

隐球菌病患者中 NK 细胞活性降低及其意义

陈孙孝¹, 温海^{1*}, 陈江汉¹, 顾菊林¹, 邓安梅²

(1. 第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科)

[摘要] **目的:** 研究隐球菌病患者中 NK 细胞和隐球菌之间的相互作用, 为开发有效的预防和治疗方法提供依据。 **方法:** 收集隐球菌病患者和健康对照者各 40 例的外周血标本。(1) 采用流式细胞术分析外周血单个核细胞(PBMC)中 CD2、CD3、CD4、CD8、CD28、CD18、CD19、CD56 表达水平;(2) 以 K562 为靶细胞, 采用 MTT 法分析 NK 细胞毒性活性以及 IFN- α 或 IL-2 对其的作用;(3) 经 ELISA 法检测培养上清中的 IFN- γ 水平, 并检测培养上清液的细胞毒性活性;(4) 定量 PCR 分析穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素的转录水平;(5) 将新生隐球菌与 NK 细胞共同孵育, 探讨 NK 细胞对新生隐球菌生长的抑制作用。 **结果:** 与健康对照相比, 隐球菌病患者 PBMC 中 CD56⁺ 细胞显著减少 ($P < 0.01$), CD8⁺、CD19⁺、CD18⁺ 细胞显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), CD8⁺/CD28⁺ 比例升高 ($P < 0.05$), CD4⁺/CD8⁺ 比例下降 ($P < 0.05$), 而 CD2⁺、CD3⁺、CD4⁺ 细胞无显著变化。隐球菌病患者 PBMC 中 NK 细胞的细胞毒性活性显著降低 ($P < 0.01$); 加入 IFN- α 或 IL-2 后其活性显著升高 ($P < 0.01$)。隐球菌病患者 PBMC 培养上清液中 IFN- γ 显著低于健康对照组 ($P < 0.01$)。隐球菌病患者中穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素的转录水平均显著降低 ($P < 0.01$)。隐球菌病患者 NK 细胞抑制新生隐球菌生长的程度明显低于健康对照 ($P < 0.05$)。 **结论:** 隐球菌病患者中 NK 细胞数量和活性降低, 利用 IL-2 或 IFN- α 等细胞因子能显著上调 NK 细胞的杀伤活性, 提示了一条新的高效低毒的治疗途径。

[关键词] 隐球菌病; 自然杀伤细胞; 细胞因子; 天然免疫

[中图分类号] R 519 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0120-05

Decrease of natural killer cell activity in patients with cryptococcosis and its clinical significance

CHEN Sun-xiao¹, WEN Hai^{1*}, CHEN Jiang-han¹, GU Ju-lin¹, DENG An-mei² (1. Department of Dermatology and Venereology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the interactions between natural killer (NK) cells and *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) in patients with cryptococcosis, so as to pave a way for treatment and prevention of cryptococcosis. **Methods:** The peripheral blood samples of 40 cryptococcosis patients and 40 healthy controls were collected. Expression of CD2, CD3, CD4, CD8, CD28, CD18, CD19, and CD56 in patients peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were detected by FACS. Cytotoxic activity of NK cells was analyzed by MTT using K562 cells as target cells and the influence of IFN- α and IL-2 on NK cell activity was also studied. The level of IFN- γ in the culture supernatant was assayed by ELISA and the cytotoxic activity of the supernatant was determined. The transcription levels of perforin, granzyme B and granulysin were examined by quantitative real-time PCR. *C. neoformans* and NK cells were cocultured to investigate the inhibition of NK cells on *C. neoformans*. **Results:** Compared with that in healthy controls, CD56⁺ cells decreased significantly ($P < 0.01$) in the PBMC of patients with cryptococcosis, CD8⁺, CD19⁺ and CD18⁺ cells increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the ratio of CD8⁺/CD28⁺ increased and of CD4⁺/CD8⁺ declined significantly ($P < 0.05$). However, the levels of CD2⁺, CD3⁺ and CD4⁺ cells had no change. Compared with that in healthy controls, the NK cells cytotoxicity in patients with cryptococcosis decreased significantly ($P < 0.01$), but increased when IFN- α or IL-2 was added ($P < 0.01$). IFN- γ level in the PBMC supernatant of patients with cryptococcosis was much lower than that in healthy controls ($P < 0.01$). Transcription of perforin, granzyme B and granulysin in PBMC of patients with cryptococcosis decreased markedly in contrast to those of healthy controls ($P < 0.01$). The inhibitory effect of NK cells on growth of *C. neoformans* was significantly lower in cryptococcosis patients than that in healthy controls ($P < 0.05$). **Conclusion:** The quantity and function of NK cells decrease in patients with cryptococcosis. Cytokines such as IL-2 and IFN- α can upregulate the cytotoxicity of NK cells, which suggests a new way for treatment of cryptococcosis.

