

Akt下游蛋白调控炎症介质表达机制的研究进展

韩婷婷¹, 史家欣², 李小民^{3*}

¹徐州医科大学附属连云港医院急诊内科, ²呼吸内科, 江苏 连云港 222046; ³南京医科大学康达学院附属医院急诊内科; 江苏 连云港 222002

[摘要] 磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路是生物体内重要的信号通路之一,能够调控细胞生长、增殖、凋亡等生物活性。大量研究表明PI3K/Akt信号通路激活可以参与炎症反应、调节免疫应答。Akt是PI3K信号通路的关键下游蛋白,因此研究Akt下游蛋白对休克、脓毒症、缺血再灌注损伤等炎症疾病调控的作用机制,有助于找到治疗该类疾病的潜在靶点。

[关键词] Akt;mTOR;GSK-3 β ;eNOS;FOXO1;炎症反应

[中图分类号] R364.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)06-853-05

doi:10.7655/NYDXBNS20180628

Research advance in the mechanism of Akt downstream protein regulation of inflammatory mediators

Han Tingting¹, Shi Jiaxin², Li Xiaomin^{3*}

¹Department of Emergency Medicine, ²Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University; ³Department of Emergency Medicine, Affiliated Hospital of the Kangda College of NMU, Lianyungang 212002, China

[Abstract] Phosphoinositol 3-kinase (PI3K)/serine threonine protein kinase (Akt) signaling pathway is one of the important signaling pathways in the body, which can regulate the biological activity of cell growth, proliferation and apoptosis. A large number of studies have shown that activation of PI3K/Akt signaling pathway is involved in inflammatory responses and regulation of immune responses. Akt is a key downstream protein of the PI3K signaling pathway. Therefore, the mechanism of Akt downstream protein on the regulation of inflammatory diseases such as shock, sepsis and ischemia-reperfusion injury is helpful to find a potential target for the treatment of these diseases.

[Key words] Akt;mTOR;GSK-3 β ;eNOS;FOXO1;inflammatory responses

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06):853-857]

脓毒症定义为机体对感染的反应失调导致危及生命的器官功能障碍^[1];脓毒症休克为脓毒症合并出现严重循环障碍和细胞代谢紊乱,死亡风险更高^[1]。感染是炎症反应的根源,而免疫紊乱是器官功能障碍的根本原因^[2]。磷酸肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激

酶(protein-serine-threonine kinase, Akt)信号通路调控炎症反应^[3-4],主要通过Akt的下游蛋白调控炎症介质的表达,比如哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和转录因子叉头框蛋白O1(forkhead box O1, FOXO1)等(图1)。Akt既是PI3K、JAK/STAT、TLR4等信号通路的交叉点,又是PI3K信号通路的关键下游蛋白^[5],因此研究Akt下游蛋白对脓毒症、脓毒症休克、缺血再灌注损伤等与炎症反应有关疾病的调

[基金项目] 江苏省卫计委面上科研课题(H201558);国家自然科学基金(81300052);中国博士后科学基金(2015M570420);连云港市科技局资助(SH1401)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:lyglxm1@163.com

控机制,有助于找到治疗该类疾病的潜在靶点。

1 Akt下游调控炎症介质表达的蛋白

Akt参与炎症反应^[3-4],是PI3K下游信号通路的关键蛋白^[5]。脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)刺激人固有免疫细胞,应用PI3K或Akt抑制剂后促炎因子IL-12、TNF- α 和IL-6的表达增加,抗炎因子IL-10表达减少^[6]。有研究表明Akt的激活可抑制LPS诱导的脓毒症小鼠、脓毒症兔的炎症反应^[7]。以上体内外实验研究表明Akt参与固有免疫应答和炎症反应。

Akt的完全活化需要PDK-1和mTOR复合物2(mTORC2)的参与,分别激活Akt的苏氨酸308(Thr308)、丝氨酸473(Ser473)疏水位点^[7]。完全活化的Akt激活下游一系列信号分子,这些信号分子包含mTOR、GSK-3 β 、抑制性 κ B激酶(inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK)、eNOS、促凋亡蛋白Bad(BCL-xL/BCL-2-associated death promoter, Bad)、环磷腺苷反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3/9(cysteiny aspartate specific proteinase3/9, Caspase-3/9)和FOXO1等^[8]。其中mTOR^[9]、GSK-3 β ^[10]、eNOS^[11]、FOXO1^[12]能够调控炎症反应(图1)。

