

刘双双,孙 凯,蔡国栋,等. 呕吐毒素对小鼠 T 淋巴细胞体外活化及相应活化标志分子的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):150-155.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.027

呕吐毒素对小鼠 T 淋巴细胞体外活化 及相应活化标志分子的影响

刘双双^{1,2}, 孙 凯¹, 蔡国栋¹, 宋瑞龙¹, 邹 辉¹, 顾建红¹, 袁 燕¹, 刘学忠¹, 刘宗平^{1,2}, 卞建春^{1,2}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009)

摘要:为探究脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, 简称 DON)对离体 T 淋巴细胞活化的抑制作用, 研究 DON 对刀豆蛋白 A(concanavalin A, 简称 Con A)介导的小鼠离体 T 淋巴细胞活化及活化标志分子 CD69、CD25、CD71 的影响, 以 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞为材料, 分设细胞空白组、刀豆蛋白 A 对照组、不同浓度 DON 染毒组(Con A + 0.5/1/2 $\mu\text{mol/L}$ DON), 用 CCK-8 法检测 24h 内细胞的相对活性, 用流式细胞术分别检测 6、30、72 h 时 CD69、CD25、CD71 的表达量。结果显示, DON 在终浓度为 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 时均极显著地降低了 Con A 介导的 T 细胞的相对活性($P < 0.01$), 在终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时显著地降低了 T 细胞 CD69 的表达率($P < 0.05$), 在终浓度为 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 时均极显著地降低了 CD25、CD71 的表达率($P < 0.01$), 且呈剂量效应关系。由结果可知, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对动物机体免疫抑制作用的产生与其直接抑制小鼠 T 淋巴细胞的活化有关。

关键词:呕吐毒素; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 刀豆蛋白; T 淋巴细胞; CD69; CD25; CD71

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)04-0150-06

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, 简称 DON)又名呕吐毒素(vomitoxin, 简称 VT)^[1-2], 是一种由粉红镰刀菌和禾谷镰刀菌产生的单端孢霉烯族毒素, 是广泛引起粮食、饲料污染的主要霉菌毒素之一。1970 年日本诸冈信一等首次从香川县感染赤霉病的大麦中分离到 DON。DON 的细胞毒性很强, 但无特殊的靶器官, 对机体各种器官均有影响。不同动物对 DON 的敏感程度表现不一, 猪最敏感^[3]。近年来, 在我国动物配合饲料中 DON 的检出率高达 98.02%, 在猪饲料中最高含量达到 4 773 $\mu\text{g/kg}$, 远远超出我国限量标准(1 000 $\mu\text{g/kg}$), 引起了养殖业的广泛重视^[4-5]。目前, 国内外对 DON 毒性的研究主要集中在动物生产性能、器官组织病理损伤、免疫功能等方面^[6]。大量研究证明, DON 可对动物机体的免疫系统产生明显的急、慢性毒性作用。据报道, 一次急性染毒

DON 可以导致小鼠肝、肾、脾、胸腺的细胞损伤, 诱导和促进免疫细胞的凋亡并抑制其增殖^[7-8]。T 淋巴细胞在细胞免疫中发挥主要作用, 而其发挥作用的重要前提和基础是 T 细胞必须经过活化及增殖^[9-10]。目前的研究表明, DON 在体内外均可抑制 T 淋巴细胞的活化与增殖^[7,11], 但其作用机制尚未阐明。为了揭示 DON 抑制 T 淋巴细胞的活性与活化作用的机制, 本研究分析了 DON 对离体 T 淋巴细胞活化过程的影响, 并研究了 DON 对 T 细胞早期活化抗原 CD69、中期活化抗原 CD25 和 CD71 表达的影响, 本研究结果可以为 DON 中毒的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 清洁级 BALB/c 小鼠, 雄性, 4~5 周龄, 体质量(20 ± 2) g, 购自扬州大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂与仪器 脱氧雪腐镰刀菌烯醇、刀豆蛋白(concanavalin A, 简称 Con A), 购自美国 Sigma 公司; CD3-APC、CD69-FITC、CD4-FITC、CD25-PE、CD71-PE 流式抗体, 购自美国 BD 公司; RPMI-1640 完全培养液, 含 10% 胎牛血清

