

MKI67-siRNA 可抑制 QGY-7703 细胞的生长

侯艳艳, 刘涛, 李欣, 刘民, 汤华*

(天津医科大学基础医学院, 天津市生命科学中心实验室, 天津 300070)

摘要 为了探讨 *MKI67* 在肝癌细胞发生发展中的作用, 采用实时定量 PCR 方法检测人肝细胞癌 QGY-7703 细胞中 *MKI67* 基因表达水平, 以及 *MKI67* 在肝细胞癌组织和癌旁正常组织中的表达情况, 设计并合成针对 *MKI67* 的 siRNA, 利用脂质体转染法将其转入 QGY-7703 细胞内, 通过 MTT 和细胞集落形成实验观察 *MKI67*-siRNA 对 QGY-7703 细胞生长活性和增殖能力的影响。实时定量 PCR 结果表明, *MKI67* 在肝细胞癌组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织 ($P < 0.01$)。MTT 和细胞集落形成实验结果显示, 转染 *MKI67*-siRNA 的 QGY-7703 细胞生长活性和集落形成率明显低于对照组 ($P < 0.01$)。由此得出结论: *MKI67* 在肝癌细胞系 QGY-7703 细胞中的表达水平较高, 且它在肝癌组织中的表达水平明显上调。同时, *MKI67*-siRNA 可以有效抑制 QGY-7703 细胞的生长活性和增殖能力, 提示 *MKI67* 可能与肝细胞癌的发生、发展相关。

关键词 肝细胞癌; *MKI67*; 增殖; RNA 干扰; 小干扰 RNA

中图分类号 Q786; R735.7

MKI67-siRNA Suppresses QGY-7703 Cell Growth

HOU Yan-Yan, LIU Tao, LI Xin, LIU Min, TANG Hua*

(Tianjin Life Science Research Center and Basic Medical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract To explore the expression of *MKI67* in human hepatocellular carcinoma (HCC), real-time-PCR (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression level of *MKI67* in human HCC tissues, the adjacent normal tissues, and human HCC cell line QGY-7703. The chemical synthesized *MKI67*-siRNA, which was designed to target *MKI67*, was transfected into QGY-7703 cells. MTT and colony formation assays were used to detect the cell growth activity and proliferation capacity of QGY-7703 cells. The result showed that the expression level of *MKI67* mRNA in HCC tissues was higher than that in adjacent normal tissues ($P < 0.01$). MTT and colony formation analyses demonstrated that the cell growth activity and clone formation ratio of *MKI67*-siRNA transfected QGY-7703 cells were markedly decreased ($P < 0.01$). In conclusion, the *MKI67*, which was up-regulated in HCC tissues and QGY-7703 cells, promote the cell activity and proliferation ability of QGY-7703 cells. In other word, *MKI67* may be related to the pathogenesis of HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; *MKI67*; proliferation; RNA interference; siRNA

肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发生是多因素、多基因参与的复杂生物学过程。MKI67 是一种增殖细胞相关的核抗原, 其功能与有丝分裂密切相关, 在细胞增殖中必不可少, 但其确切机制尚不清楚。近年研究发现, *MKI67* 是细胞增殖相关的核蛋白基因, 广泛表达于增殖期细胞而不表达于静止期细胞^[1], 是评价细胞增殖状态的指标之一^[2], 是应用最广泛的增殖细胞标志之一。MKI67 基因位于人类基因染色体 10q26, 是 359 kD 的核蛋白, 来自于小鼠的霍奇金淋巴瘤细胞系 L428 的细胞核, 命名

收稿日期: 2010-11-22; 接受日期: 2011-01-25

国家自然科学基金重点项目 (No: 30873017; No: 31071191) 和天津市自然科学基金重点科学项目 (No: 08JCZDJC23300; 09JCZDJC17500)

* 联系人 Tel: +86 22-23542603; E-mail: htang2002@yahoo.com

Received: November 22, 2010; Accepted: January 25, 2011

Supported by National Natural Science Foundation of China (No: 30873017; No: 31071191) and Natural Science Foundation of Tianjin (No: 08JCZDJC23300; 09JCZDJC17500)

