论文

一氧化氮抑制恶性胸腔积液形成的机制

姜帅^{1†}, 吴秀芝^{1†}, 翟侃¹, 伊凤双¹, 王臻¹, 王政¹, 叶志坚², 杨卫兵³, 施焕中^{1*}

1. 首都医科大学附属北京朝阳医院呼吸与危重症医学科, 北京 100020;

2. 中山大学附属佛山医院呼吸内科, 佛山 528000;

3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸与危重症医学科, 武汉 430022

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: shihuanzhong@sina.com

收稿日期: 2018-04-23; 接受日期: 2018-05-10; 网络版发表日期: 2018-07-11

国家自然科学基金(批准号: 31470883, 81600070, 81400069和31670920)资助

摘要 本研究旨在明确一氧化氮(NO)在恶性胸腔积液(MPE)形成中的作用, 探究NO是否调控MPE中Th1/Th17免疫反应. 利用在野生型(WT)小鼠(*Mus musculus*)及诱导型一氧化氮合酶敲除(*NOS2^{-/-}*)小鼠的胸膜腔内注射肺腺癌细胞或肠腺癌细胞, 建立MPE模型. 明确小鼠MPE中NO的含量; 分析并比较WT及*NOS2^{-/-}*小鼠的胸水量及生存期的差异; 检测NO对胸膜血管通透性的影响; 以及NO对MPE中Th1及Th17细胞的影响. 研究结果显示, NO在WT小鼠恶性胸腔积液中的含量显著高于外周血. 与WT小鼠相比, *NOS2^{-/-}*小鼠的胸膜血管通透性增强, 胸水量增加, 生存期缩短, 其MPE中Th1细胞比例降低, 而Th17细胞比例升高. NO可促进Th1细胞的分化, 抑制Th17细胞的分化. 本研究证实了NO通过影响MPE小鼠胸膜血管通透性而抑制MPE的形成, NO可促进Th1细胞的分化并抑制Th17细胞的分化, 从而调节MPE中Th1/Th17细胞免疫反应.

关键词 恶性胸腔积液, 一氧化氮, Th1细胞, Th17细胞

一氧化氮(nitric oxide, NO)是内源性、脂溶性的小分子物质, 易穿过细胞膜进入细胞内发挥生物效应^[1]. NO由三种合成酶(NO synthase, NOS)诱导生成, 包括神经型合酶(NOS1或nNOS)、细胞因子诱导型合酶(NOS2或iNOS)和内皮型合酶(NOS3或eNOS). NOS1及NOS3促NO生成的能力较弱, 生成的NO较少, 而NOS2促NO生成能力强, 可被包括IFN- γ , TNF- α 和LPS在内的多种炎症因子激活, 诱导产生大量的NO^[2].

恶性胸腔积液(malignant pleural effusion, MPE)是大部分恶性肿瘤的晚期并发症^[3]. 恶性胸腔积液的产

生, 表明肿瘤已远处转移, 预示着患者的生存质量下降, 生存时间缩短^[4]. 恶性胸腔积液的形成机制包括肿瘤细胞堵塞淋巴管; 肿瘤细胞与血管系统以及宿主免疫反应的交互作用致胸膜血管通透性增强, 胸水产生增加^[5]. 其中, 后一机制受到研究者们更多的关注.

越来越多的研究证明, NO参与前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌以及肺癌等多种肿瘤免疫. NO在肿瘤免疫中的作用与肿瘤细胞的类型, 肿瘤的分期以及生长部位相关^[6]. 目前在多种不同的肿瘤模型中也观察到NO的含量与肿瘤中的免疫反应密切相关^[2]. 本课题组过

引用格式: 姜帅, 吴秀芝, 翟侃, 等. 一氧化氮抑制恶性胸腔积液形成的机制. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 795–801

Jiang S, Wu X Z, Zhai K, et al. Nitric oxide suppresses formation of malignant pleural effusion (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 795–801, doi: 10.1360/N052018-00063

