

番荔枝内酯体外抑制人胃癌细胞活性研究

叶健斌, 温俊杰, 林彦青, 吴丹琳, 胡冰心, 罗美群, 宁立军, 宁云山*, 李妍*

南方医科大学检验与生物技术学院生物治疗研究所, 广东 广州 510515

摘要: 目的 探究番荔枝内酯对人胃癌细胞体外活性的影响。方法 分别采用 MTT 实验、黏附实验和划痕实验考察番荔枝内酯对 4 种人胃癌细胞 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901 生长活性、黏附能力和迁移能力的影响。结果 番荔枝内酯抑制人胃癌细胞 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901 的生长并呈剂量依赖性, 其 IC_{50} 值分别为 5.32、6.25、5.46、4.43 $\mu\text{g/mL}$; 抑制人胃癌细胞黏附能力并呈剂量依赖性; 抑制人胃癌细胞的迁移能力并呈剂量依赖性。结论 番荔枝内酯体外可以有效抑制人胃癌细胞的活性, 有望被开发成治疗胃癌的候选药物。

关键词: 番荔枝内酯; 人胃癌细胞; 生长; 黏附; 迁移; AGS 细胞; MKN45 细胞; BGC823 细胞; SGC7901 细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)14-2895-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.015

Inhibition of annonaceous acetogenins on cell activities of human gastric cancer cells *in vitro*

YE Jian-bin, WEN Jun-jie, LIN Yan-qing, WU Dan-lin, HU Bing-xin, LUO Mei-qun, NING Li-jun, NING Yun-shan, LI Yan

Biotherapy Institute, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the effect of annonaceous acetogenins (ACGs) on human gastric cancer cells *in vitro*. **Methods** After ACGs were administered to gastric cancer cells *in vitro*, the cell viability, cell adhesion ability and cell migration ability were assessed by MTT assay, adhesion assay and wound-healing assay, respectively. **Results** ACGs inhibited the cell viability, adhesion ability and migration ability in a dose-dependent manner in gastric cancer cells. **Conclusion** ACGs could inhibit cell activities of human gastric cancer cells *in vitro*, and will be developed as a promising anticancer candidate and used in gastric cancer.

Key words: annonaceous acetogenins; human gastric cancer cells; viability; adhesion; migration; AGS cells; MKN45 cell; BGC823 cells; SGC7901 cells

胃癌起源于胃黏膜上皮, 约 60% 的病例是由幽门螺旋杆菌感染而引起, 其他病因包括食用腌制食品和吸烟等。胃癌发病率在全球癌症的发病率中位居第 5, 死亡率位居第 3, 约占全球癌症 7% 的病例数和 9% 的死亡数, 其发病在发展中国家更为常见^[1]。经世界卫生组织统计, 2012 年胃癌的发病人数达 95 万人, 同年因胃癌死亡的人数达 72.3 万人, 在全球癌症致死数排名第 3^[2]。在中国, 2011 年胃癌在城市和农村的死亡率分别为 19.66/10 万人和 22.09/10 万人, 均居中国恶性肿瘤死因顺位第 3 位^[3]。由此可见,

胃癌的情况依然不容乐观, 而这很大程度上是由于胃癌在早期诊断中并无明显的特异症状, 确诊状态下经常已是晚期甚至出现转移^[4]。目前胃癌的主要治疗方法包括手术切除、化疗和放疗, 但这些传统治疗方式效果并不理想^[5-6]。因此, 开发探索新的治疗方法如对现有疗法的改进、新药研发或是生物疗法已成为人们的共识。

1971 年人们从红豆杉植物中提取得到抗癌药物紫杉醇后^[7], 人们开始更加关注天然抗癌化合物。1982 年, Jolad 等^[8]在美洲植物 *Uvaria accuminata*

收稿日期: 2016-11-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81470831); 国家自然科学基金-广东省联合基金重点项目(U1401223); 国家高技术研究发展技术(“863”计划)(2014AA020909); 广东省科技计划创新载体建设项目(2013B090800036); 广东省科技计划项目(2015A040404021, 2016B090919019); 广东省大学生创新项目(201512121122, 201612121100, 201612121243, 201612121034, 201612121246); 深圳市科技计划项目基础研究项目(JCYJ20160429102107498); 深圳市卫生计生系统科研项目(201606028)

作者简介: 叶健斌(1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤免疫学。Tel: (020)62789135 E-mail: janusfaces@163.com