收稿日期: 2019-01-15

基金项目: 国家重点研发计划支持项目(编号: 2016YFD0501208); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

作者简介: 刘双双(1996—), 女, 河南漯河人, 硕士, 主要从事动物营养代谢病与中毒病研究。E-mail: 1326247070@qq.com。

通信作者: 卞建春, 博士, 教授, 主要从事动物营养代谢病与中毒病研究。Tel: (0514) 87979042; E-mail: jcbian@yzu.edu.cn。

(Gibco)、L-谷氨酰胺(2 mmol/L, Sigma)、二巯基乙醇(50 μ mol/L, Sigma)、1%青链霉素(青霉素、链霉素比例为1:1)、RPMI-1640培养基粉末(Gibco); Cell Counting Kit-8, 东仁化学科技有限公司; 红细胞裂解液, 购自索莱宝生物科技有限公司。

CyAn ADP7 流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司生产; CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 生产; Tecan Sunrise 光吸收酶标仪, 澳大利亚 Tecan 公司生产; SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台, 苏州净化设备有限公司生产; 5810R 台式高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 脾脏淋巴细胞悬液的制备 将 BALB/c 小鼠断颈处死, 无菌摘取脾脏, 用组织研磨棒在 200 目滤网上研磨过滤, 制备单细胞悬液。加入红细胞裂解液处理 3 min 后, 用无菌磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤细胞 2 次, 1 000 r/min 离心 8 min。

将细胞按一定比例稀释后重悬于 1 mL 10% 胎牛血清 RPMI-1640 完全培养液中, 用台盼蓝染色计数活细胞数(活细胞数占总细胞数的 95% 以上), 最终调整为细胞密度为 3×10^6 mL 的淋巴细胞悬液。

1.2.2 CCK-8 法检测 DON 对小鼠 T 淋巴细胞体外存活的影响 本试验分别设细胞空白组(Control 组)、Con A 对照组(终质量浓度为 5 mg/L, 参照笔者所在实验室前期的研究成果^[12], 下同)、Con A + 0.5 μ mol/L DON(终质量浓度, 下同)组、Con A + 1 μ mol/L DON 组、Con A + 2 μ mol/L DON 组, 将制得的淋巴细胞悬液接种于 12 孔板中, 每孔 1 mL, 于药物处理组中加入相应浓度的 DON 工作液各 2 μ L(终质量浓度与各处理组对应), 除细胞空白组外, 每组加入 5 μ L Con A(终浓度为 5 mg/L)。混匀每孔中的培养液, 分组加入 96 孔板中, 每组设 6 个重复, 100 μ L/孔, 同时设立空白对照孔(不加细胞), 之后在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h。加入 CCK-8 试剂, 10 μ L/孔, 于 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 培养箱中培养 3 h 后, 立刻用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。根据公式[细胞相对存活率 = (处理组吸光度 - 空白对照组吸光度)/(Con A 组吸光度 - 空白对照组吸光度)]计算细胞相对存活率。具体公式如下:

$$\text{细胞存活率} = [(D_{450 \text{ nm}(s)} - D_{450 \text{ nm}(b)}) / (D_{450 \text{ nm}(c)} - D_{450 \text{ nm}(b)})] \times 100\%;$$

$$\text{抑制率} = [(D_{450 \text{ nm}(c)} - D_{450 \text{ nm}(s)}) / (D_{450 \text{ nm}(c)} - D_{450 \text{ nm}(b)})] \times 100\%。$$

