

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.05.006

过表达 miR-153 非小细胞肺癌细胞稳转株的构建及鉴定 *

赵国丽^{1,2} 杨彤^{1,2} 陈为军³ 王朝霞² 牛世英^{1,2} 张月英^{2Δ} 王兆朋^{2Δ}

(1 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院 山东 济南 250200;

2 山东省医学科学院基础医学研究所 山东第一医科大学 山东 济南 250062; 3 烟台山医院肿瘤内科 山东 烟台 264000)

摘要 目的:构建过表达 miR-153 的非小细胞肺癌的稳转细胞株,为进一步探讨 miR-153 在肺癌发生发展中的作用奠定基础。**方法:**构建具有嘌呤霉素抗性的 miR-153 慢病毒载体;体外培养非小细胞肺癌细胞系 SPC-A-1 和 A549,加入浓度梯度的嘌呤霉素溶液,筛选出最佳浓度;使用慢病毒转染细胞株,并在转染 72 h 后用荧光显微镜检测绿色荧光蛋白(EGFP)的表达,评价转染效率;体外实验使用 PCR 检测 miR-153 在稳转株的表达;稳转株移植裸鼠体内成瘤,取出瘤体后检测瘤体内 EGFP 和 miR-153 的表达。**结果:**完成过表达 miR-153 慢病毒载体及阴性对照载体的构建;确定嘌呤霉素最佳筛选浓度:在 SPC-A-1 细胞中的浓度为 2.0 g/mL, A549 细胞中的浓度为 3.0 g/mL;目的基因 miR-153 被慢病毒成功导入 SPC-A-1 细胞和 A549 细胞中,荧光显微镜下能直接观察到 EGFP。转染 miR-153 组和阴性对照组的 PCR 实验结果显示:在 SPC-A-1 细胞中,miR-153 的表达量为 92.9 ± 20.6 ,明显高于阴性对照组($P=0.016$);在 A549 细胞中,miR-153 的表达量为 2624.6 ± 153.4 ,显著高于阴性对照组($P<0.001$)。稳转株能在裸鼠体内形成移植瘤,瘤体内有明显 EGFP 的表达;与阴性对照组的瘤体相比,移植瘤组 miR-153 的表达量为显著上调($P=0.048$)。**结论:**成功构建过表达 miR-153 的非小细胞肺癌的稳转细胞株。

关键词:慢病毒载体;miR-153;非小细胞肺癌

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)05-827-05

Construction and Identification of miR-153 Overexpression in the Non-small Cell Lung Cancer Cell Stable Lines*

ZHAO Guo-li^{1,2}, YANG Tong^{1,2}, CHEN Wei-jun³, WANG Zhao-xia², NIU Shi-ying^{1,2}, ZHANG Yue-ying^{2Δ}, WANG Zhao-peng^{2Δ}

(1 School of Medicine and Life Science, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong, 250200, China;

2 Institute of Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong, 250062,

China; 3 Department of Medical Oncology, Yantai Hospital, Yantai, Shandong, 264000, China)

ABSTRACT Objective: To construct stable cell lines of non-small-cell lung cancer overexpressed miR-153 and further explore its role in the development of non-small-cell lung cancer. **Methods:** Mir-153 lentivirus vector with puromycin resistance was constructed. Non-small cell lung cancer cell lines SPC-A-1 and A549 were cultured in vitro and the concentration gradient of puromycin solution was added to determine the optimal concentration. Lentivirus was used to transfect cell lines, and the expression of green fluorescent protein (EGFP) was detected with a fluorescence microscope 72 h after transfection to evaluate the transfection efficiency. In vitro, PCR was used to detect the expression level of mir-153 in stable cell lines. Tumor formation in nude mice was obtained by transplanting the stable cell lines, and the expression of EGFP and miR-153 in the tumor was detected. **Results:** The construction of mir-153 lentivirus vector and negative control vector was completed. The optimal concentration of puromycin was determined: 2.0 g/mL in SPC-A-1 cells and 3.0 g/mL in A549 cells. Target gene miR-153 was successfully introduced into SPC-A-1 and A549 cells by lentivirus, and EGFP expression could be directly observed under fluorescence microscope. PCR results of transfection of miR-153 group and negative control group showed that the expression of miR-153 in SPC-A-1 cells was 92.9 ± 20.6 , which was significantly higher than that in the negative control group ($t=7.79$ $P=0.016$). The expression of miR-153 in A549 cells was 2624.6 ± 153.4 , significantly higher than that in the negative control group ($t=29.63$ $P<0.001$). Stable transplanting cell lines can form transplanted tumor in nude mice. EGFP was obviously expressed in the tumor. Compared with the tumor in the negative control group, the expression of miR-153 in the miR-153 group was 559 ± 220.6 , which was significantly up-regulated ($t=4.38$ $P=0.048$). **Conclusion:** A stable cell line of non-small cell lung cancer