***通信作者** 李妍(1971—), 女, 教授, 研究方向为肿瘤免疫学。Tel: (020)62789135 E-mail: liyan_nys@hotmail.com

宁云山(1968—), 男, 教授, 研究方向为肿瘤免疫学。Tel: (020)62789135 E-mail: nys@fimmu.com

(番荔枝科)的根部提取物中分离得到天然化合物双四氢呋喃脂肪酸内酯(uvaricin),发现其对小鼠白血病细胞有强烈杀伤作用。后来科学家发现它还具有强大细胞毒性、T 细胞抑制活性、抗肿瘤、驱虫、抗寄生虫、杀菌等药理活性,由此掀起了植物化学家在各种番荔枝科植物中分离这类化合物的热潮以及科学家对番荔枝内酯类化合物(annonaceous acetogenins, ACGs)的药理活性进行了深层次、宽范围和多角度的研究,被科学家们预测为继紫杉醇之后天然化合物中的“明日抗癌之星”。天然番荔枝内酯中活性最强的有 4 个,分别是泡番荔枝辛(bullatacin)、番荔枝辛(asimicin)、三叶辛(trilobacin)和三叶素(trilobin),由于其种类太多导致还无法有效单独分离其中的任一种成分,目前主要是以 ACGs 来进行研究。在过去 20 多年,有更多的证据证明 ACGs 在不同的肿瘤中都有抗癌作用^[9]。ACGs 中 AA005 能够导致大肠癌细胞生长抑制并诱导细胞凋亡,还可以导致结肠癌细胞的自噬^[10]。同样,ACGs 中 desacetylavaricin 可以抑制结直肠癌细胞系 SW480 的增长^[11]。在异种移植小鼠实验中,ACGs 模拟药 thiophene-3-carboxamide 可以强烈抑制人肺癌细胞株 NCI-H23 的生长^[12]。在番荔枝属刺果番荔枝 *Annona muricata* Linn. (Graviola) 叶子中提取的黄酮类化合物对前列腺癌具有保护作用^[13]。从刺果番荔枝果实中提取的 3 种新的 ACGs 对人前列腺癌 PC-3 细胞具有抑制增殖作用^[14],其在 HeLa 细胞中具有相同的作用^[15]。作为颇具前景的抗癌药物,番荔枝内酯在胃癌中的研究报道的相对较少。故本研究考察番荔枝内酯体外对人胃癌细胞活性的影响,以期从天然产物中发现抗胃癌新药提供参考。

1 材料

1.1 药物与试剂

番荔枝内酯(混合物,主要成分为泡番荔枝辛,质量分数为 40%),由北京协和医学院中国医学科学院药用植物研究所王向涛教授提供,使用前用二甲基亚砜(DMSO)溶解,起始质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。使用时用培养基倍比稀释至所需实验质量浓度:0.312 5、0.625 0、1.250 0、2.500 0、5.000 0、10.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。DMEM 培养基、胰蛋白酶(广州泰勒生物科技有限公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma 公司);DMSO (Amresco 公司)。

1.2 细胞株

人胃癌细胞株 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901,由南方医科大学病理生理学实验室提供。

1.3 主要仪器

超净工作台(苏州净化设备公司);培养板、培养皿及细胞培养瓶(美国 Corning/costar 公司);Epoch 超微量微孔板分光光度计(美国 Biotek 公司);DMIL 倒置显微镜(德国 Leica 公司);BDCalibur 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司);XH-B 漩涡混合器(江苏康健医疗用品);ZHWY-200B 恒温振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(湖南湘义离心机仪器有限公司)。

2 方法

2.1 人胃癌细胞培养

将细胞培养于含 10%新生牛血清的 DMEM 高糖培养液中,待细胞长至 80%~90%融合时用 0.25%胰酶消化传代。

2.2 MTT 法检测番荔枝内酯对人胃癌细胞增殖能力的影响

分别取处于对数生长期的 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901 细胞,加入适量 0.25%胰酶消化,用含 10%新生牛血清的 DMEM 高糖培养液配成细胞悬液,用血球细胞板计数,以 DMEM 高糖完全培养基稀释细胞悬液,并以相同数量(7×10^3 个)细胞接种于 96 孔培养板中,于 12 h 细胞完全贴壁后分组,实验组分别加入含不同质量浓度番荔枝内酯的 DMEM 培养液 100 μL ,对照组加等量 DMEM 培养液,培养 24 h 后,去除培养基,于每孔中加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL 和无血清培养基(200 μL)的混合液在培养箱孵育 2 h 后,弃上清,各孔加入 200 μL DMSO 并吹打混匀。于酶联免疫检测仪 490 nm 波长处,测定各孔吸光度(A)值。同时设不加细胞只加培养液的空白孔。计算细胞的增殖抑制率。根据改良寇氏法计算半数抑制浓度(IC_{50})。

