

β -榄香烯对非小细胞肺癌 A549 细胞线粒体结构和功能的影响

锁惠琴¹, 景晨旭², 赵景明³, 李驰坤², 丁云录², 初洪波², 成光宇², 李庆杰², 靳宏光⁴

(1. 长春中医药大学药学院药剂学专业, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医药大学附属医院中医药研发中心, 吉林 长春 130117; 3. 长春中医药大学附属医院肛肠科, 吉林 长春 130021; 4. 长春中医药大学附属医院心病科, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨 β -榄香烯对非小细胞肺癌(NSCLC) A549细胞线粒体结构及功能的影响, 并阐明其治疗NSCLC的作用机制。**方法:** 将对数生长期的A549细胞分为空白对照组(0 mg·L⁻¹ β -榄香烯), 低、中和高剂量 β -榄香烯组(10、25和50 mg·L⁻¹ β -榄香烯)及溶剂对照组(等体积0.5%乙醇)。处理24 h后, 采用MTT法检测各组的细胞活性, 透射电镜观察各组细胞的线粒体形态表现, 比色法检测各组细胞中三磷酸腺苷(ATP)水平, JC-1流式法检测各组细胞的线粒体膜电位, 线粒体膜通透性转换孔实验检测各组细胞的线粒体膜通透性。**结果:** MTT法, 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组A549细胞活性逐渐降低($P < 0.05$); 溶剂对照组A549细胞活性无明显变化, 差异无统计学意义($P < 0.05$)。透射电镜法, 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组A549细胞的线粒体出现肿胀、空泡化、嵴排列紊乱和溶解等现象; 溶剂对照组A549细胞的线粒体形态无明显变化。比色法, 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组A549细胞中ATP水平逐渐降低($P < 0.05$); 溶剂对照组A549细胞中ATP水平无明显变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。JC-1流式法, 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组A549细胞的线粒体膜电位降低, Q2-4区域细胞百分率升高($P < 0.05$); 溶剂对照组的A549细胞线粒体膜电位与Q2-4区域细胞百分率无明显变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。线粒体膜通透性转换孔实验法, 与空白对照组比较, 低、中、高剂量 β -榄香烯组A549细胞线粒体膜通透性增加, 各组M4区域细胞百分率升高($P < 0.05$); 溶剂对照组A549细胞的线粒体膜通透性和M4区域细胞百分率均无明显变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:** β -榄香烯能够抑制A549细胞的增殖, 其作用机制可能是通过降低A549细胞中ATP水平和线粒体膜电位、改变细胞线粒体形态以及增加线粒体膜通透性而破坏A549细胞线粒体结构, 引起线粒体功能损伤。

[关键词] β -榄香烯; 癌, 非小细胞肺; A549细胞; 细胞活性; 线粒体; 膜电位

[中图分类号] R979.1; R734 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-10-09 [录用日期] 2024-12-10

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(20200404088YY, 20240305002YY)

[作者简介] 锁惠琴(2000—), 女, 甘肃省白银市人, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物作用机制方面的研究。

[通信作者] 李庆杰, 研究员, 博士研究生导师(E-mail: lqj19811005@163.com);

成光宇, 副主任药师(E-mail: 616012938@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Effect of β -elemene on mitochondrial structure and function of non-small cell lung cancer A549 cells

SUO Huiqin¹, JING Chenxu², ZHAO Jingming³, LI Chikun², DING Yunlu², CHU Hongbo²,
CHENG Guangyu², LI Qingjie², JIN Hongguang⁴

