

鸡血藤中黄酮类化合物与环氧合酶-2 对接研究

蒋延超, 蒋世云*, 傅凤鸣, 黄凯, 康星欣, 徐丹

广西科技大学生物与化学工程学院, 柳州 545006

摘要: 探索黄酮类化合物抗环氧合酶-2 的分子机理, 筛选鸡血藤中选择性抗环氧合酶-2 的黄酮类化合物。本研究应用 Autodock 4.2 软件对环氧合酶和环氧合酶抑制剂进行分子对接研究, 建立阳性抑制剂结合自由能与抑制活性关系模型, 并筛选鸡血藤中选择性抗环氧合酶-2 的黄酮类化合物。阳性抑制剂与环氧合酶的对接模型 R^2 分别为 0.96997 和 0.84171, 建立了预测能力较好的对接模型, 可用于指导环氧合酶抑制剂的筛选。筛选结果表明, 3',4',7-三羟基黄酮、儿茶素、没食子儿茶素、表儿茶素具有较强的环氧合酶-2 选择性抑制活性, 可作为母体用于新型抗炎药物设计。

关键词: 鸡血藤; 黄酮类化合物; 环氧合酶-2; 分子对接

中图分类号: R91

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.011

Molecular Docking Study on *Spatholobus suberectus* Dunn Flavonoids with Cyclooxygenase-2

JIANG Yan-chao, JIANG Shi-yun*, FU Feng-ming, HUANG Kai, KANG Xing-xin, XU Dan

College of Biological and Chemical engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China

Abstract: Cyclooxygenase-2 is a key enzyme which catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostaglandin. Cyclooxygenase-2 is an important target for developing anti-inflammatory drugs because prostaglandin is an important inflammatory mediator. *Spatholobus suberectus* Dunn has anti-inflammatory effect, but the specific anti-inflammatory constituents require further investigation to confirm. To formulate the molecular mechanism of flavonoids inhibiting cyclooxygenase-2 and screen flavonoids of *S. suberectus* with cyclooxygenase-2 selective-inhibitory activity. The Autodock 4.2 software was used to do molecular docking studies of cyclooxygenase and cyclooxygenase inhibitor. Furthermore, flavonoids of *S. suberectus* were screened with cyclooxygenase-2 selective-inhibitory activity. Two satisfactory docking models (R^2 , 0.96997, R^2 , 0.84171) of Positive inhibitor and cyclooxygenase possessing predictive capability were obtained. The two models can be applied to design selective cyclooxygenase-2 inhibitor. Among the 15 flavonoids of *S. suberectus*, 3',4',7-trihydroxyflavone, catechin, gallic catechin, epicatechin has strong cyclooxygenase-2 selective-inhibitory activity. These compounds can be used as a matrix for the design of new type of anti-inflammatory drugs.

Key words: *Spatholobus suberectus* Dunn; flavonoids; cyclooxygenase-2; molecular docking

大量临床并发症是由炎症导致的, 因此开发高效、副作用低的抗炎药物对于人类健康十分重要。前列腺素是炎症反应中最主要的炎症介质之一, 环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素生物合成的关键酶。环氧合酶被证实存在两种亚型^[1], 即结构型环氧合酶-1(COX-1)、诱导型环氧合酶-2(COX-2)。由 COX-1 催化合成的前列腺素具有保护胃肠道黏膜免受外界刺激, 维持正常的肾功能和凝血功

能等作用, 而由 COX-2 催化合成的各种前列腺素(PGE_2 、 PGI_2)则具有致炎效应^[2]。

目前应用的甾体抗炎药存在严重的胃肠道、心血管等副作用, 因此开发副作用低的新型抗炎药物势在必行。世界卫生组织报道, 发达国家超过 80% 的人们更相信从植物中提取的药物。最近, 国内外十分重视从传统植物药中研究开发新型选择性抑制 COX-2 的抗炎药物, 以降低甾体抗炎药对胃和肾脏等的副作用。鸡血藤为豆科植物密花豆属密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)的干燥藤茎, 已被证明具有抗炎作用^[3,4]。该草药化学成分稳定, 提取工艺简单, 临床应用广泛, 是一个很有医用价值和

收稿日期: 2014-12-23 接受日期: 2015-03-19

基金项目: 广西自然科学基金(2013GXNSFAA019168)