式中:s 表示试验孔;c 表示对照孔;b 表示空白孔。

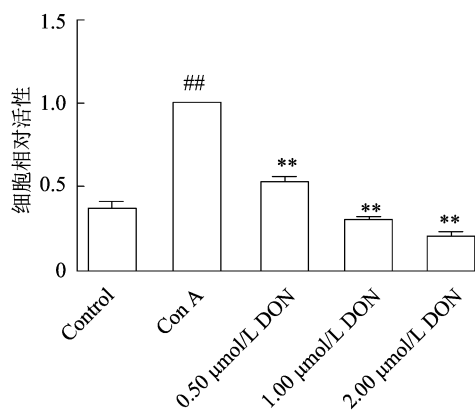
1.2.3 T 细胞 CD69、CD25、CD71 表达的检测 采用直接免疫荧光标记法染色, 细胞培养 6 h 后, 取样离心, 用冷 PBS 清洗 2 次后, 将细胞悬液浓缩至 100 μ L, 分别加入 1 μ g CD3-APC、CD69-FITC 单克隆抗体; 细胞培养 30 h 后, 分别加入 1 μ g CD25-PE、CD4-FITC 单克隆抗体; 细胞培养 72 h 后, 分别加入 1 μ g CD71-PE、CD3-APC 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 用冷 PBS 离心洗涤 1 次, 重悬于 500 μ L PBS 中, 立即上流式细胞仪(FACSCalibur)检测。

1.2.4 统计学分析 所有数据以均值 \pm 标准差表示, 用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, 组间比较采用配对 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 DON 对小鼠 T 淋巴细胞相对活性的影响

小鼠 T 淋巴细胞培养 24 h 后, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度, 以此来计算细胞的相对活性。由图 1 可见, 加入 Con A 后, 与细胞空白组对比, 细胞的相对活性极显著提高($P < 0.01$); 加入 DON 后, 各染毒组细胞活性均降低, 与 Con A 比较均存在极显著差异($P < 0.01$)。



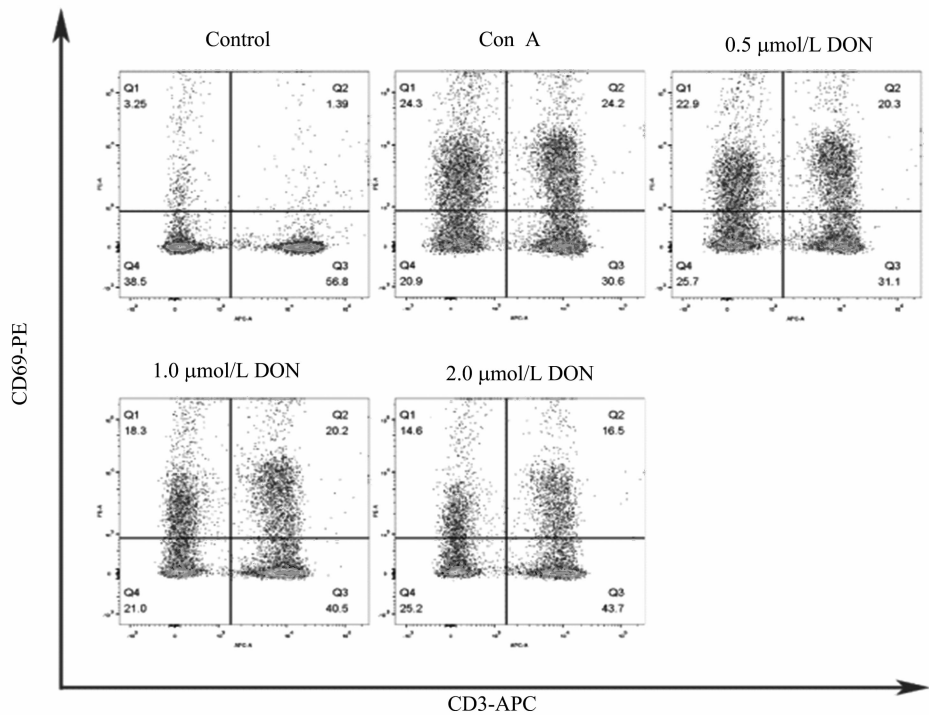
表示 Con A 组与空白组相比差异极显著 ($P < 0.01$); *, ** 分别表示染毒组与 Con A 组相比差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$)。下图同图 1

