

夏枯草提取物对人乳头瘤病毒阳性宫颈癌细胞的凋亡作用

范鹏莺

河南省安阳市妇幼保健院生殖不孕科, 河南 安阳 455000

摘要: 目的 研究夏枯草提取物 (EPV) 对人乳头瘤病毒 (HPV) 阳性人宫颈癌细胞的凋亡作用。方法 培养人宫颈癌细胞 SiHa、HeLa (HPV 阳性) 及 C-33-A (HPV 阴性), 与 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EPV 共孵育 24 h, 对照组加入等体积的 DMSO, 采用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞存活率; 流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡及细胞周期。取对数生长期的 SiHa、HeLa 细胞, 与 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EPV 共孵育 24 h, Western blotting 法检测凋亡相关蛋白 caspase 3、caspase 9、Bcl-2、Bax 的表达情况。结果 EPV 剂量相关地抑制 HPV 阳性人宫颈癌细胞 SiHa、HeLa 活力 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 诱导 SiHa、HeLa 细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、 0.01), 使 SiHa、HeLa 细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期, 抑制其增殖; 对 C-33-A 细胞无显著作用。显著上调 SiHa、HeLa 细胞内 Cle caspase 3、Cle caspase 9、Bax 表达, 下调 Bcl-2 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 EPV 可诱导 HPV 阳性人宫颈癌 SiHa、HeLa 细胞凋亡, 对 HPV 阴性 C-33-A 细胞无显著作用, 为夏枯草及其制剂在临床上治疗宫颈癌提供依据。

关键词: 夏枯草提取物; 人乳头瘤病毒; 宫颈癌; 凋亡

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)03-0388-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.03.011

Apoptotic effect of extract from *Prunella vulgaris* on human papilloma virus positive cervical cancer cells

FAN Peng-ying

Reproduction Department, Anyang Maternal and Children Health Care Hospital, China, 455000

Abstract: Objective To study the potential apoptotic effect of extract from *Prunella vulgaris* (EPV), a traditional Chinese medicine, on human papilloma virus (HPV) positive and negative human cervical cancer cells. **Methods** Human cervical carcinoma cell lines SiHa, HeLa (HPV positive), and C-33-A (HPV negative) were cultured, and treated with 20, 40, and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EPV for 24 h. Control group were treated with equal volume of DMSO. The survival rate of cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Flow cytometry Annexin V/PI double staining method was used to detect cell apoptosis and cell cycle. SiHa and HeLa cells were incubated with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EPV for 24 h, and Western blotting was used to detect the expression of apoptosis related protein caspase 3, caspase 9, Bcl-2, and Bax. **Results** EPV reduced the viability of SiHa and HeLa cells dose-dependently ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001). Moreover, EPV induced apoptosis in SiHa and HeLa cells ($P < 0.05$ and 0.01), inhibited the proliferation of SiHa and HeLa cells through arresting their cycle in G_0/G_1 phase. However, EPV did not show significantly effect on C-33-A cells. Western blotting results showed that Cle caspase 3, Cle caspase 9, Bax, and Bcl-2 proteins were involved in EPV induced cell apoptosis ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001). **Conclusion** EPV could induce apoptosis in HPV-positive cervical cancer cells, which provides novel information for clinical application of *P. vulgaris* and its preparations for the HPV-positive cervical cancer patients.

Key words: extract of *Prunella vulgaris* (EPV); human papilloma virus; cervical cancer; apoptosis

夏枯草为唇形科夏枯草属植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥花序, 亦可全草入药。主要含有三萜及其苷类 (熊果酸、齐墩果酸等)、黄酮类 (芦丁、木樨草素、异荭草素、木樨草苷等)、甾醇及其苷类、

香豆素、有机酸、挥发油及糖类成分^[1-4]。作为传统中药, 夏枯草具有清火、明目、散结、消肿的功效, 临床用于治疗乳痈肿痛、甲状腺肿大、淋巴结核、乳腺增生症、高血压等症。现代药理学研究表

