

肿瘤转移相关基因 1 与妇科恶性肿瘤关系的研究进展

宋 振(综述), 金 平(审校)

作者单位: 518000 广东, 南方医科大学附属深圳妇幼保健院妇科

作者简介: 宋 振, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤的诊疗。E-mail: tsxy8596@163.com

通信作者: 金 平, 医学博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 妇科肿瘤的诊疗。E-mail: pingjin66@sina.com

[摘要] 肿瘤转移相关基因(MTA)是与肿瘤进展相关的一个基因家族。MTA1 是其主要成员之一, 在多种肿瘤中异常表达, 与肿瘤的侵袭、转移和预后密切相关, 具有重要的临床研究价值。该文对 MTA1 的结构、功能及其在妇科恶性肿瘤中的研究进展作一综述。

[关键词] 肿瘤转移相关基因 1; 组蛋白去乙酰化酶; 子宫内膜癌; 宫颈癌; 卵巢癌

[中图分类号] R 737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2022)07-0662-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2022.07.22

Research progress on the relationship between tumor metastasis associated gene 1 and gynecological malignant tumors SONG Zhen, JIN Ping. Department of Gynecology, Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangdong 518000, China

[Abstract] Tumor metastasis-associated gene(MTA) is a gene family related to tumor progression, of which MTA1 is one of the main members. It is abnormally expressed in a variety of tumors, which is closely related to tumor invasion, metastasis and prognosis, and has important clinical research value. This paper reviews the structure and function of MTA1 and its research progress in gynecological malignant tumors.

[Key words] Tumor metastasis-associated gene 1(MTA1); Histone deacetylase; Endometrial cancer; Cervical cancer; Ovarian cancer

恶性肿瘤具有侵袭性和转移性的重要生物学特性,其特性的发挥受多种复杂机制的调节^[1]。肿瘤转移相关基因 1(tumor metastasis-associated gene 1, MTA1)是一种与肿瘤转移相关的基因。研究发现,该基因在多种实体肿瘤如乳腺癌^[2]、食管癌^[3-5]、胃癌^[6-7]、肺癌^[8]、胰腺癌^[9]、前列腺癌^[10-11]等均有高表达,并与肿瘤的侵袭、转移及预后密切相关。本文就 MTA1 的结构、功能及其在妇科恶性肿瘤中的研究进展综述如下。

1 MTA1 的结构与功能

肿瘤转移相关基因(tumor metastasis-associated gene, MTA)是新发现的一个基因家族,由 3 个成员组成(MTA1、MTA2 和 MTA3),可表达为 6 种不同的异构体(MTA1、MTA1S、MTA1-ZG29P、MTA2、MTA3 和 MTA3L)^[12]。MTA1 的研究报道最多,也是最重要的成员之一。MTA1 在该家族中首先被发现,它是 1993 年 Pencil 等^[13]利用相差杂交技术首次从具有

转移潜能的鼠乳腺癌细胞株 13762NF 中分离出的一种新的乳腺癌转移相关基因,后在人的高转移性乳腺癌细胞株中发现了同源的 MTA1 基因。因其表达水平与乳腺癌转移能力呈正相关,被命名为 MTA1。MTA1-ZG29P 是 MTA1 的 N 端截断形式。人类 MTA1 位于 14q32.3 上,全长 2.2 kb,其 cDNA 全长 2 756 bp,包含一个独立开放阅读框。MTA1、MTA2 和 MTA3 cDNA 的核苷酸序列具有约 30% 的同源性;在蛋白质水平上,三者的氨基酸具有约 60% 的同源性。MTA1 基因编码的蛋白质含有 715 个氨基酸残基,分子量约为 80.8 kDa^[14]。MTA 家族系列包含几个共同的结构域[BAH(bromo-adjacent homology)、ELM(egl-27 and MTA1 homology)、SANT(Swi, Ada2, N-CoR, TFIIB-B)、GATA 锌指结构域]和多个磷酸化位点,通过蛋白质与蛋白质间或蛋白质与 DNA 间相互作用,在信号转导和转录调节中发挥重要作用^[14-16]。多因素参与肿瘤转移的调控,其中 MTA 家族成员发挥重