(1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Research Center of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Department of Proctology, Affiliated Hospital, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China; 4. Department of Cardiology, Affiliated Hospital, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of β -elemene on mitochondrial structure and function of the A549 cells of non-small cell lung cancer (NSCLC), and to elucidate the mechanism of β -elemene in the treatment of NSCLC. **Methods:** The A549 cells at logarithmic growth stage were divided into blank control group ($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ β -elemene), low, medium and high doses of β -elemene groups (10 , 25 and $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), and solvent control group (0.5% ethanol in equal volume). After treatment for 24 h , the cell activities in various groups were detected by MTT assay; the morphology changes of mitochondria in the cells in various groups was observed by transmission electron microscope; the levels of adenosine $5'$ -triphosphate (ATP) in the cells in various groups were detected by colorimetry; the mitochondrial membrane potential of the A549 cells in various groups were detected by JC-1 flow cytometry; mitochondrial membrane permeability transfer hole assay was used to detect the mitochondrial membrane permeabilities of the cells in various groups. **Results:** The MTT results showed that compared with blank control group, the cell activities in low, medium and high doses of β -elemene groups were decreased gradually ($P < 0.05$), while the cell activity in solvent control group had no significant change, and the difference was not significant ($P > 0.05$). The transmission electron microscope results showed that compared with blank control group, the mitochondria of A549 cells in low, medium and high doses of β -elemene groups showed swelling, vacuolation, disordered arrangement and dissolution, while the mitochondrial morphology of the A549 cells in solvent control group had no significant changes. The colorimetric method results showed that compared with blank control group, the ATP levels in the A549 cells in low, medium and high dose β -elemene groups were gradually decreased ($P < 0.05$), while the ATP level in the A549 cells in solvent control group had no significant change, and the difference was not significant ($P > 0.05$). The JC-1 flow cytometry method results showed that compared with blank control group, the mitochondrial membrane potential of the A549 cells in low, medium and high doses of β -elemene groups were decreased, and the percentages of the cells in Q2-4 region were increased ($P < 0.05$); the percentage of the A549 cells in the Q2-4 region in solvent control group had no significant change. The results of mitochondrial membrane permeability transfer hole experiment showed that compared with blank control group, the mitochondrial membrane permeabilities of the A549 cells in low, medium and high doses of β -elemene groups were increased, and the percentages of the cells in M4 region were increased ($P < 0.05$); the mitochondrial membrane permeability of the A549 cells and the percentage of the M4 cells in solvent control group had no significant changes, and the difference was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** β -elemene can inhibit the proliferation of the A549 cells, and the mechanism may be that the mitochondrial structure of A549 cells is damaged by reducing the level of ATP and mitochondrial membrane potential, changing the mitochondrial morphology and increasing the mitochondrial membrane permeability.

KEYWORDS β -elemene; Cancer, non-small cell lung; A549 cells; Cell activity; Mitochondrial; Membrane potential

肺癌是世界范围内癌症相关死亡的主要原因之一,早期诊断率低,晚期预后差,而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌中最常见的类型,占肺癌的85%~90%^[1-2]。近20年来,由于对癌症发生发展机制的认识,使得NSCLC的早诊早治及多途径治疗成为可能,且该癌症的临床治疗也取得了重要进展,但NSCLC总治愈率和生存率仍然很低^[3]。因此,NSCLC临床有效治疗新方法的研发极具重大意义。 β -榄香烯是从中草药莪术中分离出来的一种萜类成分,具有抗肿瘤活性,得到了研究人员的高度重视^[4]。 β -榄香烯被应用于肺癌、肝癌和妇科肿瘤等多种恶性肿瘤的临床治疗中,既可增强化疗效果,又能减少放疗的不良反应,体现出一定的治疗优势^[5-6],但 β -榄香烯在治疗NSCLC中的作用机制尚未阐明。线粒体是细胞的重要细胞器之一,参与了细胞各项生命活动,介导肿瘤细胞线粒体功能紊乱是治疗NSCLC药物的重要机制之一^[7]。本研究探讨 β -榄香烯对NSCLC A549细胞线粒体结构和功能的影响,阐明 β -榄香烯通过破坏细胞线粒体结构、引起线粒体功能损伤发挥对NSCLC治疗作用的机制,为NSCLC的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和主要仪器 人NSCLC细胞A549购自中国科学院细胞库。 β -榄香烯购自美国Apexbio公司,F-12K培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司,醋酸铀购自美国默克公司,钼酸购自美国TedPella公司,三磷酸腺苷(adenosine 5'-triphosphate, ATP)测试盒购自南京建成科技有限公司,线粒体膜电位检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,线粒体膜通透性转换孔检测试剂盒购自上海贝博生物科技公司。 CO_2 恒温培养箱(型号:311,美国Thermo公司),倒置显微镜(型号:DMILLED,德国Leica公司),酶标仪(型号:AMR-100,杭州奥盛仪器有限公司),透射电镜(型号:HT7700,日本日立公司),流式细胞仪(型号:CytoFLEXS,美国Beckman公司)。

