

文章编号:1004-7220(2019)02-0121-06

· 肿瘤生物力学专栏 ·

基质刚度通过调节 YAP 活化控制乳腺癌细胞的耐药性

秦翔, 吕晓莹, 李顺, 李莉, 江莹, 刘贻尧

(电子科技大学 生命科学与技术学院, 生物物理系, 成都 610054)

摘要:目的 探究肿瘤细胞外基质刚度调控细胞耐药性的详细分子机制。方法 制备不同基质刚度的软基底(10 kPa)、硬基底(38 kPa)和刚性基底(57 kPa)聚丙烯酰胺水凝胶,模拟体内乳腺癌不同阶段的物理基质刚度。结果 硬基底刚度上的乳腺癌细胞增殖率明显高于软基底和刚性基底。乳腺癌细胞对阿霉素的内吞在硬基底上显著低于软基底和刚性基底。在硬基底上 YAP 的入核水平相比软基底和刚性基底显著增加,证实 YAP 是参与肿瘤细胞耐药性的关键分子。结论 基质刚度可通过 YAP 活化调节乳腺癌细胞的耐药性。研究结果不仅为阐明乳腺癌细胞耐药机制提供新方向,也为开发乳腺癌治疗的药物传递系统奠定新基础。

关键词:基质刚度; 内吞; 入核; 耐药性

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.02.002

Matrix Stiffness Regulates Drug Resistance of Breast Cancer Cells Through YAP Activation

QIN Xiang, LÜ Xiaoying, LI Shun, LI Li, JIANG Ying, LIU Yiyao

(Department of Biophysics, School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China)

Abstract: Objective To investigate the detailed molecular mechanism of matrix stiffness regulating cell drug resistance. **Methods** Polyacrylamide hydrogels of soft substrate (10 kPa), hard substrate (38 kPa) and rigid substrate (57 kPa) with different matrix stiffness were configured to simulate the physical matrix stiffness at different stages of breast cancer *in vivo*. **Results** The cell proliferation rate of the hard substrate was significantly higher than that of the soft and rigid substrates. The intracellular endocytosis was significantly lower on the hard substrate. The YAP nucleus translocation increased significantly on the hard substrate, compared with the soft and the rigid substrates, indicating that YAP was a key molecule involved in drug resistance of tumor cells. **Conclusions** Matrix stiffness could regulate the drug resistance of breast cancer cells through YAP activation. This study not only provides a new direction for elucidating the mechanism of drug resistance, but also lays a new foundation for the drug delivery system of breast cancer treatment.

Key words: matrix stiffness; uptake; nucleus translocation; drug resistance

收稿日期:2018-12-28; 修回日期:2019-01-29

基金项目:国家自然科学基金项目(11772088, 31700811, 11802056, 31800780)

通信作者:刘贻尧,教授,博士研究生导师, E-mail: liuyiyao@uestc.edu.cn

乳腺癌是由乳腺发育不良等多种因素引起的疾病,存在高度的异质性。化疗是目前乳腺癌的主要治疗方法,但患者容易出现耐药性。因此,研究细胞耐药性的机制以进一步优化乳腺癌治疗方案是目前临床上迫切需要解决的问题。肿瘤细胞的发生和发展与肿瘤微环境密切相关,可为肿瘤的侵袭、转移和耐药提供必要的物质基础^[1-6]。细胞和微环境之间的相互作用受细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的调节。ECM物理性质(如空间排列、孔径、基质刚度、拓扑结构和溶解性)不仅可以确保组织的完整性,还可以调节细胞对微环境的响应行为。ECM从产生、交联到降解和重塑都是动态过程,如果发生异常,通常伴有癌症和组织纤维化等疾病的发生。实体瘤的发展通常伴有ECM的异常交联、重塑和组织硬度的增加^[7]。因此,临床上肿瘤组织硬度可以用作辅助肿瘤诊断的手段。ECM异常直接导致细胞的恶性转化和转移,还可以在微环境中转化间充质细胞,产生大量的基质降解酶、趋化因子和生长因子,形成新的促进肿瘤发生发展的微环境^[6,8]。

对组织生理过程的研究主要集中在生理过程中的生化信号。然而,许多器官功能障碍和疾病可以理解为由组织力学性质的变化引起。例如,动脉粥样硬化的特征通常在于血管壁硬度的增加。随着年龄增长,血管壁基质和细胞的组成发生变化,导致血管壁的刚性增加。在生理条件下,血管组织的弹性模量约为30 kPa;而在病理条件下,由于间充质干细胞的增殖和培养基向内膜的迁移,大量的胶原和细胞外基质分泌,可导致血管壁刚度增加到80 kPa^[9]。与组织力学功能障碍相关的其他疾病,包括由胶原沉积引起的硬皮病均表明肿瘤微环境的力学性质与疾病取向密切相关。