[KEY WORDS] cryptococcosis; natural killer cells; cytokines; innate immunity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2):120-124]

近年来,随着艾滋病发病率明显上升、免疫抑制剂的应用以及其他原因,由新生隐球菌引起的隐球菌病发病率呈明显上升趋势,主要发病人群为一些

[基金项目] 上海市卫生局科技发展基金(044092). Supported by Science Development Grant of Shanghai Health Bureau(044092).

[作者简介] 陈孙孝, 博士, 讲师、主治医师。

* Corresponding author. E-mail: wenhai98@sohu.com

免疫功能低下的人群,包括艾滋病患者^[1](预计到2010年我国将有1 000万人感染艾滋病,按照目前艾滋病患者隐球菌病6%~10%的发病率,到时将有60万~100万艾滋病患者合并患有隐球菌病)。目前对隐球菌病的治疗还较为棘手,效果还不理想,病死率和病残率较高。一线抗真菌药物两性霉素B不良反应较大,治疗周期长,花费较高,患者难以长期承受。

在人体抵抗隐球菌感染的过程中,天然免疫反应形成人体防御的第一道防线,其中天然杀伤(natural killer,NK)细胞起着关键性的作用^[2]。因此在机体产生抗隐球菌的保护性免疫反应中,NK细胞的充分激活至关重要。如果能提高患者自身免疫系统的抵抗能力尤其是NK细胞的杀伤病原体功能,将有助于提高抗感染治疗效果、降低不良反应。因此研究隐球菌病患者中NK细胞和隐球菌之间的相互作用,开发有效的预防和治疗方法来控制疾病的发生和病情发展,对隐球菌病的预防和治疗具有重要意义和应用前景。

本课题对隐球菌病患者外周血中NK细胞数量、表型、细胞毒性活性以及可溶性细胞毒性分子、细胞因子的分泌进行了分析,并初步探讨了IL-2、IFN- α 对NK细胞活性的作用,为深入研究NK细胞与病原体新生隐球菌之间的信号分子和细胞作用机制、进一步探讨预防和治疗隐球菌病途径打下了基础。

1 材料和方法

1.1 试剂 完全 α 2MEM培养基为Gibco产品,含IL-2 100 U/ml,15%新生牛血清、15%马血清、100 μ g/ml链霉素、100 U/ml青霉素;K562细胞(人红白血病细胞系)为本科实验室保存,培养于完全RPMI 1640培养基(含10%牛血清);MTT(5 mg/ml)为Fluca产品;IL-2和IFN- α 购自R&D公司。

1.2 外周血标本 收集2000~2005年间本科确诊收治的隐球菌病患者40例以及相应年龄、性别的40例健康对照个体外周血标本,各20 ml。

1.3 外周血NK细胞的分离 采用密度梯度法,分离纯化人外周血中单个核细胞(PBMC)。经洗涤后,以每50 μ l冰的MACS缓冲液(0.1 mol/L PBS,含2 nmol/L EDTA和0.5%人白蛋白)中加 1×10^7 PBMCs混匀。为去除CD3⁺ T细胞,以包被抗人CD3单抗的MACS磁珠与细胞悬液混匀,6 $^{\circ}$ C孵育

30 min,经洗涤后用MACS LD分离柱分离得到CD3⁻细胞。而后用CD56磁珠分离得到CD3⁻/CD56⁺细胞。经流式细胞仪分析CD3⁻/CD56⁺细胞纯度,纯度 $>90\%$ 的样品进行下一步实验。

1.4 细胞表面标志物分析 取100 μ l外周血,用相应的荧光标记的抗CD2、CD3、CD4、CD8、CD28、CD18、CD19、CD56单克隆抗体,经流式细胞术分析细胞表面标志物表达水平。