* Corresponding author Tel: 022-23542503;

E-mail: htang2002@yahoo.com

取自德国地名 Kiel 和发现有意义的单克隆在 96 孔板的位置. *MKI67* 基因的表达仅存在于细胞核内, 尤其在有丝分裂期, 其与许多蛋白共定位于染色体的表面^[1]. 目前临床研究证实, *MKI67* 阳性肿瘤细胞的分值(*MKI67* 的标记指数)增高与多种恶性肿瘤的进展和预后相关^[3]. *MKI67* 蛋白可作为增生细胞的标志并与预后相关, 有可能成为判断非小细胞肺癌预后走向有价值的分子标志, 对判断其恶性程度及临床治疗提供了一个重要指标^[4]. 已有大量实验证实, *MKI67* 对前列腺癌、脑肿瘤及乳腺癌的预后评价和癌症的复发有重要的参考价值^[5-6], 且 *MKI67* 在胃癌^[7], 卵巢癌^[8,9] 等肿瘤中表达水平增高, 并且与肿瘤患者的生存率关系密切^[10,11]. *MKI67* 可作为肿瘤基因治疗的新靶点^[12].

本研究采用实时定量 PCR 方法检测 *MKI67* 在肝细胞癌组织和癌旁正常组织中的差异表达, 并应用 RNA 干扰技术观察 *MKI67* 表达水平下降后对 QGY-7703 细胞生长活性和增殖能力的变化.

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 QGY-7703 来自本实验室的保存株. 收集天津肿瘤医院肝细胞癌手术标本 11 对, 即癌组织和癌旁组织各 11 例, 且均经病理组织学证实. 所有组织取材已获供者知情同意. 标本离体后立即置液氮中, -80°C 保存. RPMI1640 购自美国 GIBCO 公司; 胎牛血清购自中美合资兰州民海生物工程有限公司; 脂质体 Lipofectamine 2000、Opti-MEM 无血清培养基、RNA 抽提试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂购自美国 Promega 公司和日本 TaKaRa 公司.

1.2 细胞培养

QGY-7703 细胞用含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液培养于 37°C 、5% CO_2 孵箱中.

1.3 实时定量 PCR

TRIzol 试剂抽提对数生长期的 QGY-7703 细胞、肝癌组织和癌旁正常组织的总 RNA, 紫外分光光度仪定量. 取 5 μg 总 RNA 按说明书步骤逆转录为 cDNA, 再用不同引物进行 PCR 反应. PCR 引物序列设计如下: *MKI67*, 正义链: 5'-CGCGAATTCAGAGAGCTTT TCCAGACACCATG-3', *MKI67*, 反义链: 5'-CGAGCCTCGAGGAAGATTGTTGGGGTACCCAC-3', 扩增产物为 214 bp; 内参 β 肌动蛋白 (β -

Actin), 正义链: 5'-CGTGACATTAAG GAGAAGCTG-3', 反义链: 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3', 扩增产物为 500 bp. *MKI67*、 β -actin 扩增程序: 94°C 变性 4 min; 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min, 40 个循环.

