

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01291

IL-22 在支气管哮喘患者血清中的表达及其受体 IL-22R1 在人气道细胞中的表达

张 旃¹, 罗雅玲^{1*}, 周丽丽², 赖文岩³, 徐 建⁴, 黎振兴¹, 任敦强¹, 叶 涵¹, 钟浩海¹

1. 南方医科大学南方医院呼吸内科, 广州 510515
2. 南方医科大学南方医院肾内科, 广州 510515
3. 南方医科大学南方医院心血管内科重点实验室, 广州 510515
4. 南方医科大学南方医院肾移植科, 广州 510515

[摘要] **目的** 检测 IL-22 在支气管哮喘患者血清中的表达, 检测 IL-22R1 在人气道上皮细胞、气道平滑肌细胞、肺成纤维细胞中的表达, 寻找 IL-22 作用的靶细胞。**方法** 应用 ELISA 法检测 36 例支气管哮喘患者及 20 例正常对照者血清 IL-22 及 IL-17 的表达, 同时检测 36 例患者肺通气功能, 根据 1 秒率(FEV1/FVC)及 FEV1 占预计值的百分比将支气管哮喘患者分为支气管激发试验阳性组(17 例)和支气管舒张试验阳性组(19 例)。应用实时定量 PCR 检测人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞、人气道上皮细胞 IL-22R1 mRNA 的表达, 用免疫荧光以及蛋白质印迹法检测 IL-22R1 蛋白在上述 3 种细胞中的表达。**结果** 支气管哮喘患者血清 IL-22 及 IL-17 水平与正常对照组相比差异无统计学意义, 但支气管舒张试验阳性组患者血清 IL-22 和 IL-17 水平高于支气管激发试验阳性组($P < 0.05$)。IL-22R1 mRNA 及蛋白在上述 3 种细胞均有表达。**结论** IL-22 可能涉及支气管哮喘的发生发展过程, 气道平滑肌细胞、肺成纤维细胞、人气道上皮细胞可能均是 IL-22 发挥作用的靶细胞。

[关键词] IL-22; IL-22R1; 气道上皮细胞; 气道平滑肌细胞; 肺成纤维细胞

[中图分类号] R 562.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1291-05

Serum IL-22 level in asthmatic patients and expression of IL-22R1 in human airway cells

ZHANG Zhan¹, LUO Ya-ling^{1*}, ZHOU Li-li², LAI Wen-yan³, XU Jian⁴, LI Zhen-xing¹, REN Dun-qiang¹, YE Han¹, ZHONG Hao-hai¹

1. Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China
2. Department of Nephrology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China
3. Laboratory of Cardiovascular Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China
4. Department of Kidney Transplantation, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To examine the serum level of IL-22 in asthmatic patients and the expression of IL-22R1 in human airway epithelial cells, human airway smooth muscle cells, and lung fibroblasts, so as to explore the target cells of IL-22. **Methods** The serum levels of IL-22 and IL-17 in 36 asthmatic patients and 20 normal control subjects were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). And lung function of the asthmatic patients was assessed by Gaeger spirometry. According to the values of FEV1/FVC and FEV1%, the patients were divided into two groups: bronchodilation test positive group (19 patients) and bronchial provocation test positive group (17 patients). The expression of IL-22R1 mRNA in human airway epithelial cells, human airway smooth muscle cells, and lung fibroblasts was examined using real-time PCR, and IL-22R1 protein expression was detected by immunofluorescence staining and Western blotting analysis. **Results** There was no significant difference in serum IL-22 and IL-17 levels between the asthmatic patients and normal controls. The serum IL-22 and IL-17 levels in asthmatic patients positive for bronchodilation test was significantly higher than those positive for bronchial provocation test ($P < 0.05$). IL-22R1 mRNA and protein were detected in all the 3 types of cells. **Conclusion** IL-22 may be involved in the pathogenesis of asthma, and human airway epithelial cells, human airway smooth muscle cells, and lung fibroblasts may all be the target cells of IL-22.

