

紫堇灵对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及机制的研究

冯培文¹, 韩吉春¹, 李德芳¹, 王凤华^{1,2}, 房雪¹, 郑秋生^{1*}

¹滨州医学院中西医结合学院; ²烟台毓璜顶医院莱山分院, 烟台 264003

摘要:探讨紫堇灵(Corynoline, COR)对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制。50只昆明种小鼠随机均分成5组,分别为正常组(Con)、GW9662阻断剂组(GW)、模型组(CCl₄)、紫堇灵预处理组(COR)以及紫堇灵与阻断剂GW9662联合处理组(COR+GW),采用腹腔注射0.2%四氯化碳(CCl₄)玉米油溶液(10 mL/kg)建造小鼠急性肝损伤模型。20 h后,小鼠脱白处死后取血清,使用ELISA法检测血液中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性。检测肝脏组织中C反应蛋白(CRP)的含量和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的含量。利用HE染色观察肝组织病理学变化,通过Western blot方法检测肝脏组织中过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)和NF- κ B的蛋白表达。结果显示,紫堇灵能显著降低CCl₄性肝损伤所引起的血清中ALT、AST活性升高,明显改善肝组织病理损伤程度;抑制肝脏中炎症因子CRP和TNF- α 含量和NF- κ B蛋白表达量的升高;有效地拮抗受损肝组织中过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR- γ)蛋白表达量的降低。并且我们发现紫堇灵的这种减轻CCl₄性肝损伤的作用几乎全部被GW9662阻断。COR对四氯化碳致小鼠急性肝损伤有一定的保护作用,其机制可能与PPAR- γ 和NF- κ B信号通路有关。

关键词:紫堇灵;四氯化碳;急性肝损伤;抗炎;过氧化物酶增殖物激活受体 γ

中图分类号: R965

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.007

Hepatoprotective Effect of Corynoline on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Mice

FENG Pei-wen¹, HAN Ji-chun¹, LI De-fang¹, WANG Feng-hua^{1,2}, FANG Xue¹, ZHENG Qiu-sheng^{1*}

¹Binzhou medical university; ²Department of Internal medicine, Yantai Yuhuangding Hospital of Laishan branch, Yantai 264003, China

Abstract: To investigate the hepatoprotective activities of Corynoline in the mice model of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver toxicity. In addition, attempts were made to elucidate the possible mechanism of action. Hepatotoxicity was induced in Kunming mice by an intraperitoneal injection (i. p.) of CCl₄, 10 mL/kg body weight, diluted with corn oil at a ratio of 1:500. The corynoline (COR) was administered once a day for 7 days (i. p.) as pretreatment at 10 mg/kg · day. The levels of C-reactive protein (CRP) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were analyzed to determine the inflammation status. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were analyzed by ELISA. Liver ultrastructure was observed via optical microscopy. The protein expression degrees of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and nuclear factor-k-gene binding (NF- κ B) were assayed by Western blot. CCl₄-induced hepatotoxicity was manifested by an increase in the levels of ALT, AST, CRP and TNF- α . The histopathological examination of liver sections revealed necrosis and inflammatory reactions. The pretreatment with COR decreased levels of ALT, AST, CRP and TNF- α , decreased the protein expression degrees of NF- κ B, and the protein expression degrees of PPAR γ , and normalized the hepatic histo-architecture. This study supported the use of COR against hepatotoxicity, and the hepatoprotective effect was mainly through PPAR γ and NF- κ B signaling pathway.

Key words: Corynoline; carbon tetrachloride; anti-inflammatory; hepatotoxicity; peroxisome proliferator-activated receptor

收稿日期: 2016-09-26 接受日期: 2016-11-01

基金项目: 国家自然科学基金(31471338); 山东省高等学校优势学科人才团队培育计划; 滨州医学院科研启动基金(BY2014KYQD01); 新疆特种植物药物物质基础与作用机制研究创新团队支持项目(2015BD005)

* 通讯作者 Tel: 86-013999328286; E-mail: zqsyts@sohu.com

肝脏是人体最大、最重要的消化腺体,也是人体的主要的代谢器官和防御器官。肝脏疾病是影响人类健康的最为常见的疾病之一^[1]。目前认为,化学性肝损伤的机制较为复杂,基本的损伤因素为细

