

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20181007

长链非编码 RNA-linc00152 可能通过 miR-4767 影响血管内皮细胞凋亡和迁移

滕 伟, 郑先杰*, 巩贵宏, 何兆辉, 张君毅, 惠学志

河南大学第一附属医院心内科, 开封 475001

[摘要] **目的:**探讨长链非编码 RNA(lncRNA)-linc00152 在静脉血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)凋亡和迁移中的作用及其机制。**方法:**用溶于磷酸盐缓冲液(PBS)的氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)处理人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)。通过载体转染、蛋白质印迹、荧光素酶构建、生物素化等检测 HUVEC 中 linc00152 与 miR-4767 的相互作用,以及两者对 HUVEC 凋亡、迁移的影响及相关机制。**结果:**linc00152 负向调节 HUVEC 中 miR-4767 的表达($P<0.05$)。miR-4767 促进 HUVEC 的凋亡,抑制 HUVEC 的迁移;linc00152 抑制 HUVEC 的凋亡,促进 HUVEC 的迁移($P<0.05$)。阻断 miR-4767 后,linc00152 敲减引起的 HUVEC 凋亡增加与迁移减少的作用被减弱;同时,linc00152 敲减引起的 Bcl2L12 和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)蛋白表达的减少被改善。**结论:**linc00152 可能成为改善血管内皮功能和治疗部分心血管疾病的潜在靶点。

[关键词] 长链非编码 RNA-linc00152;血管内皮细胞;细胞凋亡;细胞迁移;miR-4767

[中图分类号] R 394.2; R 45 **[文献标志码]** A

Long-chain non-coding RNA-linc00152 expression may play a role in apoptosis and migration of vascular endothelial cells via miR-4767

TENG Wei, ZHENG Xian-jie*, GONG Gui-hong, HE Zhao-hui, ZHANG Jun-yi, HUI Xue-zhi

Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475001, Henan, China

[Abstract] **Objective:** To explore the role of long-chain non-coding RNA (lncRNA)-linc00152 in the apoptosis and migration of vascular endothelial cells (VECs) and the underlying mechanisms. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) were treated with oxidized-low density lipoprotein (ox-LDL) which was solving in fetal bovine serum (FBS). The interactions of linc00152 and miR-4767 in HUVEC were detected by transfection of vectors, Western blotting, luciferase construction, and biotinylation analysis. Then the effects of miR-4767 and linc00152 on the apoptosis and migration of HUVEC and the underlying mechanisms were explored. **Results:** The expression of miR-4767 was negatively regulated by linc00152 ($P<0.05$). miR-4767 increased the apoptosis of HUVEC and decreased their migration; linc00152 decreased the apoptosis of HUVEC and increased their migration ($P<0.05$). After blocking miR-4767, the apoptosis and migration induced by linc00152 knockdown were reduced, meanwhile, the decrease of Bcl2L12 and epidermal growth factor receptor (EGFR) induced by linc00152 knockdown were attenuated. **Conclusions:** Linc00152 may become a potential therapeutic target for improving vascular endothelial function and treating some cardiovascular diseases.

[Key Words] lncRNA-linc00152; vascular endothelial cells; apoptosis; migration; miR-4767

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可根据其在基因组中的位置分为正义 lncRNA(sense lncRNA)、反义 lncRNA(antisense lncRNA)、双向 lncRNA(bidirectional lncRNA)、基因内 lncRNA(intronic lncRNA)和基因间 lncRNA

(intergenic lncRNA, 又称 lincRNA)5 种类型。其中,linc00152 在肝细胞肝癌细胞中起转录因子的作用^[1]。而在胃癌细胞中,linc00152 可起到信号传导或支架作用。RNA 降低和 RNA 免疫沉淀实验^[2]显示, linc00152 可直接与表皮生长因子受体

[收稿日期] 2018-09-10 **[接受日期]** 2019-01-10

[基金项目] 河南省高等学校重点科研项目(18A320023)。Supported by Key Research Project of Henan Higher Education Institutions (18A320023)。