增殖抑制率 = $1 - (\text{实验组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值}) / (\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值})$

2.3 细胞黏附实验检测番荔枝内酯对人胃癌细胞黏附能力的影响^[16]

分别取对数生长期的 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901 细胞,以 0.25%胰蛋白酶消化吹打制成单细胞悬液,将 5×10^4 个/ mL 细胞接种于直径 60 mm 的培养皿中,待细胞贴壁后分组,番荔枝内酯

设 4 个质量浓度 0、0.25、0.50、1.00 $\mu\text{g/mL}$ ，每个培养皿终体积为 2 mL，在培养箱中培养 36 h。36 h 后消化细胞，用血球细胞板计数，并以 DMEM 高糖完全培养基稀释细胞悬液，并以相同数量 (7×10^3) 细胞接种于 96 孔培养板中，30 min 后吸出培养基并用 PBS 缓慢吹打一遍并吸走，于每孔中加入 MTT 溶液 (20 μL ，5 mg/mL) 和无血清培养基 (200 μL) 的混合液在培养箱孵育 2 h 后 (期间使用荧光显微镜进行拍照记录) 各孔加入 200 μL DMSO 并吹打混匀。于酶联免疫检测仪 490 nm 波长处，测定各孔 A 值。通过 A 值间接反映细胞黏附能力的变化。

2.4 细胞划痕实验检测番荔枝内酯对人胃癌细胞细胞迁移能力的影响^[16]

分别取对数生长期的 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901 细胞，以 0.25% 胰蛋白酶消化吹打制成单细胞悬液，将 5×10^4 个/mL 细胞接种于直径 60 mm 的培养皿中，待细胞均匀分布并长至 90% 汇合度后，使用 200 μL 枪头垂直于培养板均匀划痕并分组，分

组及给药同“2.3”项，每个培养皿终体积为 2 mL。在培养箱中培养 36 h。期间使用荧光显微镜对 36 h 这个时间点进行观察并拍照记录，同时要确保每次的比例尺一样。迁移距离为 0 h 和 36 h 的划痕间距的差值，划痕距离通过多次测量取平均值获取。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。成组设计多个样本均数比较采用方差分析，多个样本均数间两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 番荔枝内酯作用人胃癌细胞的 IC_{50} 值

MTT 法检测结果表明不同质量浓度 (0.312 5~10.000 0 $\mu\text{g/mL}$) 番荔枝内酯给药 24 h 后，对 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901 细胞的生长呈明显抑制作用，其 IC_{50} 值依次分别为 5.32、6.25、5.46、4.43 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明，细胞增殖抑制率与药物质量浓度密切相关，药物质量浓度越高，细胞增殖抑制率越高，见图 1。