去的研究发现, Th1 (产IFN- γ 的CD4⁺ T细胞)、Th17细胞(产IL-17的CD4⁺ T细胞)在MPE中发挥重要的免疫学作用。本课题组既往的研究结果表明, 人和小鼠(*Mus musculus*)恶性胸腔积液中Th1细胞以及Th17细胞的水平都高于对应的外周血, 且二者的产生及分化受胸腔积液中的多种细胞因子调控^[7,8]。本研究探讨NO信号通路是否通过调控Th1/Th17免疫反应, 在恶性胸腔积液形成中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6的野生型小鼠(wild type, WT)购于北京维通利华实验动物有限公司, 细胞因子诱导型一氧化氮合酶基因敲除的C57BL/6小鼠(*NOS2* deficient, *NOS2*^{-/-}, 编号为: 002609, 该小鼠血清中检测不到NO)购于美国杰克逊实验室。用于实验的各组小鼠的性别、体重(18~20 g)、周龄(8~12周)均匹配。小鼠饲养于首都医科实验动物中心SPF级动物房, 小鼠饲养条件为12 h黑夜/12 h白天节律, 恒温(25℃)恒湿, 繁殖饲料喂养。动物实验方案通过首都医科大学附属北京朝阳医院的实验动物伦理委员会批准。

1.2 细胞培养

小鼠肺腺癌细胞(lewis lung cancer cells, LLC)购于ATCC公司(美国); 小鼠肠腺癌细胞(mouse colon adenocarcinoma, MC38)由Georgios教授赠予^[9,10]。两种细胞均用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的高糖DMEM培养基培养, 使用0.25%的胰酶-EDTA进行消化传代。细胞培养于37℃, 含5% CO₂的细胞培养箱中。

1.3 小鼠MPE模型的建立及标本的收集与处理

胸膜腔内注射 1.0×10^5 个LLC或MC38细胞建立小鼠MPE模型, 方法与本课题组之前发表的文章一致^[8,10]。造模第14天, 麻醉小鼠, 摘取眼球并经眼眶静脉收集外周血, 经横膈膜抽取胸水, 并计量胸水体积。胸水和外周血收集于肝素锂或EDTA抗凝管中, 300×g离心10 min, 吸取上清冻存于-80℃备检。胸腔积液、外周血以及碾磨重悬的脾脏细胞经Ficoll密度梯度离心(在室温下密度为1.0770~1.0800 g/mL) (MP公司, 美

国)分离单个核细胞用于检测T细胞亚群。

1.4 胸膜血管通透性测定

为明确MPE小鼠胸膜血管通透性, 在小鼠造模第14天, 经尾静脉注射4 mg/mL埃文斯蓝(Sigma, 美国)染料200 μ L, 并在1 h后对小鼠执行安乐死, 抽取胸腔积液及外周血, 离心后收集上清, 测量630 nm波长的吸光值, 确定MPE和血清中的埃文斯蓝浓度, 并计算胸腔积液上清/血清的埃文斯蓝比值。

1.5 NO对MPE小鼠生存期的影响

在小鼠生存期实验中, 各组小鼠同时时间造模, 造模后观察WT及*NOS2*^{-/-}小鼠至小鼠死亡, 记录小鼠生存天数。遵循实验动物伦理的要求, 在小鼠极度衰弱的终末期, 对小鼠实施CO₂麻醉安乐死。判断小鼠终末期的标准: 1, 小鼠体重减轻大于10%; 2, 小鼠毛色差, 行动迟缓; 3, 小鼠停止进食。同时符合以上3条标准视为终末期小鼠。