* 通讯作者 Tel: 86-013557308328; E-mail: jiangshiyun@126.com

开发前景的中药。鸡血藤中大量黄酮类化合物已被鉴定出来。本研究旨在筛选鸡血藤中对 COX-2 有选择性抑制活性的黄酮类化合物,并从分子角度出发深入研究黄酮类化合物与 COX-2 的作用机制。

本研究应用大分子对接软件包 Autodock 4.2 对鸡血藤中黄酮类化合物与 COX 进行模拟对接,筛选鸡血藤中具有 COX-2 选择性抑制活性的黄酮类化合物,从分子水平研究黄酮类化合物对 COX-2 的抑

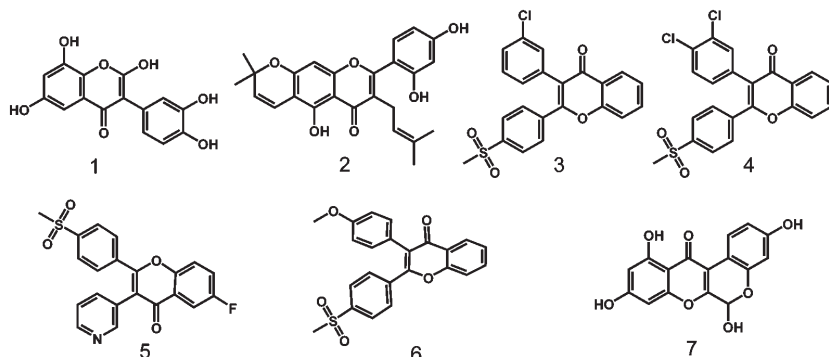


图 1 7 种抗 COX-2 黄酮类抑制剂的化学结构式

Fig. 1 The structure of seven flavonoids inhibitors with COX-2

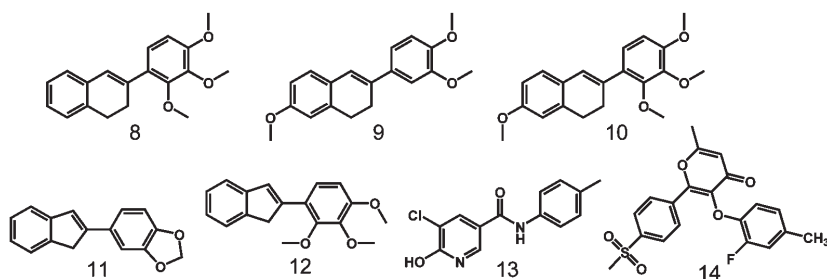


图 2 7 种抗 COX-1 多环类抑制剂的化学结构式

Fig. 2 The structure of seven polycyclic inhibitors with COX-1

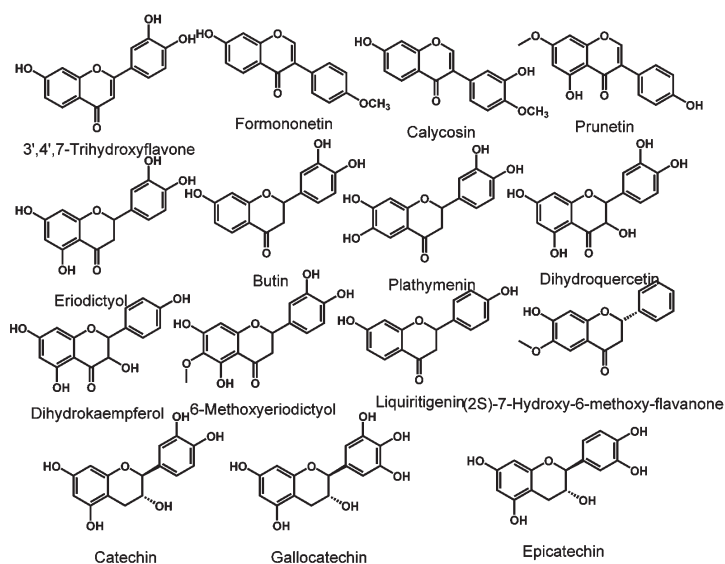


图 3 鸡血藤中黄酮类搜集物的二维结构式

Fig. 3 The structure of flavonoids of *S. suberectus*

制机理,为阐明黄酮类化合物的抗炎机制提供依据。

1 材料与方法

对接研究使用 Autodock 4.2 软件,数据处理使用 origin 8.0 软件。

1.1 配体的构建

本研究考察了两种类型的配体,阳性抑制剂及鸡血藤中的黄酮类化合物。阳性抑制剂根据对接的酶分为与 COX-2 对接的 7 种黄酮类抑制剂和与 COX-1 对接的 7 种多环抑制剂。7 种黄酮类抑制剂命名为 1-7,其相应的半抑制浓度分别为 28.6、2.5、0.365、0.269、1.26、0.517 和 25.5 $\mu\text{mol/L}$ ^[5-8]。7 种多环抑制剂命名为 8-14,其相应的半抑制浓度分别为 0.015、0.38、0.48、1.33、12.8、18.8、100 $\mu\text{mol/L}$ ^[9-11]。7 种黄酮类抑制剂相应的化学结构如图 1,7 种多环抑制剂相应的化学结构如图 2,鸡血藤中黄酮类搜集物的二维结构如图 3^[12-14]。化合物的二维结构通过化学软件 Chemoffice 构建并利用 MM2 立场将分子的三维结构进行能量最优化。

1.2 配体结构的预处理