2 mTOR调控炎症介质表达的机制

mTOR是一种保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。mTOR有mTORC1、mTORC2两种形式。mTOR信号通路主要由PI3K/Akt/mTOR和LKB1/AMPK/mTOR^[13]组成,前者在调控细胞生物活性、蛋白质翻译和炎症反应等方面起主要作用。LPS刺激细胞或动物后,可通过PI3K/Akt信号通路完全活化Akt,完全活化的Akt随后以两种方式激活mTORC1:一种是激活Akt/TSC-2/TSC-1/Rheb/mTORC1信号通路^[14],另一种是直接激活mTORC1即PI3K/Akt/mTORC1信号通路^[15](图1)。

Vangan等^[9]研究表明LPS刺激人单核细胞、THP-1起源的巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)后,通过激活mTORC1信号通路调控炎症介质的表达。进一步研究发现,用雷帕霉素(mTORC1抑制剂)处理LPS刺激的细胞后,能激活NF- κ B、抑制STAT3活性而上调IL-12、下调IL-10的表达^[9]。相反,在人单核细胞中敲低TSC2后,以激活mTORC1信号通路的方式上调IL-10表达、下调IL-12、IL-6和TNF- α 等的表达^[16]。有研究表明用雷

帕霉素治疗肾小球肾炎、间质性肺炎和淋巴细胞性肺炎患者后,化验结果支持雷帕霉素促炎这一不良反应^[17]。Li等^[18]用PI3K、ERK和mTOR抑制剂刺激c-fos^{-/-}大鼠的骨髓源性巨噬细胞后,发现mTOR通过调节c-fos转录因子与NF- κ B特异性结合进而调控LPS诱导的炎症反应。以上体内外实验研究表明:mTORC1信号通路在转录因子水平上以阻断NF- κ B的激活、增强STAT3活性的方式限制炎症反应(图1)。

缺血再灌注损伤指组织或器官遭受一定时间缺血恢复血液灌流即再灌注,组织或器官损伤程度反而迅速增剧,常见于器官移植术后、器官组织损伤、肺切除术、体外循环、心肌梗死介入术后等过程。缺血再灌注损伤的机制比较复杂,可能与氧化应激、炎症反应、钙超载、自噬等有关^[19],其中炎症反应是导致器官组织缺血再灌注损伤的重要环节^[20]。

Aoyagi等^[21]发现缺血再灌注损伤后第28天,过表达mTOR的转基因小鼠(mTOR-Tg)的死亡率低于同窝野生型(WT)小鼠。mTOR-Tg小鼠心脏促炎因子的表达水平低于WT小鼠。可见心脏过表达mTOR能够保护缺血再灌注损伤小鼠的心脏功能并抑制炎症反应。但mTOR在缺血再灌注损伤中抑制炎症反应的具体作用机制并不清楚,需进一步深入研究。

3 GSK-3 β 调控炎症介质表达的机制

GSK-3 β 是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,不仅是体内众多信号通路的关键靶点,也是炎症反应中的关键激酶^[22]。细胞未受刺激时,GSK-3 β 处于活性状态;当细胞受到LPS刺激时,通过PI3K/Akt信号通路进一步磷酸化GSK-3 β N-端的丝氨酸位点并使GSK-3 β 失活^[10];随后下调NF- κ B表达进而抑制炎症反应^[7]。磷酸化失活的GSK-3 β 通过增强CREB与共转录因子CREB结合蛋白(CREB binding protein, CBP)的相互作用,降低CBP与NF- κ B的结合力。活化的GSK-3 β 可直接磷酸化NF- κ B的p65亚基和B淋巴细胞瘤3编码蛋白BCL-3^[23];BCL-3是NF- κ B的p50亚基同型二聚体的转录共激活子^[23];磷酸化的BCL-3通过与NF- κ B1(p50)-DNA或者NF- κ B2(p52)-DNA的结合形成三聚体促进炎症因子的表达^[24];磷酸化失活的GSK-3 β 不能磷酸化BCL-3,从而使p52或p50从DNA上解离变成BCL-3-p52或BCL-3-p50二聚体,同时磷酸化失活的GSK-3 β 通过泛素-蛋白酶体降解途径促进BCL-3的降解从而限