要作用。研究发现,MTA1 是核小体重塑和组蛋白去乙酰化酶(nucleosome remodeling and histone deacetylase, NuRD)复合物的一个亚单位,与三磷酸腺苷依赖的染色质重塑有关,并通过组蛋白的乙酰化和去乙酰化参与转录调控。乙酰化中和了组蛋白的正电荷,从而减少了基因组 DNA 与组蛋白乙酰化区域之间的结合,使基因组 DNA 和组蛋白结合变得松散,促进基因转录^[12]。MTA1 蛋白能与组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)结合,募集 HDACs 到目标基因的启动子区域,通过去除组蛋白的乙酰基来重塑染色质结构,使其变得更加紧密而不利转录。MTA1 或许可以通过此类功能直接或者间接作用于某些抑制肿瘤浸润转移的基因,下调其转录。

2 MTA1 与肿瘤淋巴血管生成的关系

肿瘤淋巴管血管生成是肿瘤生长、浸润和转移的物质基础。血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)是血管内皮生长因子家族的成员,参与多种恶性肿瘤淋巴血管生成,导致肿瘤淋巴转移,影响预后。MTA1 是 NuRD 复合物的的重要组成部分,参与大量基因的转录调节。MTA1 通过稳定缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)蛋白使其去乙酰化,增加 HIF-1 α 的转录活性,并增强 HIF-1 α 的靶分子血管内皮生长因子的表达,在体内外均能促进血管生成,从而增加癌细胞转移潜能^[17]。Liu 等^[3]运用免疫组化技术检测 107 例食管鳞癌组织和 56 份正常食管组织 MTA1 和 VEGF-C 的蛋白表达水平,评价微淋巴管密度,并分析其与各项临床病理因素的关系。结果表明,MTA1 基因可能在食管鳞癌的发展、淋巴血管生成和淋巴结转移中起促进作用,检测活检标本中 VEGF-C 的表达水平对预测淋巴转移有帮助。Yang 等^[18]在非小细胞肺癌中的研究也有类似结果,研究还发现 MTA1 高表达与膀胱癌的浸润和转移密切相关。

3 MTA1 与妇科恶性肿瘤的关系

3.1 MTA1 与子宫内膜癌 Balasenthil 等^[19]利用免疫组化和蛋白质印迹方法检测子宫内膜腺癌和不同时期良性子宫内膜 MTA1 的表达,发现增殖期和分泌期的子宫内膜,MTA1 在腺体和间质中均有表达,其定位于这些细胞的细胞核和细胞质中。MTA1 在分泌期的表达低于增殖期。蛋白质印迹分析 MTA1 在肿瘤标本中的表达明显增加。为进一步了解 MTA1 在子宫内膜腺癌组织中的亚细胞定位,研究者还对 70 例不同分期的子宫内膜腺癌进行免疫组化染色,发现 75.7% (53/70) 的肿瘤标本有 MTA1 表达,且