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81403150);山东省自然科学基金项目(ZR2014HL064);

山东省中医药科技发展项目(2015-325);山东省医学科学院医药卫生科技创新工程

作者简介:赵国丽(1986-),女,研究生,主要研究方向:病理肿瘤学,E-mail: 450775538@qq.com

Δ 通讯作者:张月英(1981-),女,研究生导师,副研究员,主要研究方向:病理肿瘤学,E-mail: zhangyueying828@126.com,

电话:0531-82919939;

王兆朋(1976-),男,研究生,助理研究员,主要研究方向:病理肿瘤学,E-mail: charle92003@163.com,电话:0531-82919939

(收稿日期:2019-11-08 接受日期:2019-12-11)

overexpressed miR-153 was successfully constructed.

Key words: Lentivirus vector; MiR-153; Non-small cell lung cancer

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)05-827-05

前言

MicroRNA(miRNA)是一类小分子非编码且高度进化保守的RNA,通过与靶基因的3'非翻译区(3'-UTR)结合并在靶基因转录后的翻译中发挥着抑制作用^[1,2]。越来越多的证据表明miRNA在肿瘤的血管生成、耐药性和转移的调节中扮演着重要角色^[3,4]。有文献报道与癌旁组织相比,miR-153在肺癌组织中的表达水平显著降低^[5]。miR-153可通过靶向ADAM19抑制人NSCLC的迁移和侵袭;在肺癌中过表达miR-153还能通过抑制AKT的表达来达到抗肿瘤活性的目的,从而诱导肺癌细胞凋亡^[6,7]。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷病毒1(human immunodeficiency virus 1, HIV-1)来源的一种病毒载体,可将外源基因或外源的shRNA有效地整合到宿主染色体上,从而达到持久性表达目的序列的效果^[8]。近年来,以慢病毒为载体的基因治疗已广泛应用于恶性肿瘤和遗传病中^[9-11]。本研究旨在通过慢病毒载体系统建立过表达的miR-153重组载体转染非小细胞肺癌系SPC-A-1细胞和A549细胞并进行评估,以期分析miR-153在非小细胞肺癌中作用的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

肺癌细胞系SPC-A-1和A549购自吉凯基因科技公司(中国);胎牛血清购自中国天航公司;DMEM购自Gibco公司;EDTA、PS(青霉素+链霉素)及0.25%胰酶培养基购自中国索莱宝公司;TRIZOL购自美国Invitrogen公司;miRNA反转录试剂购自中国诺唯赞公司;一抗EGFP购自中国华安公司;二抗抗鼠标记488抗体购自中国谷德生物公司;3D荧光扫描仪购自匈牙利3DHISTECH公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SPC-A-1和A549细胞培养使用的DMEM培养基含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素。细胞与37℃含5%CO₂培养箱中培养。

1.2.2 过表达miR-153慢病毒载体的构建 完成miR-153及阴性对照的载体设计和构建及慢病毒的包装。采用GV369载体,抗嘌呤霉素puromycin为其稳定筛选标志。由于质粒带有EGFP基因,成功转染的细胞在荧光显微镜下可以观察到绿光。

1.2.3 嘌呤霉素浓度筛选 细胞 1.0×10^5 个/mL的浓度铺至12孔板中,培养细胞至30%~40%的融合度;嘌呤霉素的浓度梯度设为1.0 g/mL,2.0 g/mL和3.0 g/mL这三个浓度,并加入培养液中。培养三天后,细胞全部死亡的嘌呤霉素浓度为最佳浓度。

1.2.4 慢病毒浓度筛选 细胞 3×10^3 个/mL的浓度加入96孔板,培养24h;用无血清培养基将慢病毒稀释为三种浓度(1×10^8 TU/mL, 1×10^7 TU/mL, 1×10^6 TU/mL)并按MOI值为

1,10,100的相应体积加入培养基中,混匀继续培养;根据细胞形态在感染后的8-12h换回常规培养基。感染约72h,用荧光显微镜观察荧光表达丰度。感染效率80%左右,且细胞生长良好的组对应的感染病毒浓度和MOI即可作为后续正式感染实验的依据。