[Key words] IL-22; IL-22R1; airway epithelial cell; airway smooth muscle cell; lung fibroblasts

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(12): 1291-1295]

[收稿日期] 2010-09-16 [接受日期] 2010-11-18

[作者简介] 张 旃, 博士生. E-mail: nlmc@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 020-61641575, E-mail: lyling2005@163.com

近年研究显示 Th17 细胞与支气管哮喘密切相关^[1],而 IL-17 和 IL-22 是 Th17 细胞分泌的 2 种细胞因子。目前关于 IL-17 与支气管哮喘的研究表明,IL-17 涉及支气管哮喘的发生发展过程^[2-3]。IL-22 作为 Th17 细胞分泌的另一重要细胞因子,很可能也参与其中。IL-22 通过与 IL-22 受体复合物结合发挥其生物学作用。IL-22 受体复合物由 IL-22R1 和 IL-10R2 组成^[4-5]。IL-10R2 是一些细胞因子受体的一部分,故 IL-22R1 链是 IL-22 受体复合物的特异性部分。目前研究表明呼吸道系统(肺、气管)人肺泡上皮细胞^[6]和气道上皮细胞^[7]表达 IL-22R1 受体。我们推测 IL-22 如果参与支气管哮喘发生发展过程,除了气道上皮外,气道平滑肌细胞及气道成纤维细胞也有可能表达 IL-22R1 受体。为此我们检测了支气管哮喘患者血清中 IL-22 蛋白表达的水平,并检测了这些患者的肺功能,以考察 IL-22 是否与支气管哮喘的反应性增高有关;同时应用实时定量 PCR 检测人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人胚肺成纤维细胞中 IL-22R1 mRNA 的表达,用免疫荧光和蛋白质印迹法检测上述 3 种细胞 IL-22R1 蛋白的表达,以确定上述细胞是否是 IL-22 的靶细胞,从而拓展 IL-22 在支气管哮喘中作用的研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 IL-22 ELISA 试剂盒、IL-17 ELISA 试剂盒(ADL 公司);TRIzol(Invitrogen 公司);反转录试剂盒(晶美公司);SYBR Green 试剂盒(NEB 公司);IL-22R1 一抗(eBIOSCIENCE 公司,种属来源:兔);FITC 标记羊抗兔二抗(北京博奥森公司), β -actin 一抗(Santa Cruz 公司,种属来源:小鼠),抗 α -actin(北京博奥森公司,种属来源:兔)。

1.2 研究对象 收集自 2006 年 8 月至 2007 年 2 月南方医院呼吸科门诊轻中度哮喘患者(发作期)共 36 例,其中男性 19 例,女性 17 例,平均年龄(38.4±13.9)岁。所有病例均符合 2008 年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的支气管哮喘防治指南^[8]中规定的诊断标准。正常对照组 20 例为正常体检者,其中男性 11 例,女性 9 例,平均年龄(36.6±13.3)岁,近 2 个月无急性感染病史。所有入选者均未患过溃疡性结肠炎、肾脏疾患、类风湿性关节炎等疾病,近 7 个月内均未口服或静脉使用激素类药物。

1.3 肺功能测定 所有哮喘患者均测定肺功能,实

验在耶格强迫振荡肺功能仪上进行,由专人进行操作。根据肺功能用力肺活量(forced vital capacity, FVC)值来分组,如果 FVC 值 \leq 80%预计值,分入支气管舒张试验组(舒张组);如果 FVC 值 $>$ 80%预计值,分入支气管激发试验组(激发组)。激发组共 17 例,男性 8 例,女性 9 例,平均年龄(35.11±14.24)岁;舒张组共 19 例,其中男性 11 例,女性 8 例,平均年龄(41.4±13.3)岁。

1.4 血标本采集及处理 经受试者同意,受试者在行肺功能检查或体检前从肘部静脉采血 5 ml,缓慢放入无抗凝的干燥玻璃管,放置令其凝固、贴壁。再置于 4℃ 冰箱过夜,使血凝块收缩后,吸取上层血清经 $1\ 015 \times g$ 离心 10 min,收集上层血清分装后 -80℃ 冻存同批待测。

