

肝癌组织中遗传印记基因 PEG10 表达的特异性及其意义

常莹, 陶璐薇, 陈孝平, 周秀敏, 宋宇虎, 黄锦, 张琼, 林菊生

常莹, 陶璐薇, 周秀敏, 宋宇虎, 黄锦, 张琼, 林菊生, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
陈孝平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030
常莹, 女, 1977-08-05 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 2003 年华中科技大学同济医学院附属同济医院硕士生, 主要从事肝脏疾病基因治疗方面的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30471983
通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市航空路 13 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. jslin@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662578 传真: 027-83662578
收稿日期: 2005-03-25 接受日期: 2005-04-08

Specificity and significance of expression of imprinted gene PEG10 in hepatocellular carcinoma

Ying Chang, Lu-Wei Tao, Xiao-Ping Chen, Xiu-Min Zhou, Yu-Hu Song, Jin Huang, Qiong Zhang, Ju-Sheng Lin

Ying Chang, Lu-Wei Tao, Xiu-Min Zhou, Yu-Hu Song, Jin Huang, Qiong Zhang, Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Xiao-Ping Chen, Department of General Surgery, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471983
Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. jslin@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2005-03-25 Accepted: 2005-04-08

Abstract

AIM: To study the specificity and significance of the expression of imprinted gene PEG10 in hepatocellular carcinoma (HCC) and to evaluate the feasibility for PEG10 as a novel molecular target of gene therapy for HCC.

METHODS: The total RNA was extracted from different tumor cell lines (liver cancer HepG2, gastric cancer SGC7901, colorectal cancer Lovo, pancreatic cancer PC3, melanoma A375 and T lymphoma Jurkat cells), normal human fetal liver cell line L02, human HCC ($n = 32$) and the corresponding cancer-adjacent tissues ($n = 32$), benign liver tissues ($n = 10$) and peripheral blood cells ($n = 10$). Then the expression of PEG10 was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Simultaneously, AFP expression was detected in human HCC and the corresponding cancer-adjacent tissues.

RESULTS: After amplification, the length of PEG10 and AFP fragment was 455 bp and 140 bp respectively. PEG10 was markedly expressed in HepG2 cells, and weakly expressed in SGC7901, PC3, Lovo cells. PEG10 expression was found negative in L02 and other tumor cell lines. The positive rates of PEG10 expression in HCC and the corresponding tissues were 78.1% and 0%, but the ones for AFP were 93.8% and 59.4% respectively. There was no significant difference between PEG10 and AFP expression in HCC tissues ($P > 0.05$), whereas the expression of AFP (19/32) was significantly higher than that of PEG10 in cancer-adjacent tissues (0/32) ($\chi^2_{0.01,1} = 17.05$, $P < 0.01$). PEG10 wasn't detected in benign liver tissues and normal peripheral blood cells.

CONCLUSION: PEG10 is more specifically expressed in HCC than AFP, which provides evidence for PEG10 as a novel molecular target of gene therapy for HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Imprinted gene; PEG10; Gene therapy; Molecular target

Chang Y, Tao LW, Chen XP, Zhou XM, Song YH, Huang J, Zhang Q, Lin JS. Specificity and significance of expression of imprinted gene PEG10 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(12):1408-1411

摘要

目的: 研究 PEG10 在肝癌组织中表达的特异性, 为其作为一个潜在的肝癌基因治疗的新的分子靶点提供实验依据。

方法: 从来自不同器官组织的肿瘤细胞系(人肝癌细胞株 HepG2、人胃癌细胞株 SGC7901、人结肠癌细胞株 Lovo、人胰腺癌细胞株 PC3、人黑色素瘤细胞株 A375、人 T 淋巴瘤细胞株 Jurkat)、正常人胎肝细胞株 L02、32 例肝癌患者的肝癌组织、癌旁组织、10 例良性肝病患者的肝组织、10 例正常人外周血单个核细胞中抽提总 RNA, 经 RT 逆转录合成 cDNA, 再以 PCR 方法检测 PEG10 的表达。同时, 肝癌组织和癌旁组织标本经 RT-PCR 检测 AFP 的表达。

结果: 经 RT-PCR 扩增的 PEG10 基因片段为 455 bp, AFP 基因的扩增片段为 140 bp, 与原设计一致; PEG10 在人肝癌细胞株 HepG2 中明显表达, 人胃癌细胞株 SGC7901、人结肠癌细胞株 Lovo、人胰腺癌细胞株