收稿日期: 2016-03-20

作者简介: 范鹏莺, 女, 副主任医师, 研究方向为妇科内分泌。Tel: 13937228329 E-mail: fpy0305@163.com

明,夏枯草主要有降压、降糖、抗菌、抗炎、抗过敏及抗病毒等作用,近年来,由于其明确的抗病毒及抗癌作用受到重视^[4-7]。

人类乳头状瘤病毒(Human papilloma virus, HPV)是一种嗜上皮性病毒,在人和哺乳动物中分布广泛,有高度的特异性。HPV可引起人类良性的肿瘤和疣,如生长在生殖器官附近的皮肤和黏膜上的尖锐湿疣,以及生长在黏膜上的乳头状瘤^[8]。宫颈癌是在全球妇女中发病率排在第3位的最常见的恶性肿瘤之一,高危型HPV(high-risk HPV, HR-HPV)持续感染是宫颈癌发展的主要危险因素^[9],因此,抑制HR-HPV生长的措施可以用于治疗宫颈癌。HR-HPV感染导致一系列分子过程失衡,促进宫颈癌的发生发展,但其确切机制尚不完全清楚^[10-13]。化疗药物在一定程度上能够抑制宫颈癌细胞增殖和转移,但往往毒性较大且容易产生耐药性,临床疗效并不理想,且部分患者难以耐受。因此从天然产物中寻找低毒、高效的抗宫颈癌活性成分是近年来的研究热点^[14-17]。

本研究以3株不同分型的人宫颈癌细胞系为研究对象,观察夏枯草对宫颈癌细胞增殖凋亡的影响,拟探讨其抗HPV进而抗宫颈癌的作用机制。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

夏枯草经水煎法制备成夏枯草提取物(EPV),由贵阳新天药业股份有限公司提供,制备工艺如下:取夏枯草加水煎煮3次,加水量分别为药材量的10、8、6倍,每次煎煮1h,合并煎液,滤过,浓缩为相对密度是1.1的EPV,使用时用DMSO溶解。参照《中国药典》2015年版夏枯草口服液项下的质量标准,对EPV中总黄酮以及迷迭香酸的水平进行控制,总黄酮、迷迭香酸质量浓度分别约为6.0、1.2 mg/mL。

RPMI 1640 培养液,北京 Gibco-BRL 公司; oligo20 (dT), 北京华夏远洋科技有限公司; 青霉素、链霉素,南京森贝伽生物科技有限公司; 噻唑蓝(MTT)试剂盒,上海华蓝化学科技有限公司; 胎牛血清,北京 Invitrogen 公司; caspase 3、caspase 9、Bcl-2、Bax 抗体,美国 Cell Signaling Technology 公司; AnnexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞浆蛋白抽提试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂(分析纯)购于北京试剂厂。

1.2 细胞

人宫颈癌 SiHa、HeLa、C-33-A 细胞,购于上海中科院细胞库。

1.3 仪器

细胞培养箱、酶标仪(美国 Thermo 公司); 流式细胞仪、冷冻台式离心机(美国贝克曼库尔特公司); 超声振荡清洗仪(上海生析超声仪器有限公司); 电泳仪(北京六一仪器厂); 分光光度计(日本岛津公司); 超低温冰箱(海尔公司); 摇床(北京莱普特科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 SiHa、HeLa、C-33-A 细胞培养于 RPMI 1640 培养液(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素)中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱内,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 细胞增殖抑制实验

取对数生长期的 3 株宫颈癌细胞,以 1×10⁵/mL、200 μL/孔分别接种于 96 孔板,细胞贴壁后分为对照组、EPV 组。EPV 组加入终质量浓度为 20、40、80 μg/mL 的 EPV,对照组加入等体积的 DMSO,各组均设 5 个复孔,继续培养 24 h,加入等体积的培养液作为调零孔。于实验结束前 4 h 加入 MTT 试剂 20 μL/孔,孵育 4 h,吸弃上清,加入 DMSO 150 μL/孔,摇床上振荡 10 min,待结晶完全溶解后,酶标仪检测 570 nm 处吸光度(A)值,计算抑制率。

细胞增殖抑制率=1-(实验组平均A值-调零孔A值)/(对照组平均A值-调零孔A值)

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期

取对数生长期的 3 株宫颈癌细胞,以 1×10⁶/mL、200 μL/孔接种于 6 孔培养板内,待细胞贴壁后分别加入终质量浓度为 20、40、80 μg/mL EPV 培养液,对照组加入等体积的 DMSO。培养 24 h 后,收集细胞,加入 Annexin V-FITC 和 PI,室温避光染色。筛网过滤后送流式细胞仪进行细胞凋亡及细胞周期的检测。

2.4 Western blotting 法检测蛋白表达变化

取对数生长期的 SiHa、HeLa 细胞,接种方法同“2.3”项,待细胞贴壁后加入终质量浓度为 40 μg/mL EPV 培养液,对照组加入等体积的 DMSO。继续培养 24 h 后收集细胞,参照试剂盒说明书进行细胞浆蛋白抽提并测定浓度,加入 1/5 体积的 5×