胞应激、线粒体损伤和特异性免疫反应等^[2,3],这些始动因素又可以进一步启动如死亡受体介导的信号通路等下游事件,导致线粒体通透性转换孔开放,最终引起细胞凋亡和坏死^[4,5]。尽管现代医学有了突飞猛进的发展,然而肝病的预防和治疗仍然存在局限。因此,如何进行有效的预防,不断地开发、寻找疗效肯定、价格低廉的保肝护肝的药物就成为许多医药工作者的普遍共识。

急性肝损伤的发生发展是一个复杂的病理生理过程,与多种有害因素如内毒素、氧化应激、炎症细胞因子有密切联系。有研究表明 CCl₄ 抑制肝脏组织中 PPAR γ 的蛋白表达,激活肝脏组织中 NF- κ B 的蛋白表达,增加炎症因子的释放,造成严重的急性肝损伤^[6,7]。

紫堇灵(corynoline)系从中药紫堇提取出的异喹啉生物碱,具有很好的抗炎作用^[8]。有研究报道,紫堇灵对 CCl₄、硫代乙酰胺、扑热息痛所致的小鼠肝损伤均有保护作用,使谷丙转氨酶(ALT)显著降低,肝病理损伤程度减轻^[9]。本研究探讨紫堇灵抗 CCl₄ 所致急性肝脏损伤是否与 PPAR- γ /NF- κ B 信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 仪器

全自动酶标仪(Thermo 3001 VARIOSKAN FLASH);AR-2140 型万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司制造)。

1.2 药品及试剂

紫堇灵(纯度 >99%)由成都曼斯特生物科技有限公司提供;谷丙转氨酶(ALT)比色法试剂盒、谷草转氨酶(AST)比色法试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所)、C 反应蛋白试剂盒(CRP)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 试剂盒(均购自美国 Tsz Biosciences 公司)、PPAR γ 抗体和 NF- κ B 抗体(均购自美国 Cell Signaling 公司),其它试剂为国产分析纯。

1.3 实验动物

昆明种雄性小白鼠,体重 20 ± 2 g 左右,由济南市金丰实验动物繁育有限公司提供[许可证号:SCXK(鲁)2014-0006]。

2 实验方法

2.1 动物饲养与实验分组

50 只健康雄性昆明种小鼠(20 ± 2 g)随机均分

成 5 组:正常组(Con)、GW9662 阻断剂组(GW)、模型组(CCl₄)、紫堇灵治疗组(COR)和 COR + 阻断剂联合组(COR + GW)。GW 组每天以 5 mg/kg 剂量的 GW9662 腹腔注射,连续 7 d。COR 组每天以 10 mg/kg 剂量的 COR 腹腔注射(COR 预先溶于 5% 的 DMSO 中,注射前,按照相应剂量溶于生理盐水中),连续 7 d。COR + GW 组每天以 10 mg/kg COR 腹腔注射,连续 7 d,并且第 7 d 同时腹腔注射 5 mg/kg GW9662(GW9662 的剂量是通过前期预实验计算出的,GW9662 事先溶于 5% 的 DMSO 中,注射前,按照相应剂量溶于生理盐水中)。Con 组与 CCl₄ 组给予等体积生理盐水。末次给药后,Con 组和 GW 组均注射了不含 CCl₄ 的玉米油溶媒,其余各组腹腔注射 0.2% CCl₄ 玉米油溶液 10 mL/kg,注射后禁食 20 h,摘除眼球采血,4000 g 离心 10 min,取上层血清待测。肝脏组织存放在 10% 甲醛溶液。

2.2 血清转氨酶水平的检测

摘除眼球采血,4000 g 离心 10 min,取上层血清待测。血清 ALT 和 AST 活性均按试剂盒说明书测定。

2.3 肝脏组织中炎症因子 CRP 和 TNF- α 含量检测

准确称取肝脏相同部位 0.5 g,以 1:9(m/V) 的生理盐水制成肝匀浆。按试剂盒说明书方法分别测定肝组织中 CRP 和 TNF- α 含量。

2.4 HE 染色切片观察

取血后处死小鼠,马上摘取肝脏,立即以 0.02 mol/L 冰冷的乙二氨四乙酸(EDTA)溶液洗涤,吸干水分。取相同部位肝脏组织放入 10% 中性甲醛中固定,HE 染色切片,病理学观察,观察每组切片中脂肪变、炎症细胞及组织坏死程度。