2.2 DON 对小鼠 T 淋巴细胞 CD69 表达的影响

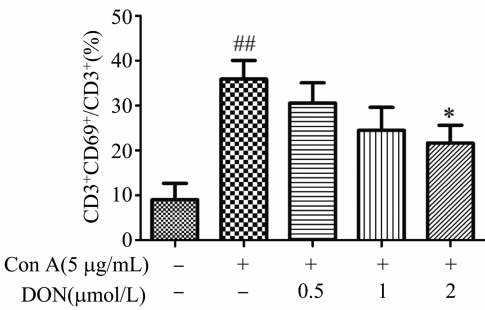
小鼠 T 淋巴细胞培养 6 h 后, 用流式细胞术检测 T 淋巴细胞早期活化抗原 CD69 的表达情况。如图 2 所示, 细胞空白组小鼠 CD3⁺T 细胞中 CD69⁺T

细胞的比例为 $(9.04 \pm 6.24)\%$,即 CD69 的表达率为 $(9.04 \pm 6.24)\%$ 。在用 Con A 刺激 6 h 后,其 CD69 表达量达到 $(35.88 \pm 7.20)\%$,与空白组相比极显著升高($P < 0.01$)。加入 DON 后,随着 DON

终浓度的升高,Con A 介导的 T 细胞 CD69 表达呈现下降趋势,并具有剂量 - 效应关系,2 $\mu\text{mol/L}$ DON 组与 Con A 组相比差异显著($P < 0.05$)。