在进行分子对接实验之前,合并配体中的非极性氢原子,并加上 Gasteiger 电荷。配体中可旋转键通过 Autodock-Tools 1.5.4 软件中的 Ligand 子程序包自动检测,且在构象搜索过程中这些可旋转键全部设置为活性的旋转键。

1.3 受体结构的预处理

对接所用的 COX-1 和 COX-2 的三维结构从美国布鲁克海文(Brookhaven)国家实验室运作的蛋白质数据库(Protein Data Bank)中下载获得,PDB 代码分别为 1CQE 和 6COX。在进行分子对接实验之前,应用 Autodock Tools 1.5.4 软件给蛋白加氢并计算 Gasteiger 电荷,合并非极性氢原子,确定原子类型,纠正 COX 中氨基酸残基上非整数的电荷。

1.4 对接参数的设置

本研究对接过程采用半柔性对接,即配体设置为柔性,受体设置为刚性。在格点盒子中,x 维、y 维和 z 维格点的数目依次设为 80、80、80。该格点盒子的空间大小设为 0.375 Å。该格点盒子的中心设为 27.678、29.495、40.113。配体构象搜索过程使用拉马克遗传算法(Lamarckian Genetic Algorithm, LGA),拉马克遗传算法对接的轮数设为 100,能量评估的最大数目设为 250 万。其他没有提及的参数都使用该软件的默认参数。对于与 COX-2 结合自

由能较低的鸡血藤中黄酮类小分子,进一步将其与 COX-1 对接,对接过程参数设置与 COX-2 相同。

2 实验结果

2.1 复合物 SC-558-COX-2 分子结构的晶体重现

为考察 Autodock 4.2 参数设置是否合理,将抑制剂 SC-558 与 COX-2 按上述参数设置进行分子对接,然后与晶体结构(ID:6COX)相比较。如图 4 所示,分子对接结果与复合物 SC-558-COX-2 晶体结构非常一致。两个结构的均方根偏差(RMSD)为 0.68,表明 Autodock 4.2 可以很好的重现原晶体结构,完全适用于该体系的研究。

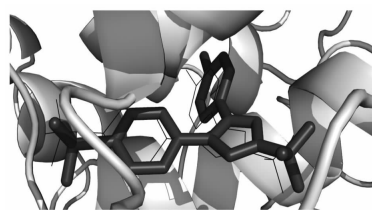


图 4 复合物 SC-558-COX-2 分子结构的晶体重现

Fig. 4 Repeat the crystal structure of complex SC-558-COX-2

注:用 Pymol 画图:SC-558 在原晶体中用细线模型表示,在分子对接结构用球棍模型表示

Note: With Pymol drawing: SC-558 marked thread model in the original crystal, structure in molecular docking by stick model representation