1.6 流式细胞术

用于流式分析的抗体包括: 抗-CD3 (BD公司和eBioscience公司, 美国), -CD4 (BD公司和eBioscience公司), -CD8 (BD公司和eBioscience公司), -CD45 (BD公司和eBioscience公司), -IFN- γ (BD公司和eBioscience公司)和抗-IL-17 (eBioscience公司和CST公司)。分离的胸腔积液、外周血以及脾脏的单个核细胞以含10% FBS的RPIM-1640培养基培养, 细胞密度为 1×10^6 /mL, 在培养体系中加入佛波酯(50 ng/mL, Sigma)、离子霉素(1 ng/mL, Sigma)及高尔基体阻断剂BFA (10 μ g/mL, Enzo公司, 美国), 于37℃, 5% CO₂细胞培养箱中孵育4~6 h。收集细胞, 加入表面抗体(抗-CD3, -CD4, -CD8, -CD45)在4℃孵育20 min, 使用PBS洗涤, 并用固定破膜剂(Cytofix/Cytoperm, BD公司)重悬细胞, 并加入细胞内抗体(抗-IFN- γ , -IL-17)在4℃孵育30 min, 使用试剂盒中的洗液重悬细胞并离心, 以BD FACSCanto II检测, 并用FACS Express 5软件分析流式结果。

1.7 体外Th1细胞、Th17细胞的分化

使用小鼠CD4⁺CD62L⁺ T cells isolation kit II分选

试剂盒(美天旎, 德国)分选初始CD4⁺ T细胞^[8], 经流式细胞术检测初始CD4⁺ T细胞纯度>90%. 用含有结合抗-CD3和抗-CD28抗体磁珠的小鼠T细胞活化/扩增试剂盒(T Cell Activation/Expansion Kit, 美天旎)活化初始CD4⁺ T细胞, 并在含相应细胞因子的10% FBS的RPMI-1640中培养5天. 培养结束后进行细胞因子染色(方法同流式细胞术).

初始CD4⁺ T细胞分化条件如下: Th1细胞: IL-12 (10 ng/mL), IL-2 (10 U/mL), 抗IL-4单克隆(10 µg/mL); Th17细胞: 人TGF β (2 ng/mL), IL-23 (10 ng/mL), IL-1β (10 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), 抗IFN-γ单克隆抗体(10 µg/mL), 和抗IL-4单克隆抗体(10 µg/mL). 上述重组细胞因子及功能抗体来自Peprotech公司(美国)及BD公司.

1.8 NO含量测定

使用硝酸盐/亚硝酸盐比色测定试剂盒(Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman化学公司, 美国)检测胸水上清、血清及细胞培养上清中总亚硝酸盐的含量(NO₂⁻)以反应NO的含量. 小鼠恶性胸腔积液及外周血用EDTA抗凝管收集(肝素抗凝影响NO₂⁻检测). 具体操作方法参考试剂盒说明书.

1.9 统计学分析

数据以均数±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示. 根据实验的分组及数据类型分别采用 t 检验, 单因素方差分析, 多因素方差分析. 通过Kaplan-Meier法绘制生存率曲线, 并用配对对数秩检验进行统计分析. $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 NO通过降低胸膜血管通透性抑制MPE形成

$NOS2^{-/-}$ 小鼠的MPE和血清中没有检测到NO; WT小鼠MPE中NO水平高于血清(图1A和B). 如图1C所示, 在两种模型中, WT小鼠MPE的体积均少于 $NOS2^{-/-}$ 小鼠(LLC模型: (0.61 ± 0.04) vs. (0.72 ± 0.04) mL, $P = 0.032$; MC38模型: (0.38 ± 0.03) vs. (0.50 ± 0.03) mL, $P = 0.005$).

鉴于血管通透性增高是MPE形成的关键机制, 在MPE小鼠尾静脉注射0.8 mg埃文斯蓝1 h后收集胸水及外周血, 通过测定渗漏到胸膜腔内的及存留在外周血管中的埃文斯蓝浓度比值来确定胸膜血管通透性. 如图2所示, 无论是LLC还是MC38模型, $NOS2^{-/-}$ 小鼠胸腔积液/血清的埃文斯蓝比值均显著高于WT小鼠