上样缓冲液，沸水煮沸 5 min，20 μg/孔上样，进行 SDS-PAGE 电泳，电转至 PVDF 膜上，脱脂牛奶室温封闭 1 h，分别加入 1 : 1 000 稀释的 caspase 3、caspase 9、Bcl-2、Bax 抗体，β-actin 作为内参，4 °C 过夜。TBST 洗膜 3 次，加入 1 : 1 000 稀释的辣根酶标记的兔抗山羊 Ig G，室温孵育 2 h，同样洗膜 3 次，ECL 发光液显色，观察各条带深浅变化。Image J v 2.1.4.7 软件进行灰度分析。

2.5 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件进行统计处理，计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对宫颈癌细胞增殖的影响

EPV 处理 24 h，在 20、40、80 μg/mL 均可显著抑制 SiHa、HeLa 细胞增殖 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)，且呈浓度相关性。经过同样浓度的 EPV 处理 24 h 后，C-33-A 细胞活力基本不变。结果见图 1。

3.2 对宫颈癌细胞凋亡的影响

流式细胞术结果显示，EPV 处理 SiHa、HeLa 细胞 24 h 后，凋亡率增加，显著高于对照组 ($P < 0.05, 0.01$)，且呈浓度相关性。相应地，EPV 对 HPV 阴性的宫颈癌 C-33-A 细胞无明显诱导凋亡作用。结果见图 2、表 1。

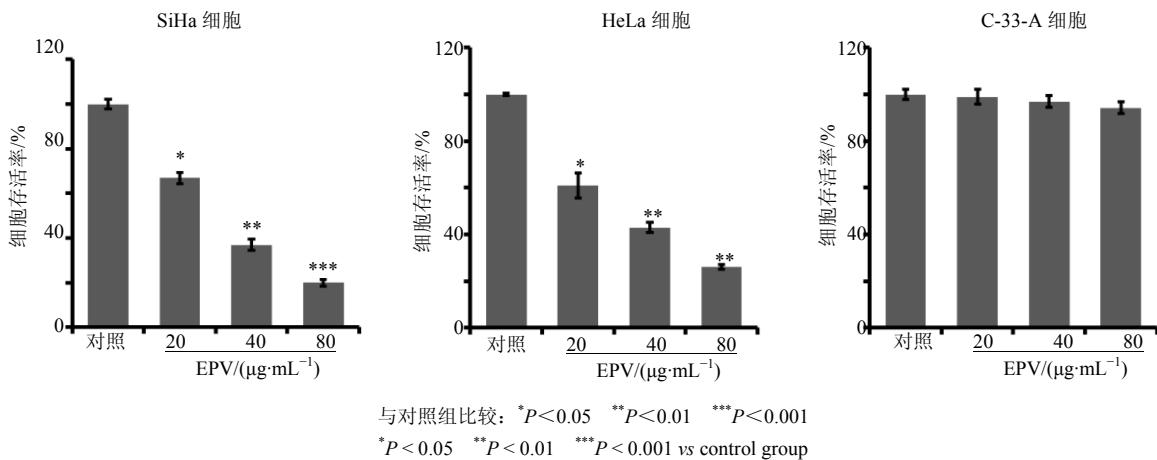


图 1 EPV 对宫颈癌细胞株活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig 1 Effects of EPV on viability of cervical cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