2.2 Autodock 4.2 软件对接的结果

在用 Origin 8.0 软件对用 Autodock 4.2 软件计算的结合自由能与实验的抑制活性作图之前,抑制剂半抑制浓度单位 $\mu\text{mol/L}$ 被转化为 mol/L ,并取负对数,将其化为 pIC_{50} 。由 Autodock 4.2 软件预测的黄酮类抑制剂与 COX-2 之间的结合自由能、多环类抑制剂与 COX-1 之间的结合自由能以及鸡血藤中黄酮类化合物与 COX 之间的结合自由能见表 1、表 2、表 3。线性回归分析得到预测的结合自由能(ΔG)与 COX-2、COX-1 的阳性抑制剂抑制活性之间的关系为: $\Delta G = 2.21404 - 2.42926 \times (\text{pIC}_{50})$, $R^2 = 0.96997$ (图 5a); $\Delta G = -5.64046 - 0.48574 \times (\text{pIC}_{50})$, $R^2 = 0.84171$ (图 5b)。由线性回归分析可知,用 Autodock 4.2 软件预测的结合自由能与实验获得的半抑制浓度的负对数之间存在着良好的相关性,因为决定系数 R^2 高达 0.96997 和 0.84171, P 值分别为 0.00003 和 0.00226,这些数值都是可以接受的值,进而也可以说明通过 Autodock 4.2 软件预

测的半抑制浓度接近于实验获得的半抑制浓度。

表1 黄酮类抑制剂与 COX-2 预测的结合自由能及其 pIC50

Table 1 The binding energy and pIC50 of flavonoids inhibitors with COX-2

化合物 Compound	结合自由能 Binding free energy (kcal/mol)	半抑制浓度 pIC50 (μM)		残差 Residual (μM)
		实验值 Actual	预测值 Predicted	
1	-8.89	4.54363	4.57096	-0.02733
2	-10.94	5.60206	5.41483	0.18723
3	-13.46	6.43771	6.45219	-0.01448
4	-13.73	6.57025	6.56333	0.00692
5	-11.77	5.89963	5.75650	0.14313
6	-13.58	6.28651	6.50159	-0.21508
7	-9.14	4.59346	4.67387	-0.08041

表2 多环类抑制剂与 COX-1 预测的结合自由能及其 pIC50

Table 2 The binding energy and pIC50 of polycyclics inhibitors with COX-1

化合物 Compound	结合自由能 Binding free energy (kcal/mol)	半抑制浓度 pIC50 (μM)		残差 Residual (μM)
		实验值 Actual	预测值 Predicted	
8	-9.23	7.82391	7.38984	0.43407
9	-8.89	6.42022	6.68987	-0.26965
10	-9.11	6.31876	7.14279	-0.82403
11	-8.21	5.87615	5.28995	0.58620
12	-8.19	4.89279	5.24877	-0.35598
13	-7.85	4.72584	4.54881	0.17703
14	-7.46	4.00000	3.74591	0.25409

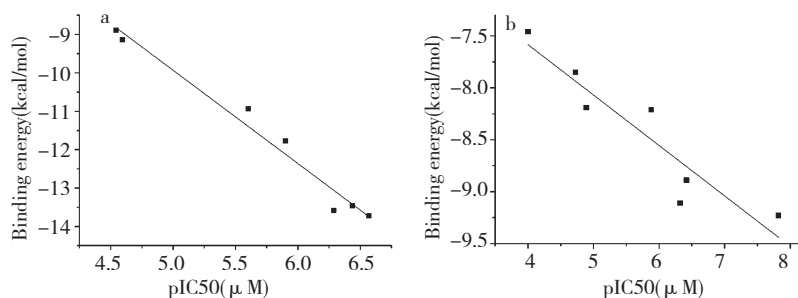


图5 黄酮类抑制剂与 COX-2 (a)、多环类抑制剂与 COX-1 (b) 预测的结合自能与抑制活性之间的相关性

Fig. 5 Correlation between the binding energy calculated and the pIC₅₀ of positive inhibitors

表3 鸡血藤中黄酮类化合物与 COX 的结合能及选择性

Table 3 The binding energy and selectivity of flavonoids of *S. suberectus* with COX

化合物 Compound	结合自由能 Binding free energy (kcal/mol)		预测 IC50 COX-1/COX-2
	COX-2	COX-1	
3',4',7-Trihydroxyflavone	-9.11	-7.47	7.9
Calycosin	-9.33	-8.17	0.4
Formononetin	-8.94	-	-

Prunetin	-8.44	-	-
Butin	-9.24	-7.77	2.1
Eriodictyol	-9.20	-7.81	1.7
Liquiritigenin	-8.99	-	-
Plathymenin	-8.96	-	-
Dihydroquercetin	-8.79	-	-
6-Methoxyeriodictyol	-8.61	-	-
Dihydrokaempferol	-8.61	-	-
(2S)-7-Hydroxy-6-methoxy-flavanone	-8.42	-	-
Galocatechin	-9.85	-6.61	933.5
Catechin	-9.55	-7.55	8.2
Epicatechin	-9.00	-7.01	62.6