图1 小鼠MPE中NO升高, NO抑制小鼠MPE形成, 并延长MPE小鼠生存期

LLC (A)及MC38 (B)造模的WT及 $NOS2^{-/-}$ 小鼠恶性胸腔积液及血清中亚硝酸盐的含量(各组 $n=10$). C: WT小鼠及 $NOS2^{-/-}$ 小鼠胸水量(各组 $n=30$). D: 在WT小鼠及 $NOS2^{-/-}$ 小鼠胸膜腔内注射LLC或MC38细胞后生存天数(各组 $n=24$). *: $P < 0.05$

图2 $NOS2^{-/-}$ 小鼠胸膜血管通透性增加

WT小鼠及 $NOS2^{-/-}$ 小鼠胸水/血清埃文斯蓝浓度比值(各组 $n=10$)

($P<0.001$), 表明NO缺失可促进血管内液体渗出到胸膜腔。

2.2 NO延长MPE小鼠的生存期

研究表明, 肺癌患者呼出NO及血清中NO含量升高与肿瘤进展相关^[6]。本研究LLC-MPE模型的 $NOS2^{-/-}$

小鼠的中位生存期为21.5天, WT小鼠为24.5天($P=0.022$); MC38-MPE模型的 $NOS2^{-/-}$ 小鼠的中位生存期为12天, WT小鼠为14天($P=0.039$) (图1D), 表明 $NOS2^{-/-}$ MPE小鼠的生存期缩短, 即胸水中NO含量高的小鼠生存期延长。

2.3 $NOS2$ 缺乏抑制Th1, 增强Th17细胞分化

鉴于Th1和Th17细胞都参与了人和小鼠MPE的发生发展, 研究了NO对MPE中Th1和Th17细胞的分布的影响。在LLC或MC38模型中, 发现 $NOS2^{-/-}$ 小鼠MPE中Th1和Th17细胞显著高于配对的外周血和脾脏($P<0.05$), 而外周血和脾脏中的Th1和Th17细胞数量无差异($P>0.05$) (图3)。更重要的是, 相比于WT小鼠, $NOS2^{-/-}$ -MPE中Th1细胞的数量明显降低($P<0.01$); 相反, $NOS2^{-/-}$ -MPE中Th17细胞的数量显著升高($P<0.001$)。

从WT和 $NOS2^{-/-}$ 小鼠脾脏中分选纯化初始 $CD4^{+}$ T细胞, 并分别在Th1和Th17条件下培养。与WT小鼠来

图3 NO调节Th1和Th17细胞在胸腔积液、外周血、脾脏中的分布

LLC (A)及MC38 (B)造模的WT组、 $NOS2^{-/-}$ 组小鼠的胸腔积液、外周血和脾脏中Th1 ($CD4^{+}$ IFN- γ^{+})细胞和Th17 ($CD4^{+}$ IL-17 $^{+}$)细胞占 $CD4^{+}$ T细胞的比例的代表性流式散点图。Th1, Th17细胞在LLC (C)及MC38 (D)造模后胸腔积液、外周血、脾脏中比例的柱状统计图(各组 $n=5$, 每组5只小鼠)。*: $P<0.01$ 为比较胸水与对应的外周血及脾脏中Th1及Th17细胞的差异; †: $P<0.01$, ‡: $P<0.001$, 为比较Th1及Th17在WT与 $NOS2^{-/-}$ 两组间差异

源的初始CD4⁺ T细胞相比, *NOS2*^{-/-}小鼠初始CD4⁺ T细胞的向Th1细胞分化比例明显减低, 其培养上清中IFN- γ 含量少于WT小鼠(图4A和C); 然而, 在Th17分化条件下, *NOS2*^{-/-}小鼠来源的初始CD4⁺ T细胞向Th17细胞分化显著增强, 培养上清中IL-17A水平升高(图4B和D). 以上结果表明, *NOS2*基因缺失可抑制Th1细胞分化, 并促进Th17细胞分化.