制炎症反应^[24]。可见活化的GSK-3 β 以磷酸化活化NF- κ B p65和BCL-3的方式增强NF- κ B的活性,进而调控促炎因子的表达。

Wang等^[25]研究表明LPS刺激单核细胞后,应用雷帕霉素,GSK-3 β 的磷酸化水平降低,其激酶活性反而增强。免疫共沉淀法证实GSK-3 β 是mTORC1, p85S6K的下游靶标。抑制S6K1后可减弱GSK-3 β 的磷酸化水平,进而上调IL-12、下调IL-10的表达;抑制GSK-3 β 后可减弱上游S6K1的抑制能力、增加CREB的表达水平,进而上调IL-10、下调IL-12的表达。可见GSK-3 β 活性受mTORC1调控^[26],进而在CREB、NF- κ B p65和AP-1等转录因子水平上调调控细胞因子的表达(图1)。未来需进一步深入研究mTORC1调控炎症介质表达的具体分子机制,以及如何调控GSK-3 β 参与的炎症反应。

GSK-3 β 功能失调与许多疾病的病理生理有关,比如心衰、炎性疾病^[27]、高血压和2型糖尿病^[28]等。因此研究GSK-3 β 的功能活性及其抑制剂成为治疗众多疾病的潜在靶点。Jellestad等^[29]研究者构建大鼠肝脏缺血再灌注损伤模型发现,与假手术相比,应用GSK-3 β 抑制剂后显著改善肝脏微循环、肝细胞功能和上调IL-10的表达。GSK-3 β 抑制剂作为应激事件后调节炎症反应的关键调节剂,在脓毒症、脓毒症休克、缺血再灌注损伤等与炎症反应有关的疾病中起保护作用。但GSK-3 β 抑制剂的特异性(有ATP竞争性抑制剂、非ATP竞争性抑制剂,又有单靶点药物和多靶点药物)、安全性(特别是ATP竞争性抑制剂容易引起癌症^[30])、耐药性不容忽视,同时其具体作用机制并不十分清楚,仍需进一步深入研究和长期实验观察。

4 eNOS调控炎症介质表达的机制

eNOS是调节内皮源性NO产生的关键激酶,也是依赖钙调蛋白的酶。在血管内皮细胞和心肌细胞中分布广泛。eNOS的功能失活与氧化应激、炎症反应^[22]和对血管内皮的黏附有关。内皮功能障碍在动脉粥样硬化和缺血再灌注损伤中扮演重要角色。内皮功能障碍的特点是降低eNOS诱导的NO生物利用度。NO不仅扩张血管,而且具有抑制炎症反应的作用^[11]。

Wang等^[11]研究发现,应用LY294002(PI3K抑制剂)或EGTA(去除细胞外Ca²⁺的培养基)预处理人脐静脉内皮细胞(HUVEC)后,CAP(特异性TRPV1激动剂)诱导NO的产生被显著抑制,这表明TRPV1可

通过依赖Ca²⁺的PI3K/Akt信号通路诱导NO产生。进一步研究发现,CAP通过下游蛋白eNOS的激活抑制LPS诱导的炎症反应。LPS处理HUVEC后,上调IL-6、ICAM-1和VCAM-1等的表达,这与NF- κ B的活性增强有关;用CAP处理HUVEC后可抑制LPS诱导的炎症反应。可见TRPV1诱导的eNOS激活以阻断NF- κ B的方式减弱LPS诱导的炎症反应。但eNOS调控炎症介质表达的机制并不明确,需进一步深入研究和长期实验观察。

