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 1998, 25(化疗专辑): 42-44.
- [18] 刘叙仪, 孟松娘, 杨敬贤, 等. 中药 R3(补骨脂抽提剂)对耐阿霉素人乳腺癌细胞 MCF7/Adr 多药耐药的逆转[J]. *中国肿瘤临床*, 1997, 24(5): 325-330.
- [19] 常宏宇, 潘凯丽, 李琦, 等. 姜黄素对 K562/A02 细胞上 P-gp 的表达及其功能的影响[J]. *中华血液杂志*, 2006, 27(4): 254-258.
- [20] 陈艳明, 王宁生. 冰片对 P-GP 的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2003, 14(2): 96-99.
- [21] 王驰, 陈鸿雁, 舒艳等. 氧化苦参碱对放疗鼻咽癌 HNE-1 细胞 P-GP 表达影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(1): 16-19.
- [22] 王利, 魏品康, 许玲, 等. 葛根素对胃癌多药耐药的逆转实验研究[J]. *中国中西医结合杂志(基础理论研究特集)*, 2005, 25(6): .
- [23] 解霞, 杨毅, 高洁波等. 川芎嗪对人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞多药耐药性的逆转及 P-GP 表达的影响[J]. *大连大学学报*, 2006, 27(4): 76-78.
- [24] 范莉. 绞股蓝总皂甙对 P-GP 高表达急性粒系白血病细胞化疗药物敏感性的影响[J]. *衡阳医学院学报*, 2000, 28(4): 345-347.
- [25] 胡凯文, 陈信义, 左明焕. 浙贝母逆转白血病(肿瘤)细胞耐药的临床与实验研究[J]. *中国医药学报*, 2004, 19(Z1): 15.
- [26] 伍倩. 引经药对 P-GP 的影响[J]. *现代预防医学*, 2005, 32(7): 855-856.
- [27] 张文卿, 刘叙仪, 韩复生, 等. 中药 R1 对耐阿霉素人乳腺癌细胞(MCF7/Adr)多药耐药的逆转作用[J]. *中药药理与临床*, 1994, 10(5): 16-21.
- [28] 渡边由香. 芍药甘草汤对人 P-GP ATPase 活性的抑制作用[J]. *国外医学中医中药分册*, 2005, 27(5): 16.
- [29] 渡边由香. 大黄甘草汤及其组成生药对 P-GP 的抑制作用 日本药学会第 125 次年会论文摘要[J]. *国际中医中药杂志*, 2006, 28(1): 26.

(收稿日期: 2007-07-03)