3 讨论

NO作为一个重要的信号传导分子和生物效应分子, 在免疫系统、神经系统及心血管系统中都起重要作用. 然而NO在恶性胸腔积液中的作用还不明确. 利

用目前最为常用的Griess反应试剂盒检测了小鼠恶性胸腔积液中的总亚硝酸盐的含量以反应NO的含量, 发现胸水中的NO含量显著高于对应的外周血. *NOS2*^{-/-}小鼠的胸水和外周血中均检测不到NO, 因此使用*NOS2*^{-/-}小鼠与WT小鼠对比研究探讨NO在胸腔积液形成中的机制.

肿瘤微环境中的高浓度的NO对肿瘤细胞具有直接杀伤作用^[11]. 本研究观察到*NOS2*^{-/-}小鼠胸水量显著高于WT小鼠, 且其中位生存期明显短于WT小鼠, 可能与WT小鼠MPE中*NOS2*受炎症因子激活, 释放大量的NO, 直接抑制肿瘤细胞的生长有关. 同时, 检测了MPE小鼠的胸膜血管通透性, 发现*NOS2*^{-/-}小鼠的胸膜通透性升高, 从另一方面阐明了*NOS2*^{-/-}小鼠胸水量增

图4 *NOS2*基因缺失对Th1, Th17体外分化的影响

WT及*NOS2*^{-/-}小鼠脾脏来源的初始CD4⁺ T细胞在Th1及Th17细胞分化条件下培养3天后分别检测的IFN- γ (A), IL-17 (B)比例的代表性流式散点图. C: 在Th1细胞分化条件下的分化比例柱状统计图及相应培养上清中IFN- γ 的浓度. D: 在Th17分化条件下的分化比例统计图及相应培养上清中IL-17A的浓度(各组n=5). *: $P < 0.05$; †: $P < 0.01$

加的机制。

既往研究表明, Th1细胞具有抗肿瘤活性^[12], 而Th17细胞具有抗肿瘤和促肿瘤双重作用, 其具体功能取决于所处的肿瘤微环境^[13]。研究表明, NO与Th1细胞及Th17细胞之间存在相互调节的作用。IFN- γ 可诱导炎症部位产生NO, 反向抑制Th1对内皮细胞的黏附作用, 下调Th1介导的炎症反应^[14]。另一方面, NO选择性地上调IL-12受体的表达, 促进Th1细胞的分化^[15], 并抑制Th17细胞的增殖和功能^[16]。另外, Th17细胞的诱导分化和细胞的稳定性均需要内源性NOS2和NO^[17]。本课题组既往的研究表明, Th1细胞及Th17细胞均参与MPE的形成, MPE中NO如何调节Th1/Th17免疫反应还属未知。

本课题组发现, *NOS2*^{-/-}小鼠MPE中Th1比例低于WT小鼠, 而Th17比例升高。进一步分选出*NOS2*^{-/-}小鼠

及WT小鼠脾脏中的初始CD4⁺ T细胞并进行定向分化实验, 发现NO促进了Th1分化并抑制Th17分化。本课题组以往研究表明, 在小鼠MPE模型中, IL-17抑制Th1细胞分化, 而IFN- γ 抑制Th17细胞分化, IL-17缺乏促进血管生成和胸膜肿瘤的增殖活性, 以及胸膜血管通透性进而促进MPE形成, 而IFN- γ 缺乏显示了相反作用^[8]。综合以上, 推测恶性胸腔积液中NO可能通过调节Th1/Th17免疫反应而影响MPE的生成。

综上所述, 本课题组发现WT小鼠恶性胸腔积液中NO含量高于对应的外周血。胸腔积液及外周血中均检测不到NO的*NOS2*^{-/-}小鼠胸水量较WT小鼠增多, 生存期缩短。进一步发现, *NOS2*^{-/-}小鼠胸膜血管通透性增加, 胸水中Th1细胞下调, Th17细胞比例上调, 即NO通过影响胸膜血管通透性及调节MPE中Th1/Th17细胞水平而参与调节恶性胸腔积液的生成。