[作者简介] 滕 伟, 博士, 副主任医师。E-mail: tw221618@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 0371-22736828; E-mail: messages-noreply@linkedin.com

(epidermal growth factor receptor, EGFR)结合并激活 PI3K/Akt 信号传导。

miR-4767 最早被发现于乳腺癌^[3]。最近一项研究^[4]证实 Bcl2L12 和 EGFR 都是 miR-4767 的靶基因,并证实 miR-4767 通过靶向抗凋亡基因 Bcl2L12 参与人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的凋亡过程。然而,miR-4767 在 HUVEC 迁移中的作用机制尚不明确。

因此,本研究通过过表达或阻断 linc00152 及 miR-4767,检测 linc00152 对经氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)处理的 HUVEC 凋亡、迁移的影响及相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和 ox-LDL 处理 HUVEC 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),HEK293T 细胞购自上海生命科学研究院细胞资源中心。将 HUVEC 置于含 10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 中,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培育。将 HUVEC 以 10⁵ 个/孔接种于 12 孔培养板中传代培养,当细胞汇合度达 50%时,将 ox-LDL[溶于含有 0.08 μmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)的磷酸盐缓冲液(PBS)]以 50、100、150、200 μg/mL 分别加入细胞中,分别标记培养 24 h。对照组用含 0.08 μmol/L EDTA-Na₂ 的等体积 PBS 培养细胞 24 h。

1.2 载体转染 用阳离子脂质体 lipofectamine 3000(Invitrogen 公司)分别转染含或不含全长 linc00152 序列的 pcDNA3.1、linc00152 siRNA(silinc00152)、miR-4767 模拟物、miR-4767 拮抗剂及混杂的阴性对照寡核苷酸。

1.3 实时荧光定量逆转录多聚酶链反应(qRT-PCR) 采用 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)提取细胞的总 RNA,用反转录酶 SuperScript III 试剂盒(Invitrogen 公司)合成 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司]以 25 μL 的终体积进行 qRT-PCR,并通过 iQ5TM 多色实时 PCR 检测系统(Bio-Rad 公司)监测反应过程。反应条件如下:95℃ 1 min;94℃ 15 s、54℃ 30 s、72℃ 20 s,共 35 个循环。应用 2^{-ΔΔCt} 方法计算所有测试基因的转录浓度(以 U6 作为内参)。反应中使用的引物由广州锐博生物科技有限

公司设计和合成。

1.4 蛋白质印迹 将蛋白样品定量后,计算出含 30 μg 蛋白质的样品量,用 12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离目标蛋白质并转移至 0.22 μm PVDF 膜(Millipore 公司)。转膜后,用以下抗体 4℃孵育过夜:抗-Bcl2L12(1:500, Abcam 公司),EGFR 抗体(1:500, Abcam 公司),抗-PI3K(1:400, CST 公司),抗-p-PI3K(1:200, CST 公司),抗半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 7(抗 Caspase-7, 1:300, Abcam 公司),抗 β-肌动蛋白(1:800, Abcam 公司)。用相应的辣根过氧化物酶标记法孵育后,用增强型化学发光(ECL)蛋白质印迹试剂盒(Millipore 公司)及凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)分析。

1.5 linc00152 与 HUVEC 的荧光原位杂交 采用 FISH 试剂盒(Roche 公司)检测 linc00152 的亚细胞定位。收集 HUVEC,洗涤 2 次,并用 4%多聚甲醛固定,加入杂交溶液及地高辛标记的 linc00152 探针;探针作为阴性对照。细胞核用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, Sigma 公司)室温染色 10 min。用冷 PBS 重复冲洗 2 次后,在共聚焦激光扫描显微镜(FV 1000, Olympus 公司)下观察。