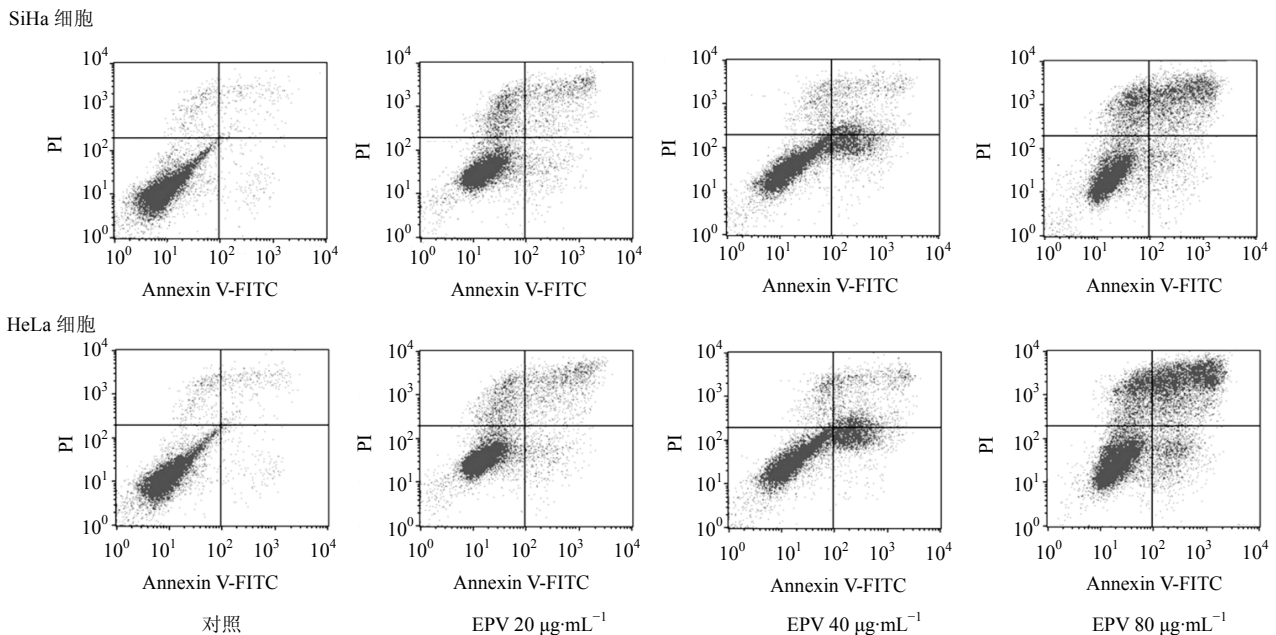


图 2 流式细胞术测定 EPV 对 HPV 阳性宫颈癌细胞凋亡率的影响

Fig 2 Effect of different concentration of EPV on apoptosis rate of HPV positive cervical cancer cells by flow cytometry

表 1 不同浓度 EPV 处理宫颈癌细胞后凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Apoptotic effect of EPV on cervical cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞凋亡率/%		
		SiHa 细胞	HeLa 细胞	C-33-A 细胞
对照	0	1.5 \pm 0.04	1.8 \pm 0.03	1.6 \pm 0.02
EPV	20	23.4 \pm 0.94**	12.4 \pm 1.16*	2.3 \pm 0.04
	40	47.5 \pm 2.90**	44.4 \pm 5.11**	3.3 \pm 0.11
	80	66.7 \pm 3.65**	58.5 \pm 5.43**	3.5 \pm 0.58

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.3 对宫颈癌细胞周期的影响

不同浓度 EPV 处理 24 h 后, SiHa、HeLa 细胞的 G₀/G₁ 期细胞比例增加, 同时 G₂/M 期与 S 期细胞比例减少, 提示 EPV 能使 SiHa、HeLa 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 从而抑制细胞增殖。EPV 对 C-33-A 细胞无明显作用。结果见表 2。

3.4 对 HPV 阳性宫颈癌细胞中蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EPV 处理 SiHa、HeLa 细胞 24 h 后, Cle caspase 3 和 Cle caspase 9 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), 促凋亡蛋白 Bax 的表达量显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