1.5 NK细胞毒性活性分析 5×10^4 /ml K562靶细胞100 μ l/孔加入96孔板,按照效/靶比2.5:1、5:1、10:1、20:1、40:1取NK效应细胞100 μ l加入不同效/靶孔,实验同时设立效应细胞、靶细胞和RPMI 1640调零孔,每组4个复孔,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂孵育12 h,加入5 mg/ml MTT 10 μ l/孔继续培养4 h,离心弃上清,加入10% SDS,0.01 mol/L HCl溶解沉淀过夜,检测570 nm处的光密度(D)值,计算杀伤百分比。杀伤百分比 = $[1 - (D_{E+T} - D_E) / D_T] \times 100\%$ 。D_{E+T}:效应细胞+靶细胞;D_E:效应细胞;D_T:靶细胞。

在细胞毒性活性实验中,于效/靶孔加入1 000 U/ml人IFN- α 或100 U/ml人IL-2共同孵育,以研究细胞因子对NK细胞活性的作用。

1.6 体外培养产生可溶性细胞毒性因子和IFN- γ 的检测 取患者和健康对照组的 4×10^6 PBMC,加入1 ml RPMI 1640培养基,含0.2% BSA和25 mmol/L HEPES,1 000 U IL-2,孵育24 h。收集上清液,冻存于-70 $^{\circ}$ C。(1)经ELISA法检测培养上清中的IFN- γ 水平;(2)以K562细胞作靶细胞检测溶解细胞活性:100 μ l培养上清液,50 ml完全RPMI 1640培养基,含K562靶细胞,混合培养16 h后,经MTT法检测细胞毒性活性。

1.7 定量PCR分析穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素的转录水平 采用RNA纯化试剂盒(Qiagen公司)提取PBMC中的RNA,取1 μ g RNA,用随机引物进行cDNA转录反应。采用特异性的引物在Gene Amp 7900检测仪(ABI公司)进行定量PCR分析穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素的转录水平。引物如下:颗粒溶素上游引物为5'-GTC GAC ATG GCC GGA CTA CAG GAC C-3',下游引物为5'-CTC GAG TAC CTA GGT CCT CCA GAT CTG-3';穿孔素上游引物为5'-GTC GAC ATG CAG CCC GCT GCT C-3',下游引物为5'-CTC GAT CAC CCA CGG CCC CAC T-3';颗粒酶B上游

引物为 5'-GTC GAC ATA ACC AAT CCT GCT TCT-3',下游引物为 5'-CTC GAG TTG GCG TTT CAT GGT TTT-3'。

1.8 NK 细胞对新生隐球菌的生长抑制 将新生隐球菌(2×10³/孔)与 1×10⁶ NK 细胞共同孵育 0、24 或 48 h 后,用 0.1% Triton X-100 裂解效应细胞,并涂布于沙氏培养基,计数隐球菌菌落数。通过与只加入隐球菌的对照孔比较,探讨 NK 细胞对新生隐球菌生长的抑制作用。

2 结果

2.1 细胞表面标志物分析 结果见表 1。与健康对照相比,隐球菌病患者 PBMC 中 CD56⁺细胞显著减少($P < 0.01$),CD18⁺细胞显著增加($P < 0.01$),CD8⁺、CD19⁺细胞增加($P < 0.05$),CD8⁺/CD28⁺比例升高($P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺比例下降($P < 0.05$)甚至倒置,而 CD2⁺、CD3⁺、CD4⁺细胞表达水平无明显差异。

表 1 隐球菌病患者 PBMC 表面标志物分析

Tab 1 Cell surface marker in PBMC of patients with cryptococcosis

(n=40, $\bar{x} \pm s$)

Group	CD2 ⁺ (%)	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD56 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD18 ⁺ (%)	CD19 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD8 ⁺ /CD28 ⁺
Control	80.14±7.24	72.21±5.83	44.03±6.37	16.85±5.83	23.85±7.95	55.1±10.24	12.75±4.63	2.25±0.58	12.00±3.78
Cryptococcosis	82.26±9.12	76.92±8.93	47.28±7.28	2.94±0.93*	30.80±8.93*	98.70±4.32**	18.93±5.79*	1.14±0.36*	20.86±6.98*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.2 隐球菌病患者 NK 细胞的细胞毒性活性分析 与健康对照相比,隐球菌患者 PBMC 中 NK 细胞的细胞毒性活性显著降低。在同一效/靶比,2 组的特异性溶解率间存在显著性差异($P < 0.01$)。随着效/靶比的增加,NK 细胞的细胞毒性活性也增加。见图 1。