1.2 细胞培养和分组处理 A549细胞培养于含10%胎牛血清的F-12K培养基中,待细胞融合率大于80%时,继续传代。将生长状态良好的A549

细胞分为空白对照组,低、中和高剂量 β -榄香烯组及溶剂对照组。根据前期预实验筛选,空白对照组细胞采用F-12K培养基处理,低、中和高剂量 β -榄香烯组细胞分别采用质量浓度为10、25和50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 β -榄香烯处理,溶剂对照组细胞采用等量0.5%乙醇处理。分组处理24 h后进行实验检测。

1.3 MTT法检测不同浓度 β -榄香烯作用后A549细胞活性 收集对数期生长细胞,调整细胞密度约为每孔 5×10^3 个细胞,每孔180 μL ,分布于96孔细胞培养板中,培养过夜待细胞贴壁后,按“1.2”步骤中方法分组处理24 h,每孔中加入5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT液20 μL ,4 h后,将上清液吸掉,再加入二甲基亚砜150 μL ,在低转速下振荡5 min,于酶标仪上测定490 nm波长处各孔吸光度(A)值,以A值代表各组细胞活性。

1.4 透射电镜观察不同浓度 β -榄香烯作用后A549细胞线粒体形态表现 离心收集各组细胞,加入2.5%戊二醛固定30 min,PBS缓冲液洗涤3次,加入1%钼酸固定1 h。PBS缓冲液清洗后,进行脱水、包埋,切成厚度为60 nm超薄切片,醋酸铀染色20 min,枸橼酸染色15 min(避光),洗涤后用滤纸吸干,使用透射电镜观察细胞线粒体形态表现并拍照。

1.5 比色法检测不同浓度 β -榄香烯作用后A549细胞中ATP水平 收集各组细胞,按照ATP水平测定试剂盒说明书操作,将所测A值代入标准曲线,计算细胞中ATP水平。

1.6 JC-1流式法检测不同浓度 β -榄香烯作用后A549细胞线粒体膜电位 收集各组细胞,取约 1×10^6 个细胞重悬于0.5 mL培养基中,加入0.5 mL JC-1工作液,混匀孵育20 min,离心3 min,弃上清液,加入JC-1染色缓冲液重悬细胞沉淀,重复2次,加入400 μL JC-1染色缓冲液重悬细胞,上流式细胞仪检测。

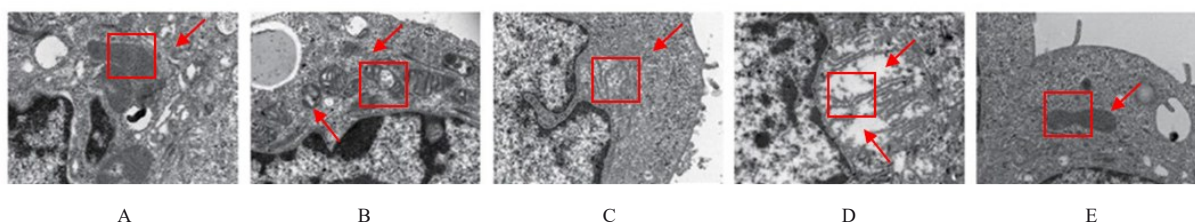
1.7 线粒体膜通透性转换孔实验检测不同浓度 β -榄香烯作用后A549细胞的线粒体通透性 收集各组细胞,采用细胞染色缓冲液制备单细胞悬液,并调整细胞密度为每毫升 1×10^6 个细胞,按照1:500比例采用细胞染色缓冲液稀释Calcein AM储存液,制备成2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 工作液,并取5 μL 工作液