1.6 HUVEC 凋亡和迁移检测 重组载体转染 HUVEC 48 h 后,用 ox-LDL 处理 HUVEC,检测 HUVEC 的凋亡与迁移情况。采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒(Roche 公司),通过计算杂交后 12 个培养孔中共计 1 000 个细胞的阳性细胞数来定量各转染组凋亡情况。采用 Transwell 迁移实验检测细胞迁移情况。

1.7 荧光素酶报道重组子构建和活性检测 分别采用野生型(WT)Bcl2L12 3'UTR、EGFR 3'UTR 扩增 linc00152 序列。使用 QuikChange II XL 定点诱变试剂盒(Stratagene 公司)诱导 linc00152 序列突变(MUT)。将 WT 序列(含 miR-4767 结合位点)和 MUT(缺乏 miR-4767 结合位点)序列分别亚克隆到萤光素酶基因编码区下游的 Dual-Glo Dual-Luciferase 载体(Promega 公司)中。将 HEK293T 细胞以 3×10⁴ 个/孔接种到 24 孔板中,细胞汇合度达 70%时,将细胞与双萤光素酶(萤火虫和海肾萤光素酶)报道重组子和 mi-4767 模拟物或 NC 寡核苷酸与 Lipofectamine 3000 共转染 48 h。通过 Multi-label 测量萤火虫或海肾萤光素酶活性(读板

器:VICTORTM X2,PerkinElmer 公司),标准化萤光素酶活性。

1.8 生物素化 miR-4767 的测定 用生物素化的 miR-4767-WT/MUT 转染 HUVEC 48 h 后,收集细胞并用 PBS 洗涤,离心;用裂解缓冲液(Ambion 公司)中裂解 10 min,将其中 50 mL 裂解物等分。余裂解物与 RNase-free 离心管、酵母 tRNA(Sigma 公司)、链亲和素包被磁珠(Dynal Biotech 公司)于 4℃下孵育 3 h,冷裂解缓冲液洗涤 2 次,低盐缓冲液洗涤 3 次,高盐缓冲液洗涤 1 次;经 Trizol 纯化后,对 HUVEC 内的外源 linc00152 进行 qRT-PCR

分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 Dunnett's 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 linc00152 与 HUVEC 的原位杂交结果 RNA-FISH 法结果(图 1)显示:linc00152 主要位于 HUVEC 的细胞质中;与免疫球蛋白 G(IgG)免疫沉淀物相比,linc00152 在富含 Ago2 的 miRNA-核糖核蛋白复合物(miRNP)中的含量更高。

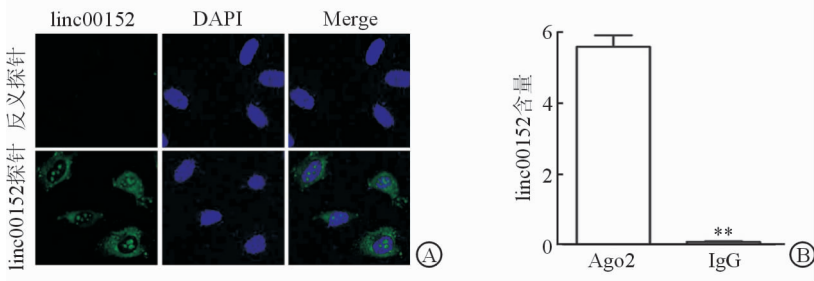


图 1 linc00152 的荧光原位杂交结果

A:linc00152 定位于 HUVEC 的细胞质,反义探针作阴性对照;B:相比 IgG,linc00152 在富含 Ago2 的 miRNP 中含量更高。Original magnification: $\times 400$. ** $P<0.01$

2.2 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 linc00152 与 miR-4767 的相互作用 linc00152 上具有结合的 miR-4767 的位点,结合自由能低(图 2)。图 3 显示 WT 和 MUT linc00152 萤光素酶报道重组子。