1.5 血清中 IL-22、IL-17 的测定 均采用 ELISA 法,操作过程严格按照试剂盒说明书。

1.6 人气道平滑肌细胞原代培养及传代 经患者及家属同意,取南方医科大学附属南方医院胸外科(2006 年 9 月及 10 月)做肺叶切除术患者(女性 2 例,36 岁及 45 岁腺癌患者,无哮喘,无肺部感染,无慢性气道疾病病史)显微镜下显示正常的肺叶、段支气管标本第 2 及 4 级支气管^[9]。采用组织块贴壁培养法,无菌条件下用手术剪及镊小心分离出肺叶或肺段中的小支气管,仔细去除周围结缔组织及血管、软骨后,用冰冷 PBS 反复冲洗后转入含血清的青霉素小瓶中,用虹膜剪将气管平滑肌剪成 1 mm² 左右大小,将组织小块移置于培养瓶底部。将培养瓶放入 37℃、5% CO₂ 孵箱,3~4 h 后组织块贴壁,从瓶侧面再加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,3~4 d 换液 1 次,组织块 7 d 后细胞开始爬出,14 d 生长达到融合,高低起伏成“峰、谷”状,倒置显微镜下进行细胞形态鉴定。经 α -actin 细胞免疫组化染色鉴定为人气道平滑肌细胞。

1.7 人气道上皮细胞 HBE135-E6E7 和人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 的培养及传代 HBE135-E6E7(美国 ATCC)用含 15% 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限工司)、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基,37℃、5% CO₂ 培养箱培养,完全融合后,3~4 d 传代 1 次。当细胞完全融合后,按 2.5×10^4 /cm² 的密度传至 6 孔板继续培养,90% 融合后换成角质化无血清培养基。人胚肺成纤维细胞株 MRC-5(购自中国科学院上海细胞生物学研究所)培养于 DMEM 培养液中,培养液中加入 10% 胎牛血清,

细胞培养在 37℃、5%CO₂培养箱中。

1.8 PCR检测人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞 IL-22R1 mRNA 表达

1.8.1 引物、探针的合成 IL-22R1 基因引物序列:上游 5'-CCC CAC TGG GAC ACT TTC TA-3' (20 bp),下游 5'-TGG CCC TTT AGG TAC TGT GG-3' (20 bp)^[10]。内参基因 GAPDH 引物序列为:上游 5'-TTC GAC AGT CAG CCG CAT CTT-3' (21 bp),下游 5'-ATC CGT TGA CTC CGA CCT TCA-3' (21 bp)。引物由广州泰盛生物有限公司合成。

1.8.2 细胞总 RNA 的提取及反转录反应 按 TRIzol 试剂盒提供的操作步骤提取各组细胞各自的 RNA, -70℃ 保存,按反转录试剂盒提供的操作步骤合成 cDNA(-20℃ 保存)。将得到的 PCR 产物进行凝胶电泳,回收纯化,计算浓度及纯度。

1.8.3 荧光定量 PCR 检测 IL-22R1 表达量 采用 SYBR Green 染料法,按照试剂盒说明书配好反应体系,建立标准曲线后,将每个样本重复 3 次,上机(7000 real-time PCR system, ABI)。反应体系及条件如下: Mix+SYBR 10 μl, F 4P 2 μl, R 4P 2 μl, H₂O 5 μl, 模板 1 μl, 总量 20 μl, 扩增条件: 95℃ 2 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s, 40 个循环。将检测结果进行标准曲线分析,以对待测样品的 IL-22R1 基因进行定量。

1.9 蛋白质印迹法检测人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞 IL-22R1 蛋白的表达