在所有Ⅲ期标本中染色强度相似。在Ⅰ期和Ⅱ期肿瘤中,MTA1 同时存在于细胞核和细胞质。在Ⅲ期肿瘤中,MTA1 只存在于细胞质。这说明 MTA1 在子宫内膜腺癌中具有潜在作用。杨益民等^[20]利用免疫组化方法检测 62 例子宫内膜癌和 30 份正常子宫内膜组织中 MTA1 和 VEGF 的表达,发现 MTA1 和 VEGF 在子宫内膜癌组织中的表达均高于正常子宫内膜组织。MTA1 和 VEGF 在子宫内膜癌中的表达与临床分期、病理类型、淋巴结转移和肌层浸润有关。这说明两者与子宫内膜癌的发生、发展呈正相关。MTA2 与 MTA1 有 65% 的同源性。高灵通和刘玮^[21]研究显示,MTA2 在子宫内膜癌中的表达上调,MTA2 在子宫内膜癌组织中的表达显著高于癌旁组织,且肿瘤分级越高,MTA2 等表达量越高。miR-30c 是子宫内膜癌的一种肿瘤抑制因子,其在子宫内膜癌组织的表达下调,而在雌激素受体阳性的 Ishikawa 细胞和雌激素受体阴性的 HEC-1-B 细胞中均高表达,且雌二醇可使两者表达下调。miR-30c 通过 miR-30c-MTA1 信号通路直接抑制 MTA1 的表达,并作为肿瘤抑制因子发挥作用^[22]。王毅锋和宋文广^[23]采用免疫组化方法检测子宫内膜癌和正常子宫内膜组织中 MTA1 蛋白的表达,采用逆转录聚合酶链反应测定组织和细胞中 MTA1 mRNA 的表达,采用蛋白质印迹检测细胞中 MTA1 蛋白的表达,结果发现子宫内膜癌组 MTA1 蛋白阳性率和 MTA1 mRNA 表达率明显高于对照组($P < 0.05$)。研究还采用 RNA 干扰技术沉默子宫内膜癌 HEC-1-C 细胞中的 MTA1 基因,结果发现沉默子宫内膜癌 HEC-1-C 细胞中的 MTA1 基因后,子宫内膜癌 HEC-1-C 细胞中的 MTA1 蛋白和 mRNA 的表达下降,子宫内膜癌 HEC-1-C 细胞的侵袭和迁移能力也下降,说明 MTA1 基因高表达能够促进子宫内膜癌的侵袭和转移。

3.2 MTA1 与宫颈癌 宫颈癌的发生、发展涉及多个基因的改变,包括原癌基因、抑癌基因及 MTA,这些基因的变化可引起信号转导异常^[24]。既往的研究证据证实,宫颈癌的发生主要与高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的 E6 和 E7 病毒蛋白有关。Jia 等^[25]研究 HPV 感染与宫颈癌细胞中主转录调控因子 MTA1 上调之间的相关性后发现,MTA1 在感染 HPV16 的宫颈癌细胞中高表达,而在 HPV 阴性宫颈癌细胞中弱表达。转染 HPV 基因组可同时引起 MTA1 mRNA 和蛋白质水平上调,仅高危 E6 就足以诱导 MTA1 上调。MTA1 作为 HPV 感染的靶点及核因子- κ B 信号的调节器,在 HPV 感染引起的免疫下

调中发挥重要作用。韩肖燕等^[26]利用 pcDNA3-MTA1 表达质粒和 pSilencer3.1-MTA1-siRNA 干扰质粒在宫颈癌中进行研究,通过上调和下调宫颈癌 CaSKi 细胞中 MTA1 基因的表达观察细胞生物学行为变化。结果发现,CaSKi 细胞转染 pcDNA3-MTA1 质粒后,细胞生长加速,克隆形成及划痕后迁移能力增强,肿瘤细胞对细胞外基质的黏附、侵袭及体外迁移能力明显增强,而转染干扰载体 pSilencer3.1-MTA1-siRNA 质粒降调 MTA1 基因表达后,上述细胞生物学行为受到明显抑制。顾青等^[27]的研究也表明,MTA1 基因能促进宫颈癌细胞的增殖,沉默 MTA1 基因表达能抑制宫颈癌细胞的增殖及迁移能力,MTA1 基因高表达可能参与宫颈癌的形成,为未来应用 RNA 干扰技术进行以 MTA1 基因为靶点的治疗提供理论基础。Liu 等^[28]利用免疫组化方法检测 132 例宫颈组织中 MTA1 的表达情况,发现 73 例(55.3%)存在 MTA1 过表达,且与组织学分级、淋巴结转移和复发明显相关。这说明 MTA1 过表达与宫颈癌的进展和转移相关。侯晓梅等^[29]也通过免疫组化发现,MTA1 蛋白在宫颈癌组的表达明显高于宫颈上皮内瘤变组及正常宫颈组,且阳性表达与临床分期、肌层浸润深度及淋巴结转移有关,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这与王海清等^[30]的研究结果一致。Wang 等^[31]通过多种实验研究发现,长链非编码 RNA 肺癌相关转录物 1(lung cancer associated transcript 1, LUCAT1)的表达水平显著高于正常宫颈上皮细胞系 NC104, LUCAT1 高表达促进宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭, LUCAT1 低表达水平的患者有较长的总体生存率。LUCAT1 过表达可上调 MTA1 蛋白质水平,相关性分析表明,癌组织中 MTA1 表达水平与 LUCAT1 表达呈正相关。