细胞对ECM的生化 and 生物力学特征有响应,这些反应涉及如增殖、凋亡、迁移和分化等多种行为,对人类健康至关重要。与正常细胞一样,肿瘤细胞也具有这种反应特征。然而,与正常细胞不同,癌细胞通常在响应ECM时失调,并表现出抗性和形成复发性肿瘤的能力。越来越多的证据表明,ECM可以调节肿瘤的生长和转移,增加的ECM刚度是肿瘤发生发展的关键特

征之一^[10]。肿瘤ECM的刚度与正常组织相比,胶原蛋白的沉积量增加,这种差异与肿瘤细胞转移潜能的改变有关^[11]。细胞膜表面的整合素不仅可以与细胞连接到ECM,还可以响应机械力的变化激活生化信号网络^[12-13]。Plodinec等^[14]使用压痕型原子力显微镜研究从健康到恶性转化过程中肿瘤微环境的力学性质,他们测量了纳米级组织样本的刚度图,并评估乳腺癌的良性和恶性病变。结果表明,良性组织的刚度峰宽,伴随着组织纤维化导致其比正常组织更硬;较低硬度部分是间质纤维化中的成纤维细胞。这些结果解释了肿瘤发展不同阶段的力学分布,可用于在肿瘤组织学检查前检测样本的力学性质,从而提高诊断的可靠性。

YAP(Yes相关蛋白)和TAZ(PDZ结合基序,也称为WWTR1)转录共激活因子具有转录共激活活性,调节靶基因的转录过程。YAP和TAZ在癌症的发展中也起着关键作用。Kim等^[15]研究证实,黑色素瘤细胞可以通过肌动蛋白的重塑促进YAP/TAZ的活性。研究发现,微环境刚度可通过YAP/TAZ调节细胞对拉帕替尼的耐药性^[16]。YAP磷酸化是YAP的失活状态,磷酸化的YAP停留在细胞质中与14-3-3蛋白结合,启动泛素化降解途径。YAP的激活则表现为入核,从而启动下游基因转录的程序。

除了加速肿瘤的发展外,肿瘤组织刚度的增加还可能影响耐药性并增加治疗难度。目前,ECM引起的耐药性变化研究主要集中在两个方面:①改变药物的扩散和药物进出细胞的速度。抗肿瘤药物在具有高胶原蛋白含量(高硬度)的肿瘤组织中的渗透比在低胶原蛋白含量(低硬度)的组织中慢^[17-18]。②降低细胞对药物的敏感性(如减少细胞凋亡)。但目前对于特异性信号传导的分子机制尚不清楚。为研究不同基质刚度对乳腺癌细胞耐药性的影响及其调控机制,本文采用聚丙烯酰胺水凝胶模拟乳腺癌不同阶段的基质刚度,分别确定10、38、57 kPa模拟良性组织(纤维瘤)、恶性组织和骨转移发生时的肿瘤细胞刚度。深入探究基质刚度和细胞耐药性之间的关系及其潜在的调节机制,有助于癌症耐药性研究,并为疾病的治疗提供新的视角。

1 材料和方法

1.1 抗体和试剂

L15 细胞培养基、青霉素、链霉素和新生小牛血清购自美国 Gibco 公司。针对 Ki67 的多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, YAP 购自美国 Santa Cruz Technology 公司, DAPI 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 细胞培养

三阴性人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 获自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection)。将细胞培养在含有 10% 新生小牛血清、1% 青霉素和链霉素的 L15 培养基中。培养条件为 37 °C 加湿培养箱中。

1.3 聚丙烯酰胺水凝胶制备

聚丙烯酰胺水凝胶 (PA 凝胶) 的制备参考了 Tse 等^[19] 的研究。在过硫酸铵 (APS) 和四甲基乙二胺 (TEMED) 的催化下, 丙烯酰胺和亚甲基双丙烯酰胺发生自由基凝胶化反应。PA 凝胶刚度分别为 10、38、57 kPa。对于每种硬度凝胶的配方, 10 mL PA 凝胶的组成如表 1 所示。