2.3 筛选结果

通过与 COX-1 和 COX-2 的对接研究(表 3) 可得,3',4',7-三羟基黄酮(3',4',7-Trihydroxyflavone)、圣草酚(Eriodictyol)、儿茶素(Catechin)、紫柳素(Butin)、没食子儿茶素(Galocatechin)、表儿茶素(Epicatechin)、毛蕊异黄酮(Calycosin)具有较强的抗 COX-2 活性,其中,没食子儿茶素(Galocatechin)、儿茶素(Catechin)、表儿茶素(Epicatechin)、3',4',7-三羟基黄酮(3',4',7-Trihydroxyflavone)对 COX-2 有较好的选择性抑制活性。

2.4 分子结合模式

COX-2 的活性位点由三部分组成:一是由

Tyr385、Trp387、Phe381、Ser530、Met522、Leu384 等残基组成的体积较大的疏水口袋,二是由 Arg120、Glu524、Tyr355 等亲水残基组成的底物入口,三是由 His90、Arg513、Val523、Gln192 等残基组成的体积较小的侧面口袋。对接研究表明,黄酮类抑制剂与 COX-2 有多种结合模式。

7 种黄酮类抑制剂中活性最强和最弱的化合物 4 和 1 与 COX-2 受体活性部位对接后的分子结合模型见图 6,筛选得到的鸡血藤中具有较强抗 COX-2 活性的各类黄酮类化合物与 COX-2 的结合模式见图 7,结合模式中配体的构象是基于与 COX-2 对接时容量最大的簇中结合自由能最低时的构象。

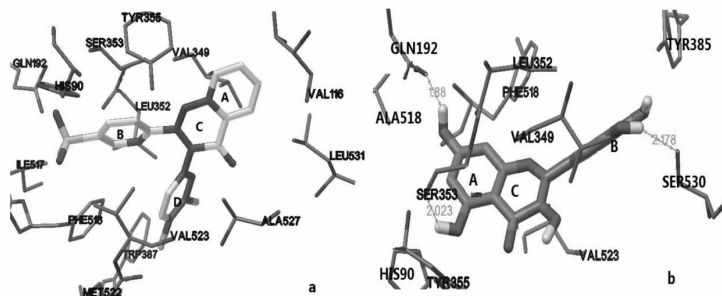


图 6 抑制剂 4 (a)、1 (b) 与受体 COX-2 活性位点的相互作用模式

Fig. 6 The binding mode of inhibitor 4 (a) and 1 (b) against COX-2

由图 6 可知,抑制剂 4 的 B 环占据了 COX-2 的侧面口袋,D 环朝向疏水口袋,与 Ala516、Val349、Trp387、Leu359、Leu352、Ala527、Tyr355、Phe518、Val523 等疏水残基发生疏水相互作用。抑制剂 4 与 COX-2 之间没有氢键形成,这可能意味着抑制剂 4 对 COX-2 的抑制活性不是由氢键作用产生的,而是通过与酶活中心处残基的范德华力及溶剂化作用

等产生的。抑制剂 1 的 A 环占据 COX-2 的侧面口袋,B 环临近疏水口袋,其 3'、5 和 7 位羟基分别与 Ser530、Ser353 和 Gln192 形成了一个长 2.178、2.023、1.88 Å 的氢键,并与 Phe518、Ala516、Tyr355、Val523、Leu352、Tyr385、Val349 等疏水残基存在疏水相互作用。

本课题研究的鸡血藤中 15 种黄酮类化合物由

黄酮化合物、异黄酮、黄烷酮和黄烷-3-醇组成。从图7可以看出,各类化合物与COX-2的结合模式基本一致。黄酮化合物3',4',7-Trihydroxyflavone的A环位于疏水口袋中,B环占据侧面口袋,其3',4'位羟基分别和His90、Ser353形成了一个长1.991、2.191Å的氢键,并与Trp387、Tyr355、Phe518、Val523、Ala527、Met522、Leu352等残基具有疏水相互作用。异黄酮化合物Calycosin的B环占据侧面口袋,A环朝向疏水口袋,其3',7位羟基分别和Gln192和Gly526形成了一个长1.984、2.073Å的氢键,并与Tyr385、Phe518、Val523、Ala516、Met522、