5 FOXO1调控炎症介质表达的机制

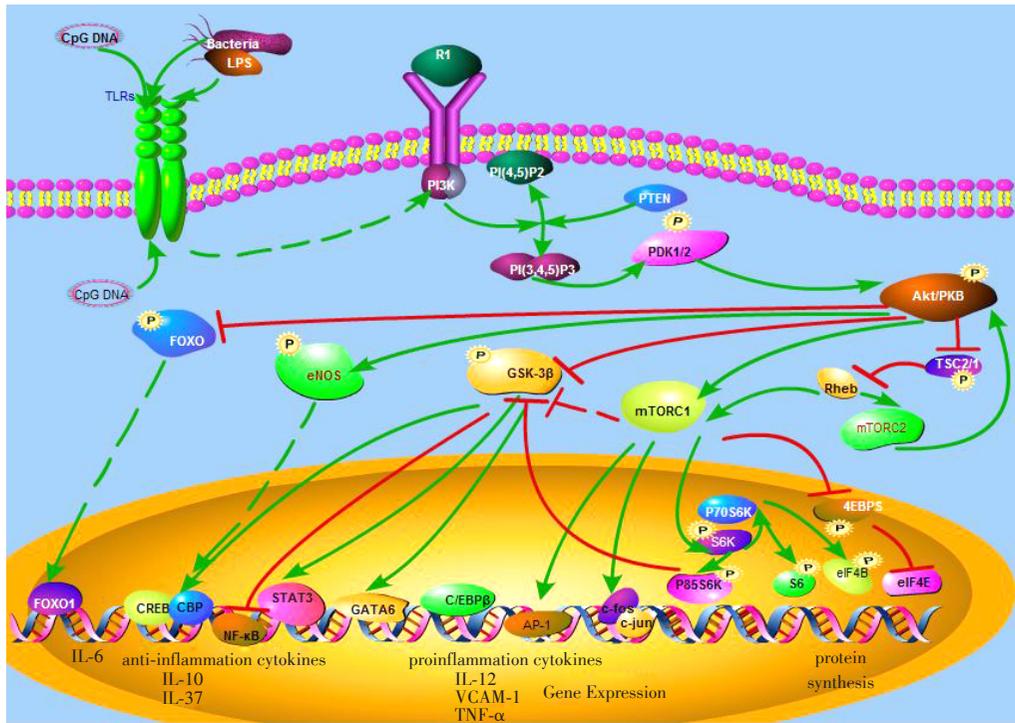
FOXO1涉及许多疾病的病理生理过程,包括糖类脂类代谢、免疫炎症和抗氧化应激等方面,与肿瘤、糖尿病和心血管疾病等多种疾病有关。有研究表明FOXO1参与炎症反应^[12]。

Wang等^[31]研究发现LPS不仅刺激FOXO的表达、细胞核定位和FOXO介导的基因转录,还通过调控FOXO转录因子的活性诱导炎症因子的表达。在成熟巨噬细胞中,FOXO1以增强TLR4信号通路的方式促进LPS诱导的炎症反应。LPS通过几种信号通路激活Akt,促进FOXO1的快速磷酸化和出细胞核。当FOXO1增强TLR4信号通路时,TLR4/PI3K/AKT信号通路又使FOXO1反式激活的功能失效进而限制炎症反应。

FOXO1过度激活所致的炎症反应受到mTOR信号通路的反馈调节。Rictor是mTORC2的关键组成部分,通过降低下游蛋白FOXO1的活性限制炎症反应。Brown等^[12]研究发现在rictor缺陷MEFs(小鼠胚胎成纤维细胞)中敲低FOXO1或在DC中敲低FOXO1可下调炎症介质的表达,表明mTORC2通过调控FOXO1的活性影响炎症介质的表达(图1)。但FOXO1调控炎症介质表达的机制并不明确,需进一步深入研究和长期实验观察。

6 展 望

Akt调控炎症介质表达的下游蛋白有mTOR、GSK3 β 、eNOS和FOXO1等。LPS刺激细胞后,使PI3K/Akt/TSC-2/TSC-1/Rheb/mTORC1、PI3K/Akt/GSK-3 β 、PI3K/Akt/mTORC1/GSK-3 β /GATA-6、PI3K/Akt/mTORC1/eNOS-Thr495和PI3K/mTORC2/Akt/FOXO1等一系列信号分子活化(图1),从而激活CREB、NF- κ B p65和AP-1等转录因子(图1),进而影响促炎、抗炎反应平衡和免疫应答,最终影响休克、脓毒症和缺血再灌注损伤等炎性疾病的发生发展。