表 1 聚丙烯酰胺水凝胶构成

Tab.1 Formation of polyacrylamide hydrogel

基质刚度/kPa	40% 丙烯酰胺/mL	2% 双丙烯酰胺/mL	水/mL	10% 过硫酸铵/ μ L	四甲基乙二胺/ μ L
10	2.5	0.5	7.0	100	10
38	2.5	1.5	6.0	100	10
57	2.0	2.5	5.5	100	10

1.4 免疫荧光染色

将接种在玻璃盖玻片上的细胞用 4% 多聚甲醛在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中室温下固定 15 min, 之后用含 1% BSA 的 PBST (1×PBS, 0.1% Tween-20) 封闭。1 h 后将细胞与指定的一抗一起在 4 °C 温育过夜, 并在室温下用 Alexa 偶联的二抗染色 1 h。在 PBST 中洗涤 3 次 5 min 后, 在共聚焦激光扫描显微镜 (FV1000, Olympus 公司, 日本) 下观察样品。使用 Image J 软件 (NIH 公司, 美国) 分析共聚焦图像的荧光强度和共定位情况。

1.5 统计分析

为减小误差, 每个实验重复至少 3 次, 数据以均值 \pm 标准差显示, t 检验用于双尾分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.005$ 表示统计学上

存在极显著的差异。

2 结果

2.1 硬基底促进乳腺癌细胞增殖

肿瘤细胞的增殖与肿瘤的生长、转移和复发密切相关。细胞死亡是正常生物体发育过程中的重要组成部分^[20], 细胞增殖和死亡之间的稳定状态对于维持正常的生理过程至关重要。因此, 研究阿霉素处理 MDA-MB-231 细胞后在不同硬度基底上的增殖情况。

将 MDA-MB-231 细胞接种于不同硬度的聚丙烯酰胺水凝胶上, 培养 24 h, 之后用 3 mg/L 阿霉素处理细胞 48 h。通过免疫荧光检测 ki67 的表达, 其中蓝色表示 DAPI 染色的细胞核, 绿色表示 ki67。可以看出, 在 10、57 kPa 硬度基底上细胞 ki67 的表达显著低于 38 kPa 硬度基底。由此可知, 阿霉素处理后 10、57 kPa 硬度基底上细胞增殖明显低于 38 kPa 硬度基底, 说明 10、57 kPa 硬度基底上细胞对阿霉素更敏感 (见图 1)。

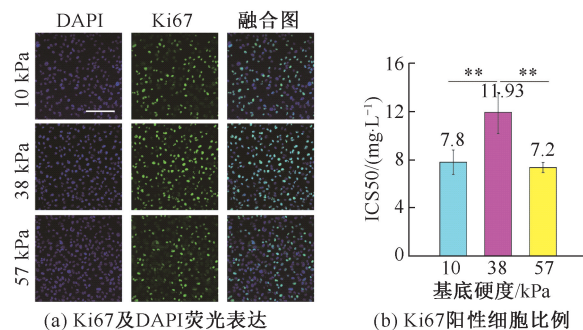


图 1 硬基底刚度促进细胞增殖 (** $P < 0.005$)

Fig.1 Hard stiffness promoted cell proliferation (a) Fluorescence expression of Ki67 and DAPI, (b) Proportion of Ki67 positive cells

2.2 硬基底刚度降低乳腺癌细胞对阿霉素的摄取

阿霉素作为拓扑异构酶 II 抑制剂, 广泛用于乳腺癌的临床治疗^[21]。由于细胞药物摄入量的减少意味着耐药性增强, 故研究不同硬度基底上细胞对阿霉素的摄取情况。首先, 通过免疫荧光观察不同硬度基底上细胞对阿霉素的吸收, 其中蓝色为细胞核, 红色为阿霉素。10、57 kPa 硬度基底上细胞荧光强度显著高于 38 kPa 硬度基底, 表明 38 kPa 硬度基底上细胞内阿霉素含量较低。上述结果表明, 与 10、57 kPa 硬度基底相比, 38 kPa 硬度基底显著

降低了细胞对阿霉素的摄取(见图2)。

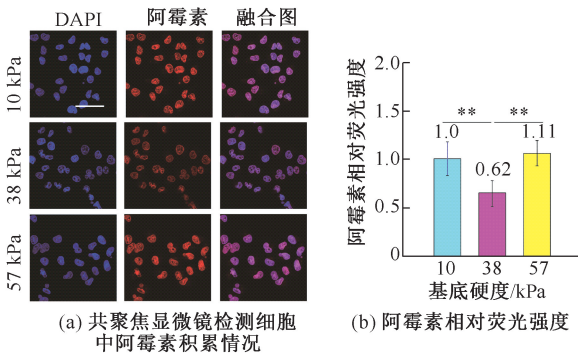


图2 刚性基质降低乳腺癌细胞对阿霉素的摄取 (** $P < 0.005$)