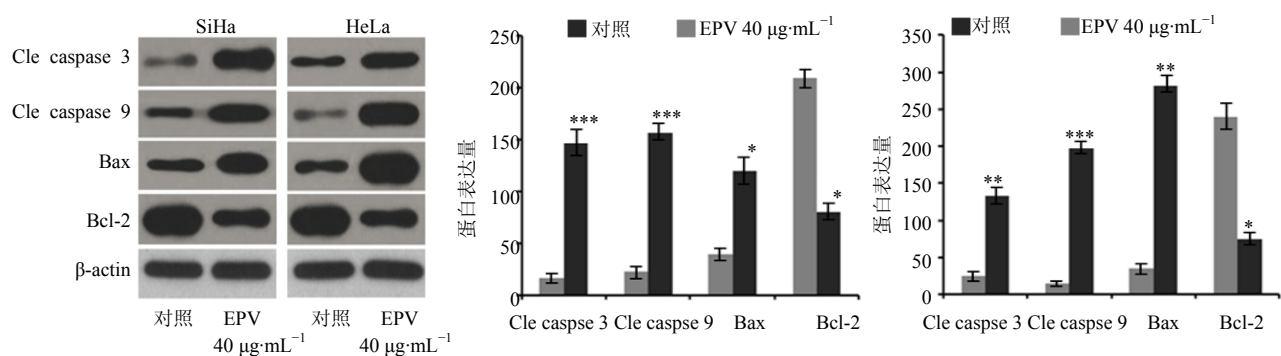
表 2 不同浓度 EPV 对 HPV 阳性宫颈癌细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of EPV on cell cycle in HPV positive cervical cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SiHa 细胞周期/%			HeLa 细胞周期/%		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	—	40.32 \pm 0.89	41.12 \pm 0.95	18.47 \pm 0.54	41.52 \pm 0.89	37.12 \pm 0.05	21.47 \pm 0.78
EPV	20	54.33 \pm 1.87	34.09 \pm 0.83	12.28 \pm 0.55*	54.98 \pm 1.87	30.09 \pm 1.81*	16.43 \pm 0.25*
	40	69.47 \pm 1.36*	25.25 \pm 0.73*	6.63 \pm 0.73**	63.78 \pm 1.36*	27.41 \pm 0.73*	13.83 \pm 0.09**
	80	73.94 \pm 2.23**	23.46 \pm 0.72**	4.77 \pm 0.43**	75.65 \pm 2.23**	19.76 \pm 0.72**	4.56 \pm 0.66**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 3 EPV 对 HPV 阳性宫颈癌细胞中凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 3 Effect of EPV on expression of apoptosis related protein in HPV positive cervical cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

全球宫颈癌发病率自 20 世纪 70 年代末开始一直呈上升趋势, 妇女宫颈癌的发病率和死亡率远较

其他 HPV 相关恶性肿瘤高。如今, 宫颈癌患者最佳治疗手段的选择依然面临很大的挑战。中医药, 包括民族医药, 是祖国医学用来防治疾病的有力武

器,与化学药品相比,中药除了有着来源广泛、价格低廉和毒副作用低等优点外,更重要的是,在减轻癌症患者临床症状,提高生存质量,防止复发转移,延长生存期,提高免疫力,增强放、化疗敏感性,减轻放、化疗不良反应,逆转耐药性^[18]等很多方面都具有优势。近年来中药及其有效部位或成分抗癌研究工作取得了一系列的成果,已成为肿瘤医学的研究热点之一^[19]。

据报道,EPV具有抗病毒和抗肿瘤的作用,本研究选择不同分型的人宫颈癌细胞为研究对象,检测EPV对HPV阳性或阴性宫颈癌细胞的作用,旨在探索夏枯草在宫颈癌治疗中的潜力。本研究选取的3株人宫颈癌细胞系,分别是SiHa细胞(HPV-16阳性)、HeLa细胞(HPV-18阳性)和C-33-A细胞(HPV阴性),也是最典型的宫颈癌细胞。通过MTT实验,本研究发现EPV可以显著降低HPV阳性的SiHa、HeLa细胞活力,而对HPV阴性的C-33-A无显著影响。表明EPV对不同类型宫颈癌细胞的不同作用有HPV特异性。本研究结果也为临床上不同分型宫颈癌患者给予不同治疗提供了细胞水平的依据。

细胞凋亡是多细胞机体维持内环境稳定的重要自我调节机制,诱导细胞凋亡已成为肿瘤治疗的热点,亦成为评估抗癌药物作用能力的重要指标^[20-21]。本研究发现,EPV在20~80 μg/mL均能抑制人HPV阳性的宫颈癌细胞的增殖,且呈现明显的剂量依赖效应:EPV处理HPV阳性的宫颈癌细胞24 h后可诱导凋亡,且随着药物浓度的升高细胞凋亡率增加。

此外,本研究发现,经EPV处理后,宫颈癌细胞抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调,促凋亡蛋白Bax表达上调。Bcl-2蛋白家族是一个特别的家族,Bcl-2是一种内膜蛋白,在多种肿瘤细胞中表达,具有抗凋亡作用;Bax可直接激活死亡效应因子caspase 3、9,具有促进细胞凋亡的作用。细胞Bcl-2和Bax比例改变可调节细胞凋亡,当Bcl-2占优势时,细胞具有抗凋亡作用;相反,当Bax过表达时,细胞易发生凋亡^[22-23]。由于EPV具有广泛的生物学作用,对肿瘤细胞的作用可能并非针对单一靶点,因此对EPV诱导宫颈癌细胞凋亡机制的进一步研究以及阻滞细胞传导通路、信使的相关研究,将对其临床应用具有良好的指导意义。

