

猪雌激素受体关联受体 α 基因的克隆、表达及其对脂肪细胞脂质聚集的影响

鞠大鹏, 何晶晶, 郑雪莉, 杨公社

西北农林科技大学动物科技学院 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100

摘要: 雌激素受体关联受体 α (Estrogen-related receptor α , ERR α)是调控机体能量代谢的关键转录调控因子, 其在白色脂肪组织中的作用尚不清楚。本研究旨在通过 touch down-PCR 方法克隆猪 ERR α 基因的 ORF 序列; 通过 Western blotting 和细胞免疫荧光染色法分析其在猪各组织及成熟脂肪细胞中的表达模式; 利用 ERR α 特异性抑制剂 XCT790 处理原代培养的猪成熟脂肪细胞, 探讨其对成熟脂肪细胞甘油三酯聚集的影响。结果显示, 所克隆的猪 ERR α 基因 ORF 序列长 1269 bp (GenBank Accession No. FJ446485, 尚未公布), 编码 422 个氨基酸, 其核苷酸和氨基酸序列与其他物种高度同源; ERR α 蛋白高表达于猪白色脂肪组织(White adipose tissue, WAT)、肾脏以及心脏中, 在脾脏中表达量较低; 细胞免疫荧光化学染色显示, ERR α 蛋白广泛分布于脂肪细胞的细胞核和胞浆中; XCT790 在 10 μ mol/L 浓度时显著抑制了 ERR α 蛋白的表达和成熟脂肪细胞中甘油三酯的聚集。本研究将为有效调控体脂沉积提供新的靶点和理论参考。

关键词: 猪, ERR α , 基因克隆, 白色脂肪组织, 脂质聚集

Cloning, expression of the porcine *Estrogen-related receptor α* gene and its effect on lipid accumulation in mature adipocytes

Dapeng Ju, Jingjing He, Xueli Zheng, and Gongshe Yang

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: Estrogen-related receptor α (ERR α) is an orphan nuclear receptor and functions as a key regulator of energy metabolism in high energy demand tissues. However, its role in white adipose tissue is largely unknown. In this study, we aim to clone the ORF sequence of pig ERR α with touch down-PCR, analyze the expression pattern of ERR α protein and its subcellular localization with Western blotting and cell immunofluorescence method respectively, and identify the effect of ERR α on lipid accumulation in mature porcine adipocytes with its specific inhibitor XCT790. The results showed that the ERR α ORF sequence is 1269 bp (GenBank Accession No. FJ446485, not published), and encode 422 amino acids. The homologies of ERR α nucleotide and amino acids sequences are high in different species. ERR α protein is highly expressed in pig white adipose tissue, kidney and heart, while remarkably lower in spleen. Cell immunofluorescence results indicated that ERR α protein distribute widely in adipocytes nucleus and cytoplasm. XCT790 significantly inhibited the expression of ERR α and lipid accumulation in porcine mature adipocyte. This study will provide new target and theoretical reference for fat deposition control.

Received: July 9, 2009; **Accepted:** September 22, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(No. 2006AA10Z138).

Corresponding author: Gongshe Yang. Tel: +86-29-87092430; Fax: +86-29-87092430; E-mail: gsyang999@hotmail.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA10Z138)资助。

Keywords: pig, *ERRα*, gene cloning, white adipose tissue, lipid accumulation

雌激素受体关联受体 α (Estrogen-related Receptor α , *ERRα*) 是最早被鉴定出的核激素受体之一^[1]。近年研究表明, *ERRα* 高表达于线粒体含量丰富的组织中, 具有促进线粒体生成及调节能量代谢相关基因表达的作用^[2-3], 但其在机体能量消耗组织和能量贮存组织中的表达及功能的差异尚不清楚。以往的研究显示, *ERRα* 在白色脂肪组织中表达量很低^[4], 但近期在 3T3-L1 细胞中的研究表明 *ERRα* 随脂肪细胞分化表达量显著升高^[5], 提示其在白色脂肪细胞分化过程中可能具有重要的作用。此外, *ERRα* 基因敲除鼠脂肪组织含量显著减少 60%, 并能够抵抗高脂日粮诱导的肥胖产生^[6], 推测 *ERRα* 可能促进脂肪细胞中的脂质沉积, 但上述现象及其作用机制尚有待证实。