在效/靶孔加入 IFN- α 或 IL-2 共同孵育后,患者和健康对照组 NK 细胞的细胞毒性活性均显著增高($P < 0.01$),且 2 组间存在显著差异($P < 0.01$),但细胞因子刺激引起的 NK 细胞的活性增高比例在患者组和对照组之间无明显差异(图 1)。

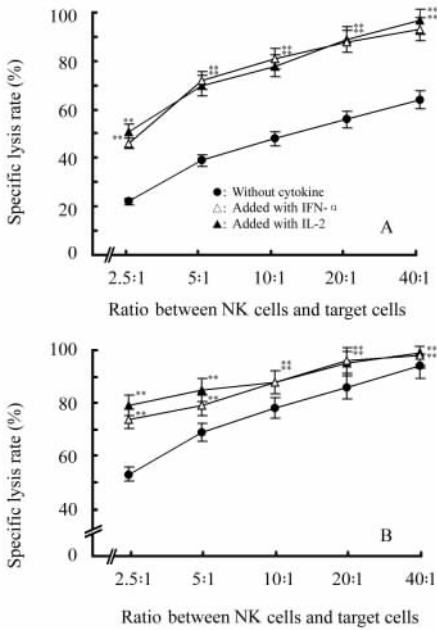


图 1 隐球菌病患者(A)和健康对照个体(B) NK 细胞的细胞毒性活性

Fig 1 Cytotoxicity of NK cells in PBMC of patients with cryptococcosis(A) and healthy controls(B)

** $P < 0.01$ vs without cytokine group; n=40, $\bar{x} \pm s$

2.3 体外培养上清液细胞毒性活性和 IFN- γ 的检测 NK 细胞培养上清液中可溶性细胞毒性因子活性分析(特异性溶解率)显示,健康对照组不加细胞因子、加 IFN- α 、加 IL-2 后的细胞毒性活性分别为(15.76±3.75)%、(35.98±8.95)%、(39.75±7.96)% ,而隐球菌病患者则分别为(13.38±3.52)%、(34.06±7.58)%、(37.99±7.32)% ,2 组间无明显差异。在同一效/靶比,隐球菌病患者 PBMC 培养上清液中产生的 IFN- γ 显著低于健康对照组($P < 0.01$);而随着效/靶比的增加,IFN- γ 产生量也增加(图 2)。

2.4 穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素的转录水平 与健康对照组相比,隐球菌患者 PBMC 中穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素的转录水平均显著降低($P < 0.01$)。加入 IFN- α 或 IL-2 共同孵育后,三者的转录水平增高($P < 0.05$,图 3)。

2.5 NK 细胞对新生隐球菌的生长抑制 新生隐球菌与 NK 细胞共同培养,其生长受到抑制,菌落增殖 $< 400\%$,隐球菌病患者 NK 细胞抑制程度明显低于健康对照($P < 0.05$)。加入 IFN- α 或 IL-2 后,可明显增强 NK 细胞对新生隐球菌生长的抑制作用($P < 0.05$,图 4)。

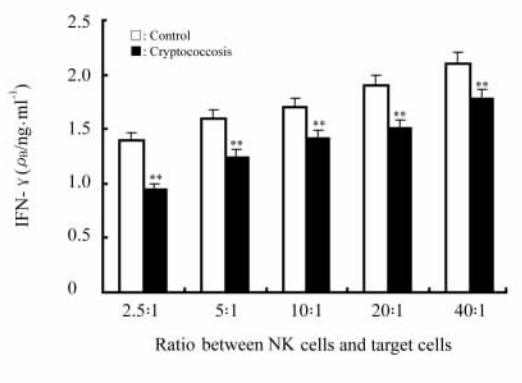


图 2 隐球菌病患者 NK 细胞培养上清液中 IFN- γ 水平

Fig 2 IFN- γ level in PBMC supernatant of patients with cryptococcosis

** $P < 0.01$ vs control; $n = 40, \bar{x} \pm s$

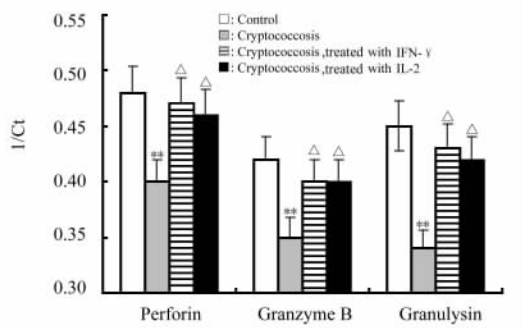


图 3 PBMC 细胞中穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素的转录水平

Fig 3 Transcription of perforin, granzyme B and granulysin in PBMC of patients with cryptococcosis