1.2.5 筛选稳转株 慢病毒转染非小细胞肺癌细胞系后,采用合适的嘌呤霉素浓度进行筛选,根据细胞增长情况进行传代和换液(始终使用含有嘌呤霉素的培养液)。筛选14d后获得稳转株。

1.2.6 RT-PCR 使用Trizol试剂(中国诺唯赞公司)提取细胞内的总的RNA,并用miRNA反转录试剂(中国诺唯赞公司)进行miRNA的合成。U6作为内参。数据分析使用2^{-ΔΔCT}方法。每个实验按一式三份进行分析。miR-153的正向引物5-AAC-GAAGCTGCATAGTCACAAAAG-3;反向引物5-TATGGTT-TTGACGACTGTGTGAT-3。U6的正向引物5-CAGCACAT-ATACTAAAATTGGAACG-3;反向引物5-ACGAATTTGCGT-GTCATCC-3。

1.2.7 裸鼠移植瘤模型构建 取miR-153组和对照组的SPC-A-1细胞,使用生理盐水将胰蛋白酶消化下来的SPC-A-1细胞稀释成浓度为 1×10^6 个/mL的单细胞悬液,吸取100 μL注射入五周大的BALB/c雄性裸鼠皮下。接种SPC-A-1细胞后,每两天观察一次成瘤情况。

1.2.8 免疫荧光检测 裸鼠成瘤后的第25天,脱颈处死裸鼠,取出肿瘤组织。将肿瘤组织按取材、脱水和包埋的步骤制成蜡块;接着将肿瘤组织蜡块切成5 μm厚的切片,按照常规步骤将组织切片脱蜡并浸入蒸馏水中;在柠檬酸钠缓冲液中煮沸15分钟进行抗原修复;切片在含有5%山羊血清的PBS 37℃封闭1h;孵育一抗EGFP(1:100)4℃孵育过夜;与相应的鼠抗标记488二抗(1:200)37℃黑暗中孵育1小时并进行DAPI染色。通过3D荧光扫描仪检测免疫荧光。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,两组之间使用t检验进行比较。*P*值<0.05时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-153慢病毒载体的构建

构建miR-153表达载体及阴性对照表达载体以及包装慢病毒。载体采用GV369,以Ubi-MCS-SV40-EGFP-IRES-puromycin作为原件顺序,将AgeI/NheI作为克隆位点。病毒滴度为 3×10^8 TU/mL。载体图谱如图1所示。

2.2 确定嘌呤霉素的筛选浓度

使用嘌呤霉素筛选SPC-A-1细胞和A549细胞的3天后,浓度≥2.0 g/mL的孔中SPC-A-1细胞全部死亡,浓度≥3.0 g/mL的孔中A549细胞全部死亡。因此SPC-A-1细胞的嘌呤霉素最佳浓度为2.0 g/mL,A549细胞嘌呤霉素的最佳浓度为3.0 g/mL。

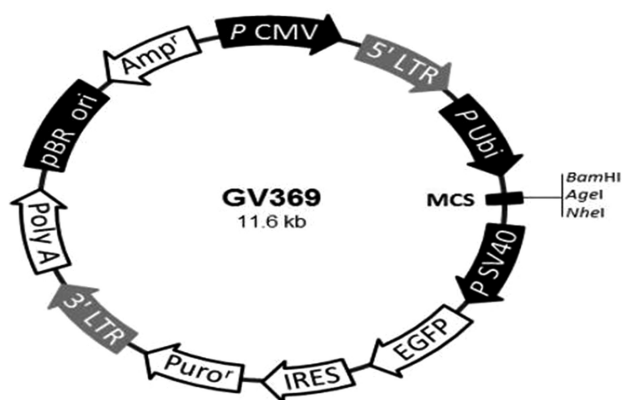


图 1 miR-153 过表达慢病毒载体的构建

Fig. 1 Construction of miR-153 over expression lentivirus vector

2.3 慢病毒负载 miR-153 转染细胞及筛选

根据预实验选出的最佳感染条件和参数,使用慢病毒转染椭圆形的 SPC-A-1 细胞和菱形的 A549 细胞,并在转染 72 小时后使用荧光显微镜观察对照组(Control)和 miR-153 组发出绿色荧光的情况。依据标记,观察 SPC-A-1 和 A549 的感染效率都为 70 %以上(图 2)。