LPS:脂多糖;CpG:含 CpG 基序的 DNA;TLRs:Toll 样受体;PIP2:磷脂酰肌醇 2 磷酸;PIP3:磷脂酰肌醇 3 磷酸;PTEN:磷酸酶 PTEN;PI3K:磷脂酰肌醇 3 激酶;PDK1/2:磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶;Akt:蛋白激酶 B;TSC2/1:结节性硬化复合物;Rheb:小 G 蛋白;mTORC1:哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 C1;mTORC2:哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 C2;4EBPs:真核细胞转录起始因子;eIF4E:真核起始因子 4E;eIF4B:真核起始因子 4B;S6K:核糖体 S6 激酶;P70S6K:70kDa 核糖体蛋白 S6 激酶;P85S6K:85kDa 核糖体蛋白 S6 激酶;S6:核糖体蛋白;GSK-3β:糖原合成酶激酶-3β;FOXO:叉头蛋白;FOXO1:叉头蛋白 1 转录因子;eNOS:内皮型一氧化氮合酶;c-fos:转录因子;c-jun:转录因子;AP-1:激活子蛋白;CREB:环磷酸腺苷反应元件结合蛋白;CBP:CREB 的结合蛋白;NF-κB:核因子κB;STAT3:信号传导与转录激活因子 3;GATA-6:GATA 结合蛋白 6;VCAM-1:血管细胞黏附分子 1。

图 1 Akt 下游蛋白调控炎症介质表达的作用机制

Figure 1 The mechanism of Akt downstream protein regulate inflammatory mediators

吴慧丽等^[32]通过检测溃疡性结肠炎患者的血清发现,使用 mTORC1 抑制剂雷帕霉素后,IL-6 表达降低,IL-10 表达增高,说明雷帕霉素可以调节免疫炎症反应,减轻炎症反应。PI3K/Akt/TSC-2/TSC-1/Rheb/mTORC1 信号通路为休克、脓毒症和缺血再灌注损伤等炎性疾病的发生发展提供新的解释机制, mTORC1 抑制剂可能为休克、脓毒症和缺血再灌注损伤等炎性疾病的治疗提供新的思路。

虽然 GSK-3β 抑制剂已经在多种脓毒症、缺血再灌注损伤动物模型中被证明发挥有效的抗炎作用,但因 GSK-3β 抑制剂的特异性、致癌风险性及耐药性,需要继续研发高效特异性、能够降低患癌风险、降低耐药性的抑制剂,为脓毒症、炎症性疾病患者带来福音。

目前关于 eNOS 和 FOXO1 的细胞与动物实验研究仅证实与炎症反应有关,但具体作用机制并不清楚,而且临床上针对炎症反应的有关 eNOS 和

FOXO1 抑制剂的使用尚未见报道,仍需进一步深入研究和长期实验观察。因此深入研究 Akt 下游蛋白及其对炎症、休克、脓毒症、缺血再灌注损伤等的调控机制,有助于找到治疗炎症性疾病的作用靶点,从而指导临床诊断治疗、降低该类疾病的病死率。

[参考文献]

[1] Simpson SQ. New sepsis criteria: A change we should not make[J]. Chest, 2016, 149(5):1117-1118
 [2] 薄禄龙,卞金俊,邓小明. 2016 年脓毒症最新定义与诊断标准:回归本质重新出发[J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(3):259-262
 [3] 易梦秋,余 旻. 脓毒症导致多器官功能障碍的发病机制[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(20):3451-3454
 [4] Stark AK, Sriskantharajah S, Hessel E M, et al. PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2015, 23(4):82-91
 [5] Testa JR, Tsiachlis PN. AKT signaling in normal and ma-

