

虫草素对大鼠肾小球系膜细胞自噬的调节作用

毕凌云, 冯明翌, 张媛媛, 司艳凤

新乡医学院第一附属医院儿科, 河南 卫辉
Email: woailt2006@163.com

收稿日期: 2020年11月27日; 录用日期: 2020年12月23日; 发布日期: 2020年12月30日

摘要

目的: 本实验目的是研究虫草素(Cordycepin)对HBSS平衡盐溶液诱导的原代培养的大鼠肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)自噬的保护作用。方法: 大鼠GMCs分离后分别在含有细胞培养基、高糖溶液、HBSS溶液、HBSS溶液 + 虫草素培养基中培养, 培养24 h、72 h后用Western blotting分析方法检测细胞自噬标记LC3 I、II和p62/SQSTM1。结果: 培养24 h, 各组之间LC3和p62/SQSTM1表达没有显著差异, 72 h后在高糖培养基中的细胞LC3-I、LC3-II、p62/SQSTM1下调, 在含HBSS溶液培养基中的细胞LC3-I、LC3-II、p62/SQSTM1表达均上调, 在含HBSS溶液 + 虫草素培养基中的细胞LC3-I、LC3-II、p62/SQSTM1则相反, 表达均下降。结论: 虫草素可以抑制HBSS溶液诱导的肾小球系膜细胞的自噬作用。

关键词

虫草素, 自噬, 肾小球系膜细胞, 大鼠

Regulatory Effect of Cordycepin on Autophagy in Rat Glomerular Mesangial Cells

Lingyun Bi, Mingzhao Feng, Yuanyuan Zhang, Yanfeng Si

Pediatric Department, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui Henan
Email: woailt2006@163.com

Received: Nov. 27th, 2020; accepted: Dec. 23rd, 2020; published: Dec. 30th, 2020

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the effects of cordycepin on the impairment of autophagy induced by HBSS in primary cultured rat glomerular mesangial cells (GMCs). **Methods:** Rat GMCs were isolated and cultured in cell medium, cell medium + high-glucose, HBSS and HBSS + cordycepin medium. At 24 h and 72 h of culture, the cells were examined for expression levels of the autophagy markers LC3 I, II and p62/sequestosome-1 (SQSTM1) using western blotting analysis. **Results:** At 24 h, no significant difference in the expression of LC3 I, II and p62/SQSTM1 was observed among the groups; however, at 72 h the cells exposed to high-glucose medium showed down-regulated LC3 I, II and p62/SQSTM1 expression. The cells exposed to HBSS for 72 h showed up-regulated LC3 I, II and p62/SQSTM1 expression. These changes were reversed in the HBSS + cordycepin group at 72 h. **Conclusions:** In conclusion, Cordycepin can inhibit HBSS-induced autophagy in rat GMCs.

Keywords

Cordycepin, Autophagy, Glomerular Mesangial Cells, Rat

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

自噬是一种重要的细胞机制，在生理状态下，机体通过自噬清除老化的蛋白质，以此来维持细胞内环境的稳定，起着“内务处理”的作用；自噬的另一个重要作用则是清除细胞内的细胞器及异常蛋白。自噬活性减弱可导致胰岛素分泌减少、神经退行性病变、感染加重、系膜细胞氧化损伤与衰老[1]-[6]等多种疾病，过度的自噬也可能诱导细胞死亡[7]。因此自噬在人类疾病发生发展过程中的作用具有两面性，可以说是一把双刃剑。

近年来，自噬在 IgA 肾病、糖尿病肾病、中毒性肾损伤、肾缺血 - 再灌注损伤等疾病的进程中发挥着重要作用，既有保护作用，也有损伤作用[8] [9] [10] [11]。一些研究提示虫草素对肾脏疾病具有治疗作用主要是通过以下机制：虫草素可以通过促进肝细胞生长因子表达、抑制 ROS 产生、抑制肿瘤坏死因子- β 、阻断未折叠蛋白反应[12] [13] [14] [15]。还有研究发现 mTORC1 可以增强 IRE-JNK 通路促进 ERS 引起的凋亡[16]。然而，虫草素是否可以通过调节细胞自噬发挥作用鲜有报道，仍有待研究。本研究的目的是通过使用 HBSS 平衡盐溶液饥饿诱导大鼠肾小球系膜细胞自噬，并探讨虫草素对肾小球系膜细胞自噬的影响，对虫草素的肾脏保护作用提供新的见解。