1.4 siRNA 的设计及合成

使用 Ambion 公司的 siRNA 设计软件, 依据 *MKI67* 基因的 cDNA 序列 (NM_002417) 进行设计. 设计出的 *MKI67*-siRNA 的序列为: 正义链 5'-GATCCGCTGGTAGAAGAGAAT CTGTTTCAAGAGAA CAGATTCTCTTCTACCAGTTTTTTGAATTCTCGAGA-3', 反义链 5'-AGCTTCTCGAGAATTCAAAAAAGCTGG TAGAAGAGAATCTGTTCTCTTGAACAGATTCTCTT CTACCAGCG-3'. 作为为阴性对照的半乳糖苷酶基因的 siRNA (si-LacZ) 序列为: 正义链 5'-GATCCGACTACACAAATCAGCGATTTCAAGAGAAT CGCTGATTTGTGT AGTCTTTTTTGGAAA-3', 反义链 5'-AGCTTTTCCAAAAAAGACTACACAATCAG CGA TTCTCTTGAAATCGCTGATTTGTGTAGTCC-3'. 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司化学合成, 经 PAGE 胶纯化并退火形成双链. 将退火双链插入 pSilencer 2.1-U6 neo 载体的 *Bam* H I 和 *Hind* III 位点处, 转化 XL1-blue 感受态细胞, 氨苄青霉素抗性 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板筛选阳性克隆, 挑取阳性克隆进行扩增培养, 快速小量提取质粒后用 *Bam* H I 和 *Hind* III 将双链酶切进行初步鉴定, 插入 DNA 片段的阳性克隆菌可有 71 bp 的 DNA 片段切出, 并将阳性克隆菌进行测序鉴定.

1.5 细胞转染

将培养的 QGY-7703 细胞分 3 组: A 组转染空脂质体 (Lipofectamine only, 空白对照), B 组转染对照的 si-LacZ + 脂质体 (阴性对照), C 组转染针对 *MKI67* 的 HTKi67-SR + 脂质体 (实验组). 转染前 1 d, 将 QGY-7703 细胞接种于 100 mL 培养瓶中, 细胞汇合至 70% ~ 80% 时转染, 按照 Lipofectamine 2000 说明书的步骤分别转染空脂质体、阴性对照 si-LacZ、实验组 HTKi67-SR. 转染后 5 h, 补加 0.5 倍转染时体积的新鲜含 10% 胎牛血清的全培养基 (无抗), 转染 24 h 后更换新鲜含 10% 胎牛血清的全培养基.

1.6 MTT 实验

取对数生长期的 QGY-7703 细胞, 按 6×10^3 / 孔于 100 μL 培养液中接种于 96 孔板, 37°C 、5% CO_2 条件下培养过夜后, 按 Lipofectamine 2000 说明

书的步骤转染 A、B 两组,每组设 4 个复孔.转染后分别于 24 h、48 h 和 72 h 每孔加入 (5 mg/L) MTT 10 μ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下继续孵育 4 h.吸出上清液,每孔加二甲亚砜溶解剂 100 μ L,微量振荡器振荡约 10 min,镜下观察甲臞结晶全部溶解后,利用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A_{570} 值).

1.7 克隆形成实验

A、B 两组细胞转染 48 h 后,1 \times PBS 洗涤 1 次,用 0.1% 胰蛋白酶消化 2 组 QGY-7703 细胞,调整细胞密度至 1 $\times 10^3$ 个/mL.取上述各组 QGY-7703 细胞,以 120 个/孔的密度接种于 12 孔板中,每组设 3 个复孔,每 3 d 换液 1 次,用新鲜 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 全培养基.于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂,相对湿度为 90% 的条件下培养 10 d,甲醇固定 10 min,2 g/L 结晶紫染色 10 min,倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的集落.细胞集落形成率 = (集落数/120) $\times 100\%$.

1.8 Western 印迹检测

核蛋白的提取方法:转染 72 h 的细胞用 1 \times PBS 冲洗后,用胰蛋白酶消化细胞,再用 1 \times PBS 重悬,于室温 5 000 r/min,3 min.收集沉淀后用 0.4% NP-40 于 4 $^{\circ}$ C 进行通透化处理,再用 0.1% NP-40 冲洗,最后将收集的沉淀用 RIPA 液裂解,样品放置 -80 $^{\circ}$ C 保存.

SDS-PAGE (4 $^{\circ}$ C,恒流 350 mA,3.5 h)后将蛋白电转到硝酸纤维素膜 (NC) 上,将 NC 膜在含 50 g/L 脱脂奶粉的 1 \times TBST 中室温封闭 2 h 后,加抗目的蛋白的抗体 (1:200) 室温作用 2 h,1 \times TBST 洗去未结合一抗,再加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:2 000) 室温作用 1 h,1 \times TBST 洗去未结合二抗,加底物反应 1 min 后暗室曝光并观察结果.