** $P < 0.01$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs cryptococcosis; $n = 40, \bar{x} \pm s$

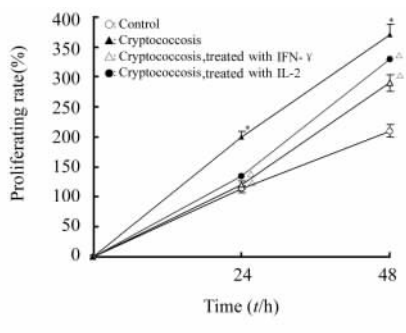


图 4 NK 细胞对隐球菌的生长抑制

Fig 4 Inhibition of *Neoform cryptococcus* growth by NK cells of patients with cryptococcosis

* $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs cryptococcosis; $n = 40, \bar{x} \pm s$

3 讨论

隐球菌病是一种病死率高、预后较差的疾病，目

前临床应用的抗真菌药不良反应比较严重，尤其难以用于具有肝、肾功能障碍的患者。因此，深入研究隐球菌病中宿主与病原体之间的相互作用、激发抗隐球菌感染的保护性免疫反应机制，开发有效的预防和治疗方法，不仅具有重要的社会意义、科学价值，而且将产生巨大的经济效益。

研究^[3]表明，在感染早期，NK 细胞可被病原体及其产物激活，能通过直接的细胞毒性反应或分泌可溶性因子杀死入侵病原体。其主要机制是释放含穿孔素、颗粒酶 B 和颗粒溶素的细胞毒性颗粒，因而分析 NK 细胞的细胞毒性效应因子有助于了解个体的细胞毒性反应能力。除杀伤功能外，NK 细胞还能分泌大量具有免疫调节活性的细胞因子，从而对获得免疫应答进行调节，是联系天然免疫与获得性免疫的桥梁。在隐球菌感染人群中，只有部分免疫功能较为低下的个体才发病。因此在受隐球菌感染而不发病的健康个体中的免疫反应，与发病患者中的免疫反应有所不同。本研究结果表明，与健康对照相比，隐球菌病患者 PBMC 中 CD56⁺ 细胞显著减少，CD18⁺ 细胞显著增加，CD8⁺、CD19⁺ 细胞增加，CD8⁺/CD28⁺ 比例增高。CD56 是 NK 细胞的标志物，CD18 表达于淋巴细胞和髓细胞，与 CD11a、b、c 以及细胞间黏附分子 (ICAM) 等黏附分子结合，起调理吞噬、黏附的作用，因此提示隐球菌病的病程中，天然免疫系统包括 NK 细胞、巨噬细胞等发挥着重要的作用。由于 NK 细胞的减少导致患者天然免疫力降低，抵抗病原体入侵的能力不足，而导致疾病的发生。尽管 CD8⁺、CD19⁺ 细胞增加，CD8⁺/CD28⁺ 比例增高，但仍不足以代偿 NK 细胞的不足，因此在隐球菌病的治疗中需要寻找激发 NK 细胞功能以恢复足够的杀伤病原体的正常天然免疫作用。

与健康对照相比，隐球菌患者 PBMC 中 NK 细胞的细胞毒性活性显著降低。随着效/靶比的增加，NK 细胞的细胞毒性活性也增加。这提示，隐球菌病患者的 NK 细胞活性受损，导致对病原体的抵抗力不足；而另一方面，隐球菌的入侵，也可能损伤 NK 细胞功能，尤其当侵入病原体量越大，可能导致对 NK 细胞损伤越大^[4]。在细胞毒性活性实验中，加入 IFN- α 或 IL-2 共同孵育，可显著增高 NK 细胞的细胞毒性活性，提示辅以一定的细胞因子刺激，可提高已受损的 NK 细胞的活性，有助于机体发挥天然免疫效应以杀伤病原体。隐球菌病患者 PBMC