2. 材料和方法

2.1. 大鼠 GMCs 分离和培养

40 只 2 月龄雄性 Sprague Dawley 大鼠由河南省实验动物中心提供(郑州, 中国)。本研究严格按照美国国立卫生研究院颁布的《实验动物保健和使用指南》建议进行。新乡医学院第一附属医院(卫辉, 中国)《实验动物保健和使用委员会》对动物使用协议进行审查和批准。无菌分离 2 月龄 Sprague Dawley 大鼠两侧肾脏，剥离肾被膜，碎成小块，放在 3 层不锈钢丝网上，不锈钢丝网在使用之前经过冲洗和研棒磨

平。当显微镜下观察不到肾小管, 98%以上肾小球与肾小球囊分离时终止洗涤。从第二层网收集肾小球组织($<75\ \mu\text{m}$), 转移至离心管, $15,000 \times g$, 离心 5 分钟。弃去上清, 沉积物用胶原蛋白 V (Sigma, St. Louis, MO, USA) 处理 10~15 分钟, 37°C , 加入 RPMI-1640/15%胎牛血清(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 混合物终止反应, 标本离心, $15,000 \times g$, 离心 5 分钟, 弃去上清液。收集肾小球, 接种于胶冻状培养瓶, 培养基含 RPMI-1640/15%胎牛血清, 在 37°C 、5% CO_2 条件下培养。第一阶段是 7~10 天之后进行的。24 小时后, 细胞粘附, 形成梭形或不规则的星状细胞。培养 3~4 天后, 细胞形成一片。

2.2. 免疫荧光染色

免疫荧光显示单克隆鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白(1:200, 碧云天生物技术研究, 上海, 中国)和单克隆兔抗人波形蛋白(1:200, 碧云天生物技术研究, 上海, 中国)呈阳性结果, 单克隆细胞角蛋白(1:200, 碧云天生物技术研究, 上海, 中国)和鼠单克隆 VIII 因子(1:200, 碧云天生物技术研究, 上海, 中国)呈阴性。细胞培养三代后进行检测。

2.3. 分组

细胞分为四组, 对照组: 细胞在 RPMI-1640/15%胎牛血清 + PBS 溶液培养基中培养; 高糖组, 细胞在 RPMI-1640/15%胎牛血清 + 30 mmol/l 糖培养基中培养; HBSS 组: 细胞在 1 ml HBSS 溶液中培养; HBSS + 虫草素组: 细胞在 1 ml HBSS、5 $\mu\text{mol/ml}$ 虫草素(Sigma, 美国)溶液中培养。分别在培养 24 h、72 h 后收集细胞进行检测。

2.4. Western Blotting 检测

收集上述实验步骤中的不同组别的细胞, 弃去培养板中的培养液, 用 PBS 清洗两次, 每孔加入 100 μL 细胞裂解液, 置于冰上充分震荡裂解 5 min, 并用 200 μL 移液器在培养板上来回均匀刮动, 使细胞裂解更加充分, 吹打混匀后装入 600 μL 微量离心管中。取等量蛋白质与 5 \times SDS 上样缓冲液及 100 Mm DDT, 95°C 煮沸 5 min, 置冰上或 -20°C 冰箱备用。通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质样品。浓缩胶电压为 8 V/cm 凝胶(约 80 V), 分离胶电压为 15 V/cm 凝胶(约 120 V), 继续电泳至溴酚蓝到达分离胶底部。梯度胶电压为 200 V 恒压, 100~125 mA/gel (开始时) 60~80 mA/gel (结束时)。用湿式电转法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上(恒流 300 mA, 4°C , 1.5 h~3 h, 转膜时间因目的蛋白分子量的大小而不同)。聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(tris buffered saline tween, TBST)洗 5 min \times 2 次, 5% BSA 封闭 1 h。加入相对应的一抗, 其中 LC3 I、II 和 p62 抗体 1:200 稀释, β -actin 抗体 1:2000 稀释, 于 4°C 冰箱中孵育过夜。TBS 漂洗膜在室温下摇床快摇 10 min \times 3 次; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(二抗)孵育, 室温下轻摇 2 h; TBS 漂洗膜在室温下摇床快摇 10 min \times 3 次; ECL 化学发光, 胶片显影, 得到的胶片置于凝胶成像仪中扫描成像, Image J 软件分析电泳条带灰度值, 目的蛋白的相对表达量用目的蛋白条带灰度值与同一标本 β -actin 的灰度值的比值来表示, SPSS 软件对 Western blotting 数据进行统计学分析。