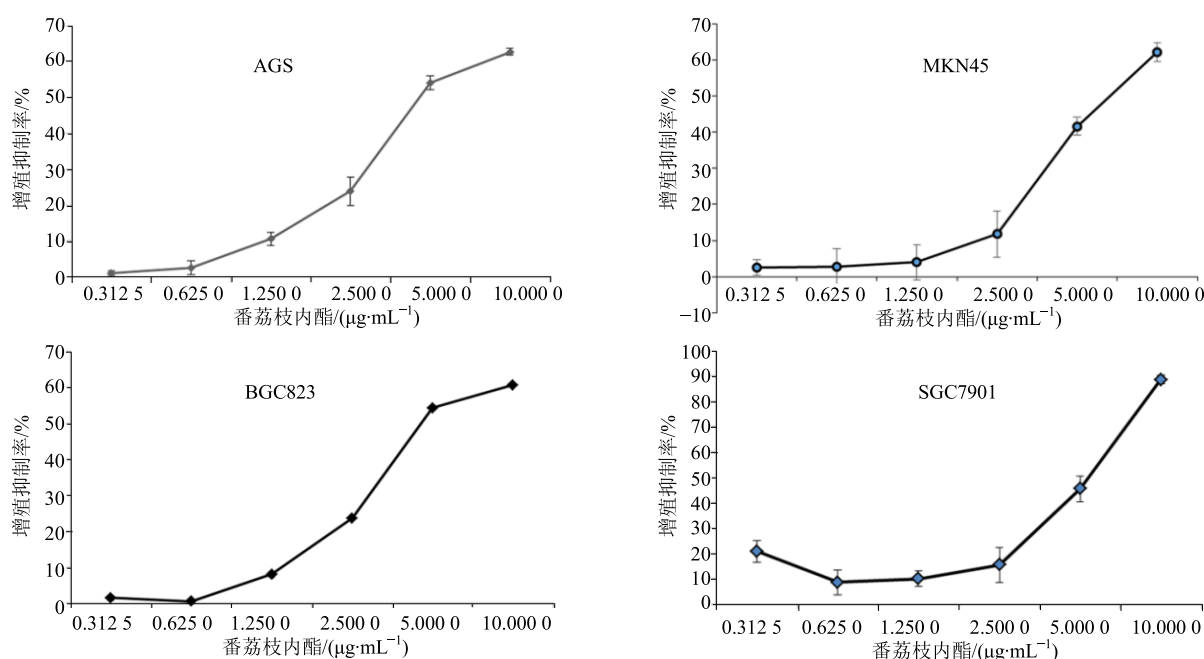


图 1 番荔枝内酯对 4 种人胃癌细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Inhibition of ACGs on four kinds of human gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.2 番荔枝内酯抑制胃癌细胞增殖的量效关系

根据番荔枝内酯作用于 4 种胃癌细胞的 IC_{50} 值，经预试验对比发现药物作用 36 h 后效果最为明显及合理。故分别用 0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的番荔枝内酯作用于 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901 胃癌细胞 36 h 后，MTT 法检测结果显

示随着番荔枝内酯质量浓度的升高，对细胞的增殖抑制率也升高，两者之间呈明显的量效关系。见图 2。

3.3 对人胃癌细胞黏附的影响

在不导致细胞死亡的前提下，分别使用 0、0.25、0.50 和 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的番荔枝内酯作用于 AGS、

MKN45、BGC823 和 SGC7901 细胞 36 h 后, 观察其对细胞黏附的影响。结果显示, 随着药物质量浓度的上升, 4 株细胞的黏附能力逐渐下降, 在一定时间内黏附的细胞逐渐减少, 见图 3。