培养上清液中, IFN- γ 显著低于健康对照组, 说明 IFN- γ 在机体抗隐球菌的反应中也起着重要作用, 提示在临床治疗中应用 IFN- γ 提高疗效的可能性。通过定量 PCR 检测, 隐球菌患者中穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素的转录水平显著降低。加入 IFN- α 或 IL-2 共同孵育, 可增高三者的转录水平, 从而有助于提高机体杀伤入侵病原体的能力。因此, 检测这些杀伤相关分子的水平, 有助于即时了解患者体内免疫系统的细胞毒性活性, 实现临床治疗的个体化调控。隐球菌病患者 NK 细胞抑制新生隐球菌生长的能力明显降低。IFN- α 或 IL-2 可明显增强 NK 细胞对新生隐球菌生长的抑制作用。另一方面, 外来病原体的入侵也可能导致机体免疫功能的下降^[5]。本研究表明, 隐球菌病患者 NK 细胞降低, 细胞免疫反应能力下降。但这究竟是由于患者本身先有 NK 细胞缺陷而后导致隐球菌病的发生, 或是隐球菌感染进一步损伤 NK 细胞功能, 尚需进一步研究。

本研究结果表明, IL-2 或 IFN- α 能显著上调 NK 细胞的杀伤活性, 提示利用一定的细胞因子如 IL-2 或 IFN- α , 可调节 NK 细胞功能, 进行隐球菌病免疫干预治疗, 具有一定的实践意义。

通常情况下, NK 细胞激活后, 颗粒极化聚集, 其间涉及到 PI3、VAV、RAC、PAK、MEK、ERK 等信号分子的作用。在细胞毒性颗粒向外释放的过程中, 影响因素有胞内 Ca²⁺ 浓度、PLC 活化等, 但具体作用机制尚不明确。NK 细胞还能产生许多细胞因子, 如 IFN- γ 可增强 MHC I 类和 II 类分子的表达, 活化巨噬细胞^[6], 如 IL-5、IL-10、IL-13、GM-CSF 和

多种趋化因子可进一步调节其他免疫细胞反应, 吸引免疫反应细胞迁徙至反应位点, 调节抗原特异性免疫反应, 此间涉及多个信号分子链的作用, 包括 JAK、TYK、STAT-1、STAT-2 等^[7]。NK 细胞的激活和发挥功能过程受到抑制性和活化性信号的精确调节, 但其信号调控机制正在进一步研究中。

[参考文献]

- [1] Fournier Y, Bellini C, Baur AS, et al. Disseminated cryptococcosis as inaugural manifestation of AIDS[J]. Schweiz Rundsch Med Prax, 2005, 94:17-23.
- [2] Jacobs R, Heiken H, Schmidt RE. Mutual interference of HIV and natural killer cell-mediated immune response[J]. Mol Immunol, 2005, 42:239-249.
- [3] Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens[J]. Int J Parasitol, 2004, 34:1517-1528.
- [4] Murphy JW, Zhou A, Wong SC. Direct interactions of human natural killer cells with *Cryptococcus neoformans* inhibit granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha production[J]. Infect Immun, 1997, 65:4564-4571.
- [5] Alter G, Malenfant JM, Delabre RM, et al. Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection[J]. J Immunol, 2004, 173:5305-5311.
- [6] Siddiqui AA, Brouwer AE, Wuthiekanun V, et al. IFN- γ at the site of infection determines rate of clearance of infection in Cryptococcal meningitis[J]. J Immunol, 2005, 174:1746-1750.
- [7] Bottino C, Moretta L, Pende D, et al. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from natural killer cells[J]. Mol Immunol, 2004, 41:569-575.

[收稿日期] 2005-12-15

[修回日期] 2006-01-07

[本文编辑] 孙岩

Intercedensides D-I, cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert

Zou Z, Yi Y, Wu H, Yao X, Du L, Jiuhong W, Liaw CC, Lee KH (Research Center for Marine Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Six new triterpene glycosides, intercedensides D-I (1-6), were isolated from the whole bodies of the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert, which is found in the South China Sea. Their structures were elucidated by extensive spectroscopic analysis (NMR and ESIMS) and chemical methods. Intercedensides D (1), E (2), G (4), and H (5) have a conjugated double bond system (22Z,24-diene) in the aglycon side chain, while intercedensides F (3) and I (6) have only a single double bond (24, 25) in this same chain. Intercedensides D-H (1-5) showed significant cytotoxicity (ED₅₀ 0.96-5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against 10 human tumor cell lines.

[J Nat Prod, 2005, 68: 540-546]