1.9 统计学方法

统计软件 SPSS 12.0 进行数据处理,统计数据 ($\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Students' *t*-test. $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 pSilencer/si-MKI67 质粒的构建

将 PCR 产物克隆插入 pSilencer 2.1-U6 neo 载体的 *Bam* H I 和 *Hin* d III 位点处,构建的质粒 pSilencer/si-MKI67 用 *Bam* H I 和 *Hin* d III 双酶切产生约 70 bp 的片段,经测序比对证明质粒构建成功 (Fig. 1).

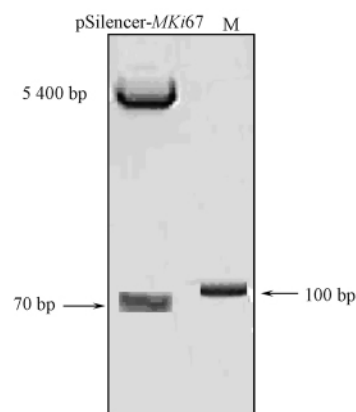


Fig. 1 Identification of MKI67-siRNA recombination

Recombinant plasmid pSilencer-MKI67 was digested by *Bam*HI and *Hin*dIII in 37 $^{\circ}$ C for 4 hours. The product was separated on 3% agarose gel electrophoresis. M: 100 bp DNA marker

2.2 MKI67 在 QGY-7703 细胞中的表达

将 siMKI67 质粒转染 QGY-7703 细胞,转染 72 h 后提取蛋白. Western 印迹结果显示, MKI67 敲除后在人肝癌细胞系 QGY-7703 中的表达水平有变化 (Fig. 2).

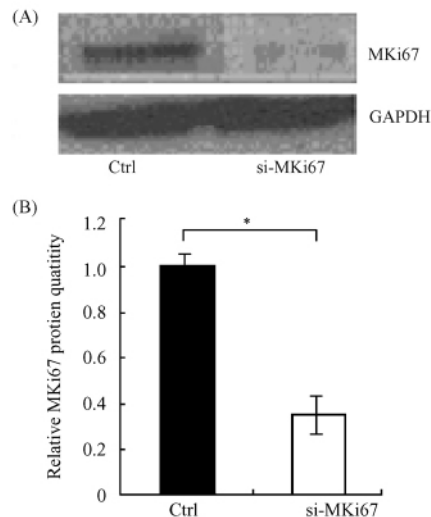


Fig. 2 Knockdown of MKI67 suppresses QGY-7703 cell growth

(A) After transfected forty-eight hours, the cells were harvested, and the nuclear protein was separated from the cytoplasmic protein using Nonidet P40 (NP-40) and RIPA. All proteins were resolved on a 6% SDS-PAGE. Western blotting assay was shown the expression level of pSilencer-MKI67 and pSilencer (Ctrl) proteins. (B) MKI67 protein expression level was significantly decreased (about 40% of the control group) in QGY-7703 cells transfected with pSilencer-MKI67

2.3 *MKI67* 在人肝癌和癌旁组织中的差异表达

实时定量 PCR 的结果显示,肝细胞癌组织和癌旁正常组织中, *MKI67* mRNA 水平的表达不同. 经过标化后(癌旁正常组织设为 1), *MKI67* 在癌组织中的表达明显高于正常组织中的表达,差异具有统计学意义($P < 0.01$) (Fig. 3).