A. DON 对 Con A 介导的 T 细胞表达 CD69 的影响



B. 不同处理组 CD3⁺CD69⁺占 CD3⁺总细胞的比例
图2 DON 对 Con A 介导的 T 细胞表达 CD69 的影响

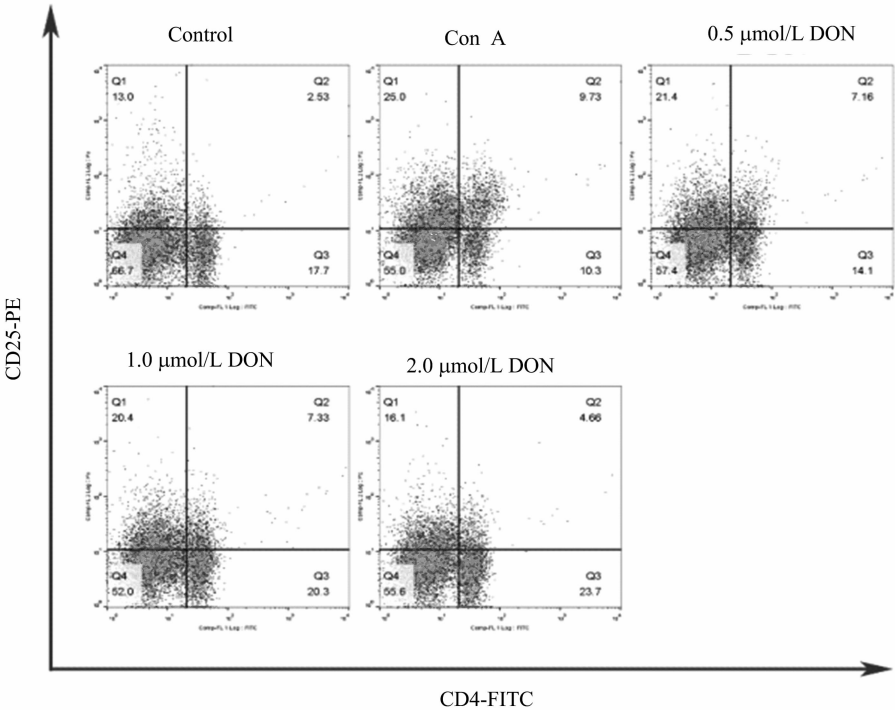
2.3 DON 对小鼠 T 淋巴细胞 CD25 表达的影响

小鼠 T 淋巴细胞培养 30 h 后,用流式细胞术检测调节 T 淋巴细胞中期活化抗原 CD25 的表达。由图 3 可以看出,细胞空白组小鼠 CD4⁺T 细胞中 CD25⁺T 细胞的比例为 $(9.88 \pm 2.57)\%$,即 CD25 的表达率为 $(9.88 \pm 2.57)\%$ 。在用 Con A 刺激 30 h 后,其 CD25 表达量达到 $(50.64 \pm 6.54)\%$,与空白组相比极显著升高($P < 0.01$)。加入 DON 后,随着 DON 终浓度的升高,Con A 介导的 T 细胞 CD25 表达呈现下降趋势,并具有剂量 - 效应关系,各染毒

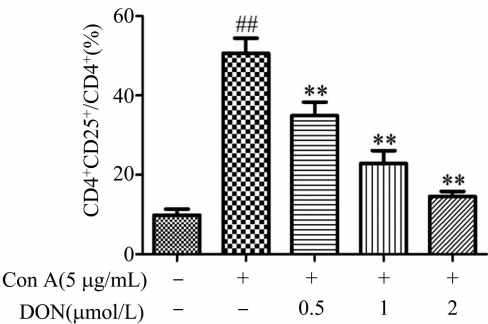
组与 Con A 组相比均有极显著差异($P < 0.01$)。

2.4 DON 对小鼠 T 淋巴细胞 CD71 表达的影响

小鼠 T 淋巴细胞培养 72 h 后,用双抗体染色法结合流式细胞术检测调节 T 淋巴细胞中期活化抗原 CD71 的表达。由图 4 可以看出,细胞空白组小鼠 CD3⁺T 细胞中 CD71⁺T 细胞的比例为 $(2.88 \pm 2.57)\%$,即 CD71 表达率为 $(2.88 \pm 2.57)\%$ 。在用 Con A 刺激 72 h 后,其 CD71 表达量达到 $(35.81 \pm 6.54)\%$,与空白组相比极显著升高($P < 0.01$)。加入 DON 后,随着 DON 终浓度的升高,Con A 介导的



A. DON 对 Con A 介导的 T 细胞表达 CD25 的影响



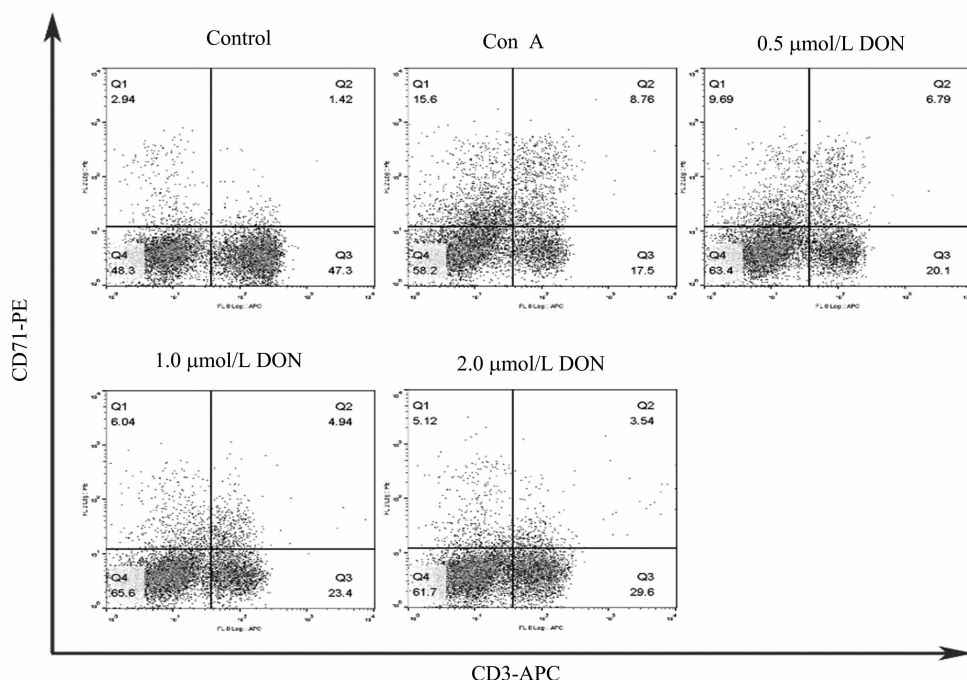
B. 不同处理组 CD4⁺CD25⁺占 CD4⁺总细胞的比例
图3 DON 对 Con A 介导的 T 细胞表达 CD25 的影响