2.4 荧光定量 PCR 检测转染后的细胞中 miR-153 的表达

使用慢病毒转染细胞 72 小时后,收集转染的细胞并提取总 RNA,并用 miRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。荧光定量 PCR 检测结果显示:与 Control 组相比,转染 miR-153 组细胞中 miR-153 的表达水平显著增高(图 3)。与对照组相比,SPC-A-1 细胞中 miR-153 上调了 92.9 ± 20.6 倍,在 A549 细胞中 miR-153 上调了 2624.6 ± 153.4 倍。

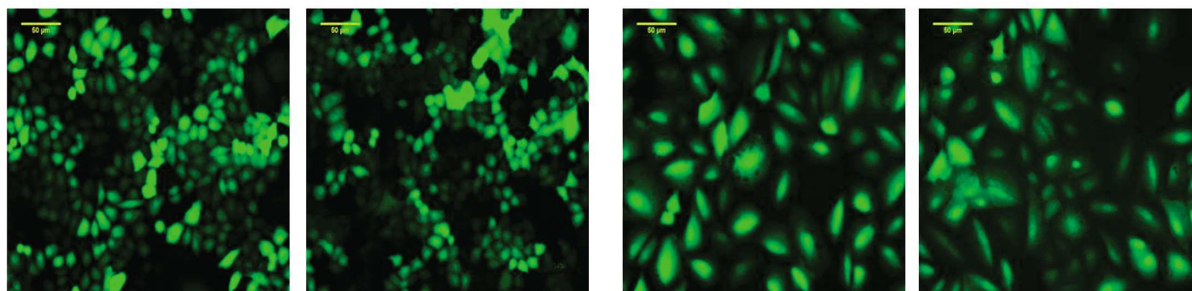


图 2 过表达 miR-153 的慢病毒成功转染 SPC-A-1 细胞和 A549 细胞(x200)

Fig.2 SPC-A-1 cells and A549 cells successfully infected with miR-153 overexpression lentivirus(x200)

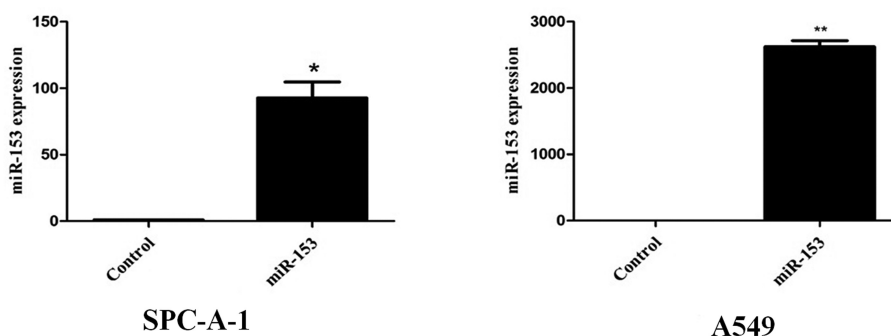


图 3 qPCR 验证慢病毒转染 SPC-A-1 细胞和 A549 细胞后 miR-153 的表达情况

Fig. 3 miR153 expression in SPC-A-1 and A549 cells after lentivirus transfection was determined by qPCR

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, compared with control group.

2.5 裸鼠皮下成瘤

为了进一步检测转染慢病毒的非小细胞肺癌细胞株能否在体内形成肿瘤,我们把嘌呤霉素筛选后的 SPC-A-1 细胞株移植入裸鼠皮下。每两天对裸鼠进行检查,发现从移植后的第五天裸鼠皮下开始形成较为结实的瘤体。稳转株移植后的第 25 天,我们拍摄了转染稳转株后裸鼠皮下成瘤的典型图片(图 4)。

2.6 肿瘤组织中 miR-153 的表达情况

为了检测慢病毒载体是否持续表达在移植瘤中,首先采用免疫组织荧光方法对外源性载体标签蛋白 EGFP 的表达进行检测,绿色荧光为 EGFP 阳性(图 5 a)。结果显示:阴性对照组和 miR-153 过表达组肿瘤组织中 EGFP 均强表达,提示慢病毒载体在移植瘤中持续表达。