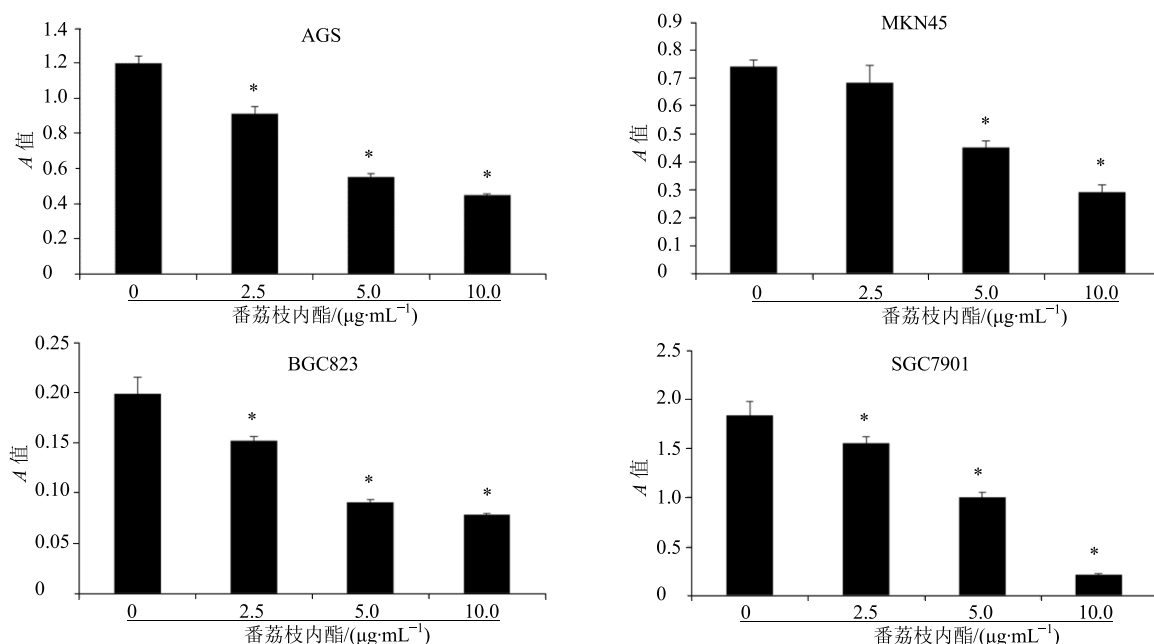
3.4 对人胃癌细胞迁移的影响

在不导致细胞死亡的前提下, 分别使用 0、0.25、0.50、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 番荔枝内酯作用于已划痕的 AGS、MKN45、BGC823 和 SGC7901 细胞 36 h。结果显示, 随着药物质量浓度的上升, 4 株胃癌细胞的迁

移能力逐步下降, 结果见图 4 和图 5。

4 讨论

目前, 胃癌的主要治疗方式包括手术治疗、化疗和放疗, 而手术治疗依然是目前为止唯一的治愈方式^[5-6,17]。胃癌的预后状况不容乐观, 原因之一是胃癌发现时通常已经处于转移阶段, 另外一点就是多数病人在发病时年纪已经相当大了(70~75岁)。据报道胃癌的 5 年生存率少于 10%^[17]。对此, 新疗法的发掘无疑具有重要意义。目前较为热门的是针



与番荔枝内酯 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较: * $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs ACGs 0 $\mu\text{g/mL}$, same as below

图2 番荔枝内酯抑制胃癌细胞增殖的量效关系 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Dose-effect relationship of inhibition of ACGs to four gastric cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n=5$)

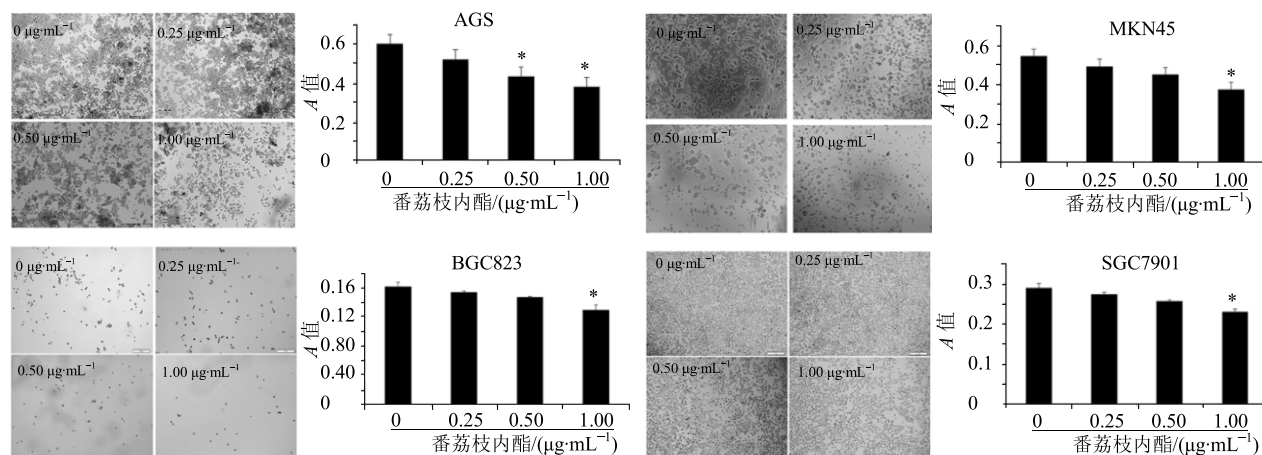


图3 光镜下4株胃癌细胞黏附能力变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Changes of adhesion ability of four gastric cell lines ($\bar{x} \pm s, n=5$)