3.3 MTA1 与卵巢癌 卵巢癌发病过程隐匿,早期常无特异性检查,确诊时多数已属晚期,出现盆腹腔及多脏器转移,预后较差,患者常死于并发症。因此,临床上寻找预示卵巢癌进展转移的分子生物学指标和有效的治疗方法非常重要。研究发现,MTA1 蛋白的表达与卵巢癌的分期和大网膜转移密切相关。Dannenmann 等^[32]对 115 例浆液性卵巢癌标本的研究显示出 MTA1 水平与卵巢癌有很强的相关性。MTA1 蛋白在晚期卵巢癌组织中的表达明显高于早期卵巢癌组织,前者表现为肿瘤低分化,更大程度的腹膜转移和腹水形成。MTA1 不仅增强了软琼脂中的集落形成活性,还下调了上皮细胞钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin)和 MTA3 的表达。MTA1 还增强了转录抑制因子 SNAIL 和 SLUG 的表达,降低了雌激素受体 β

的表达。此外,MTA1 还上调了细胞因子 GRO、CXCL1、IL6 和 IL8 的表达,这些细胞因子是调节生长的癌基因^[33]。Yi 等^[34]报道 MTA1 的 mRNA 表达水平与淋巴结转移呈正相关。Yang 等^[35]研究发现,MTA1 可通过介导双链 DNA 断裂修复促进卵巢癌细胞增殖,而利用基于 siRNA 的方法可以下调 MTA1,从而显著抑制卵巢癌细胞增殖。这说明 MTA1 可能成为治疗癌症的靶点。郭玲等^[36]利用免疫组化方法检测 68 例卵巢癌组织和 30 份正常卵巢组织中 MTA1 和 VEGF 蛋白的表达,发现两者在卵巢癌中的表达均显著高于正常卵巢组织。这说明 MTA1 和 VEGF 蛋白表达在卵巢癌发生、发展过程中可能起一定协调作用。He 等^[37]通过多种实验研究发现,MTA1 过表达不影响卵巢癌 A2780 细胞的生长活性,但能显著增强 A2780 细胞的基质非依赖的生长能力,在软琼脂中形成大的集落,说明 MTA1 是通过促进转移而不是提高细胞生长活性来促进细胞增殖。因此,MTA1 过表达促进卵巢癌细胞的侵袭,在卵巢癌的进展和转移中起着重要作用。Zhao 等^[38]通过体外实验研究发现,PGIPN(一种从牛 β 酪蛋白中提取的六肽)能与卵巢癌细胞的细胞膜结合,可能通过调节卵巢癌细胞中 MTA1 的表达以及相关的信号通路来抑制卵巢癌细胞的侵袭和转移,显示了其作为卵巢癌辅助治疗的新药研究前景。

4 结语

MTA1 在 MTA 家族中首先被发现,是 MTA 家族的重要成员,通过多种途径和机制参与恶性肿瘤的侵袭和转移。多项研究结果表明,MTA1 高表达与包括妇科恶性肿瘤在内的多种上皮来源恶性肿瘤的发生、发展和转移有关,MTA1 基因的降调表达能显著抑制恶性肿瘤细胞的生物学行为。随着对 MTA1 参与原癌基因激活、抑癌基因失活、信号转导、转录调节等过程研究的进一步深入,MTA1 的具体功能将得到确认,以 MTA1 为靶向的治疗可能成为治疗妇科恶性肿瘤的新方法。