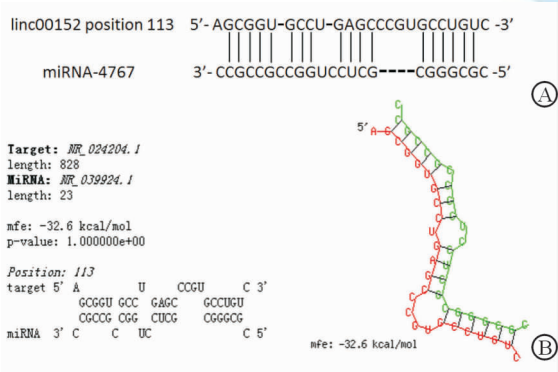


图 2 linc00152 与 miR-4767 的内源性结合

A:linc00152 序列中 miR-4767 靶向的潜在位点;B:miR-4767 结合 linc00152 的自由能

linc00152 WT AGCGGUGCCUGAGCCCGUGCCUGUC
linc00152 MUT AGCGGUGCCUGAGCCCGUGAAAAGC

图 3 linc00152 插入萤光素酶报道基因载体

结果(图 4)显示:miR-4767 抑制 luc-linc00152-WT 的萤光素酶活性 ($P<0.01$),不影响 luc-

linc00152-MUT 的活性。生物素化的 miR-4767-WT 探针使 HUVEC 中 linc00152 的表达增加 ($P<0.01$),生物素化的 miR-4767-MUT 探针无此影响。linc00152 过表达、敲减 48 h 后,HUVEC 中 miR-4767 的水平分别下降、升高 ($P<0.01$);miR-4767 模拟物、RNA 拮抗剂转染 HUVEC 后,linc00152 表达分别减少、增加 ($P<0.05$)。

2.3 linc00152 可能通过 miR-4767 影响 HUVEC 凋亡与迁移 结果(图 5)显示:miR-4767 增加 HUVEC 的凋亡,抑制 HUVEC 的迁移 ($P<0.05$);linc00152 引起的 HUVEC 的凋亡与迁移的变化与之相反 ($P<0.05$)。

2.4 linc00152 可能通过 miR-4767 影响 Bcl2L12 及 EGFR 表达 结果(图 6)显示:miR-4767 可直接靶向 Bcl2L12 及 EGFR。miR-4767 抑制 luc-EGFR-WT 的萤光素酶活性 ($P<0.01$),对 luc-EGFR-MUT 没有明显影响;miR-4767 以剂量依赖性方式负向调节 Bcl2L12 和 EGFR 的表达 ($P<0.05$)。linc00152 正向调节 Bcl2L12、EGFR 及 PI3K 的表达,负向调节 caspase-7 的表达 ($P<0.01$)。

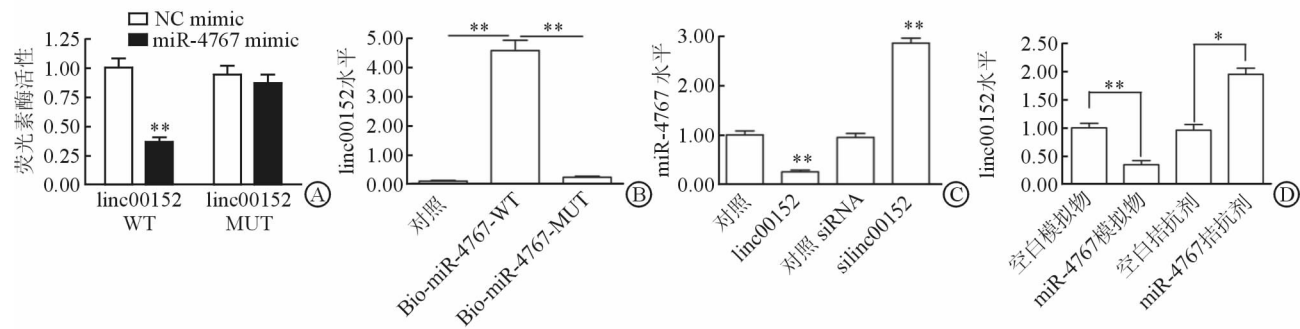


图4 经 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 linc00152 与 miR-4767 的相互作用