猪是体脂含量较高的重要经济动物, 也是研究体脂沉积的重要模式动物^[7], 对猪脂肪细胞中 *ERRα* 作用的研究可为猪分子育种以及人类肥胖相关疾病的治疗提供理论基础。然而到目前为止猪 *ERRα* 序列尚未公布, 也未见其在脂质贮存中作用的相关报道。

本实验拟克隆猪 *ERRα* 基因全长 ORF 序列, 检测其在猪脂肪组织为代表的能量贮存组织和以心脏和肾脏为代表的能量消耗组织中的表达差异, 鉴定其在成熟脂肪细胞中的亚细胞定位, 并在原代培养的猪成熟脂肪细胞中通过添加其特异性抑制剂, 探讨其对甘油三酯聚集的影响, 为进一步研究 *ERRα* 在 WAT 中脂质聚集中的作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及样品

实验动物: 3 日龄健康长白仔猪(3 头)由西北农林科技大学种猪场提供, 体重 1.5~2.5 kg, 取样前用 0.5% 的新洁尔灭清洗 0.5 h, 电击处死。

样品: 取 6 月龄长白猪 WAT、心脏、肾脏、脾脏、胰脏以及骨骼肌样品, 立即投入液氮中冷却, 之后放入 -70°C 保存备用。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂购自博大泰克公司, RT 试剂盒购自

MBI 公司。MasterMix、DL2000 购于天根公司。ultra-Pfu 高保真 *Taq* 酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购 Bioflux 公司。DMEM/F12、I 型胶原酶购于 Gibco、无酚红的 DMEM 培养基购于 Hyclone。胎牛血清购于杭州四季青公司。PVDF 膜和 ECL 试剂购于 Invitrogen。*ERRα*(anti-goat)和 β -actin(anti-mouse)一抗购于 Santa Cruz。胶片购于 Kodak 公司。山羊 SABC-cy3 免疫荧光试剂盒购于武汉博士德公司。F33342 核染料购于 Sigma 公司。*ERRα* 特异性抑制剂 XCT790 购于 Sigma 公司。甘油三酯检测试剂盒购于东瓯公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 基因的克隆与序列分析

引物设计与合成: 根据 GenBank 上已公布的各物种 *ERRα* 基因序列和猪 EST 数据库, 设计猪 *ERRα* 基因全长 ORF 区引物(表 1), 由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 Touch down PCR 引物

Table 1 Touch down PCR primer

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward	ATGTCCAGCCAGGTGGTGGG
Reverse	TCAGTCCATCATGGCCTCGAGC

组织总 RNA 提取及 RT-PCR 反应: 提取 6 月龄猪 WAT 总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后, 严格按照 MBI RT kit 进行 cDNA 第一链合成, 反转录产物于 -20 °C 保存备用。以合成的 cDNA 为模板, 按照 ultra-Pfu 高保真 *Taq* 酶说明书进行 PCR 扩增。*ERRα* 全长 CDS 区 Touch down PCR 反应程序如下: 95°C 6 min; 94°C 45 s, 72°C(每个循环降 0.5°C) 45 s, 72°C 105 s, 20 个循环; 94°C 45 s, 62°C 45 s, 72°C 105 s, 20 个循环; 72°C 10 min; 4°C 30 min。

目的基因的回收、测序及序列分析: 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 *ERRα* 全长 CDS 区, 回收产物与 pMD-18 T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 挑取阳性克隆摇菌。通过做菌液 PCR 和琼脂糖凝胶电泳检测, 选择出现目的条带的菌液测序, 最后利用 NCBI 网站的 BLAST 工具对测序结果

序列进行比对分析。

1.4 Western blotting 检测 $ERR\alpha$ 组织表达差异

组织总蛋白提取: 将组织在液氮中研成粉末。

取 100 mg 加入含有 1 mL 组织裂解液^[8]的 1.5 mL 离心管中, 充分混匀后, 4°C, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清并进行考马斯亮蓝法定量。根据定量结果, 利用上样缓冲液将不同组织蛋白的浓度调成一致, 100°C 沸水中煮 5 min 后, -70°C 保存。