综上所述,EPV可以特异性地诱导HPV阳性宫颈癌细胞凋亡。本研究为特异性临床治疗HPV

阳性宫颈癌患者提供了一定的参考,也为更合理使用夏枯草及其制剂提供了新的依据。

参考文献

- [1] Cheung H Y, Zhang Q F. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1213(1): 231-238.
- [2] Ryu S Y, Oak M H, Yoon S K, et al. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris* [J]. *Planta Med*, 2000, 66(4): 358-360.
- [3] 柏玉冰,李春,周亚敏,等.夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究[J].*中草药*, 2015, 46(24): 3623-3629.
- [4] Sahin S, Demir C, Malyer H. Determination of phenolic compounds in *Prunella* L. by liquid chromatography-diode array detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(5): 1227-1230.
- [5] Haarberg K M, Wymore Brand M J, Overstreet A M, et al. Orally administered extract from *Prunella vulgaris* attenuates spontaneous colitis in *mdr1a(-/-)* mice [J]. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2015, 6(4): 223-237.
- [6] Tan J, Qi H, Ni J. Extracts of endophytic fungus xkc-s03 from *Prunella vulgaris* L. spica inhibit gastric cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(2): 945-949.
- [7] Li C, Huang Q, Fu X, et al. Characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 75(2): 298-305.
- [8] Paul KT. "Saving lives": Adapting and adopting Human Papilloma Virus (HPV) vaccination in Austria [J]. *Soc Sci Med*, 2016, 153(1): 193-200.
- [9] Liu Y Z, Wang T T, Zhang Y Z. A modified method for the culture of naturally HPV-infected high-grade cervical intraepithelial neoplasia keratinocytes from human neoplastic cervical biopsies [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2): 1457-1462.
- [10] Motevaseli E, Azam R, Akrami S M, et al. The effect of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus rhamnosus* culture supernatants on expression of autophagy genes and HPV E6 and E7 oncogenes in the HeLa cell line [J]. *Cell J*, 2016, 17(4): 601-607.
- [11] Leeds I L, Fang S H. Anal cancer and intraepithelial neoplasia screening: A review [J]. *World J Gastrointest Surg*, 2016, 8(1): 41-51.
- [12] Nikolakis G, Karagiannidis I, Zampeli V A, et al. Multiple

- HPV-induced squamous cell carcinomas on the fingers of a patient with systemic lupus erythematosus: a case and review [J]. *Case Rep Dermatol*, 2015, 7(3): 329-334.
- [13] Yin D, Jiang Y, Wang N, *et al.* The diagnostic value of serum hybrid capture 2 (CH2) HPV DNA in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(9): 9247-9253.
- [14] Lu Q B, Zhang Q R, Ou N, *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* studies of non-platinum-based halogenated compounds as potent antitumor agents for natural targeted chemotherapy of cancers [J]. *E Bio Med*. 2015, 2(6): 544-553.
- [15] Vogel C L, Johnston M A, Capers C, *et al.* Toremifene for breast cancer: a review of 20 years of data [J]. *Clin Breast Cancer*, 2014, 14(1): 1-9.
- [16] Ye L, Jia Y, Ji KE, *et al.* Traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cancer and cancer metastasis [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3): 1240-1250.
- [17] Jiang B, Liang Y, Sun X, *et al.* Potent inhibitory effect of chinese dietary spices on fatty acid synthase [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2015, 70(3): 257-262.
- [18] 张莹, 王蕾. 中药逆转肺癌多药耐药的研究新进展 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(6): 686-689.
- [19] Yang J, Li J, Sun M, *et al.* Studies of traditional Chinese medicine monomer on HeLa cell of cervical cancer [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(4 Suppl): 1063-1068.
- [20] Wang Y, Nie F, Ouyang J, *et al.* Inhibitory effects of sea buckthorn procyanidins on fatty acid synthase and MDA-MB-231 cells [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(10): 9563-9569.
- [21] Li P, Tian W, Wang X, *et al.* Inhibitory effect of desoxyrhaponticin and rhaponticin, two natural stilbene glycosides from the Tibetan nutritional food *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf., on fatty acid synthase and human breast cancer cells [J]. *Food Funct*, 2014, 5(2): 251-256.
- [22] Juneja S, Chaitanya N B, Agarwal M. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma [J]. *Indian J Cancer*, 2015, 52(4): 505-510.
- [23] Aboalhaja N H, Zihlif M A, Taha M O. Discovery of new selective cytotoxic agents against Bcl-2 expressing cancer cells using ligand-based modeling [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 250(1): 12-26.