和 5 μ L CoCl₂ 加入细胞中, 混匀, 避光孵育 15 min, 加入 3.5 mL 染色缓冲液, 离心收集细胞, 加入 400 μ L 流式缓冲液重悬细胞沉淀, 置于冰上, 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析, GraphPad Prism 5 软件绘图。各组细胞活性、细胞中 ATP 水平和细胞线粒体膜电位均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 A549 细胞活性 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组 A549 细胞活性降低 ($P < 0.05$); 溶剂对照组 A549 细胞活性无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。



A: Blank control group; B: Low dose of β -elemene group; C: Medium dose of β -elemene group; D: High dose of β -elemene group; E: Solvent control group. The boxes in the experimental result pictures indicated mitochondria, and the arrows indicated the phenomena produced by the mitochondrial structure of A549 cells in various groups.

图 1 各组 A549 细胞线粒体结构 ($\times 12000$)

Fig. 1 Mitochondrial structures of A549 cells in various groups ($\times 12000$)

2.3 各组 A549 细胞中 ATP 水平 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组 A549 细胞中 ATP 水平均降低 ($P < 0.05$); 溶剂对照组 A549 细胞中 ATP 水平无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 各组 A549 细胞线粒体膜电位 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组 A549 细胞线粒体膜电位降低 ($P < 0.05$), Q2-4 区域细胞百分率升高 ($P < 0.05$); 溶剂对照组 A549 细胞线粒体膜电位与 Q2-4 区域细胞百分率无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2 和表 3。

2.5 各组 A549 细胞线粒体膜通透性 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组 A549 细胞线粒体膜通透性增加, M4 区域细胞百分率升高 ($P < 0.05$); 溶剂对照组 A549 细胞的线粒体膜通

表 1 MTT 法检测各组细胞活性

Tab. 1 Cell activities in various groups detected by MTT assay ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Cell activity (A value)
Blank control	0.52 \pm 0.26
β -elemene	
Low dose	0.50 \pm 0.25*
Medium dose	0.33 \pm 0.16*
High dose	0.18 \pm 0.09*
Solvent control	0.51 \pm 0.25

* $P < 0.05$ vs blank control group.

2.2 各组 A549 细胞线粒体形态表现 与空白对照组比较, 低、中和高剂量 β -榄香烯组 A549 细胞的线粒体出现肿胀, 空泡化, 嵴排列紊乱、溶解等现象, 且呈剂量依赖性加重; 溶剂对照组 A549 细胞线粒体无明显变化。见图 1。