Fig.2 Hard stiffness decreased breast cancer cells doxorubicin uptake (a) Accumulation of doxorubicin in cells detected by confocal microscopy, (b) Relative fluorescence intensity of doxorubicin

2.3 硬化基质诱导 YAP 的活化

在乳腺癌细胞的刚度依赖型耐药中,研究能否通过调节 YAP 的入核最终调节乳腺癌细胞的耐药性。共聚焦显微镜检测不同刚度基底上细胞中 YAP 的定位和荧光强度情况,蓝色为细胞核,绿色为 YAP,比例尺为 40 μm 。结果表明,38 kPa 硬度基底上细胞核中的 YAP 荧光强度显著强于细胞质,在 57、10 kPa 硬度基底上则不明显。定量分析 YAP 细胞核荧光大于细胞质荧光细胞占所有细胞的比

例后发现,38 kPa 硬度基底上 YAP 的入核细胞占比显著高于其他硬度基底,说明 YAP 在 38 kPa 硬度基底上具有最高的细胞入核比例(见图3)。

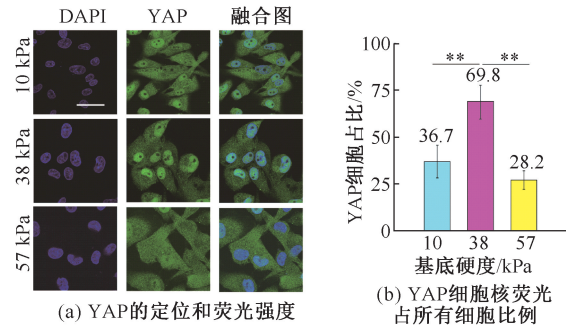


图3 硬基底刚度诱导的 YAP 活化 (** $P < 0.005$)

Fig.3 Hard stiffness induced YAP activation

(a) Localization and fluorescence intensity of YAP, (b) Proportion of nuclear fluorescence of YAP cells to all cells

2.4 硬化基质上调 YAP 靶基因及 P-gp 表达

基质刚度能够调节 YAP 的入核,而 YAP 作为转录因子,进入细胞核后会发挥转录活性,激活下游靶基因的表达。对 YAP 的两个靶基因 CTGF 和 CYR61 进行检测,发现 YAP 的转录活性在 38 kPa 硬度基底上显著高于 57、10 kPa 硬度基底,说明 YAP 在 38 kPa 硬度基底上具有高转录活性,进而可参与调节乳腺癌细胞的耐药性(见图4)。

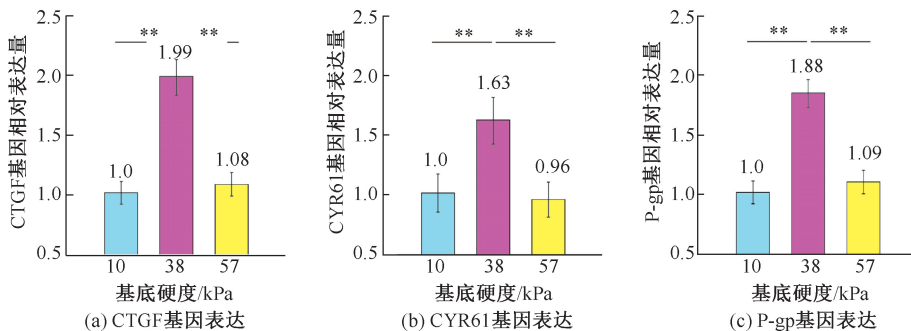


图4 硬基底上调 YAP 靶基因及 P-gp 表达

Fig.4 Hard stiffness upregulated YAP target gene and P-gp expression (a) CTGF mRNA, (b) CYR61 mRNA, (c) P-gp expressions

3 讨论与结论

力学微环境是肿瘤微环境的重要组成部分之一,胞外基质刚度是细胞对力学微环境的直接感受载

体^[22-23]。肿瘤 ECM 的硬度差异能调节增殖、凋亡和迁移等诸多过程。研究发现,ECM 的异常交联和沉积可导致基质硬度的增加^[24-25]。在癌症的治疗中,细胞会逐渐产生耐药性,这是癌症患者预后不