T 细胞 CD71 的表达量呈现下降趋势,并具有剂量-效应关系,各染毒组与 Con A 组相比均有极显著差异($P < 0.01$)。

3 讨论

DON 对谷物的污染状况相当普遍,其对动物机体免疫功能的影响已经引起医学界的广泛重视。DON 在高浓度时可诱导免疫细胞凋亡,从而引发免疫抑制;在低浓度时可抑制免疫细胞增殖和细胞因子的分泌,扰乱免疫系统的正常功能^[13]。DON 也可通过对淋巴结和脾脏中免疫细胞数量和功能的调节,引起小鼠淋巴细胞免疫球蛋白 A (IgA)分泌量升高^[14]。Kim 等报道,DON 可导致雄性小鼠体内 IgM、IgG 的含量明显降低^[15]。Ouyang 等研究发现,

DON 能延迟或抑制体外培养 CD4⁺T 淋巴细胞的增殖^[11]。总之,DON 可以通过诱导免疫细胞凋亡、抑制其增殖而影响免疫细胞因子的分泌及抗体的表达,进而对细胞免疫和体液免疫产生影响。淋巴细胞是动物机体进行免疫调节的核心成分,其中 T 淋巴细胞是淋巴细胞中数量最多、功能最复杂的一类。它具有多种生物学功能,如直接杀伤靶细胞、辅助或抑制 B 细胞产生抗体、对特异性抗原或促有丝分裂原的应答反应以及产生细胞因子等,此外,T 淋巴细胞对机体抵御疾病也发挥着非常重要的作用^[16]。目前,在关于 DON 免疫毒性机制的相关研究中,虽已有报道表明,DON 可以抑制 T 淋巴细胞的增殖,但其作用机制尚不明确。T 淋巴细胞的活化是其发挥免疫功能的重要前提和基础^[9]。本试