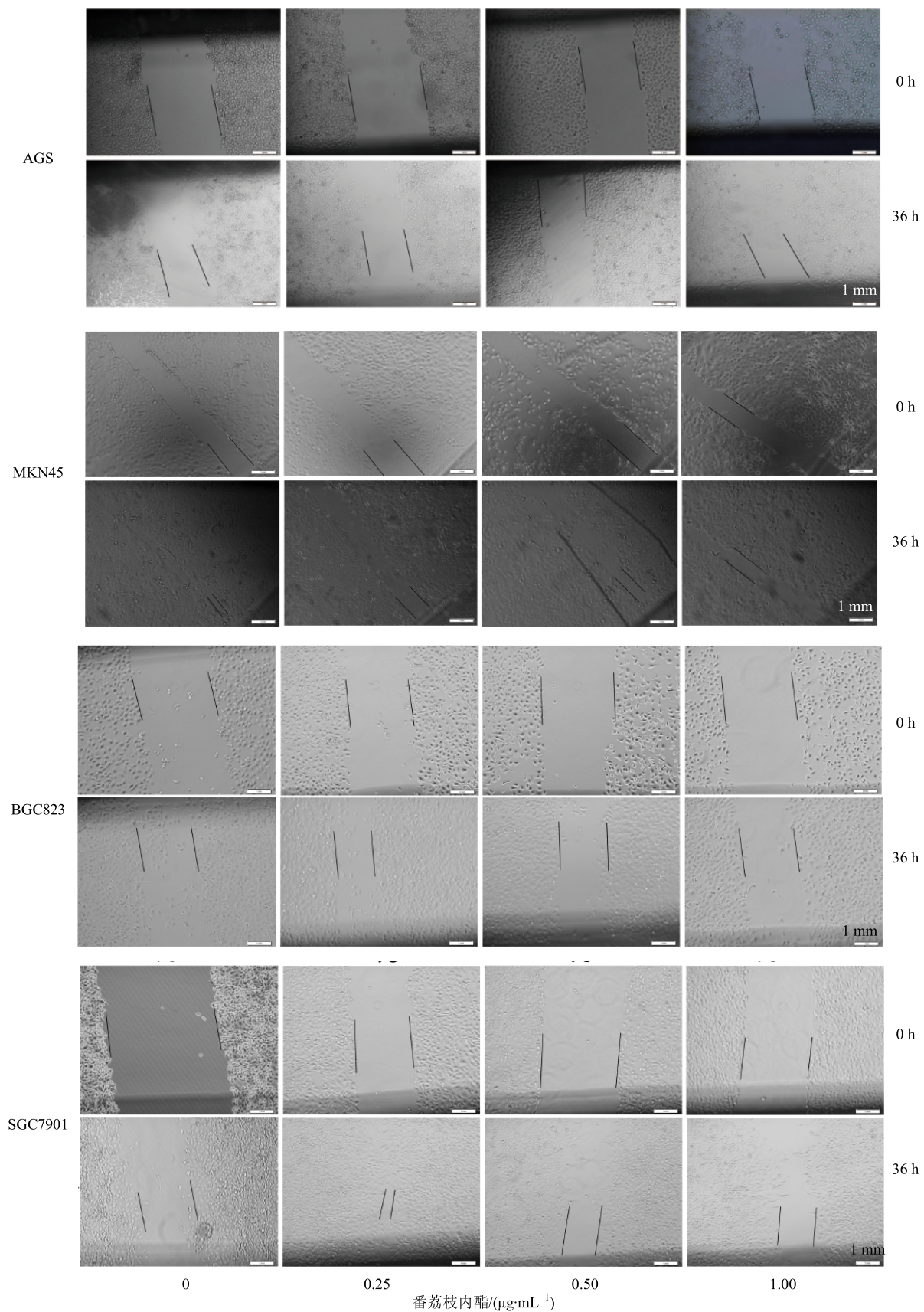
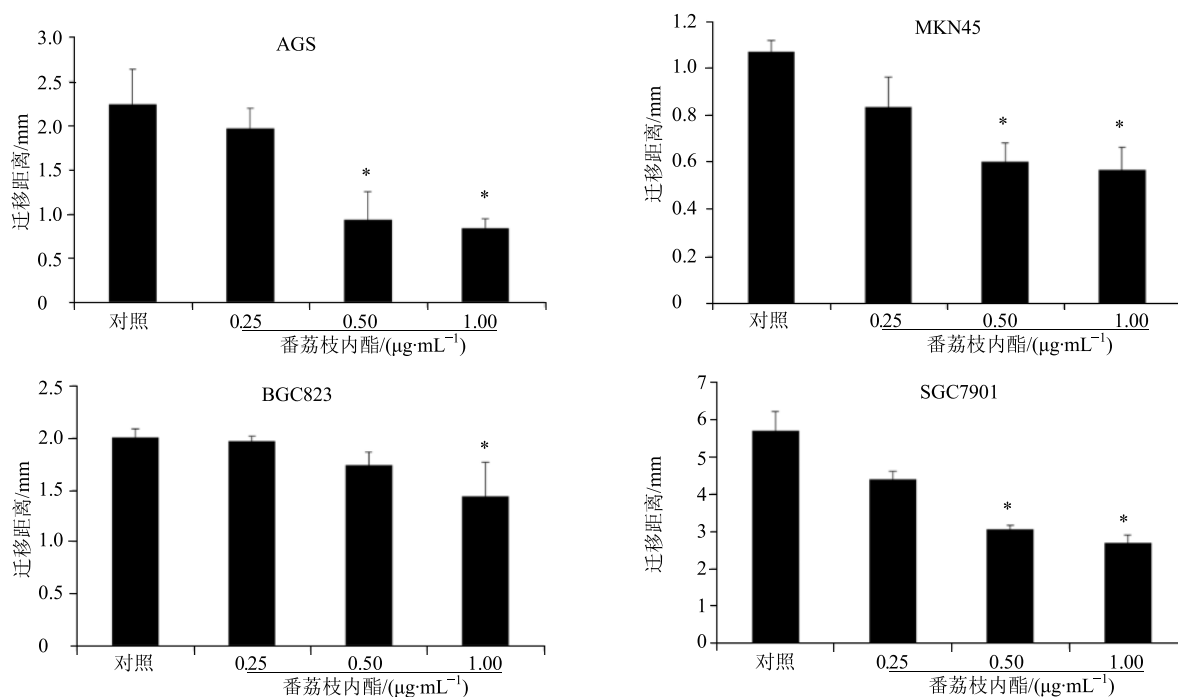