进一步采用 RT-PCR 验证 miR-153 的表达情况。与对照组

比较,转染 miR-153 组中的 miR-153 的表达水平上调了 559 ± 220.6 倍(图 5 b),进一步验证了慢病毒转染后稳转株构建的成功建立。

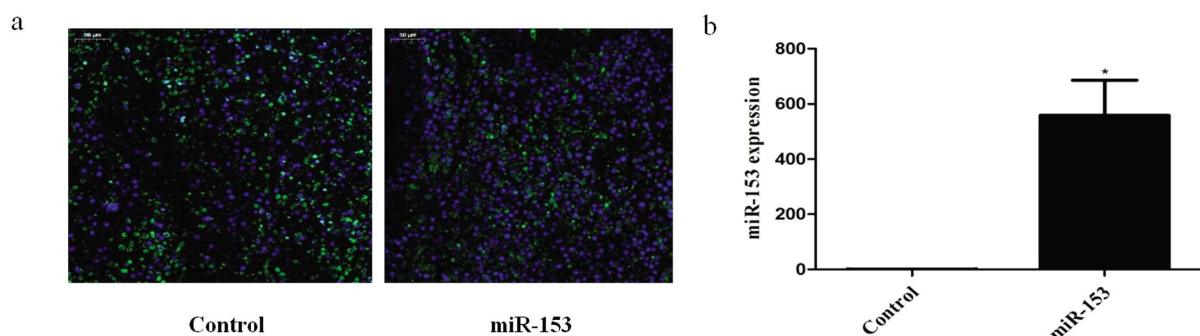
3 讨论

肺癌的发病率及死亡率都居于各类恶性肿瘤的首位^[12]。根据生物学特性,肺癌分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌,而 NSCLC 就占肺癌的 80%^[13]。因此,本研究选择了 SPC-A-1 和 A549 这两株 NSCLC 细胞系作为研究对象。肺癌具有肿瘤相关基因表观遗传改变的特点^[14,15]。越来越多的证据表明 miRNA 参与肺癌的发展,并可作为肺癌的治疗靶点^[16-18]。最近研究表明 miR-153 在多种肿瘤如乳腺癌、胶质瘤和肾癌等癌症中扮演着重要角色^[19-21]。同时,



图4 稳转株 SPC-A-1 裸鼠移植瘤典型图片

Fig.4 Representative image of tumor formation after 25 days of stable cell line SPC-A-1transplantation in nude mice

图5 (a)绿色荧光蛋白(EGFP)在移植瘤体内的荧光表达情况($\times 200$);(b) qPCR 验证移植瘤体内 miR-153 的表达情况Fig.5 (a)Fluorescence expression of green fluorescent protein (EGFP) in transplanted tumor($\times 200$);

(b) miR-153 expression in the transplanted tumor was determined by qPCR

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. * $P < 0.05$, compared with control group.

miR-153 作为抑癌的 miRNA,被证明在包括肺癌在内的多种肿瘤中的表达显著降低^[22-24]。同样,我们既往的研究证明 miR-153 在临床肺癌标本中的表达显著低于正常的癌旁组织。然而,关于 miR-153 在肺癌发生发展中的作用和机制目前尚不完全明确。

目前,研究 miRNA 在细胞中过表达方法有化学合成的 miRNA 模拟物或者是经过特殊标记和化学修饰的 miRNA 激动剂,但这两种方法只是通过瞬转染手段达到增强 miRNA 的表达,作用时间短且效果相对较差不稳定,并且在做体内外实验时 miRNA 发挥的作用较为有限^[25-27]。与传统的非病毒载体相比,以慢病毒为载体有很多优势,例如传递长基因片段,持久效果,宿主免疫反应的低风险等。由于慢病毒载体具有较高的转染效率且作用时间长,因此被广泛用作实验研究中的主要载体^[28-30]。

本研究构建了 miR-153 过表达的慢病毒载体,选取非小细胞肺癌细胞系 SPC-A-1 和 A549 作为转染对象,并通过筛选出的最佳的嘌呤霉素浓度对转染细胞进行筛选,最后获得稳定表达 miR-153 的细胞株。由于转染的慢病毒载体携带绿色荧光蛋白(EGFP),因此在细胞转染 72h 后可以通过荧光显微镜观察发光情况便可以初步确定病毒是否转入细胞中。我们又进一步提取转染后细胞中的 RNA,对 miR-153 在细胞中的表达水平进行了定量分析,结果显示与转染的阴性病毒细胞相比,转染携带 miR-153 慢病毒转染的细胞中 miR-153 的表达水平显著上

调。我们在后来的稳转株形成的瘤体进行荧光检测时也发现了绿色荧光的表达,同样 miR-153 在瘤体内的表达水平也是显著上调的。由此可见,以慢病毒载体构建稳转株的方法可行且效果好。