良的重要因素,故探讨肿瘤细胞的耐药机制十分必要。目前,耐药性研究目前主要从药物灭活、药物靶标改变、药物外排、DNA 损伤修复和细胞凋亡抑制等方面进行。然而,关于基质刚度和耐药性之间关系的研究却很少。本文针对乳腺癌细胞,通过制备不同硬度聚丙烯酰胺水凝胶,模拟不同阶段乳腺癌的组织特征,发现基底为 38 kPa 时细胞增殖明显强于 10、57 kPa 硬度基底,凋亡细胞比例也显著减少。38 kPa 硬度基底上细胞对药物内吞降低、外排增强,均显示出细胞的耐药性。研究还表明,基质硬度可通过调节整合素的激活和表达来调节细胞正常表型向恶性表型的转化^[26],这种微环境变化有助于癌症的发生发展。

肿瘤组织硬度的变化对细胞耐药性存在影响。本文证明不同的基质刚度可以引发细胞耐药性的差异,并探索其相关的分子机制,寻求能够将刚度这种力学信号传递给细胞的分子途径,从而改变细胞对药物的反应。YAP/TAZ 是一种共转录激活因子,参与了细胞耐药的进程。研究表明,YAP 可以作为细胞中的力学敏感分子,响应各种细胞外力学状态的变化^[27]。此外,YAP 还可以通过参与多种信号传导途径来调节细胞耐药性^[15,28]。本研究发现,YAP 的入核在 38 kPa 硬度基底上最高,而在 10、57 kPa 硬度基底不明显。因此,将刚性的力学信号传递给细胞的关键分子,能够改变细胞对药物的反应。P-gp 作为耐药性的关键分子,其高表达表现为更强药物的泵出能力,即表现为更强的耐药性。

因为细胞在硬质基质上产生更大的张力,细胞往往会在较硬的基质上扩散。在一定范围内,随着刚度增加,细胞铺展面积和周长的增长速度加快。当刚度继续增加时,铺展区域和周长的增长率降低。除了影响细胞面积和周长外,基质刚度还可以减少细胞铺展时间。在干细胞中,中等硬度基质上细胞的应力纤维方向平行于细胞的长轴方向。基质刚度可能通过影响细胞铺展和细胞骨架排列调节细胞运动。当细胞前端与硬质基质接触时,细胞迁移到硬质基质上。相反,硬基底上的细胞前端与软基底接触时,伪足则会缩回,同时迁移方向将改变。鉴于 YAP 可能与肌动蛋白和整联蛋白连接以及不同基质中细胞骨架形态的分布存在关联,细胞骨架和耐药性之间的相关性值得进行更深入的研究。

肿瘤基质刚度的增加主要是由于 I 型胶原纤维的沉积所致。在肿瘤生长期间,胶原蛋白呈现纤维化并形成紧密束的形态。临床上可以使用成像或微创活检来确定胶原重组和肿瘤基质硬度的变化,以此作为确定肿瘤转移或患者预后风险的标准之一。因此,基质刚度在肿瘤微环境的影响力不言而喻。本研究发现,38 kPa 基质刚度下肿瘤微环境的高抗药性是通过 YAP 的入核活化实现。该研究结果为阐明癌症定位和发展的机制奠定理论基础,还从药物选择的角度为临床肿瘤的诊断和治疗提供思路。

参考文献:

- [1] BAHK YW. On launching a new twenty-first century quarterly journal, nuclear medicine and molecular imaging [J]. Nucl Med Mol Imaging, 2010, 44(1): 1-2.
- [2] LI S, CHEN Y, ZHANG Y, et al. Shear stress promotes anoikis resistance of cancer cells via caveolin-1-dependent extrinsic and intrinsic apoptotic pathways [J]. J Cell Physiol, 2018, 234(4): 3730-3743.
- [3] LI S, XIONG NY, PENG YT, et al. Acidic pHe regulates cytoskeletal dynamics through conformational integrin beta 1 activation and promotes membrane protrusion [J]. BBA-Mol Basis Dis, 2018, 1864(7): 2395-2408.
- [4] ZHANG J, LI L, PENG Y, et al. Surface chemistry induces mitochondria-mediated apoptosis of breast cancer cells via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. BBA-Mol Cell Res, 2018, 1865(1): 172-185.
- [5] 江莹,李顺,杨红,等. RalA 通过小窝蛋白-1 调节肿瘤细胞活性氧自由基和三磷酸腺苷的生成 [J]. 医用生物力学, 2017, 32(5): 458-463.
JIANG Y, LI S, YANG H, et al. RalA regulates ROS and ATP production in cancer cells by association with caveolin-1 [J]. J Med Bioemch, 2017, 32(5): 458-463.
- [6] 李莉,熊妮妮,张婧,等. 肿瘤细胞间相互作用:Notch-1 信号转导与调控机制 [J]. 医用生物力学, 2016, 31(3): 284-290.
LI L, XIONG NY, ZHANG J, et al. cancer cell-cell interaction: Notch-1 signaling pathway and its regulation mechanisms [J]. J Med Bioemch, 2016, 31(3): 284-290.
- [7] LOPEZ JI, KANG I, YOU WK, et al. In situ force mapping of mammary gland transformation [J]. Integr Biol, 2011, 3(9): 910-921.
- [8] LU P, WEAVER VM, WERB Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression [J]. J Cell Biol, 2012, 196(4): 395-406.