A:miR-4767 抑制 luc-linc00152-WT 的荧光素酶活性;B:生物素化的 miR-4767-WT 使 linc00152 表达增加;C:linc00152 负向调节 miR-4767 的表达;D:miR-4767 负向调节 linc00152 的表达. $n=3$; $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$

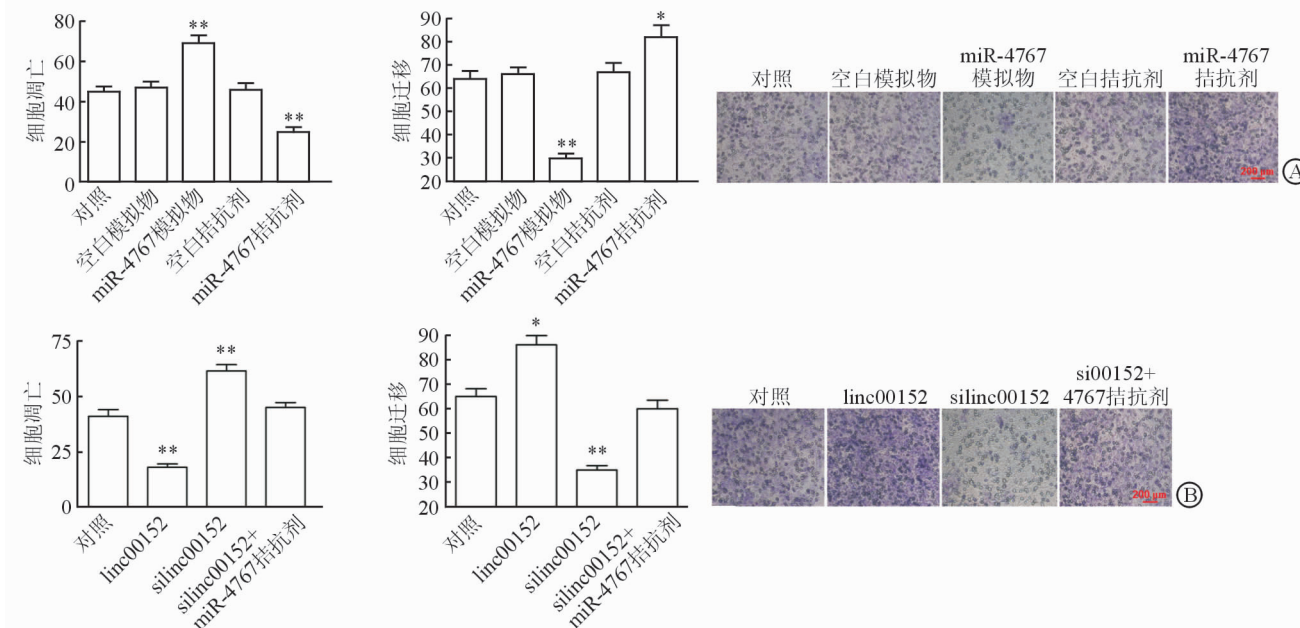


图5 MiR-4767 及 linc00152 对经 ox-LDL 处理的 HUVEC 凋亡和迁移的影响

A:miR-4767 转染 48 h,ox-LDL 处理 24 h 后,HUVEC 凋亡增加、迁移的变化;B:linc00152 转染 48 h,ox-LDL 处理 24 h 后,HUVEC 凋亡、迁移的变化. miR-4767 模拟物: 20 nmol/L; miR-4767 拮抗剂: 40 nmol/L(A),20 nmol/L(B); linc00152: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; linc00152-siRNA: 40 nmol/L; ox-LDL: 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Original magnification: $\times 200$. $n=3$; $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与对照相比