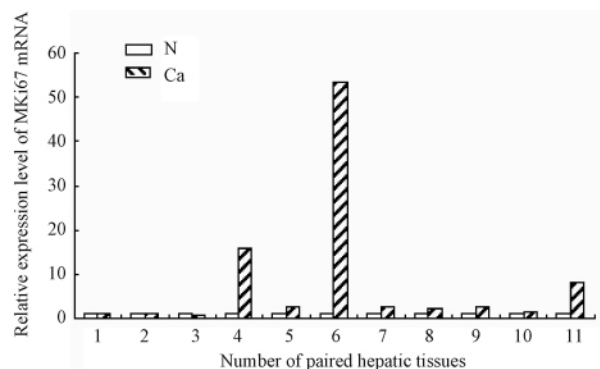


Fig. 3 Quantitative analysis of *MKI67* expression in human hepatic tissues

To detect the expression level of *MKI67* in HCC tissues and adjacent normal hepatic tissues, real-time PCR assay was performed on eleven pairs of hepatic tissue samples. The relative expression level of *MKI67* was defined as follows: quantity of *MKI67*/quantity of β -actin within the same sample. The expression level of *MKI67* in HCC was higher than in adjacent normal hepatic tissues as the histogram show

2.4 MTT 法检测 *MKI67*-siRNA 对 QGY-7703 细胞生长活性的影响

MTT 实验结果显示, si-LacZ、HTKi67-SR 转染的 A、B 两组 A_{570} 值如 Fig. 4 所示. 说明转染 HTKi67-SR 的 QGY-7703 细胞活性降低,与 si-LacZ 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$). 结果表明, *MKI67*-siRNA 可以抑制肝癌细胞的生长活性. 并显示转染剂量呈依赖性,即在一定范围内,随转染质粒浓度的增加,细胞的活性受抑制增强 (Fig. 5).

2.5 肝癌细胞转染 *MKI67*-siRNA 后细胞集落形成的检测

将转染 si-LacZ, *MKI67*-siRNA 的肝癌细胞 QGY-7703 接种于 12 孔板中,培养 10 d 后,显微镜下计数大于 50 个细胞的集落,依据公式计算细胞集落形成率. A 组转染 si-LacZ 为对照组 (Control), B 组转染 si-*MKI67*. B 组与 A 组相比集落形成率明显降低,差异具统计学意义 ($P < 0.01$) (Fig. 6). 结果表明, QGY-7703 细胞转染 HTKi67-SR (*MKI67*-siRNA) 后,细胞体外独立增殖能力和肿瘤

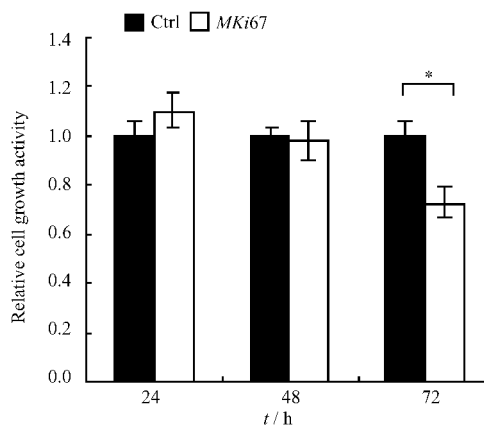


Fig. 4 Knockdown of *MKI67* suppresses QGY-7703 cell growth

The cell growth activity of QGY-7703 cells at the indicated time (24, 48, 72 hours) was detected by MTT assay. The QGY-7703 cells were transfected with either the si-*MKI67* or the control vector. The relative cell growth activity were showed. The cell growth activity which QGY-7703 cells were transfected si-*MKI67* were decreased at 72 hours. Values are mean \pm SD of triplicate experiments (* $P < 0.05$)

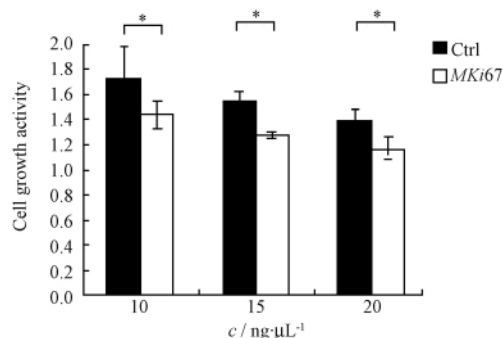


Fig. 5 Knockdown of *MKI67* suppresses QGY-7703 cell growth at dose-dependent manner

In MTT assay, QGY-7703 cells were transfected with pSilencer-*MKI67* and pSilencer (Control) about 72 hours. The activities of QGY-7703 cells were gradually decreased concentrations of si-*MKI67* from 10 ng/ μ L to 20 ng/ μ L (final concentration). The dose-dependent of anti-proliferative effects were detected by MTT assay (* $P < 0.05$)

形成能力明显受到抑制.