- [9] ROSS R. Atherosclerosis-An inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [10] DUDA DG, DUYVERMAN AM, KOHNO M, *et al.* Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21677-21682.
- [11] PROVENZANO PP, ELICEIRI KW, CAMPBELL JM, *et al.* Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion [J]. *BMC Med*, 2006, 4(1): 38.
- [12] LEVENTAL KR, YU H, KASS L, *et al.* Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 891-906.
- [13] 赵凤龙, 李莉, 杨红, 等. 整合素介导血源性转移中肿瘤细胞与宿主细胞相互作用规律研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(2): 180-187.
 ZHAO FL, LI L, YANG H, *et al.* Integrin-mediated tumor cell-host cell interaction during hematogenous metastasis and their regulatory mechanisms [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(2): 180-187.
- [14] PLODINEC M, LOPARIC M, MONNIER CA, *et al.* The nanomechanical signature of breast cancer [J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7(11): 757-765.
- [15] KIM MH, KIM J, HONG H, *et al.* Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation [J]. *Embo J*, 2016, 35(5): 462-478.
- [16] LIN CH, PELISSIER FA, ZHANG H, *et al.* Microenvironment rigidity modulates responses to the HER2 receptor tyrosine kinase inhibitor lapatinib via YAP and TAZ transcription factors [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(22): 3946-3953.
- [17] TREDAN O, GALMARINI CM, PATEL K, *et al.* Drug resistance and the solid tumor microenvironment [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(19): 1441-1454.
- [18] NETTI PA, BERK DA, SWARTZ MA, *et al.* Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(9): 2497-2503.
- [19] TSE JR, ENGLER AJ. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties [J]. *Curr Prot Cell Biol*, 2010, doi: 10.1002/0471143030.cb1016s47.
- [20] JACOBSON MD, WEIL M, RAFF MC. Programmed cell death in animal development [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 347-354.
- [21] KWON J, EOM KY, KOO TR, *et al.* A prognostic model for patients with triple-negative breast cancer: Importance of the modified nottingham prognostic index and age [J]. *J Breast Cancer*, 2017, 20(1): 65-73.
- [22] 施兴华, 张路姚, 李博, 等. 肿瘤及其微环境的力学问题 [J]. *力学进展*, 2018, 48, doi: 10.6052/1000-0992-16-039.
- [23] 冯西桥, 薛时磊, 李博, 等. 肿瘤力学生物学 [J]. *医用生物力学*, 2018, 32(S): 61-73.
 FENG XQ, XUE SL, LI B, *et al.* Mechnobiology of tumors [J]. *J Med Biomech*, 2018, 32(S): 61-73.
- [24] KIM DH, WONG PK, PARK J, *et al.* Microengineered platforms for cell mechanobiology [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2009, 11: 203-233.
- [25] LO CM, WANG HB, DEMBO M, *et al.* Cell movement is guided by the rigidity of the substrate [J]. *Biophys J*, 2000, 79(1): 144-152.
- [26] TZIMA E, DEL POZO MA, SHATTIL SJ, *et al.* Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment [J]. *Embo J*, 2001, 20(17): 4639-4647.
- [27] FISCHER M, RIKEIT P, KNAUS P, *et al.* YAP-mediated mechanotransduction in skeletal muscle [J]. *Front Physiol*, 2016, doi: 10.3389/fphys.2016.00041.
- [28] JIA Z. Role of integrin-linked kinase in drug resistance of lung cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 1561-1565.