2.5 阻断 miR-4767 后 linc00152 对 HUVEC 凋亡与迁移的影响 结果(图 5B,图 6F)表明:阻断 miR-4767 后,linc00152 敲减引起的 HUVEC 凋亡增加与迁移减少的作用被减弱;同时,linc00152 敲减引起的 Bcl2L12、EGFR 及 PI3K 表达降低,caspase-7 表达升高的作用被改善。

3 讨论

LncRNA 与心血管疾病有着密切关系,但目前对 lncRNA 的研究尚处于起步阶段。心肌梗死与 lncRNA 的关系在最近的一项来自基因芯片的实验^[5]中得到证实。在心肌梗死鼠中,有 20 个 lncRNA 转录本表达上调,10 个 lncRNA 转录本表

达下调。其中,心肌梗死相关转录本 1(MIRT1)表达上调 5 倍,MIRT2 表达上调 13 倍。另一个心肌梗死相关转录本 lncRNA MIAT^[6]也被发现,说明 lncRNA 与心肌梗死的发生、发展存在密切关系,且参与了血管的病理性发生。

LncRNA 功能相关机制可能包括:(1)基因印记,如对脊椎动物发育过程中的 H19^[7]、在 X 染色体失活中的 X 染色体特异性失活复合物(Xist)^[8]的作用;(2)染色质重塑,如 lncRNA 对骨架分子 HOTAIR 的作用^[9];(3)细胞周期调控,如其对哺乳动物细胞生长、凋亡的关键调节因子生长阻滞特异转录物 5(Gas5)表达的影响^[10];(4)剪接调控,如其对多种癌症中异常表达的肺腺癌转移相关转录物 1

(MALAT1)^[11]的调控;(5)mRNA降解,如一种被称为半 Stau1 结合位点 RNA (1/2-sbsRNA) 的 lncRNA 通过与 mRNA 的 3'UTR 的 Alu 元件的不完全配对,形成 Stau1 结合位点,促进 Stau1 与

mRNA 相结合,引起 mRNA 降解^[12]; (6) 翻译调控,如在缺少人类抗原 R(HuR)细胞中的 lincRNA-p21 可结合蛋白,在细胞中稳定存在并不断积累,与靶 mRNA 结合后抑制 mRNA 的翻译^[13]。