2.5 Western blot

将蛋白样品加入 5 \times 上样缓冲液后煮沸变性,每孔加入 30 μ g 蛋白,70V 恒压电泳至溴酚蓝指示剂至分离胶浓缩胶分界处,转为 90 V 恒压电泳至指示剂接近凝胶的底部。将电泳完毕的凝胶按照从正极到负极依次为海绵垫-滤纸-膜-凝胶-滤纸-海绵垫的顺序夹好,250 mA 恒流转膜,冰浴,转膜时间 1 h。采用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,加入事先稀释过的一抗,在室温下孵育 1 ~ 2 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜,缓慢摇动。15 mL TBS/T 洗 3 次(5 min/T);加入合适稀释度的碱性磷酸酶(AP)或辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育 1 h,缓慢摇动。15 mL TBS/T 洗 3 次(5 min/T)。采用 ECL 化学发光底物显色,UVP 化学发光成像系统获取图像信息,Image J 软件分析条

带光密度值,目的蛋白与其对应的内参比较后,再于正常组比较得出相对表达量(%)。

2.6 统计分析

统计学处理应用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,origin 8.0 处理图片,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组均数比较采用方差分析,当 $P < 0.05$ 时,则表示具有显著性差异。

3 结果与分析

3.1 COR 对血清中 AST 和 ALT 水平的影响

为了解 COR 对肝功能指标的影响,我们检测了血清中 AST 和 ALT 的水平。如表 1 所示,与 Con 组相比较,CCl₄ 组血清中的 AST 和 ALT 的活性显著升高($P < 0.01$),而 COR 预处理后可以显著降低四氯化碳造成的 AST 和 ALT 活性升高,与 CCl₄ 组相比较,具有显著性差异($P < 0.01$)。有趣的是,我们发现 COR 的这种护肝作用几乎全部被 GW9662 阻断。并且通过 Con 组与 GW 组的比较,我们发现 GW9662 对正常肝脏没有明显的损伤现象。

表 1 COR 对 CCl₄ 致急性肝脏损伤小鼠血清中 ALT、AST 含量的影响(mean \pm SD, $n = 10$ /group)

Table 1 Prophylactic effect of COR on restoration of liver function markers in CCl₄ intoxicated mice (mean \pm SD, $n = 10$ /group)

组别 Group	ALT (U/L)	AST (U/L)
Con	71.57 \pm 7.92	41.62 \pm 2.56
GW	77.35 \pm 12.68	53.21 \pm 5.93
CCl ₄	192.37 \pm 11.33 ^{##}	276.07 \pm 27.42 ^{##}
COR	122.54 \pm 7.97 ^{**}	75.16 \pm 7.66 ^{**}
COR + GW	182.35 \pm 12.64	253.21 \pm 5.93

注:^{##} $P < 0.01$,与 Con 组比较;^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,与 CCl₄ 组比较。

Note: compared with Con group, ^{##} $P < 0.01$; compared with CCl₄ group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.2 COR 对肝脏中 TNF- α 和 CRP 含量的影响

为了观察 COR 对小鼠肝脏中炎症因子的影响,我们检测了肝脏中 TNF- α 和 CRP 的含量。如表 2 所示,与 Con 组相比较,CCl₄ 组肝脏中的 TNF- α 和 CRP 的活性显著升高($P < 0.01$),而 COR 可以显著降低 CCl₄ 造成的 TNF- α 和 CRP 活性升高,与 CCl₄ 组相比较,具有显著性差异($P < 0.01$)。这表明 COR 抗 CCl₄ 诱导的急性肝脏损伤作用可能与其的抗炎作用有关。并且研究结果同样表明,COR 的抗

炎作用也被 GW9662 阻断。

表 2 COR 对 CCl₄ 致急性肝脏损伤小鼠肝脏中 TNF- α 、CRP 含量的影响(mean \pm SD, $n = 10$ /group)

Table 2 Effect of COR on the levels of TNF- α and CRP in mice subjected to CCl₄-induced hepatotoxicity (mean \pm SD, $n = 10$ /group)