参考文献

- [1] 黄永塔,莫祥兰. miRNA 与肿瘤转移调控机制的研究进展[J]. 中国临床新医学,2020,13(1):94-98.
- [2] 陈明芬,郑建清,苏菁菁,等. 中国人群乳腺癌中 MTA1 蛋白表达及其临床意义的 Meta 分析[J]. 中外医学研究,2017,15(1):6-7.
- [3] Liu J, Xia J, Zhang Y, et al. Associations between the expression of MTA1 and VEGF-C in esophageal squamous cell carcinoma with lymph angiogenesis and lymph node metastasis[J]. Oncol Lett, 2017,14(3):3275-3281.
- [4] 王学培,翟杨生,韩雪华. MTA1 表达与食管癌侵袭转移的相关性及调控作用的研究[J]. 河北医药,2020,42(12):1775-1779.

- [5] Nan P, Wang T, Li C, et al. MTA1 promotes tumorigenesis and development of esophageal squamous cell carcinoma via activating the MEK/ERK/p90RSK signaling pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2020,41(9):1263–1272.
- [6] Okugawa Y, Mohri Y, Tanaka K, et al. Metastasis-associated protein is a predictive biomarker for metastasis and recurrence in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016,36(4):1893–1900.
- [7] Lv ZY, Zhao ZS, Ye ZY, et al. Metastasis-associated protein 1(MTA1) in gastric cancer tissues is positively associated with poorer prognosis[J]. *Pathol Res Pract*, 2018,214(4):536–541.
- [8] Wang T, Li W, Huang H, et al. Metastasis-associated 1(MTA1) gene expression promotes angiogenesis in mouse xenografts from human non-small cell lung cancer(NSCLC) cells[J]. *Med Sci Monit*, 2019,25:484–491.
- [9] Sun X, Zhang Y, Li B, et al. MTA1 promotes the invasion and migration of pancreatic cancer cells potentially through the HIF- α /VEGF pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2018,38(4):352–358.
- [10] Kumar A, Dhar S, Campanelli G, et al. MTA1 drives malignant progression and bone metastasis in prostate cancer[J]. *Mol Oncol*, 2018,12(9):1596–1607.
- [11] 赵 朋, 卢炳新, 白铁男, 等. MTA1 和 XIAP 的表达与前列腺癌转移及预后的关系[J]. *天津医科大学学报*, 2019,25(3):260–263.
- [12] Kumar R, Wang RA, Bagheri-Yarmand R. Emerging roles of MTA family members in human cancers[J]. *Semin Oncol*, 2003,30(5 Suppl 16):30–37.
- [13] Pencil SD, Toh Y, Nicolson GL. Candidate metastasis-associated genes of the rat 13762NF mammary adenocarcinoma[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1993,25(2):165–174.
- [14] Pavlidis ET, Pavlidis TE. Current molecular and genetic aspects of pancreatic cancer, the role of metastasis associated proteins (MTA): a review[J]. *J Invest Surg*, 2018,31(1):54–66.
- [15] Toh Y, Nicolson GL. The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers; molecular functions and clinical implications[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009,26(3):215–227.
- [16] Zhang J, Wang H, Meng Q, et al. Expression of MTA1 in endometriosis and its relationship to the recurrence[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2018,97(35):e12115.
- [17] Moon HE, Cheon H, Chun KH, et al. Metastasis-associated protein 1 enhances angiogenesis by stabilization of HIF-1 α [J]. *Oncol Rep*, 2006,16(4):929–935.
- [18] Yang CL, Zheng XL, Ye K, et al. MicroRNA-183 acts as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by down-regulating MTA1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018,46(1):93–106.
- [19] Balasenthil S, Broaddus RR, Kumar R. Expression of metastasis-associated protein 1(MTA1) in benign endometrium and endometrial adenocarcinomas[J]. *Hum Pathol*, 2006,37(6):656–661.