2.5. 统计分析

采用 SPSS 22.0 统计软件处理实验数据, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm S$)表示。两组之间比较进行独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3. 结果

在目前的研究中, 细胞培养 24 h, 四组之间 LC3-I、LC3-II 和 p62/SQSTM1 蛋白没有显著差异(见图 1)。培养 72 h 后, 高糖组和对照组相比, p62/SQSTM1 表达降低, LC3-I、LC3-II 降低(见图 2)。相比之

下, HBSS 组细胞的 p62/SQSTM1、LC3-I、LC3-II 表达均增加, HBSS + 虫草素组 p62/SQSTM1、LC3-I、LC3-II 表达均降低(见 图 2)。这些结果表明, 高糖可以抑制系膜细胞自噬, HBSS 可以诱导系膜细胞自噬, 虫草素可以抑制这种反应。

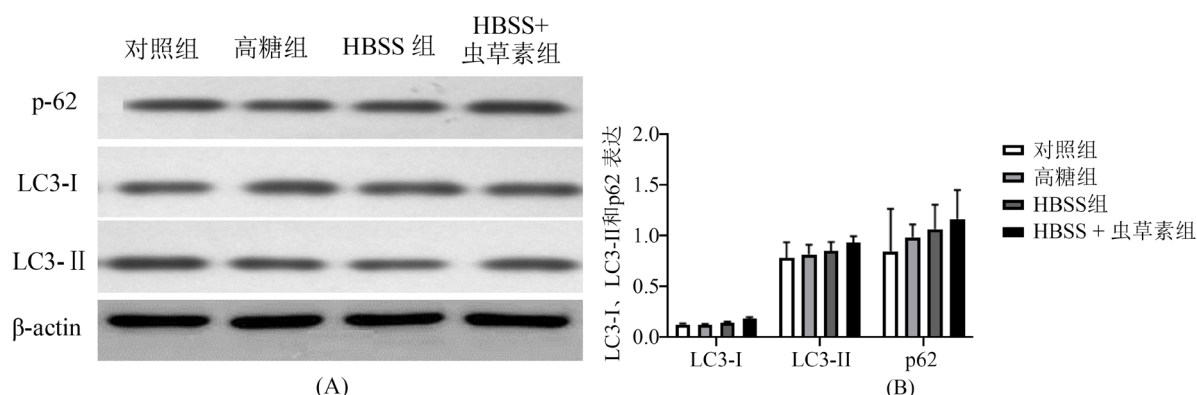


Figure 1. LC3-I, LC3-II and p62/sequestosome-1 in the groups after cell culture for 24 hours. (A) Western blotting showed that there were no significant differences in LC3-I, LC3-II and p62/sequestosome-1 between the groups after cell culture for 24 hours ($P > 0.05$). (B) Quantitative analysis with Image J software

图 1. 细胞培养 24 h 后各组之间 LC3-I、LC3-II 和 p62/sequestosome-1 情况。(A) Western blotting 显示细胞培养 24 h 后对照组、高糖组、HBSS 组和 HBSS + 虫草素组之间 LC3-I、LC3-II 和 p62/sequestosome-1 情况没有显著差异($P > 0.05$)。(B) 用 Image J 软件对 A 中条带进行的量化