组别 Group	CRP (μ g/L)	TNF- α (ng/L)
Con	579.07 \pm 44.48	293.06 \pm 18.46
GW	658.57 \pm 132.53	296.63 \pm 26.50
CCl ₄	1971.51 \pm 151.70 ^{##}	596.83 \pm 24.93 ^{##}
COR	1383.57 \pm 92.41 ^{**}	421.63 \pm 18.03 ^{**}
COR + GW	1758.57 \pm 131.67	546.63 \pm 41.88

注:^{##} $P < 0.01$,与 Con 组比较;^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,与 CCl₄ 组比较。

Note: compared with Con group, ^{##} $P < 0.01$; compared with CCl₄ group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.3 COR 对四氯化碳肝损伤小鼠肝组织学改变的影响

如图 1 所示,Con 组(图 1A)和 GW 组(图 1B):肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,肝细胞结构清晰,核大而圆、居中,无炎性细胞浸润。CCl₄ 组(图 1C)和 COR + GW 组(图 1E):肝中央静脉周围肝细胞索排列紊乱,胞质疏松,有大量的炎性细胞浸润及残留的肝细胞团。与 CCl₄ 组比较,COR 组(图 1D)可以显著降低肝组织损伤,肝小叶结构清晰,肝细胞结构清晰,也没有大量炎性细胞浸润及残留的肝细胞团。结果显示 COR 对肝细胞形态改变有保护作用,而这种保护作用却被 GW9662 显著阻断。

3.4 COR 对四氯化碳肝损伤小鼠肝组织中 PPAR γ 和 NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 2 所示,与 Con 组比较,CCl₄ 显著升高了 NF- κ B 的水平($P < 0.01$),并显著降低了 PPAR γ 蛋白表达($P < 0.01$)。当 COR 预处理后,NF- κ B 的蛋白表达显著下降,并且 PPAR γ 蛋白表达显著增加。当使用 COR 和 GW9662 联合预处理时,COR 的这种对肝脏组织中 PPAR γ 和 NF- κ B 蛋白表达的作用几乎全部被逆转。基于这些数据,我们认为 COR 减轻 CCl₄ 诱导的急性肝脏损伤的作用机制可能是介导 PPAR γ 和 NF- κ B 信号通路。

4 讨论与结论

在肝损伤的病变过程中,多种酶,自由基以及脂质过氧化反应均发生着较大的变化^[10-12]。本实验采用 CCl₄ 成功建立了急性肝损伤模型。CCl₄ 是一

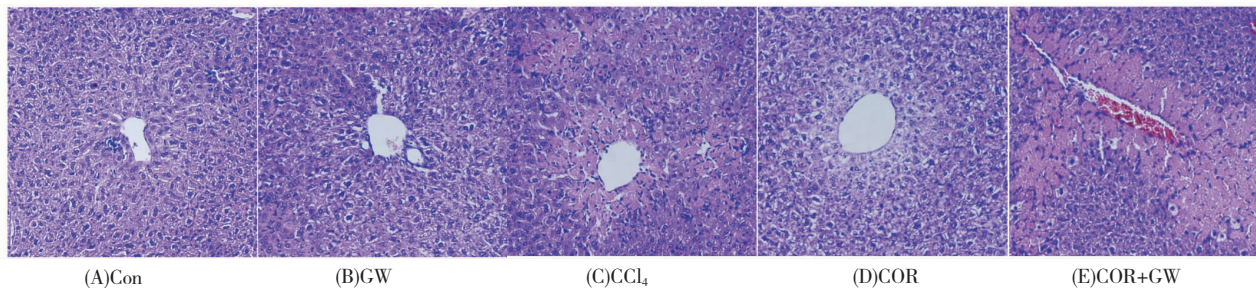


图1 COR对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠肝脏组织学损伤的影响

Fig. 1 Histopathology of liver tissues from Con group (A), GW group (B), CCl_4 group (C), COR group (D) and COR + GW9662 group (E)