各取 1×10⁶ 人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞抽提总蛋白。以 1 mg/ml BSA 溶液为标准品。以 Bradford 法建立标准曲线, 595 nm 处测定光密度(D)值, 计算样本蛋白原液浓度, -80℃ 保存。制备 12% 分离胶和 5% 积层胶。预电泳(稳压 80 V, 20 min)后点样(50 μg 细胞总蛋白), 电泳(浓缩胶 70 V 电泳 30 min, 分离胶 100 V 电泳 70 min), 转膜(255 mA 转 80 min)。封闭 1 h。用 1:1 000 的一抗孵育, 4℃ 过夜。PBS 清洗 3 次后, 加入 HRP 标记羊抗兔二抗和 HRP 标记羊抗小鼠二抗 1:5 000 孵育, 室温 1 h。PBS 洗涤 3 次, ECL 检测, 暗室曝光成像。

1.10 细胞爬片免疫荧光检测 将细胞爬片在冰甲醇/丙酮-20℃ 固定 5 min。0.1% Triton X-100/0.1% 柠檬酸钠冰浴 5 min 破膜。10% 山羊血清室温 30 min。将细胞爬片分别于稀释比例为 1:80 稀释的 IL-22R1 抗体 37℃ 孵育 1 h。FITC 标记羊抗兔二抗孵

育室温 30 min, 避光。立即以莱卡显微镜拍照。

1.11 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件对两组间的差异进行成组 *t* 检验, 检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 哮喘患者、正常对照血清 IL-22、IL-17 水平的比较 支气管哮喘组与正常对照组 IL-22 血清水平差异无统计学意义 [(234.95 ± 114.96) vs (184.04 ± 57.33) ng/ml, *P* = 0.07], 支气管哮喘组 IL-17 血清水平与正常对照组相比差异无统计学意义 [(276.40 ± 156.15) vs (232.03 ± 136.86) ng/ml, *P* > 0.05]。

2.2 哮喘患者激发组和舒张组血清 IL-22、IL-17 水平比较 舒张组患者血清 IL-22、IL-17 水平均高于激发组患者 [(277.45 ± 129.23) vs (187.45 ± 74.67) ng/ml, *P* = 0.017; (335.82 ± 172.29) vs (209.98 ± 105.17) ng/ml, *P* = 0.013]。

2.3 人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞 IL-22R1 mRNA 的表达 应用 IL-22R1 的标准曲线 ($y = -1.3294 \ln x + 46.199$, $R^2 = 0.997$), 根据所测的 Ct 值, 计算人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞 IL-22R1 mRNA 表达的相对量, 结果显示在人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞以及人肺成纤维细胞均有 IL-22R1 mRNA 的表达 (2.74×10^9 , 2.03×10^9 , 1.68×10^9)。

2.4 蛋白质印迹法检测 IL-22R1 蛋白在人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞中的表达 结果显示在人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞均可见 IL-22R1 蛋白表达(图 1)。

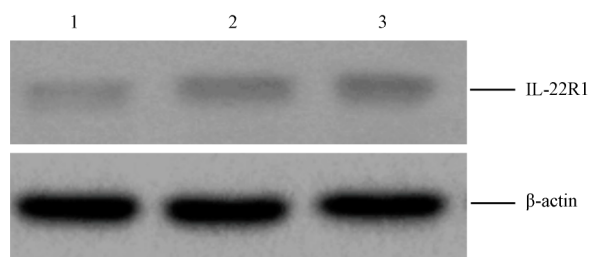


图 1 3 种细胞中 IL-22R1 蛋白的表达

Fig 1 Expression of IL-22R1 protein in three types of cells as showed by Western blotting analysis

1: Human airway epithelial cells; 2: Human airway smooth muscle cells; 3: Human lung fibroblasts

2.5 免疫荧光检测 IL-22R1 在人气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞中的表达 结果