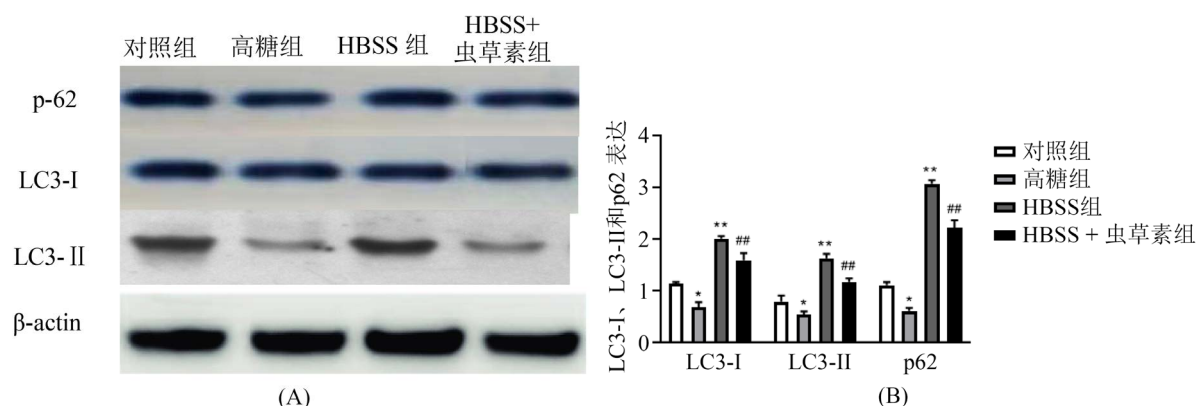


Figure 2. LC3-I, LC3-II and p62/sequestosome-1 in the groups after cell culture for 72 hours. (A) Western blotting showed the expression of LC3-I, II and p62/SQSTM1 decreased in the high glucose group compared with the control group after 72 hours of cell culture ($*P < 0.05$), but LC3-I, II and p62/SQSTM1 in the HBSS group increased ($**P < 0.01$). Compared with the HBSS group, LC3-I, II and p62/SQSTM1 in the HBSS + cordycepin group decreased ($###P < 0.01$). (B) Quantitative analysis with Image J software

图 2. 细胞培养 72 h 后各组之间 LC3-I、LC3-II 和 p62/sequestosome-1 情况。(A) Western blotting 显示细胞培养 72 h 后, 和对照组相比, 高糖组细胞 LC3-I、II 和 p62/SQSTM1 表达降低($*P < 0.05$), HBSS 组细胞 LC3-I、II 和 p62/SQSTM1 均增加($**P < 0.01$)。和 HBSS 组相比, HBSS + 虫草素组 LC3-I、II 和 p62/SQSTM1 均降低($###P < 0.01$)。(B) 用 Image J 软件对 A 中条带进行的量化

4. 讨论

本研究将 HBSS 处理的大鼠肾小球系膜细胞作为诱导自噬的基础模型, 发现 HBSS 能使系膜细胞中 LC3-I 和 II 的表达明显增加, 而高糖能使 LC3-I 和 II 的表达降低, 提示成功构建自噬模型, 与多数研究结果相一致。细胞自噬是广泛存在于真核细胞生物中的病理生理过程, “自噬”的意思是“自我进食”, 起源于希腊语, 是克里斯蒂安·德·杜夫(Christian de Duve)于 1963 年前首次提出的。Yoshinori Ohsumi

因其在控制自噬的分子原理方面的工作而获得 2016 年诺贝尔医学或生理学奖[17]。目前关于自噬的分子调控机制主要来自于对饥饿(即低水平的氨基酸、葡萄糖、ATP 和生长因子)的研究。HBSS 是细胞常用的无机盐溶液和平衡盐溶液,可通过无血清的饥饿方法在细胞内诱导自噬发生[18]。LC3 前体分裂和形成 LC3-I, LC3-I 通过激活自噬相关基因 Atg7 转换成膜结合型 LC3-II, LC3-I 和 LC3-II 是自噬的指标,显示自噬的激活[19]。p62/sequestosome-1 (SQSTM1)是一种泛素-结合蛋白,在哺乳动物体内能通过溶酶体和 LC3 作用诱导泛素化蛋白质的自我吞噬[20]。p62/(SQSTM1)高表达可导致自我吞噬过程加速,并可作为自我吞噬的标志[21]。