- lignant cells[J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7391-7393
- [6] Yin H, Zhou H, Kang Y, et al. Syk negatively regulates TLR4-mediated IFN β and IL-10 production and promotes inflammatory responses in dendritic cells[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2015, 1860(3): 588-598
- [7] Wang L, Lu Y, Zhang X, et al. Mindin is a critical mediator of ischemic brain injury in an experimental stroke model[J]. *Experimental Neurology*, 2013, 247(3): 506-516
- [8] Tokuhira N, Kitagishi Y, Suzuki M, et al. PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for Crohn's disease therapy (Review). [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 35(1): 10-16
- [9] Vangan N, Cao Y, Jia X, et al. mTORC1 mediates peptidoglycan induced inflammatory cytokines expression and NF- κ B activation in macrophages[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 99(10): 111-118
- [10] Pandey MK, Degrado TR. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)-targeted therapy and imaging[J]. *Theranostics*, 2016, 6(4): 571-593
- [11] Wang Y, Cui L, Xu H, et al. TRPV1 agonism inhibits endothelial cell inflammation via activation of eNOS/NO pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 260(5): 13-19
- [12] Brown J, Wang H, Suttles J, et al. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) negatively regulates Toll-like receptor 4-mediated inflammatory response via FOXO1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(52): 44295-44305
- [13] Li GH, Lin XL, Zhang H, et al. Ox-Lp(a) transiently induces HUVEC autophagy via an ROS-dependent PAPR-1-LKB1-AMPK-mTOR pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243(1): 223-235
- [14] Jr PJ, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 142(2): 164-175
- [15] Li X, Wu C, Chen N, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 33440-33450
- [16] Katholnig K, Linke M, Pham H, et al. Immune responses of macrophages and dendritic cells regulated by mTOR signalling[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2013, 41(4): 927-933
- [17] Ban K, Kozar RA. Protective role of p70S6K in intestinal ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *Plos One*, 2012, 7(7): e41584
- [18] Li H, Zang A, Du M, et al. mTOR regulates TLR-induced c-fos and Th1 responses to HBV and HCV vaccines [J]. *Virologica Sinica*, 2015, 30(3): 174-189
- [19] Zhao Z, Tang Z, Zhang W, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate protects against renal ischemia/reperfusion injury in a rat model via antiinflammation, antioxidation and anti-apoptosis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(3): 3627-3633
- [20] Li X, Su L, Zhang X, et al. Ulinastatin downregulates TLR4 and NF- κ B expression and protects mouse brains against ischemia/reperfusion injury [J]. *Neurological Research*, 2017, 39(4): 367-373
- [21] Aoyagi T, Kusakari Y, Xiao CY, et al. Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury [J]. *American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology*, 2012, 303(1): H75-H85
- [22] Jope RS, Cheng Y, Lowell JA, et al. Stressed and Inflamed, Can GSK3 Be Blamed? [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 42(3): 180-192
- [23] Wang HH, Lamont RJ, Kumar A, et al. GSK3 β and the control of infectious bacterial diseases [J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(4): 208-217
- [24] Viatour P, Dejardin E, Warnier M, et al. GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity [J]. *Molecular Cell*, 2004, 16(1): 35-45
- [25] Wang H, Brown J, Gu Z, et al. Convergence of the Mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3- β -signaling pathways regulates the innate inflammatory response [J]. *Journal of Immunology*, 2011, 186(9): 5217-5226
- [26] Takahashi-Yanaga F. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2013, 86(2): 191-199
- [27] Lappas M. GSK3 β is increased in adipose tissue and skeletal muscle from women with gestational diabetes where it regulates the inflammatory response [J]. *PLOS one*, 2014, 9(12): e115854
- [28] Palomo V, Martinez A. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors: a patent update (2014 - 2015) [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2017, 27(6): 657-666
- [29] Jellestad L, Fink T, Pradarutti S, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase (GSK)-3- β improves liver microcirculation and hepatocellular function after hemorrhagic shock [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 724(3): 175-184
- [30] Tighe A, Ray-Sinha A, Staples OD, et al. GSK-3 inhibitors induce chromosome instability [J]. *Bmc Cell Biology*, 2007, 8(1): 1-17
- [31] Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO transcription factors: Their clinical significance and regulation [J]. *Biomed Research International*, 2014, 2014(3): 925350
- [32] 吴慧丽, 张利, 李琨琨, 等. 雷帕霉素在溃疡性结肠炎患者中应用的临床价值评估 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(15): 1458-1461