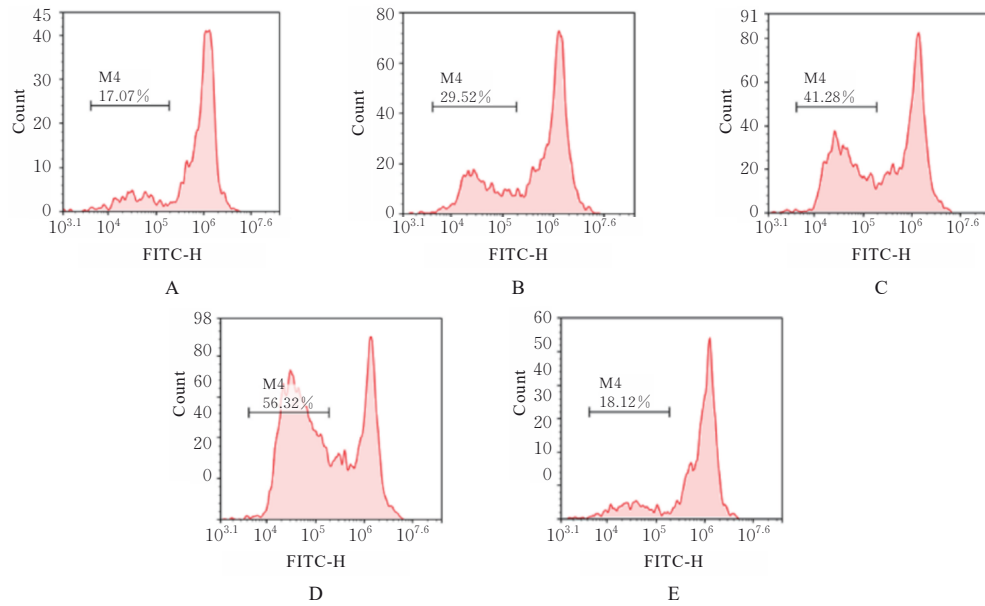
表 2 比色法检测各组 A549 细胞中 ATP 水平

Tab. 2 ATP levels in A549 cells in various groups detected by colorimetry [$n=3, \bar{x} \pm s, \omega_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$]

Group	ATP level
Blank control	50.77 \pm 25.39
β -elemene	
Low dose	41.79 \pm 20.90*
Medium dose	38.69 \pm 19.35*
High dose	36.76 \pm 18.38*
Solvent control	49.06 \pm 24.53

* $P < 0.05$ vs blank control group.

透性和 M4 区域细胞百分率无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3 和表 4。



A: Blank control group; B: Low dose of β -elemene group; C: Medium dose of β -elemene group; D: High dose of β -elemene group; E: Solvent control group.

图2 各组 A549 细胞线粒体膜电位

Fig. 2 Mitochondrial membrane potentials of A549 cells in various groups

表3 各组 A549 细胞 Q2-4 区域细胞百分率

Tab. 3 Percentages of A549 cells in Q2-4 region in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Percentages of cells in Q2-4 region
Blank control	16.91 \pm 8.45
β -elemene	
Low dose	28.75 \pm 14.37*
Medium dose	44.73 \pm 22.37*
High dose	75.48 \pm 37.74*
Solvent control	16.61 \pm 8.31

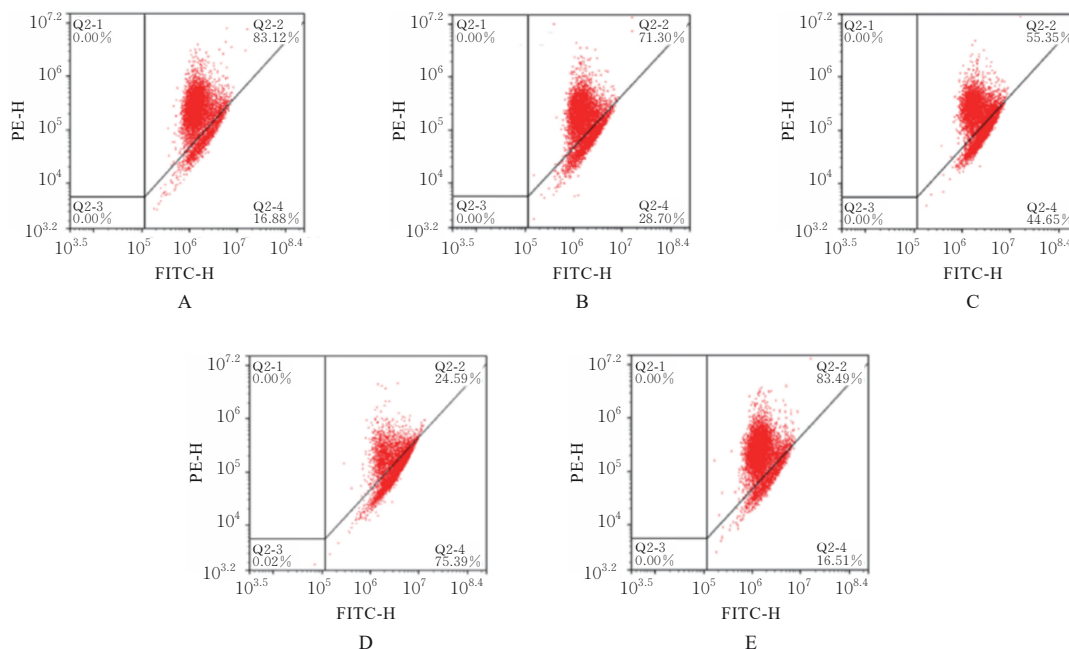
* $P < 0.05$ vs blank control group.