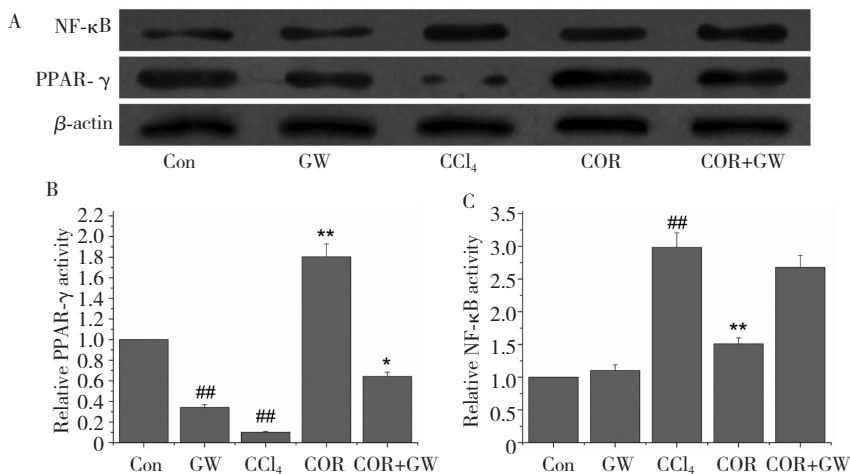


图2 (A) 肝脏组织中 PPAR γ 和 NF- κ B 在 western blot 实验中的蛋白表达条带、(B) 肝脏组织中 PPAR γ 的蛋白表达及 (C) 肝脏组织中 NF- κ B 的蛋白表达

Fig. 2 Effect of COR on PPAR γ and NF- κ B protein levels in mice liver tissue. (A) protein levels of PPAR γ and NF- κ B in mice liver analyzed by Western blot. (B) PPAR γ and (C) NF- κ B protein levels in mice liver.

注:与 Con 组比较,^{##} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$;与 CCl_4 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

Note:compared with Con group,^{##} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$;compared with CCl_4 group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

种选择性的肝毒性物质,是目前诱导肝细胞损伤的常用化学药物^[13,14]。 CCl_4 进入机体内,通过细胞色素 P450 的作用分解为三氯甲烷自由基 ($\text{CCl}_3 \cdot$), $\text{CCl}_3 \cdot$ 既能选择性的损伤小叶中央区的肝细胞,又能迅速与 O_2 结合转化为过氧化三氯甲烷自由基 (CCl_3O_2),引起脂质过氧化反应,破坏细胞膜结构,使肝细胞变性,坏死,细胞内转氨酶(如 ALT 和 AST)渗入血液而使活性升高^[15,16]。本研究发现 COR 能改善肝功能指标(ALT、AST),并且显著的减轻肝脏的损伤,这表明 COR 具有很好保护肝脏作用。

本研究发现, CCl_4 组小鼠血清中 TNF- α 和 CRP 的活性显著增高,并且在 HE 染色中,也可以清楚的看到血管周围有大量的炎性细胞浸润,这表明, CCl_4

诱导的急性肝损伤机制可能与炎症反应有关联。有趣的是,本研究也发现,COR 可以显著的降低炎症因子的水平,也显著的降低血管周围的炎性细胞浸润。这一结果表明, CCl_4 诱导的急性肝损伤机制可能与炎症有关,而且 COR 可能通过其抗炎作用发挥保护肝脏的作用。

在四氯化碳诱导的急性肝脏损伤的过程中,损伤发生的原因是由于炎症因子的过量释放和炎性细胞的大量聚集,导致严重的肝脏损伤。作为调控炎症反应的重要因子 PPAR γ 也在急性肝损伤的发生发展过程中扮演着重要的作用。有研究表明,急性肝损伤肝组织中 PPAR γ 的表达被抑制,导致炎症因子的释放增加,造成了严重的肝损伤^[6,17]。在本研

究中,四氯化碳可以降低肝脏组织中 PPAR γ 的蛋白表达,增高 NF- κ B 的蛋白表达,并且诱导大量的炎症因子释放^[18-20]。通过 COR 的治疗,我们发现,COR 可以显著增高肝脏组织中 PPAR γ 的蛋白表达,降低 NF- κ B 的蛋白表达,并且降低大量的炎症因子释放,也显著减轻了四氯化碳诱导的急性肝脏损伤。为了进一步研究 COR 保护肝脏的作用,我们使用 GW9662,并且我们也确实发现了,当 GW9662 与 COR 联合使用时,COR 的保护肝脏的作用几乎全部被阻断。通过蛋白表达量的检测,我们也发现,GW9662 可以逆转 COR 在肝脏蛋白表达量的影响,主要表现为 GW9662 可以降低紫堇灵升高 PPAR γ 和降低 NF- κ B 蛋白表达量的效果。