2.6 *MKI67*-siRNA 转染肝癌细胞对细胞周期的影响

将分别转染了 si-LacZ 和 *MKI67*-siRNA 的肝癌细胞 QGY-7703 接种于 100 mL 培养瓶内,培养 24 h 后换为无血清的培养液,继续培养 48 h 后补足血清再培养 24 h,通过流式细胞仪检测 *MKI67* 对细胞周

期的影响. 结果表明, 转染 *MKI67*-siRNA 的 QGY-7703 细胞的 G_1 期到 S 期的进程被明显抑制 (Fig. 7).

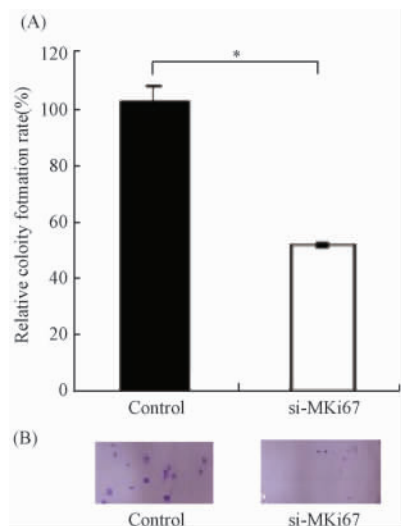


Fig. 6 Knockdown of *MKI67* suppresses QGY-7703 colony formation activity

(A) Cell-independent growth activity of QGY-7703 cells was detected by colony formation assay. The QGY-7703 cells were transfected with either the si-*MKI67* or the control vector at a final concentration of 5 ng/ μ L and seeded in 12-well plate. On the seventh day after seeding, the number of colonies was counted. The calculated colony formation rates were showed (* $P < 0.05$). (B) In the colony formation assay, the cells were stained by crystal violet, with representative pictures of the colonies being shown

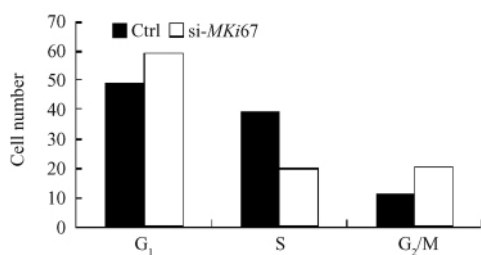


Fig. 7 si-MKI67 suppresses the process of cell cycle G_1 phase to S phase in QGY-7703 cell

After transfected with pSilencer and pSilencer-*MKI67* for 48 hours, QGY-7703 cells were subjected to FACS analysis. The level of cell number in G_1 , S, and G_2/M phase compartments were calculated. The G_1 phase was prolonged than pSilencer after transfected pSilencer-*MKI67*, meanwhile, S phase was shortened in QGY-7703 cells of transfected pSilencer-*MKI67* as the figure show

3 讨论

本文首先利用实时定量 RT-PCR 方法检测了 *MKI67* 在肝细胞癌 QGY-7703 细胞中的表达情况. 结果发现: 与对照组相比, *MKI67* 在肝癌细胞中的表达水平明显升高. 本实验又检测了 *MKI67* 分别在肝细胞癌和癌旁正常组织标本中的表达水平. 结果表明, *MKI67* 在肝细胞癌组织中表达明显上调 (Fig. 3). 由此初步推测, *MKI67* 可能参与了肝细胞癌的发生、发展过程.