3 讨论

在肺癌中, 约 85% 以上的患者为 NSCLC, 尽管在治疗 NSCLC 的效果上有所改善, 但预后仍然不理想^[8]。肿瘤的发生发展过程受到多种信号网络的相互调节, 在这极其复杂的过程中, 肿瘤细胞逐渐表现出无限增殖、逃避免疫和抵抗凋亡等标志性生物学特征, 由于线粒体在细胞能量代谢、氧自由基生成和细胞凋亡等过程中发挥着关键性作用, 导致其结构及功能发生异常时可影响肿瘤的形成和发展^[9]。线粒体作为抗癌药物潜在的治疗靶点成为肿瘤学的研究热点, 研究^[10]显示: 线粒体靶向铂复

合物可通过多种途径参与 A549 肺癌细胞能量代谢过程, 其对 A549 细胞的抑制作用强于顺铂, 对裸鼠非小细胞肺癌的生长具有较强的抑制效果。当线粒体功能受损时, 可导致细胞凋亡, 增强细胞中活性氧种类, 并产生与癌症相关的蛋白质, 通过诱导线粒体损伤, 增加细胞内活性氧水平, 介导线粒体凋亡途径, 可发挥抑制 A549 细胞及肺肿瘤生长的作用^[11]。临床数据^[12]显示: 随着线粒体 DNA 含量降低, NSCLC 早期患者死亡风险增加, 提示线粒体功能受损与肺癌风险增加及预后不良有关联。

β -榄香烯是一种新兴的抗肿瘤中药, 其作用机制与阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制上皮间质转化、抑制血管生成、逆转耐药和增敏等有关^[13]。作为国家二类非细胞毒性抗肿瘤药物, β -榄香烯具有广谱、安全和有效等突出优点, 在多种恶性肿瘤(包括肺癌)的临床治疗上具广阔的应用前景^[14]。细胞线粒体功能损伤伴随着线粒体结构破坏, 嵴消失, ATP 供应减少, 线粒体膜电位降低, 通透性增加等病理变化^[15]。YAO 等^[16]研究发现: β -榄香烯可降低 A549 细胞线粒体膜电位, 增加膜通透性导致细胞色素 C 从线粒体释放至细胞质中触发细胞凋亡级联反应, 并逆转了 A549 对顺铂的耐药性,



A: Blank control group; B: Low dose of β -elemene group; C: Medium dose of β -elemene group; D: High dose of β -elemene group; E: Solvent control group.

图3 各组 A549 细胞线粒体膜通透性

Fig. 3 Mitochondrial membrane permeabilities of A549 cells in various groups

表4 各组 A549 细胞 M4 区域细胞百分率

Tab. 4 Percentages of A549 cells in M4 region in various groups (n=3, $\bar{x} \pm s$, $\eta/\%$)

Group	Percentage of cells in M4 region
Blank control	17.14 ± 8.57
β -elemene	
Low dose	29.63 ± 14.81*
Medium dose	41.34 ± 20.67*
High dose	56.37 ± 28.18*
Solvent control	18.22 ± 9.11

*P < 0.05 vs blank control group.