显示在人的气道上皮细胞、人气道平滑肌细胞以及 人肺成纤维细胞均有 IL-22R1 蛋白表达(图 2)。

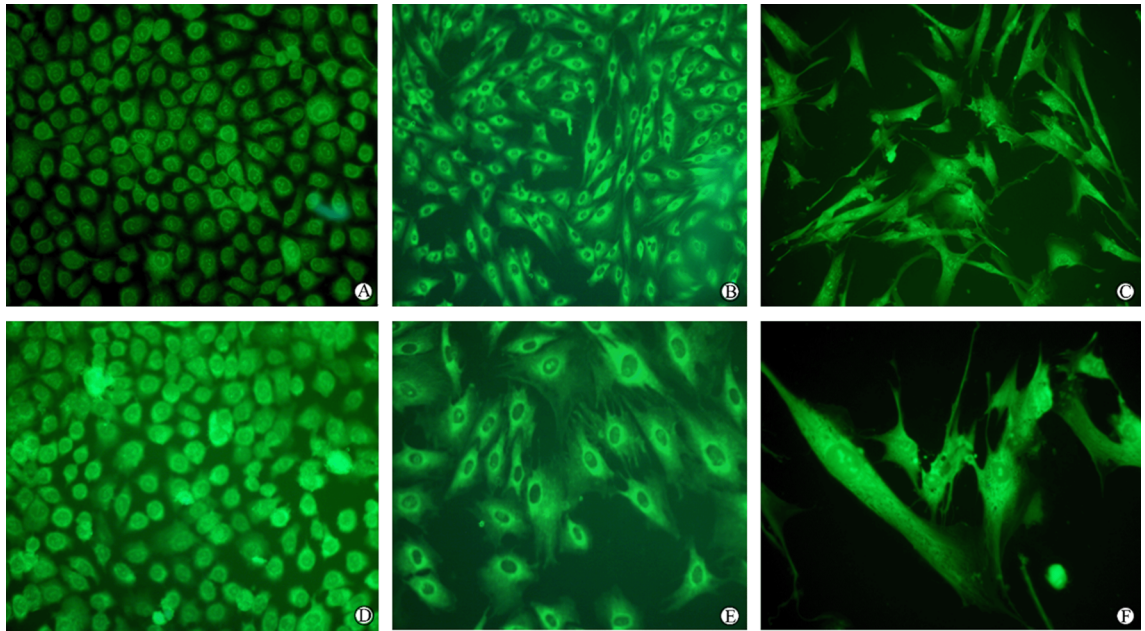


图 2 免疫荧光检测 IL-22R1 蛋白在 3 种细胞中的表达

Fig 2 Expression of IL-22R1 protein in three kinds of cells as detected by immunofluorescence examination

A,D: Airway epithelial cells; B,E: Airway smooth muscle cells; C,F: Lung fibroblasts. Original magnification: ×200(A-C); ×400(D-F)

3 讨论

Th17 细胞是近来研究的热点, Th17 细胞分泌细胞因子 IL-17 和 IL-22, Zhu 等^[1]的研究在细胞水平上显示 Th17 细胞与支气管哮喘密切相关, 而 Barczyk 等^[2]及 Agache 等^[3]的研究则从细胞因子水平表明 Th17 细胞分泌的细胞因子 IL-17 可能涉及支气管哮喘的发生发展过程。而 Th17 细胞分泌的另一细胞因子 IL-22 与支气管哮喘的研究目前较少, 为此我们检测了哮喘患者血清 IL-22、IL-17 的水平, 发现 IL-22 及 IL-17 的血清水平在支气管激发试验阳性组和支气管舒张试验阳性组患者之间差异存在统计学意义, 舒张组 IL-22 及 IL-17 的水平高于激发组。这提示除了目前普遍认为的 IL-17 以外, IL-22 可能也涉及了支气管哮喘的发生发展过程。支气管舒张试验阳性提示患者的肺通气功能异常, 存在气道阻塞, 且这种阻塞与气道平滑肌痉挛相关。因此我们推测 IL-17 和 IL-22 的增高可能与平滑肌痉挛相关, 由于 IL-17 在支气管哮喘中主要涉及作用于单核细胞系^[11], 而目前研究显示免疫细胞不是 IL-22 的靶细胞, 由此我们进一步推测支气管舒张试验阳性患者的气道痉挛可能与 IL-22 水平增高有关, 这也提示气道平滑肌细胞可能是 IL-22 作用的