- [20] 杨益民, 刘 华, 李文彬. Mta-1 与 VEGF 在子宫内膜癌组织中的表达及其相关性[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010,26(7):682–684.
- [21] 高灵通, 刘 玮. MTA2 在子宫内膜癌中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018,38(1):52–56.
- [22] Kong X, Xu X, Yan Y, et al. Estrogen regulates the tumour suppressor MiRNA-30c and its target gene, MTA-1, in endometrial cancer[J]. *PLoS One*, 2014,9(3):e90810.
- [23] 王毅锋, 宋文广. 转移相关基因 1 在老年子宫内膜癌中的表达及对侵袭转移的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019,39(1):44–47.
- [24] 余 嫆, 黄守国. 子宫颈癌恶性生物学特性相关基因的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2018,34(19):3313–3316.
- [25] Jia QP, Yan CY, Zheng XR, et al. Upregulation of MTA1 expression by human papillomavirus infection promotes CDDP resistance in cervical cancer cells via modulation of NF- κ B/APOBEC3B cascade[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019,83(4):625–637.
- [26] 韩肖燕, 钱海利, 杨隼钧, 等. MTA1 基因表达与子宫颈癌细胞侵袭转移的关系[J]. *中华妇产科杂志*, 2011,46(9):678–683.
- [27] 顾 青, 赵 艳, 陈 华. MTA1 基因沉默对宫颈癌细胞增殖及转移能力的影响[J]. *实用中西医结合临床*, 2017,17(6):1–4,56.
- [28] Liu T, Yang M, Yang S, et al. Metastasis-associated protein 1 is a novel marker predicting survival and lymph nodes metastasis in cervical cancer[J]. *Hum Pathol*, 2013,44(10):2275–2281.
- [29] 侯晓梅, 王翔宇, 王 蓁, 等. MTA-1 和 nm23-H1 在宫颈鳞组织中的表达及其临床意义[J]. *实用妇科内分泌杂志(电子版)*, 2018,5(15):11–12,14.
- [30] 王海清, 胡杏军, 刘 芳, 等. 子宫颈鳞癌中 MTA1、CDK8、HPV 16-E7 的表达及其意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018,34(1):89–92.
- [31] Wang AH, Zhao JM, Du J, et al. Long noncoding RNA LUCAT1 promotes cervical cancer cell proliferation and invasion by upregulating MTA1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019,23(16):6824–6829.
- [32] Dannenmann C, Shabani N, Friese K, et al. The metastasis-associated gene MTA1 is upregulated in advanced ovarian cancer, represses ER β , and enhances expression of oncogenic cytokine GRO[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008,7(9):1460–1467.
- [33] Murakami M, Kaul R, Robertson ES. MTA1 expression is linked to ovarian cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008,7(9):1468–1470.
- [34] Yi S, Guangqi H, Guoli H. The association of the expression of MTA1, nm23H1 with the invasion, metastasis of ovarian carcinoma[J]. *Chin Med Sci J*, 2003,18(2):87–92.
- [35] Yang QY, Li JH, Wang QY, et al. MTA1 promotes cell proliferation via DNA damage repair in epithelial ovarian cancer[J]. *Genet Mol Res*, 2014,13(4):10269–10278.
- [36] 郭 玲, 李莲娣, 周淑芬, 等. 肿瘤转移相关基因 1 和血管内皮生长因子在卵巢癌中表达的临床意义[J]. *中国现代医生*, 2017,55(24):8–10,14.
- [37] He X, Zhou C, Zheng L, et al. Overexpression of MTA1 promotes invasiveness and metastasis of ovarian cancer cells[J]. *Ir J Med Sci*, 2014,183(3):433–438.
- [38] Zhao M, Wei C, Yang X, et al. The milk-derived hexapeptide PGPIP inhibits the invasion and migration of human ovarian cancer cells by regulating the expression of MTA1 and NM23H1 genes[J]. *Int J Oncol*, 2016,48(4):1721–1729.

[收稿日期 2021-07-31][本文编辑 韦 颖]

本文引用格式

宋 振, 金 平. 肿瘤转移相关基因 1 与妇科恶性肿瘤关系的研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2022,15(7):662–665.