图 4 光镜下 AGS、MKN45、BGC823、SGC7901 细胞的迁移

Fig. 4 Changes of migration ability of AGS cell lines

图 5 番荔枝内酯对 4 种人胃癌细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 5 Effect of ACGs on migration ability of gastric cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

对人表皮生长因子受体 2 的抑制剂,即曲妥单抗(也称赫赛汀)^[18-19]。虽然其特异性强,但价格方面对于大多数胃癌患者无疑又是一大难题。因此,广谱、有效、价格低廉是抗癌药物的又一发展方向,而中药亦或者是植物提取物则满足这一要求。过往比较经典的抗癌天然产物有紫杉醇、喜树碱和长春新碱等^[7,20]。而近年来备受关注的是番荔枝内酯类化合物,其在各种癌症的作用已被许多学者所研究^[21-22],而在胃癌中的作用报道却寥寥无几。Huang 等^[23]指出与番荔枝内酯结构相似的合成化合物 AA005 作用于人胃癌细胞 AGS 后造成细胞死亡,且该死亡以坏死为主。其作用方式是通过抑制辅酶 Q 氧化还原酶来限制细胞呼吸作用和 ATP 合成。

为了进一步研究番荔枝内酯对胃癌的作用,本实验主要针对番荔枝内酯对多株人胃癌细胞的生长特性的影响进行研究,包括人胃癌细胞的生长能力、黏附能力和迁移能力。在细胞增殖方面,番荔枝内酯显著性地抑制了人胃癌细胞的生长,抑制作用呈剂量依赖性和时间依赖性;在细胞黏附能力方面,番荔枝内酯降低了人胃癌细胞的黏附能力并呈剂量依赖性;而在细胞迁移能力方面,番荔枝内酯降低了人胃癌细胞的迁移能力并呈剂量依赖性。综上所述,番荔枝内酯对人胃癌细胞的各方面生长特

性呈抑制效果。

除此之外,对于番荔枝内酯对胃癌细胞的影响的另外一个关键点是机制研究。事实上,番荔枝内酯在癌细胞中的作用机制已有一定研究:(1)通过凋亡途径促使细胞死亡,包括 Caspase-9 非依赖性的途径^[10];(2)通过激活 AMPK 诱导细胞生长抑制和细胞自噬^[24];(3)通过诱导超氧化物的过表达导致细胞周期停滞于 S 期^[11];(4)通过完整线粒体途径导致细胞凋亡^[25]。其他的作用方式很多,但番荔枝内酯在胃癌中的作用机制则有待深入研究。