PC3中弱表达,而正常人胚胎肝细胞株LO2和其他肿瘤细胞株(人T淋巴瘤细胞株、人黑色素瘤)中表达均为阴性.在32例肝癌及相应癌旁组织中,PEG10的表达阳性率分别为78.1%和0%;而AFP基因的阳性率分别为93.8%和59.4%.经McNemar检验,显示PEG10基因在肝癌组织中表达的敏感性与AFP表达敏感性之间无显著性差异($\chi^2_{0.01,1} = 1.78$, $P > 0.05$);而癌旁组织中PEG10表达率(0/32)明显低于AFP表达率(19/32)($\chi^2_{0.01,1} = 17.05$, $P < 0.01$).另外10例良性肝病患者(肝硬化4例,自身免疫性肝病2例,肝血管瘤2例,丙型肝炎1例,血色素病1例)肝组织标本及正常人的外周血细胞进行PEG10基因检测,结果均为阴性.

结论: PEG10的表达不但具有比AFP更高的肝癌组织特异性,而且具有相对器官组织特异性.本实验为PEG10作为一个新的肝癌标志物和基因治疗的分子靶点提供了实验依据.

关键词: 肝癌; 印记基因; PEG10; 基因治疗; 分子靶

常莹,陶璐薇,陈孝平,周秀敏,宋宇虎,黄锦,张琼,林菊生.肝癌组织中遗传印记基因PEG10表达的特异性及其意义.世界华人消化杂志 2005;13(12):1408-1411
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1408.asp>

0 引言

迄今为止所发现的与肝癌发病相关的靶分子都只在部分肝癌中表达或在非肝癌组织中也有不同程度的表达,缺乏特异性^[1-2]. Tsou *et al*^[3]首先发现印记基因PEG10 (paternally expressed gene 10)在肝癌细胞中有异常表达.根据以往人们对印记基因可以调控胚胎期部分组织生长^[4],及参与肿瘤细胞生长失调的生物行为的研究^[5],我们想到:PEG10基因的异常表达可能是肝癌组织发生的重要促进因素之一,有可能作为HCC基因治疗新的分子靶点.我们对PEG10在不同肿瘤细胞中的表达情况做了检测,并进一步论证了PEG10在肝癌组织中表达的特异性,比较了其于AFP在肝癌组织中表达特异性和敏感性的差异,为其作为潜在的HCC的肿瘤标志物和基因治疗的新靶点提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 由我所保存的细胞株分别为人肝癌细胞株HepG₂、人胃癌细胞株SGC7901、人结肠癌细胞株Lovo、人胰腺癌细胞株PC3、人黑色素瘤细胞株A375、人T淋巴瘤细胞株Jurkat、正常人胚胎肝细胞株LO2;收集同济医院近2 a经手术切除并经病理证实的32例肝癌患者(男28例,女4例,平均年龄48岁)的肝癌组织和癌旁组织标本,10例良性肝病患者(肝硬化4例,自身免疫性肝病2例,肝血管瘤2例,丙型肝炎

炎1例,血色素病1例)肝组织标本.以上标本收集后保存于液氮中,总RNA提取前1 d放入-75℃冰箱备用.另采集正常人血样10份,采集当日分离单个核细胞,加入Trizol(购于Invitrogen公司)1 mL裂解细胞.10 min后于-75℃冰箱保存.

1.2 方法 (1)显微镜下计数细胞达 1×10^7 后,在培养瓶中加入1 mL Trizol,细胞裂解10 min后,将细胞裂解液转至1.5 mL Ep管中;取肝组织50 mg,剪碎后置于无RNase的匀浆器(DEPC处理)中,加入Trizol 1 mL冰上匀浆,至管壁不见残余组织后将Trizol转至1.5 mL Ep管中;5 mL EDTA抗凝血于2 h内,以淋巴细胞分离液(购于上海恒信化学试剂厂)及密度梯度离心法分离单个核细胞,分离步骤同产品说明所.加入Trizol 1 mL,10 min后转入1.5 mL Ep管中.按Invitrogen的Trizol说明书提取各标本的总RNA.用DNase I (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Invitrogen)去除RNA中痕量的DNA,操作步骤详见Invitrogen的产品说明书. (2)在NCBI中查找PEG10和AFP的全长cDNA序列.根据Kampke^[6]的引物设计原则,用Primer premier5.0软件设计二者的引物序列. PEG10引物序列:正义链5'-TTGTCCACGAAAC TCACGACC-3';反义链5'-TGCCACAAAATCTCGAAGAGC-3',扩增片段长度455 bp;AFP引物序列:正义链5'-ACCAATGTACTGCAGAGATAAG-3';反义链5'-GTTTCATCTCCAGTGGGTTTC-3',扩增片段长度140 bp.内参 β -actin:正义链5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3',反义链5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3',扩增片段613 bp.以上引物均由上海生工生物工程公司合成.细胞、肝组织及外周血单个核细胞的总RNA 2 μ g,经引物oligdT₁₈和逆转录酶MMLV(均购于Promega公司)合成cDNA.详细步骤见Promega逆转录酶的Protocol.标本PCR反应条件:95℃ 2 min 30 s \rightarrow 30 \times (94℃ 45 s \rightarrow 48.8℃ (PEG10)/55℃ (AFP, 内参 β -actin) 45 s \rightarrow 72℃ 45 s) \rightarrow 72℃ 10 min (T Gradient, PCR仪购于Biometra公司).PCR用dNTP和Taq酶均购自MBI公司.