综上所述,本实验成功构建了过表达 miR-153 的稳转株,这为进一步研究 miR-153 在肺癌发生发展过程中的作用及分子调控机制奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-297
- [2] Li Y, Yin Z, Fan J, et al. The roles of exosomal miRNAs and lncRNAs in lung diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2019, 4: 47
- [3] Sun Z, Shi K, Yang S, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 147
- [4] Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer [J]. Annu Rev Pathol, 2014, 9: 287-314
- [5] Chen WJ, Zhang EN, Zhong ZK, et al. MicroRNA-153 expression and prognosis in non-small cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(7): 8671-8675
- [6] Shan N, Shen L, Wang J, et al. MiR-153 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer by targeting ADAM19 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(1): 385-391
- [7] Yuan Y, Du W, Wang Y, et al. Suppression of AKT expression by

- miR-153 produced anti-tumor activity in lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(6): 1333-1340
- [8] 孙上钧, 丁辉, 韩双印. 慢病毒载体在肿瘤基因治疗中的研究进展[J]. *中华实验外科杂志*, 2017, (2): 352-354
- [9] Han GZ, Worobey M. Endogenous lentiviral elements in the weasel family (Mustelidae)[J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29(10): 2905-2908
- [10] Janecka JE, Miller W, Pringle TH, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates[J]. *Science*, 2007, 318(5851): 792-794
- [11] Hedges SB, Dudley J, Kumar S. TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(23): 2971-2972
- [12] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34
- [13] Thawani R, McLane M, Beig N, et al. Radiomics and radiogenomics in lung cancer: A review for the clinician[J]. *LungCancer*, 2018, 115: 34-41
- [14] Danlımaz Yüce G, Ortaç Ersoy E. Lung cancer and epigenetic modifications[J]. *Tuberk Toraks*, 2016, 64(2): 163-170
- [15] Mehta A, Dobersch S, Romero-Olmedo AJ, et al. Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(2): 229-241
- [16] Guiot J, Struman I, Louis E, et al. Exosomal miRNAs in Lung Diseases: From Biologic Function to Therapeutic Targets[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(9): 1345
- [17] Dutta RK, Chinnapaiyan S, Unwalla H. Aberrant MicroRNAomics in Pulmonary Complications: Implications in Lung Health and Diseases[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 413-431
- [18] Wu KL, Tsai YM, Lien CT, et al. The Roles of MicroRNA in Lung Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7)
- [19] Zhou B, Zheng P, Li Z, et al. CircPCNXL2 sponges miR-153 to promote the proliferation and invasion of renal cancer cells through upregulating ZEB2[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(23): 2644-2654
- [20] Sun D, Mu Y, Piao H. MicroRNA-153-3p enhances cell radiosensitivity by targeting BCL2 in human glioma [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 56
- [21] Wang J, Liang S, Duan X. Molecular mechanism of miR-153 inhibiting migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer by regulating transforming growth factor beta (TGF- β) signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9539-9546
- [22] Zhang W, Mao S, Shi D, et al. MicroRNA-153 Decreases Tryptophan Catabolism and Inhibits Angiogenesis in Bladder Cancer by Targeting Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 619
- [23] Zhou B, Zheng P, Li Z, et al. CircPCNXL2 sponges miR-153 to promote the proliferation and invasion of renal cancer cells through upregulating ZEB2[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(23): 2644-2654
- [24] Chen WJ, Zhang EN, Zhong ZK, et al. MicroRNA-153 expression and prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015, 8(7): 8671-8675
- [25] Peng C, L Wang, TW Liao. A new method for the prediction of chatter stability lobes based on dynamic cutting force simulation model and support vector machine [J]. *Journal of Sound and Vibration*, 2015, 354: 118-131
- [26] 李胜男, 王梦旭, 胡伟东, 等. miR-186 过表达慢病毒载体的构建及鉴定[J]. *吉林大学学报, 医学版*, 2019, 45(5): 997-1006
- [27] 赖月华, 姚德生, 杜萍, 等. 人类 microRNA-1246 慢病毒抑制载体的构建以及鉴定[J]. *医学信息*, 2016, (29): 1006-1959
- [28] 徐晓明, 杨慧, 王晓萍. 慢病毒载体构建及优化[J]. *中国临床康复杂志*, 2006, (09): 147-149
- [29] Liu YP, Westerink JT, ter Brake O, et al. RNAi-inducing lentiviral vectors for anti-HIV-1 gene therapy[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 721: 293-311
- [30] Wang J, Liang H, Zhao Y, et al. Construction and identification of an RNA interference lentiviral vector targeting the mouse TNF- α gene [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(6): 2283-2288