Leu352、Gly526等残基具有疏水相互作用。黄烷酮化合物的A环占据疏水口袋,B环朝向侧面口袋。其中,Butin的4',7位羟基分别和His90、Met522形成了一个长1.991、2.148Å的氢键。黄烷-3醇化合物的A环朝向疏水口袋,B环占据侧面口袋。其中,Gallocatechin的3',4',5,7位羟基分别和Gln192、His90、Ser530、Met522形成了一个2.083、1.764、2.231、2.132Å的氢键,并与Tyr385、Phe518、Val349、Ala516、Met522、Leu352、Gly526等疏水残基发生疏水相互作用。

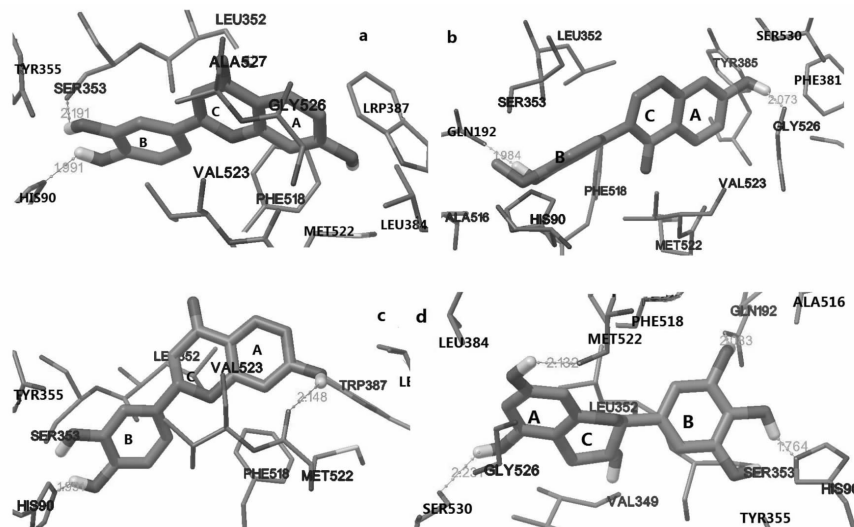


图7 配体3',4',7-三羟基黄酮(a)、毛蕊异黄酮(b)、紫柳素(c)和没食子儿茶素(d)与受体COX-2活性位点的相互作用模式
Fig. 7 The binding mode of 3',4',7-trihydroxyflavone (a), calycosin (b), butin (c) and gallocatechin catechin (d) against COX-2

3 讨论

通过从图6中比较黄酮、异黄酮、黄烷酮和黄烷-3-醇与COX-2的分子理论结合模式可以看出:位于A、B环上的取代基羟基,一类强极性基团,能够与受体分子COX-2活性部位中的极性氨基酸残基之间形成分子间的氢键而发生相互作用。形成的分子之间的氢键在决定配体化合物在受体COX-2活性部位中的取向时起到很大的作用。配体化合物中疏水性主体A、B环能够与受体COX-2活性部位中的疏水性氨基酸残基如Trp387、Tyr355、Phe518、Val523、Ala527、Met522、Leu352等通过疏水作用力而发生相互作用。因此,位于两端的分子之间的氢键有助于稳定疏水性相互作用力。

筛选得到的7种对COX-2有较强抑制活性的黄酮类化合物中黄酮3',4',7-Trihydroxyflavone、黄

烷酮Eriodictyol和Butin以及黄烷-3-醇Catechin和Epicatechin的结构中均包含一个邻苯二酚结构,这说明邻苯二酚结构对黄酮类化合物的抗COX-2活性可能十分重要。对于黄烷酮化合物来说,Butin和Eriodictyol与COX-2的结合自由能要比其他配体小分子与COX-2的结合自由能大得多,且Butin与COX-2的结合自由能大于Eriodictyol与COX-2的结合自由能,这有可能意味着A环上的5,6位的羟基和C环的3位的羟基能够降低配体小分子对COX-2的抑制活性,且降低对COX-2的抑制活性的能力依次为3位羟基>6位羟基>5位羟基。对于黄酮化合物来说,Butin与COX-2的结合自由能要比3',4',7-Trihydroxyflavone与COX-2的结合自由能大得多,这可能意味着C环的碳碳双键不利于抗炎。对于黄烷-3-醇化合物来说,与2S构型的化合物相比,2R构型的化合物似乎有利于配体与5-脂氧合酶的结