统计学处理 经McNemar检验处理和分析数据,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性.

2 结果

人肝癌细胞株HepG₂中PEG10表达明显,人胰腺癌细胞株PC3、人结肠癌细胞株Lovo、人胃癌细胞株SGC7901中也有弱的PEG10表达,条带为455 bp与原设计一致.人胚胎肝细胞株LO2、人黑色素瘤细胞株A375、人T淋巴瘤细胞株Jurkat中未见其表达(图1).在32例肝癌组织中25例PEG10表达阳性,而相应的癌旁组织则无1例PEG10的表达.同时对AFP的检

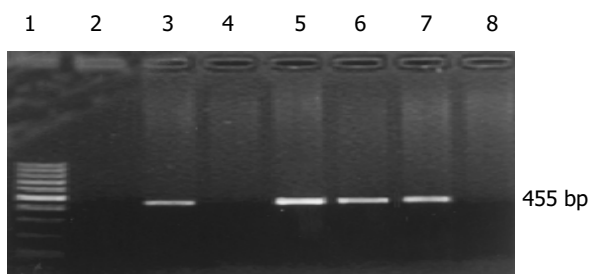


图1 不同肿瘤细胞中PEG10表达情况. 1:100 bp ladder, 500 bp 处最亮; 2: 人胚胎肝细胞L02 细胞株; 3-8: 分别为人胰腺癌细胞株PC3、人黑色素瘤细胞株A375、人肝癌细胞株HepG2、人结肠癌细胞株Lovo、人胃癌细胞株SGC-7901、人淋巴瘤细胞株Jurkat 中PEG10的表达情况.

测结果显示, 32 例中 30 例为阳性, 相应的癌旁组织也有 19 例为阳性(表 1, 2). 比较 PEG10 和 AFP 在 HCC 组织中的表达敏感性: 经 McNemar 检验, 显示 PEG10 基因在肝癌组织中表达的敏感性与 AFP 表达敏感性之间无显著性差异 ($\chi^2_{0.01, 1} = 1.78, P > 0.05$). 比较癌旁组织中 PEG10 和 AFP 表达的差异: 结果显示在癌旁组织中 AFP 的表达明显高于 PEG10, 二者之间有显著性差异 ($\chi^2_{0.01, 1} = 17.05, P < 0.01$) (图 2, 3). 另外对 10 例良性肝病患者(肝硬化 4 例, 自身免疫性肝病 3 例, 肝血管瘤 2 例, 血色素病 1 例)的肝脏组织进行 PEG10 基因的检测, 结果均为阴性(资料未给出). 对 10 例正常人外周血单个核细胞进行的检测发现, PEG10 表达也为阴性.

表1 32例肝癌组织 PEG10 基因与 AFP 基因表达

AFP 基因	PEG10 基因		合计
	有	无	
有	23	7	30
无	2	0	2
合计	25	7	32

表2 32例癌旁组织 PEG10 基因与 AFP 基因表达

AFP 基因	PEG10 基因		合计
	有	无	
有	0	19	19
无	0	13	13
合计	0	32	32

3 讨论

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) 是一种全球性高度恶性的肿瘤. 目前, 手术仍是唯一根治早期肝癌的手段^[7]. 但多数患者确诊时已失去了手术时机^[8]. 因此, 寻求更有效的治疗手段成为肝癌治疗的迫切问题. 肿瘤的基因治疗是近年来研究的热点^[9], 发现了许多与肝癌发病相关的靶分子. 但研究表明, 他们都只在部分肝癌中起致癌作用且缺乏特异性^[10].