我们的前期研究发现高葡萄糖可以抑制肾细胞自噬,脂多糖可以诱导自噬,此外,促红细胞生成素可以扭转脂多糖引起自噬和保护肾系膜细胞免受损伤[22]。本研究同样发现高葡萄糖可以抑制肾小球系膜细胞自噬。Li 等人[23]的实验表明高浓度葡萄糖可以抑制肾小球系膜细胞的自我吞噬,而雷帕霉素可以抑制其自噬,N-3-甲基腺嘌呤可以增强高糖引起的肾小球系膜细胞自噬。自噬在多种肾脏疾病中发挥作用。Ling 等[24]建立了 Wistar 大鼠肾缺血-再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)模型,自噬标记物 LC3-II、Beclin1、LAMP2、Rab7 的表达水平升高,提示肾小管上皮细胞自噬激活,特异性敲除鼠近端小管 Atg7 (自噬相关基因)基因后,肾功能恶化,凋亡细胞增多,表明自噬在 IRI 中起到一定的保护作用。Man 等[25]在顺铂诱导的肾损伤小鼠模型中发现胞质内 LC3-II 表达增加和 p62 降解,证实了肾小管近端小管细胞发生了自噬,而且自噬减轻了其损伤和凋亡,这可能与干扰细胞杀伤机制有关。环孢霉素 A 也可在肾近端小管诱发自噬,Yadav 等[26]发现当暴露于环孢霉素 A 时,表达 TMBIM6 的细胞可阻止自噬体蓄积以维持自噬活性,且溶酶体活性高度增加,而敲除 TMBIM6 基因的小鼠对环孢霉素 A 诱导的肾损伤是敏感的。以上实验提示自噬对器官损伤有保护作用,但长期的或持续性自噬在一定程度上会加重细胞损伤,导致细胞程序性死亡,表现为损伤性作用。自噬在肾脏疾病中的作用还有待充分阐明。

本研究观察到虫草素对 HBSS 诱导的肾小球系膜细胞自噬有抑制作用。虫草素(Cordycepin)是一种核苷类似物,在结构上的类似于腺苷,是中国传统名贵中药材冬虫夏草和北虫夏草的主要活性成分之一。虫草素具有调节免疫、抗炎、抗纤维化、延缓衰老等多种作用,百令胶囊是含有虫草素的中成药,在肾脏病治疗中有明确的疗效,我们前期的多项研究结果也表明,百令胶囊能减轻肾脏纤维化[27][28],虫草素可以通过多种机制对肾脏疾病发挥保护作用,虫草素是否可以通过调节细胞自噬发挥作用鲜有报道,本研究观察到虫草素对肾小球系膜细胞自噬有抑制作用,有研究报道虫草素可以通过活化 Akt-mTOR 通路抑制自噬。

综上所述,HBSS 平衡盐溶液诱导细胞自噬的模型是成功的,高葡萄糖可以抑制大鼠肾小球系膜细胞的自噬,可以证明饥饿是调控自噬的机制之一。虫草素对肾小球系膜细胞自噬有抑制作用,可能机制是通过活化 Akt-mTOR 通路而抑制自噬的发生。

基金项目

河南省科技攻关计划项目(172102310498),河南省医学科技公关项目(201602156),河南省高等学校重点科研项目计划(17B320013)。

参考文献

- [1] Wang, S., Sun, Q.Q., Xiang, B., et al. (2013) Pancreatic Islet Cell Autophagy during Aging in Rats. *Clinical and Investigative Medicine*, **36**, E72-E80. <https://doi.org/10.25011/cim.v36i2.19569>
- [2] Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., et al. (2009) Autophagy Regulates Lipid Metabolism. *Nature*, **458**, 1131-1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>
- [3] Grumati, P., Coletto, L., Sabatelli, P., et al. (2010) Autophagy Is Defective in Collagen VI Muscular Dystrophies, and Its Reactivation Rescues Myofiber Degeneration. *Nature Medicine*, **16**, 1313-1320. <https://doi.org/10.1038/nm.2247>