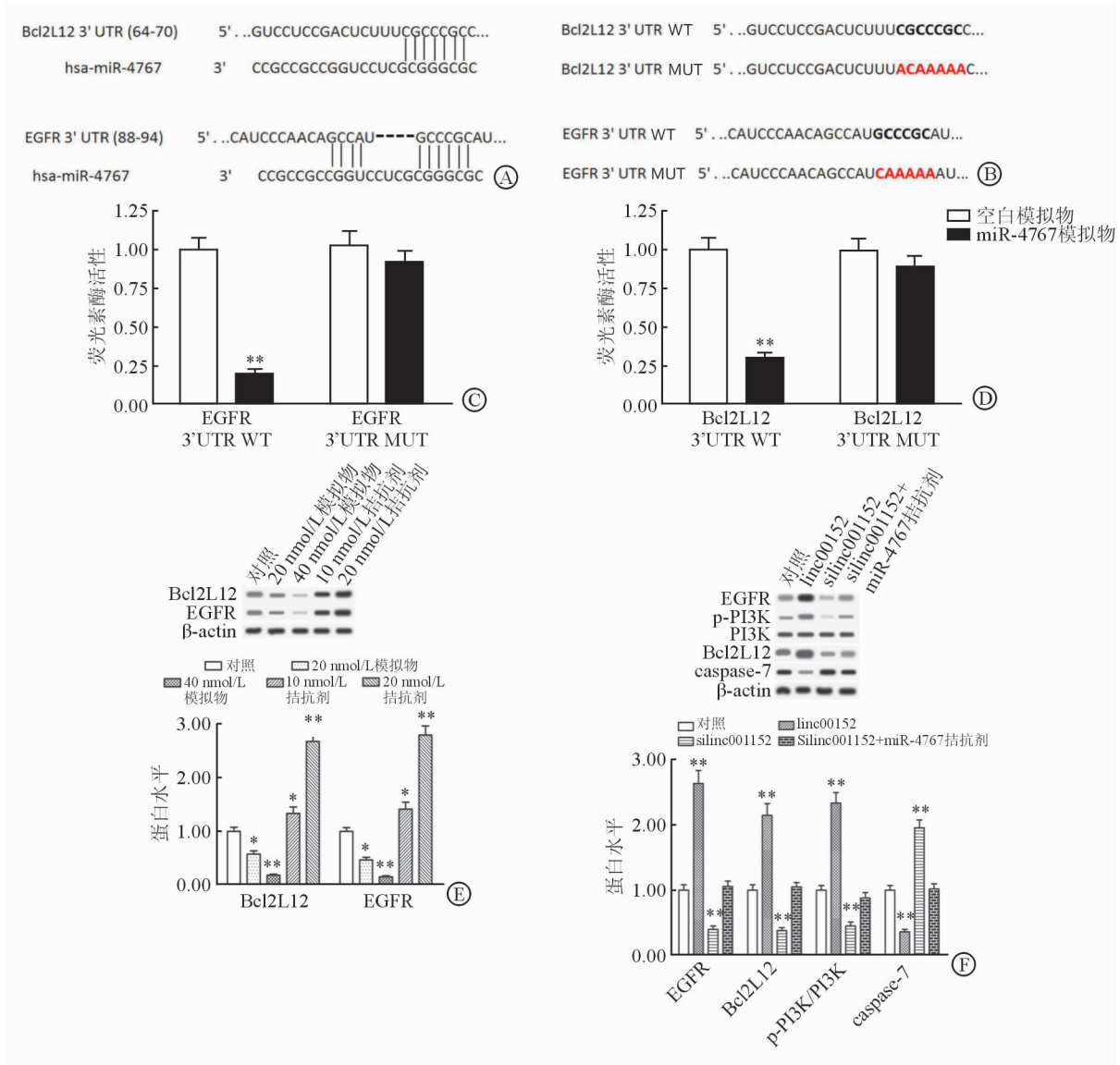


图6 miR-4767对Bcl2L12和EGFR基因的作用

A:检索结果显示,在Bcl2L12和EGFR 3'UTR的序列中存在miR-4767靶向的潜在位点;B:Bcl2L12、EGFR的WT和MUT序列;C:luc-EGFR 3'UTR-WT、luc-EGFR 3'UTR-MUT 荧光素酶活性;D:luc-Bcl2L12 3'UTR-WT、luc-Bcl2L12 3'UTR-MUT 荧光素酶活性;E:miR-4767对Bcl2L12、EGFR蛋白的影响呈剂量依赖性;F:linc00152对Bcl2L12、EGFR等蛋白的影响。 $n=3$; $\bar{x} \pm s$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与对照相比

血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)可同时分泌一氧化氮(NO)和内皮素,两者相互制约,共同参与控制血流量、调节血流速度及调节血管张力。VEGF由VEC分泌,具有多重生理作用,如开放侧支循环和直接诱导内皮细胞增殖等。He等^[14]在SVEC4血管内皮lncRNA-p21过表达和敲除的小鼠中发现,敲除lncRNA-p21后,

VEC增殖增加、凋亡减少,过表达lncRNA-p21后则VEC凋亡增加、增殖减少;进一步发现,miR-130b对减少VEC增殖的作用是通过被lncRNA-p21竞争性结合实现的。除此之外,lncRNA LOC 100129973靶向处理miR-4767及miR-4707-5p后,VEC凋亡被抑制^[15]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与miR-9的表达通过lncRNA HULC调节,影响VEC

凋亡^[16]。VEC的增殖在lncRNA H19被敲除后停留在G₁期,导致其形成毛细血管样结构的能力降低^[17]。Michalik等^[18]发现,内皮缺氧时,lncRNA MALAT1的表达明显增加;内皮增殖在体内敲除及体外沉默MALAT1后减少;MALAT1被药物抑制后,下肢毛细血管密度降低,表现为缺血后血流恢复速度减慢^[19]。