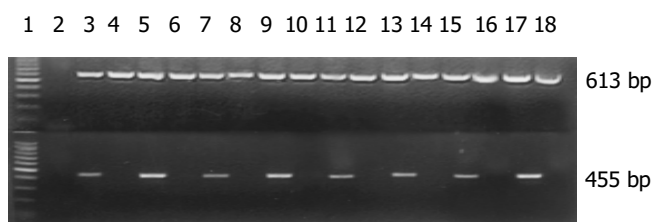


图2 肝癌组织和相应的癌旁组织中PEG10表达. 1:100 bp ladder, 500 bp 处最亮; 2: 试剂空白对照组; 3-18: 8 例肝癌组织标本(奇数 lane)和对应的癌旁标本(偶数 lane); 上方条带为内参 β -actin 613 bp; 下方条带为 PEG10 基因 455 bp.

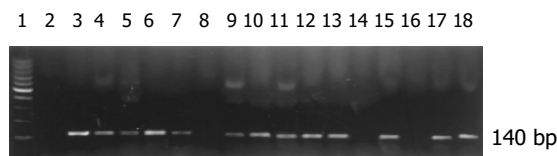


图3 肝癌组织和相应的癌旁组织中AFP表达. 1: 100 bp ladder, 500 bp 处最亮; 2: 试剂空白对照组; 3-18: 8 例肝癌组织标本(奇数 lane)和对应的癌旁标本(偶数 lane); AFP 片段大小为 140 bp, 在 8 例癌旁组织中 5 例表达阳性.

因此, 寻找参与绝大多数肝癌发病的关键性的特异分子靶是现阶段 HCC 基因治疗迫切需要解决的问题. PEG10 (paternally expressed gene 10) 是 2001 年 Ono *et al*^[11] 在肝细胞癌组织中发现的一个新的遗传印记基因 (genetic imprinted gene), 来源于病毒反转录转座子 (retrotransposon), 位于人类染色体 7q21 上. 以往的研究表明: 肿瘤形成过程中, 印记基因的改变或印记缺失 (loss of imprinting, LOI) 是最常见的改变之一^[12-13]. 例如胰岛素样生长因子-2 (insulin-like growth factor 2, IGF-2) 是肿瘤进展过程中最常见的上调基因^[14-18], 而 IGF2 的受体 (被认为是可调控 IGF2 的肿瘤抑制基因) 常在肿瘤组织中缺失^[19-20]. PEG10 和 IGF-2 一样同属于父方表达的印记基因, 有学者提出父方表达的印记基因可促进细胞的生长, 使个体发育更加强壮^[21-22]. 因此, 这类基因的过表达就有可能导致细胞的恶性转化^[23-25]. 为了探讨 PEG10 与肿瘤发生的相关性, 我们用 RT-PCR 方法检测了 PEG10 在人胚胎肝细胞株 L02 和不同肿瘤细胞株中的表达情况. 结果显示: 在人肝癌细胞株 HepG2 中 PEG10 表达明显, 人胃癌细胞株 SGC7901、人结肠癌细胞株 Lovo、人胰腺癌细胞株 PC3 也有不同程度的表达; 而正常的人胚胎肝细胞株 L02、人 T 淋巴瘤细胞株 Jurkat、人黑色素瘤细胞株 A375 中没有表达. 以往的研究表明正常人的肝、胰、结肠、胃、淋巴细胞和表皮细胞中均没有 PEG10 的表达^[10, 26], 说明 PEG10 在以上组织中的表达具有肿瘤细胞特异性, 因此 PEG10 的过量表达很可能是肿瘤发生的促进因素之一. 更令人感兴趣的是, PEG10 在肿瘤细胞中的表达还显示一定的组