参考文献

- 1 Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 1992, 6: 3051–3064
- 2 Seabra A B, Durán N. Nitric oxide donors for prostate and bladder cancers: current state and challenges. *Eur J Pharmacol*, 2018, 826: 158–168
- 3 Roberts M E, Neville E, Berrisford R G, et al. Management of a malignant pleural effusion: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax*, 2010, 65 Suppl 2: ii32–40
- 4 Ryu J S, Ryu H J, Lee S N, et al. Prognostic impact of minimal pleural effusion in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2014, 32: 960–967
- 5 Stathopoulos G T, Kalomenidis I. Malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186: 487–492
- 6 Luanpitpong S, Chanvorachote P. Nitric oxide and aggressive behavior of lung cancer cells. *Anticancer Res*, 2015, 35: 4585–4591
- 7 Ye Z J, Zhou Q, Zhang J C, et al. CD39⁺ regulatory T cells suppress generation and differentiation of Th17 cells in human malignant pleural effusion via a LAP-dependent mechanism. *Respir Res*, 2011, 12: 77
- 8 Lin H, Tong Z H, Xu Q Q, et al. Interplay of Th1 and Th17 cells in murine models of malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189: 697–706
- 9 Stathopoulos G T, Psallidas I, Moustaki A, et al. A central role for tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 in malignant pleural effusion. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100: 1464–1476
- 10 Xu C, Lu Y, Zheng X, et al. TLR2 expression in peripheral CD4⁺ T cells promotes Th17 response and is associated with disease aggravation of hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. *Front Immunol*, 2017, 8: 1609
- 11 Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol*, 2015, 6: 334–343
- 12 Muranski P, Restifo N P. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4⁺ T cells. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21: 200–208
- 13 Zou W, Restifo N P. TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 248–256
- 14 Norman M U, Zbytniuk L, Kubes P. Interferon- γ limits Th1 lymphocyte adhesion to inflamed endothelium: a nitric oxide regulatory feedback mechanism. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 1368–1380
- 15 Niedbala W, Wei X Q, Campbell C, et al. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 16186–16191
- 16 Niedbala W, Alves-Filho J C, Fukada S Y, et al. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 9220–9225
- 17 Obermajer N, Wong J L, Edwards R P, et al. Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. *J Exp Med*, 2013, 210: 1433–1445

Nitric oxide suppresses formation of malignant pleural effusion

JIANG Shuai¹, WU XiuZhi¹, ZHAI Kan¹, YI FengShuang¹, WANG Zhen¹, WANG Zheng¹,
YE ZhiJian², YANG WeiBing³ & SHI HuanZhong¹

¹Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Beijing Institute of Respiratory Medicine and Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China;

²Department of Respiratory Medicine, First People's Hospital of Foshan, Sun Yat-sen University, Foshan 528000, China;

³Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

In the present study, we were prompted to investigate the effect of NO signaling on the formation of malignant pleural effusion (MPE) and determined whether NO affects Th1/Th17 response in MPE. The development of MPE and survival of MPE mice were compared between wild-type and *NOS2*^{-/-} mice. The effect of NOS2 on vascular permeability of pleura and differentiation of Th1 and Th17 in MPE was also explored. Our current data show that production of NO is significantly enhanced in MPE as compared with peripheral circulation, and that nitric oxide synthase-2 (NOS2) deficiency increases pleural vascular permeability and thus promotes the development of MPE, and reduces the survival of mice bearing MPE. NOS2 deficiency inhibits Th1 cell differentiation and promotes Th17 cell differentiation. Our data provide the first evidence that NO inhibits MPE formation by inhibiting fluid extravasation into the pleural space and by promoting Th1 cell differentiation and suppressing Th17 cell differentiation. Overall, our results shed light on the mechanisms by which NO suppresses MPE formation, providing a promising therapeutic strategy in the management of MPE.

malignant pleural effusion, nitric oxide, Th1 cells, Th17 cells

doi: [10.1360/N052018-00063](https://doi.org/10.1360/N052018-00063)