合,即 2R 构型的化合物对 5-脂氧合酶的抑制活性要比 2S 构型的化合物强。没食子儿茶素与 COX-2 的结合自由能要比儿茶素和表儿茶素与 COX-2 的结合自由能大得多,这有可能意味着 B 环上的 3',5' 羟基能够增强配体小分子与 COX-2 亲和能力。这些结果提供了黄酮类化合物与 COX-2 作用的基本原理,可能对新型 COX-2 抑制剂的合理设计有所帮助。此外,本课题组曾筛选过鸡血藤中黄酮类化合物抗 5-脂氧合酶(5-LOX)活性,其中圣草酚(Eriodictyol)、儿茶素(Catechin)、紫柳素(Butin)具有较强的抗 5-LOX 活性。因此,圣草酚(Eriodictyol)、儿茶素(Catechin)、紫柳素(Butin)具有较好的 COX-2 和 5-LOX 双重抑制活性,儿茶素(Catechin)既具有较好的 COX-2 和 5-LOX 双重抑制活性,又对 COX-2 具有较好的选择性抑制活性。

4 结论

COX-1 和 COX-2 均具有分叉结合口袋,侧面口袋和疏水口袋。COX-1 的侧面口袋结合位点中第 523 号残基由 COX-2 中的 Val 变成了体积较大的 Ile,使得 COX-1 的侧面口袋小于 COX-2,这一差异可能成为设计选择性 COX-2 的关键。通过将鸡血藤中黄酮类化合物与 COX-1 和 COX-2 的对接研究发现,3',4',7-三羟基黄酮、圣草酚、儿茶素、紫柳素、没食子儿茶素、表儿茶素、毛蕊异黄酮具有较强的抗 COX-2 活性。其中,没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、3',4',7-三羟基黄酮对 COX-2 有较好的选择性抑制活性,圣草酚、儿茶素、紫柳素具有较好的 COX-2 和 5-LOX 双重抑制活性。

参考文献

- 1 Kalgutkar AS, Crews BC, Rowlinson SW, *et al.* Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors; facile conversion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2000, 97:925-930.
- 2 Khan Z, Khan N, Tiwari PR, *et al.* Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics. *Curr Drug Targets*, 2011, 12:

- 1082-1093.
- 3 Li RW, Ling GD, Myers SP, *et al.* Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *J Ethnopharmacol*, 2003, 85:61-67.
- 4 Yang M, Xiao CH, Wu QF, *et al.* Anti-inflammatory effect of Sanshuibaihu decoction may be associated with nuclear factor-kB and p38 MAPK α in collagen-induced arthritis in rat. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127:264-273.
- 5 Jan H, Milan B, Stanislav C, *et al.* Natural compound cudraflavone B shows promising anti-inflammatory properties *in vitro*. *J Nat Prod*, 2011, 74:614-619.
- 6 Deng SX, Afa KP, Brett JW, *et al.* Lipoygenase inhibitory constituents of the fruits of Noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *J Nat Prod*, 2007, 70:859-862.
- 7 Yung HJ, Jin KK, Seon HK, *et al.* 2,3-Diarylbenzopyran derivatives as a novel class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13:413-417.
- 8 Khemraj B, Ishwari NS, Somendu KR, *et al.* Rotenoids from *Boerhaavia diffusa* as potential anti-inflammatory agents. *J Nat Prod*, 2013, 76:1393-1398.
- 9 Bhaskar B, Sivaram H, Darshit BS, *et al.* Discovery of potential and selective COX-1 inhibitory leads using pharmacophore modeling, *in silico* screening and *in vitro* evaluation. *Eur J Med Chem*, 2014, 86:469-480.
- 10 Lei S, Li ZL, Ying Y, *et al.* Design of novel N-phenylnicotinamides as selective cyclooxygenase-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21:121-124.
- 11 Francisco C, Jimenez JM, Nuria G, *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2-phenylpyran-4-ones: A new class of orally active cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Med Chem*, 2004, 47:3874-3886.
- 12 Lee MH, Lin YP, Hsu FL, *et al.* Bioactive constituents of *Spatholobus suberectus* in regulating tyrosinase-related proteins and mRNA in HEMn cells. *Phytochemistry*, 2006, 67:1262-1269.
- 13 Cui YJ(崔艳君), Liu P(刘屏), Chen RY(陈若芸). *Caulis spatholobi* active ingredients research. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2005, 30:121-123.
- 14 Yoon JS, Sung SH, Park JH, *et al.* Flavonoids from *Spatholobus suberectus*. *Arch Pharm Res*, 2004, 27:589-592.