目前,lncRNA相关研究还处于起步阶段,对lncRNA的功能及相关机制的认识仍较局限,且仅很少的lncRNA被鉴定具有功能。但随着相关lncRNA数据库的建立与充实、生物信息技术的进步、基因芯片技术及高通量lncRNA表达分析技术的应用和发展,lncRNA将会不断被认识,进而为诊治心血管系统疾病、完整认识预防心血管病提供理论依据。

本研究在linc00152过表达或敲减并用ox-LDL处理HUVEC中发现,miR-4767水平降低或升高,提示linc00152可能通过与miR-4767的内源性结合发挥作用。linc00152可能通过miR-4767靶向Bcl2L12和EGFR抑制HUVEC凋亡和促进其迁移;而阻断miR-4767后可改善由linc00152敲减引起的Bcl2L12和EGFR的减少,进而改善linc00152敲减对HUVEC凋亡和迁移的影响。本研究提示,linc00152可能成为改善血管内皮功能和治疗部分心血管疾病的潜在靶点。

参考文献

- [1] JI J, TANG J, DENG L, et al. LINC00152 promotes proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting EpCAM via the mTOR signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(40): 42813-42824.
- [2] ZHOU J, ZHI X, WANG L, et al. Linc00152 promotes proliferation in gastric cancer through the EGFR-dependent pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 135.
- [3] PERSSON H, KVIST A, REGO N, et al. Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1): 78-86.
- [4] LU W, HUANG S Y, SU L, et al. Long non-coding RNA LOC100129973 suppresses apoptosis by targeting miR-4707-5p and miR-4767 in vascular endothelial cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21620.
- [5] SHAN K, JIANG Q, WANG X Q, et al. Role of long non-codingRNA-RNCR3 in atherosclerosis-related vascular dysfunction[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6): e2248.
- [6] ZANGRANDO J, ZHANG L, VAUSORT M, et al. Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 460.
- [7] TSAI M C, MANOR O, WAN Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes[J]. *Science*, 2010, 329(5992): 689-693.
- [8] MOURTADA-MAARABOUNI M, PICKARD M R, HEDGE V L, et al. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2009, 28(2): 195-208.
- [9] WILUSZ J E, FREIER S M, SPECTOR D L. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA [J]. *Cell*, 2008, 135(5): 919-932.
- [10] GONG C, MAQUAT L E. LncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements[J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 284-288.
- [11] YOON J H, ABDELMOHSEN K, SRIKANTAN S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation[J]. *Mol Cell*, 2012, 47(4): 648-655.
- [12] WAPINSKI O, CHANG H Y. Long noncoding RNAs and human disease[J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(6): 354-361.
- [13] ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome[J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 57-74.
- [14] HE C, DING J W, LI S, et al. The role of long intergenic noncoding RNA p21 in vascular endothelial cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2015, 34(11): 677-683.
- [15] LU W, HUANG S Y, SU L, et al. Long noncoding RNA LOC 100129973 suppresses apoptosis by targeting miR-4707-5p and miR-4767 in vascular endothelial cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21620.
- [16] MA Y, HUANG D, YANG F, et al. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in human vascular endothelial cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2016, 35(6): 296-300.
- [17] VOELLENKL E C, GARCIA-MANTEIGA J M, PEDROTTI S, et al. Implication of long noncoding RNAs in the endothelial cell response to hypoxia revealed by RNA-sequencing[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24141.
- [18] MICHALK K M, YOU X, MANAVSKI Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth[J]. *Circ Res*, 2014, 114(9): 1389-1397.
- [19] 栾桂霞, 贤惠敏, 郭译远, 等. 非编码RNA与血管内皮功能障碍的研究进展[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2017, 36(5): 860-863.