织器官特异性. 目前对不同肿瘤细胞的检测发现, PEG10 只在消化道肿瘤中有表达, 其他器官的肿瘤细胞株中没有检测到 PEG10 的表达, 说明 PEG10 不但具有肿瘤特异性, 而且还可能具有消化道器官肿瘤特异性. 这种器官肿瘤特异性的机制还不清楚, 可能与不同器官细胞微环境的变化引起的甲基化改变有关. 另外, 对 32 例肝癌和相应癌旁组织的检测发现: 在 78.1% 的肝癌组织中都有 PEG10 的表达, 而相应的癌旁组织中无 1 例 PEG10 的表达; 而传统的肝癌标志物 AFP^[27] 在癌旁组织中的表达高达 59.4%. AFP 可用于 HCC 的筛查^[28], 但肝癌患者和良性肝病患者 AFP 的检测结果可有重叠^[29]. 因此寻求高特异性的 HCC 标志物一直是肝病研究者和临床医生的追求的目标^[30]. 我们的研究不仅发现 PEG10 有比 AFP 更高的肝癌组织特异性, 而且发现良性肝病组织及正常人的外周血中均不能检测到 PEG10 的表达. 这就使得 PEG10 有可能作为特异性更高得 HCC 标志物. 综上所述, 我们想到印记基因 PEG10 有可能参与了肝癌的发生过程, 其表达具有肝癌组织特异性, 能够作为新的肝癌标志物和基因治疗的分子靶点. 但 PEG10 的作用还需要进一步的研究: 肝癌细胞中的特异性高表达是否由于印记缺失造成? PEG10 蛋白是通过什么机制发挥其调节细胞生长并参与肿瘤的发生? 能否通过抑制 PEG10 的表达遏制肝癌细胞的恶性生物学行为? 以上问题都有待进一步的研究.

4 参考文献

- Feitelson MA, Pan J, Lian Z. Early molecular and genetic determinants of primary liver malignancy. *Surg Clin North Am* 2004;84:339-354
- Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002;27:181-182
- Tsou AP, Chuang YC, Su JY, Yang CW, Liao YL, Liu WK, Chiu JH, Chou CK. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers. *J Biomed Sci* 2003;10:625-635
- Salas M, John R, Saxena A, Barton S, Frank D, Fitzpatrick G, Higgins MJ, Tycko B. Placental growth retardation due to loss of imprinting of Phlda2. *Mech Dev* 2004;121:1199-1210
- Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002;417:945-948
- Kampke T, Kieninger M, Mecklenburg M. Efficient primer design algorithms. *Bioinformatics* 2001;17:214-225
- Chen XP, Huang ZY. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma in China Surgical techniques, indications, and outcomes. *Langenbecks Arch Surg* 2005;4:1435-2443
- Yanaga K. Current status of hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2004;39:919-926
- Sangro B, Mazzollini G, Prieto J. Future therapies for hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:515-521
- Blum HE. Molecular therapy and prevention of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:11-22
- Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H, Aisaka K, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics* 2001;73:232-277
- Joyce JA, Schofield PN. Genomic imprinting and cancer. *Mol Pathol* 1998;51:185-190
- Verma M, Maruvada P, Srivastava S. Epigenetics and cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004;41:585-607
- Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 1993;362:749-751
- Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, de Boom Witzel S, Okano H, Ko MS, Ohlsson R, Longo DL, Feinberg AP. Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* 2005;307:1976-1978
- Soares J, Pinto AE, Cunha CV, Andre S, Barao I, Sousa JM, Cravo M. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer* 1999;85:112-118
- Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP. Loss of IGF2 Imprinting: A potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003;299:1753-1755
- Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997;276:1268-1272
- De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, Orton TC, Jirtle RL. M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat Genet* 1995;11:447-449
- Kong FM, Anscher MS, Washington MK, Killian JK, Jirtle RL. M6P/IGF2R is mutated in squamous cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 2000;19:1572-1578
- Hernandez L, Kozlov S, Piras G, Stewart CL. Paternal and maternal genomes confer opposite effects on proliferation, cell-cycle length, senescence, and tumor formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13344-13349
- Partridge L, Hurst LD. Sex and conflict. *Science* 1998;281:2003-2008
- Noble A, Towne C, Chopin L, Leavesley D, Upton Z. Insulin-like growth factor-II bound to vitronectin enhances MCF-7 breast cancer cell migration. *Endocrinology* 2003;144:2417-2424
- Moorehead RA, Sanchez OH, Baldwin RM, Khokha R. Transgenic overexpression of IGF-II induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma. *Oncogene* 2003;22:853-857
- Vella V, Sciacca L, Pandini G, Mineo R, Squatrito S, Vigneri R, Belfiore A. The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol Pathol* 2001;54:121-124
- Okabe H, Satoh S, Furukawa Y, Kato T, Hasegawa S, Nakajima Y, Yamaoka Y, Nakamura Y. Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1. *Cancer Research* 2003;63:3043-3048
- Kubo S, Matsukawa M. Tumor markers of hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004;31:2203-2206
- Daniele B, Bencivenga A, Megna AS, Tinessa V. Alpha-fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127(5 Suppl 1):S108-112
- Johnson PJ. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2001;5:145-159
- Marrero JA, Lok AS. Newer markers for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127(5 Suppl 1):S113-119