本实验集中研究了番荔枝内酯对不同人胃癌细胞各种生长特性的影响,并发现番荔枝内酯对人胃癌细胞的体外活性包括生长能力、黏附能力和迁移能力有抑制作用。本研究初步阐明番荔枝内酯对胃癌细胞的抑制作用,但具体机制体内抗胃癌效果值得进一步探讨。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics [J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013,

- 380(9859): 2095-2128.
- [3] 邹文斌, 李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展 [J]. 中国实用内科杂志, 2014, 34(4): 408-415.
- [4] Wadhwa R, Taketa R T, Sudo K, *et al.* Modern oncological approaches to gastric adenocarcinoma [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2013, 42(2): 359-369.
- [5] Pretz J L, Wo J Y, Mamon H J, *et al.* Chemoradiation therapy: Localized esophageal, gastric, and pancreatic cancer [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2013, 22(3): 511-524.
- [6] Chen K, Xu X W, Zhang R C, *et al.* Systematic review and meta-analysis of laparoscopy-assisted and open total gastrectomy for gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(32): 5365-5376.
- [7] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, *et al.* Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [8] Jolad S D, Hoffmann J J, Schram K H, *et al.* A new diterpene from *Cupressus goveniana* var. *abramasiana*: 5 beta-hydroxy-6-oxasugiol (cupresol) [J]. *J Nat Prod*, 1984, 47(6): 983-987.
- [9] Kojima N, Tanaka T. Medicinal chemistry of Annonaceous acetogenins: design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues [J]. *Molecules*, 2009, 14(9): 3621-3661.
- [10] Han B, Wang T D, Shen S M, *et al.* Annonaceous acetogenin mimic AA005 induces cancer cell death via apoptosis inducing factor through a caspase-3-independent mechanism [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 139.
- [11] Xue J Y, Zhou G X, Chen T, *et al.* Desacetylurvaricin induces S phase arrest in SW480 colorectal cancer cells through superoxide overproduction [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(3): 464-475.
- [12] Kojima N, Fushimi T, Tatsukawa T, *et al.* Thiophene-3-carboxamide analogue of annonaceous acetogenins as antitumor drug lead [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 86: 684-689.
- [13] Yang, C, Gundala S R, Mukkavilli R, *et al.* Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(6): 656-665.
- [14] Sun S, Liu J, Kadouh H, *et al.* Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(12): 2773-2776.
- [15] Paul J R, Gnanam R, Jayadeepa M, *et al.* Anti cancer activity on Graviola, an exciting medicinal plant extract vs various cancer cell lines and a detailed computational study on its potent anti-cancerous leads [J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(14): 1666-1673.
- [16] Zhang S, Yang Y, Liang Z X, *et al.* Silybin-mediated inhibition of Notch signaling exerts antitumor activity in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83699.
- [17] Orditura M, Galizia G, Sforza V, *et al.* Treatment of gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(7): 1635-1649.
- [18] Fusco N E, Rocco G, Conte C D, *et al.* HER2 in gastric cancer: A digital image analysis in pre-neoplastic, primary and metastatic lesions [J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(6): 816-824.
- [19] Meza-Junco J, Au H J, Sawyer M B, *et al.* Critical appraisal of trastuzumab in treatment of advanced stomach cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2011, 3: 57-64.
- [20] Fisher W S. Vinblastine or vincristine [J]. *New Engl J Med*, 1976, 295(12): 677.
- [21] 袁 斐, 白钢钢, 苗筠杰, 等. 番荔枝内酯类化合物对耐阿霉素乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 体外活性的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2815-2819.
- [22] 苗筠杰, 徐晓芳, 陈 勇, 等. 单四氢呋喃型番荔枝内酯类化合物对大鼠线粒体复合酶 I 活性的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3368-3371.
- [23] Huang G R, Jiang S, Wu Y L, *et al.* Induction of cell death of gastric cancer cells by a modified compound of the annonaceous acetogenin family [J]. *Chembiochem*, 2003, 4(11): 1216-1221.
- [24] Liu Y Q, Cheng X, Guo L X, *et al.* Identification of an annonaceous acetogenin mimetic, AA005, as an AMPK activator and autophagy inducer in colon cancer cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47049.
- [25] de Pedro N, Cautain B, Melguizo A, *et al.* Mitochondrial complex I inhibitors, acetogenins, induce HepG2 cell death through the induction of the complete apoptotic mitochondrial pathway [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2013, 45(1/2): 153-164.