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种转录后基因沉默机制, 指当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA (dsRNA) 时, 该 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默的现象^[13]. 现在, RNAi 已成为一种研究基因功能强有力的新工具. 通过导入序列特异的小双链干扰 RNA (siRNA) 可以诱导真核细胞内与其同源的 mRNA 的特异性降解, 产生类似基因敲除的效应^[14,15]. 本实验利用 RNA 干扰技术使肝癌 QGY-7703 细胞中的 *MKI67* 表达水平降低, 并运用 MTT 法和细胞集落形成实验检测了 QGY-7703 细胞转染 *MKI67*-siRNA 后细胞生长活性和增殖能力的变化. 实验结果表明: *MKI67* 表达水平下降后 QGY-7703 细胞的生长活性降低, 与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (Fig. 4), 而 QGY-7703 细胞增殖能力降低更明显 (Fig. 5). 这提示, *MKI67* 表达水平降低后短期内癌细胞的生长抑制作用表现不很明显, 但对癌细胞长期的抑制作用表现很显著. 通过流式细胞术检测 *MKI67*-siRNA 对 QGY-7703 的影响, 即 *MKI67*-siRNA 影响细胞 G_1 期到 S 期的进展. 由此推测, *MKI67* 可能参与了肝细胞癌细胞的增殖, 对肝细胞癌的发生、发展有一定的作用.

参考文献 (References)

- [1] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(3): 311-322
- [2] Nigro J M, Baker S J, Preisinger A C, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types [J]. Nature, 1989, 342(6250): 705-708
- [3] Wersto R P, Herz F, Gallagher R E, et al. Cell cycle-dependent reactivity with the monoclonal antibody Ki-67 during myeloid cell differentiation[J]. Exp Cell Res, 1988, 179(1): 79-88
- [4] Haga Y, Hiroshima K, Iyoda A, et al. Ki-67 expression and prognosis for smokers with resected stage I non-small cell lung cancer [J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(6): 1727-1732, discussion 1732-1733

- [5] Khor L Y , Bae K , Paulus R , *et al.* MDM2 and Ki-67 predict for distant metastasis and mortality in men treated with radiotherapy and androgen deprivation for prostate cancer: RTOG 92-02 [J]. *J Clin Oncol* , 2009 , **27** (19) : 3177-3184
- [6] von Minckwitz G , Sinn H P , Raab G , *et al.* Clinical response after two cycles compared to HER2 , Ki-67 , p53 , and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast [J]. *Breast Cancer Res* , 2008 , **10** (2) : R30
- [7] Rahrman E P , Collier L S , Knutson T P , *et al.* Identification of PDE4D as a proliferation promoting factor in prostate cancer using a Sleeping Beauty transposon-based somatic mutagenesis screen [J]. *Cancer Res* , 2009 , **69** (10) : 4388-4397
- [8] Griffiths E A , Pritchard S A , McGrath S M , *et al.* Hypoxia-associated markers in gastric carcinogenesis and HIF-2alpha in gastric and gastro-oesophageal cancer prognosis [J]. *Br J Cancer* , 2008 , **98** (5) : 965-973
- [9] Preusser M , Heinzl H , Gelpi E , *et al.* Ki67 index in intracranial ependymoma: a promising histopathological candidate biomarker [J]. *Histopathology* , 2008 , **53** (1) : 39-47
- [10] Xia W , Wei Y , Du Y , *et al.* Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer [J]. *Mol Carcinog* , 2009 , **48** (7) : 610-617
- [11] Liu J J , Shen R , Chen L , *et al.* Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker [J]. *Int J Clin Exp Pathol* , 2010 , **3** (4) : 328-337
- [12] Smallridge R C , Marlow L A , Copland J A. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies [J]. *Endocr Relat Cancer* , 2009 , **16** (1) : 17-44
- [13] Hannon G J RNA interference [J]. *Nature* , 2002 , **418** (6894) : 244-251
- [14] Elbashir S M , Harborth J , Lendeckel W , *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature* , 2001 , **411** (6836) : 494-498
- [15] Bernstein E , Caudy A A , Hammond S M , *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. *Nature* , 2001 , **409** (6818) : 363-366