靶细胞。为此我们检测了人气道平滑肌细胞、人气道上皮细胞以及人肺成纤维细胞 IL-22R1 受体的表达。实时定量 PCR、蛋白质印迹分析及免疫荧光的结果证实, 在人气道平滑肌细胞发现了 IL-22R1 mRNA 以及蛋白的表达。这无疑拓展了我们对 IL-22 在支气管哮喘的发生发展中发挥作用的推测。此外, 我们也发现在人肺成纤维细胞也有 IL-22R1 mRNA 以及蛋白的表达, 其意义值得进一步研究。而我们在人气道上皮细胞发现有 IL-22R1 mRNA 以及蛋白的表达, 这与 Aujla 等^[7]的报道一致。我们未能发现支气管哮喘患者组与正常对照组血清的 IL-22、IL-17 水平有显著性差异, 这与 Chen 等^[12]及 Wong 等^[13]的检测结果不一致, 这可能与我们入选的支气管哮喘患者病情程度较轻有关。

支气管哮喘的发生发展涉及气道多个体细胞的参与, 包括气道上皮、气道平滑肌细胞和成纤维细胞。我们的结果显示人气道平滑肌细胞、人肺成纤维细胞以及人气道上皮细胞均有 IL-22R1 的表达。这提示呼吸系统中 IL-22 的靶细胞不仅仅只有肺泡上皮细胞和气道上皮细胞, 平滑肌细胞和肺成纤维细胞也是 IL-22 的靶细胞。结合本研究中显示的支气管舒张试验阳性患者 IL-22、IL-17 水平显著高于支气管激发试验阳性组, 我们有理由推测: IL-22 可

能参与支气管哮喘的发生发展过程,它对支气管哮喘发生发展的影响很可能是通过多种作用多种结构细胞产生的。

[参考文献]

- [1] Zhu J, Yamane H, Paul W E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*) [J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 445-489.
- [2] Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine [J]. *Respir Med*, 2003, 97: 726-733.
- [3] Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma [J]. *Respir Med*, 2010, 104: 1131-1137.
- [4] Kotenko S V, Izotova L S, Mirochnitchenko O V, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly R P, et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10R beta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 2725-2732.
- [5] Logsdon N J, Jones B C, Allman J C, Izotova L, Schwartz B, Pestka S, et al. The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation [J]. *J Mol Biol*, 2004, 342: 503-514.
- [6] Whittington H A, Armstrong L, Uppington K M, Millar A B. Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31: 220-226.
- [7] Auja S J, Kolls J K. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense [J]. *J Mol Med*, 2009, 87: 451-454.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31: 180-185.
- [9] Watanabe S, Yamasaki A, Hashimoto K, Shigeoka Y, Chikumi H, Hasegawa Y, et al. Expression of functional leukotriene B4 receptors on human airway smooth muscle cells [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124: 59-65, e1-e3.
- [10] Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52: 1037-1046.
- [11] Sergejeva S, Linden A. Impact of IL-17 on cells of the monocyte lineage in health and disease [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2009, 9: 178-186.
- [12] Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis [J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30: 539-545.
- [13] Wong C K, Ho C Y, Ko F W, Chan C H, Ho A S, Hui D S, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma [J]. *Clin Exp Immunol*, 2001, 125: 177-183.

[本文编辑] 尹 茶

· 消 息 ·

《中华临床医师杂志(电子版)》2011年度征稿征订启事

《中华临床医师杂志(电子版)》由国家卫生部主管,中华医学会主办,是中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊。半月刊,全年出刊24期,定价672元,国内刊号CN 11-9147/R,邮发代号80-728,以电子版、纸版导读同时面向全国公开发行人,被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

本刊2011年上半年刊出重点栏目分别为:耳鼻咽喉、口腔颌面部肿瘤;泌尿生殖系肿瘤;儿童心脑血管病;乳腺肿瘤;脊柱及关节疾病;内镜在消化系统疾病中的应用;呼吸系统肿瘤;内分泌及代谢疾病;肠内及肠外营养;高血压及并发症;肝胆肿瘤;危重症的处理等。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿信箱:北京市100035-50信箱 编辑部收 邮编100035

投稿邮箱:Lcdoctor@163.com

电话:010-62219211

传真:010-62222508

网址:<http://www.clinicmed.net>