- [4] Ambegaokar, S.S. and Jackson, G.R. (2012) The Downward Spiral of Tau and Autolysosomes: A New Hypothesis in Neurodegeneration. *Autophagy*, **8**, 1144-1145. <https://doi.org/10.4161/auto.20515>
- [5] Levine, B. and Deretic, V. (2007) Unveiling the Roles of Autophagy in Innate and Adaptive Immunity. *Nature Reviews Immunology*, **7**, 767-777. <https://doi.org/10.1038/nri2161>
- [6] 李锦, 白雪源, 崔少远, 等. 雷帕霉素对高糖诱导的肾系膜细胞自噬抑制、氧化损伤和衰老的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(4): 467-471.
- [7] Lieberthal, W. (2008) Macroautophagy: A Mechanism for Mediating Cell Death or for Promoting Cell Survival? *Kidney International*, **74**, 555-557. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.325>
- [8] Hadj Abdallah, N., Baulies, A., Bouhleb, A., et al. (2018) Zinc Mitigates Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by Modulating Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy. *Journal of Cellular Physiology*, **233**, 8677-8690. <https://doi.org/10.1002/jcp.26747>
- [9] Kaushal, G.P. and Shah, S.V. (2016) Autophagy in Acute Kidney Injury. *Kidney International*, **89**, 779-791. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.11.021>
- [10] Kitada, M., Ogura, Y., Monno, I., et al. (2017) Regulating Autophagy as a Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy. *Current Diabetes Reports*, **17**, 53-63. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0879-y>
- [11] Jin, J., Hu, K., Ye, M., et al. (2018) Rapamycin Reduces Podocyte Apoptosis and Is Involved in Autophagy and mTOR/P70S6K/4EBP1 Signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **48**, 765-772. <https://doi.org/10.1159/000491905>
- [12] 范惠, 张琼. 中医药干预肾纤维化 TGF- β 1/Smad 信号转导通路的体外研究概况[J]. 西南医科大学学报, 2017, 40(2): 221-224.
- [13] Li, L., He, D., Yang, J., et al. (2011) Cordycepin Inhibits Renal Interstitial Myofibroblast Activation Probably by Inducing Hepatocyte Growth Factor Expression. *Journal of Pharmacological Sciences*, **117**, 286-294. <https://doi.org/10.1254/jphs.11127FP>
- [14] Xiao, L., Ge, Y., Sun, L., et al. (2012) Cordycepin Inhibits Albumin-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Renal Tubular Epithelial Cells by Reducing Reactive Oxygen Species Production. *Free Radical Research*, **46**, 174-183. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.647688>
- [15] Zhang, X.L., Al-Assaf, S., et al. (2012) *Cordyceps sinensis* Decreases TGF- β 1 Dependent Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation and Attenuates Renal Fibrosis. *Food Hydrocolloids*, **28**, 200-212. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.016>
- [16] Kitamura, M., Kato, H., Saito, H., et al. (2011) Aberrant, Differential and Bidirectional Regulation of the Unfolded Protein Response towards Cell Survival by 3'-Deoxyadenosine. *Cell Death & Differentiation*, **18**, 1876-1888. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.63>
- [17] Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, Jr., et al. (2003) A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Developmental Cell*, **5**, 539-545. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00296-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00296-X)
- [18] 葛军娜, 黄丹, 肖田, 等. 饥饿诱导肿瘤细胞自噬对细胞周期的影响团[J]. 癌症, 2008, 27(8): 788-794.
- [19] Kadowaki, M. and Karim, M.R. (2009) Cytosolic LC3 Ratio as a Quantitative Index of Macroautophagy. *Methods in Enzymology*, **452**, 199-213. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03613-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03613-6)
- [20] Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., et al. (2007) p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 24131-24145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>
- [21] Mizushima, N. and Yoshimori, T. (2007) How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*, **3**, 542-545. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>
- [22] Yu, Y., Shiou, S.R., Guo, Y., et al. (2013) Erythropoietin Protects Epithelial Cells from Excessive Autophagy and Apoptosis in Experimental Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *PLoS ONE*, **8**, e69620-e69633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069620>
- [23] Li, J., Bai, X.Y., Cui, S.Y., et al. (2012) Effect of Rapamycin on High Glucose-Induced Autophagy Impairment, Oxidative Stress and Premature Senescence in Rat Mesangial Cells *in Vitro*. *Journal of Southern Medical University*, **32**, 467-471.
- [24] Ling, H., Chen, H., Wei, M., et al. (2016) The Effect of Autophagy on Inflammation Cytokines in Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Inflammation*, **39**, 347-356. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0255-5>
- [25] Jiang, M., Wei, Q., Dong, G., et al. (2012) Autophagy in Proximal Tubules Protects against Acute Kidney Injury. *Kidney International*, **82**, 1271-1283. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.261>
- [26] Yadav, R.K., Lee, G.H., Lee, H.Y.H., et al. (2015) TMBIM6 (Transmembrane BAX Inhibitor Motif Containing 6)

Enhances Autophagy and Reduces Renal Dysfunction in a Cyclosporine A-Induced Nephrotoxicity Model. *Autophagy*, **11**, 1760-1774. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1082021>

- [27] 李暖, 杨达胜, 毕凌云. 百令胶囊对肾小管间质纤维化大鼠模型肾小管损伤的保护作用[J]. 中医临床研究, 2009, 1(23): 5-6.
- [28] Zhao, D., Yang, D.S., Bi, L.-Y., *et al.* (2005) Bailing Capsule in Preventing Epithelial-Mesenchymal Transition in Rats with Tubulointerstitial Fibrosis. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, **20**, 939-942.