综上所述,COR 可以减轻四氯化碳诱导的急性肝损伤作用,COR 的这种保护作用可能通过激活 PPAR γ 信号通路,抑制 NF- κ B 信号通路,调控机体氧化应激状态和炎症状态来发挥保护肝脏的作用。

参考文献

- Rabinowich L, Shibolet O. Drug induced steatohepatitis: An uncommon culprit of a common disease. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:168905.
- Suzek H, Celik I, Dogan A, *et al.* Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharm Biol*, 2016, 54:451-457.
- Zhang YQ (张引强), Tang XD (唐旭东), Wang FY (王凤云), *et al.* Effect of Ronggan mixture on immunoregulation and hepatocyte apoptosis-related factors in concanavalin A induced acute immunological liver injury mice. *Chin J Integr Trad West Med* (中国中西医结合杂志), 2013, 33:1500-1506.
- Wang FL (王凤林), Yang HZ (杨宏志), Li YM (李杨涓), *et al.* Prevention and treatment mechanism of Qingxia therapy (Based on Yinchenhao Decoction and Dachengqi Decoction) on hepatocyte apoptosis in rats with acute hepatic injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine. *J Chin Med Mater* (中药材), 2014, 37:848-852.
- Zhang XH (张晓慧), Liu X (刘新), Bai L (白丽), *et al.* Differences of liver CD₄⁺ CD₂₅⁺ Foxp₃⁺ regulatory T cells in mice with acute and chronic liver injury. *J Capital Med Univ* (首都医科大学学报), 2014, 35:484-487.
- Qiao H, Han H, Hong D, *et al.* Protective effects of baicalin on carbon tetrachloride induced liver injury by activating PPAR γ and inhibiting TGF β 1. *Pharm Biol*, 2011, 49(1):38-45.
- Xin Y, Wei J, Chunhua M, *et al.* Protective effects of Ginsenoside Rg1 against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of inflammation. *Phytomedicine*, 2016, 23:583-588.
- Yang C, Zhang C, Wang Z, *et al.* Corynoline isolated from *Corydalis bungeana* Turcz. exhibits anti-inflammatory effects via modulation of Nfr2 and MAPKs. *Molecules*, 2016, 21(8):E975.
- Wei HL, Liu GT. Protective action of corynoline, acetylcorynoline and protopine against experimental liver injury in mice. *Acta Pharm Sin*, 1997, 32:331-336.
- Zhang JQ, Shi L, Xu XN, *et al.* Therapeutic detoxification of quercetin against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice and its mechanism. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 15:1039-1047.
- Ma JQ, Ding J, Zhang L, *et al.* Protective effects of ursolic acid in an experimental model of liver fibrosis through Nrf2/ARE pathway. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015, 39:188-197.
- Hu L, Li L, Xu D, *et al.* Protective effects of neohesperidin dihydrochalcone against carbon tetrachloride-induced oxidative damage *in vivo* and *in vitro*. *Chem Biol Interact*, 2014, 213:51-59.
- Ray S, Murmu N, Adhikari J, *et al.* Inhibition of Hep G2 hepatic cancer cell growth and CCl₄ induced liver cytotoxicity in Swiss albino mice by Mahua extract. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2014, 33:295-314.
- Augustin W, Wiswedel I, Noack H, *et al.* Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Mol Cell Biochem*, 1997, 174:199-205.
- Domitrović R, Rashed K, Cvijanović O, *et al.* Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Chem Biol Interact*, 2015, 230:21-29.
- Rašković A, Pavlović N, Kvrđić M, *et al.* Effects of pharmaceutical formulations containing thyme on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15:442.
- Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, *et al.* Protective effects of thymosin β 4 on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1269:61-68.
- Hu L, Li L, Xu D, *et al.* Protective effects of neohesperidin dihydrochalcone against carbon tetrachloride-induced oxidative damage *in vivo* and *in vitro*. *Chem Biol Interact*, 2014, 213:51-59.