提示 β -榄香烯可能通过影响细胞线粒体功能对 NSCLC 细胞产生作用。

本研究结果显示： β -榄香烯干预可导致 A549 细胞活性和 ATP 水平降低，线粒体结构被破坏，出现肿胀、空泡化，嵴断裂、溶解，线粒体膜电位降低，通透性增加，且 β -榄香烯对 A549 细胞作用效果呈现出一定的浓度依赖性，高浓度 β -榄香烯效果更明显，提示 β -榄香烯可能通过破坏 NSCLC 细胞线粒体结构，造成线粒体损伤而影响其线粒体功能，进而抑制其能量供给，影响肺癌细胞生命活动。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

锁惠琴和景晨旭参与论文撰写及修改，赵景明、李驰坤、丁云录和初洪波参与研究资料收集及数据分析，成光宇、李庆杰和靳宏光参与论文设计及审阅。

[参考文献]

[1] WU Z, YANG Z, DAI Y, et al. Update on liquid biopsy in clinical management of non-small cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 5097-5109.

[2] RAFEI H, EL-BAHESH E, FINIANOS A, et al. Immune-based therapies for non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2017, 37(2): 377-387.

[3] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454.

[4] JIANG Z Y, JACOB J A, LOGANATHACHETTI D S, et al. β -elemene: mechanistic studies on cancer cell interaction and its chemosensitization effect [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 105.

[5] 周 蕾. 榄香烯联合紫杉醇脂质体加顺铂化疗治疗非小细胞肺癌的疗效分析[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(7): 411-412.

[6] 陈美婉, 钟章锋, 王胜鹏, 等. β -榄香烯抗癌活性及其

- 新型给药系统的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(12): 1358-1361, 1388.
- [7] KUMAR A, COREY C, SCOTT I, et al. Minnelide/triptolide impairs mitochondrial function by regulating SIRT3 in P53-dependent manner in non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160783.
- [8] 丁小胜, 汤传昊, 王志杰, 等. 雌激素在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(7): 499-504.
- [9] 汤春铃, 向仲怀, 崔红娟. 线粒体功能异常与肿瘤的发生[J]. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1548-1557.
- [10] ZHU Z Z, WANG Z H, ZHANG C L, et al. Mitochondrion-targeted platinum complexes suppressing lung cancer through multiple pathways involving energy metabolism[J]. Chem Sci, 2019, 10(10): 3089-3095.
- [11] TYAGI M, MAITY B, SAHA B, et al. Spice-derived phenolic, malabaricone B induces mitochondrial damage in lung cancer cells via a p53-independent pathway [J]. Food Funct, 2018, 9(11): 5715-5727.
- [12] PU X, LIPPMAN S M, GU J, et al. Abstract 879: Mitochondrial DNA content and its association with lung cancer risk and clinical outcomes[J]. Cancer Res, 2010, 70(8_Supplement): 879.
- [13] 李雪, 周赟, 陈蕾. 等. β -榄香烯主要抗肿瘤机制及在非肿瘤性疾病中的研究进展[J]. 安徽医药, 2015, 19(8): 1429-1432.
- [14] 麻杰, 陈娟, 赵冰洁, 等. 抗癌药物 β -榄香烯及其衍生物的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(5): 1184-1191.
- [15] 王永平. 线粒体和线粒体损伤研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生, 2010, 10(3): 309-311.
- [16] YAO C C, TU Y R, JIANG J, et al. β -elemene reverses the drug resistance of lung cancer A549/DDP cells via the mitochondrial apoptosis pathway [J]. Oncol Rep, 2014, 31(5): 2131-2138.