A. DON 对 Con A 介导的 T 细胞表达 CD71 的影响

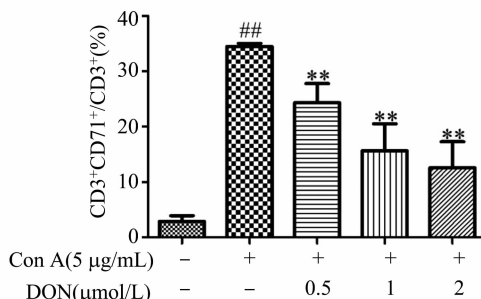
B. 不同处理组 CD3⁺CD71⁺占 CD3⁺总细胞的比例

图4 DON 对 Con A 介导的 T 细胞表达 CD71 的影响

验在证明了 DON 对小鼠活化过程中的 T 淋巴细胞相对有明显的抑制作用的基础上,进一步探究了 DON 对 T 细胞活化抗原表达的影响。

Con A 是 T 细胞多克隆刺激剂,可以作用于 T 细胞表面的 T 细胞抗原受体(TCR) - CD3 复合体,从而刺激 T 细胞活化及增殖反应^[17]。T 细胞活化后可诱发静止细胞分泌淋巴因子 IL-4、 γ -IFN 等,同时表达一系列新的表面分子(如高亲和力 CD69 和 CD25)等^[18-20],这些分子被称为表面活化标志。CD69 是一种 II 型跨膜糖蛋白,是活化的 T 细胞表面最早表达的分子。静止状态下的 T 细胞一般不表达 CD69,在活化后 1~2 h 即可以检测到 CD69 的表达^[21],它可以作为细胞共刺激信号进一步增强细胞的活化或增殖分化,可介导细胞激活后细胞因子的合成^[22],因此 CD69 可作为 T 细胞早期活化的标志。本研究发现,DON 可抑制 Con A 介导的 T 淋巴

细胞 CD69 的表达,说明 DON 可通过抑制 CD69 的表达来降低细胞前期活化的效应。CD25 是 IL-2 (白介素 2) 受体的 α 链,分子量为 55 ku,主要在 CD4⁺T 细胞上表达^[23]。IL-2 受体能否表达主要取决于 T 细胞对 IL-2 的应答,极少部分静止的 T 细胞会表达 IL-2 受体,而活化的 T 细胞表达量明显上升,因为 T 细胞通过抗原提呈细胞(APC)递呈的抗原产生活性后,能使 T 细胞膜表面表达 CD25 即 IL-2R,并分泌产生大量 IL-2。因此可见,CD25 可反映活化 T 细胞的增殖,被认为是激活 T 淋巴细胞的标志^[24]。本研究发现,DON 可抑制 Con A 介导的 T 淋巴细胞 CD25 的表达,并可能因此抑制 T 细胞对 IL-2 的应答,从而影响免疫功能。CD71 是转铁蛋白受体(TfR),表达于活化的白细胞,分子量约为 95 ku,是细胞生长和吸收铁所必需的蛋白。TfR 是一种 II 型跨膜糖蛋白,是由 2 个同

源二聚体(180 ku)的亚基通过 2 条二硫键交联而成的。TfR 的表达量主要是根据细胞内的铁水平进行转录调节的^[25],所有正常细胞都能低水平表达 CD71,但处于高增殖状态的细胞表达水平会明显升高。CD71 不仅仅参与铁的吸收,在细胞的生长、增殖中发挥作用,同时具有免疫调节功能,可以提供激活 T 细胞所必需的第二刺激信号,这也表明 CD71 是正常 T 细胞成熟所必需的。本研究发现,DON 可以抑制 Con A 介导的 T 淋巴细胞 CD71 的表达,影响了细胞的生长、增殖和免疫调节功能的发挥。本研究还发现,DON 可通过抑制 T 淋巴细胞的活化及表面活化标志分子的表达,影响动物机体细胞免疫的调节功能,从而引起免疫抑制的发生。

4 结论

DON 可直接抑制 Con A 介导的小鼠 T 淋巴细胞体外活化,并且能够抑制早期活化标志 CD69 及中期活化标志 CD25、CD71 的表达。这一结果表明 DON 对动物免疫系统的抑制作用与其可直接抑制 T 淋巴细胞的活性与活化作用有关。

参考文献:

- [1] Plattner R D, Maragos C M. Determination of deoxynivalenol and nivalenol in corn and wheat by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(1): 61–65.
- [2] 金秀娟, 朱旭东. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测[J]. 粮食加工, 2010, 35(3): 87–89.
- [3] Pestka J J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance[J]. Archives of Toxicology, 2010, 84(9): 663–679.
- [4] 杜妮. 2012 年我国部分地区饲料及原料霉菌毒素污染调查报告[J]. 养猪, 2013(4): 9–11.
- [5] 王金勇, 刘颖莉, 关舒. 2013 年中国饲料和原料霉菌毒素检测报告[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2014, 49(3): 49–51.
- [6] 黄凯, 朱风华, 宋明明, 等. 呕吐毒素体外对鸡脾脏淋巴细胞的毒性作用[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(13): 34–37.
- [7] 支媛, 方业鑫, 刘海波, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇一次经口染毒对雌性小鼠的影响[J]. 毒理学杂志, 2018, 32(1): 11–17.
- [8] 林少青, 董斌. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的免疫毒性研究进展[J]. 广东饲料, 2009, 18(7): 43–45.
- [9] Craston R, Koh M B C, McDermott A B, et al. Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells[J]. Journal of Immunological Methods, 1997, 209(1): 37–45.
- [10] 李月红, 张祥宏, 邢凌霄, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对人外周血单个核细胞 HLA-I 分子表达的影响[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(3): 297–300.
- [11] Ouyang Y L, Azcona – Olivera J, Murtha J, et al. Vomitorin – mediated IL – 2, IL – 4, and IL – 5 superinduction in murine CD4⁺ T cells stimulated with phorbol ester and calcium ionophore: relation to kinetics of proliferation[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1996, 138(2): 324–334.
- [12] 蔡国栋, 孙凯, 项自来, 等. 玉米赤霉烯酮对小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(7): 1357–1364.
- [13] Jia Q S, Zhou H R, Bennink M R, et al. Docosahexaenoic acid attenuates mycotoxin – induced immunoglobulin A nephropathy, interleukin – 6 transcription, and mitogen – activated protein kinase phosphorylation in mice[J]. Journal of Nutrition, 2004, 134(12): 3343–3349.
- [14] 张天宇, 赵勇, 李兰, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的毒理学特征及对猪业生产危害的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2017, 38(11): 84–88.
- [15] Kim E J, Jeong S H, Cho J H, et al. Plasma haptoglobin and immunoglobulin as diagnostic indicators of deoxynivalenol intoxication[J]. Journal of Veterinary Science, 2008, 9(3): 257–266.
- [16] 徐占云, 秦睿玲, 褚耀斌, 等. 枸杞多糖对雏鸡淋巴细胞体外增殖及分泌 IL – 2 的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(2): 322–328.
- [17] 曾丛梅, 蔡树涛, 周凤兰, 等. ConA 激活小鼠胸腺 T 淋巴细胞增殖过程中 c – myc 与核骨架蛋白的结合[J]. 中国科学(C 辑), 1996, 26(4): 326–330.
- [18] 徐卫东, 范永升, 谷焕鹏, 等. 雄黄对 MRL/lpr 狼疮小鼠抗 ds – DNA 抗体和 T 细胞表面分子 CD₆₉、CD₂₅ 表达的影响[J]. 中国医学创新, 2012, 9(31): 1–3.
- [19] Wang K P, Gu J, Ni X H, et al. CD₂₅ signaling regulates the function and stability of peripheral Foxp3⁺ regulatory T cells derived from the spleen and lymph nodes of mice[J]. Molecular Immunology, 2016, 76: 35–40.
- [20] Chien M W, Lin M H, Huang S H, et al. Glucosamine modulates T cell differentiation through down – regulating N – linked glycosylation of CD₂₅[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(49): 29329–29344.
- [21] 吴丹丹, 汪慧英. CD₆₉ 在细胞活化、凋亡中的双向免疫调节作用[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(9): 1859–1862.
- [22] Krechetova L V, Vtorushina V V, Nikolaeva M A, et al. Expression of early activation marker CD₆₉ on peripheral blood lymphocytes from pregnant women after first trimester alloimmunization[J]. Bulletin of Experimental Biology & Medicine, 2016, 161(4): 1–4.
- [23] 傅云峰, 吕卫国. 白介素 2 受体及其与肿瘤免疫逃逸[J]. 上海免疫学杂志, 2002, 22(2): 132–134.
- [24] 郑兴斌, 杨伟明, 赵洪远, 等. 大肠癌组织中 CD₂₅、CD₂₈ 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(2): 70–71.
- [25] 张洪明. 转铁蛋白受体的结构、表达及功能[J]. 实用临床医药杂志, 2008, 12(3): 114–117.