蛋白电泳: 取蛋白样品 80 μ g 上样, 以 80 V 电压在 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中分离约 2 h 后, 转移至 PVDF 膜上。

蛋白免疫印迹: 5% BSA 室温封闭 2 h, 一抗 ($ERR\alpha$ 为 1:300, β -actin 为 1:300) 室温孵育 2 h, 二抗 ($ERR\alpha$ 为 1:3000, β -actin 为 1:4000) 室温孵育 2 h, ECL 发光液混合后作用 PVDF 膜 3 min, 压 X 光片 1 min, X 光片显影和定影。

1.5 猪脂肪细胞原代培养

无菌条件下采集仔猪颈背部皮下脂肪组织, 用 I 型胶原酶消化法分离猪前体脂肪细胞^[9], 以 5×10^4 细胞/cm² 的密度接种于直径 60 mm 的培养皿, 加适量含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液, 置于 37°C、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱培养。接种当天记做第 0 天, 以后每 48 h 更换 1 次培养液, 直至有 80% 以上的前体脂肪细胞充脂分化为成熟脂肪细胞后, 加入含有 10 μ mol/L XCT790 的培养液处理 48 h (3 个重复), 并设置空对照组和 DMSO 对照组 (各 3 个重复)。处理结束后, 收集细胞, 用于总蛋白的提取和甘油三酯含量的测定。

1.6 免疫荧光检测 $ERR\alpha$ 细胞定位

原代培养的猪前体脂肪细胞以 1×10^4 细胞/cm² 密度接种于 24 孔板, 当细胞生长至分化成熟后, 参照山羊 SABC-cy3 免疫荧光试剂盒说明书对猪成熟脂肪细胞中 $ERR\alpha$ 染色, 倒置荧光显微镜观察并照相。

1.7 甘油三酯含量测定及油红 O 染色

超声波法裂解细胞, 收集上清。参照甘油三酯检测试剂盒说明书, 测定脂肪细胞中甘油三酯含量, 并利用蛋白浓度对其含量进行标准化。油红 O 染色参照实验室已建立的方法^[10]进行操作。

1.8 统计分析

试验数据以平均数 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示, 采用 SPSS 11.5 统计分析软件中的 One-way ANOVA 进行方差分析和显著性检验, 用 LSD 检验不同处理间的差异。

2 结果

2.1 猪 $ERR\alpha$ 全长 ORF 的获得及同源性分析

提取 6 月龄猪 WAT 的总 RNA, 利用 RT-PCR 技术, 首次扩增得到了猪 $ERR\alpha$ 基因的全长 cDNA 序列 (1269 bp) (GenBank Accession No. FJ446485)。同源序列比对结果显示, 猪 $ERR\alpha$ 基因与人、黑猩猩、犬、大鼠和小鼠等物种的核苷酸同源性分别为 99%、99%、92%、91% 和 91%; 氨基酸同源性分别为 99%、99%、99%、98% 和 98%, 表明该基因在不同物种中具有较高同源性。 $ERR\alpha$ 基因的系统进化树如图 1 所示, 其中猪 $ERR\alpha$ 基因与人 $ERR\alpha$ 基因亲缘关系最近。

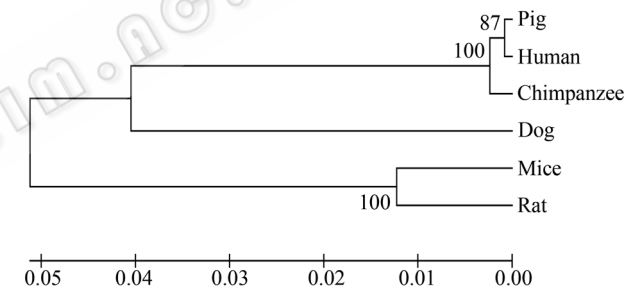


图 1 $ERR\alpha$ 基因的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of $ERR\alpha$ gene. The $ERR\alpha$ genes GenBank Accession Nos. are as follow: human NM_004451, chimpanzee XM_522050, dog NM_001002936, mice NM_007953 and rat NM_001008511.

2.2 猪 $ERR\alpha$ 蛋白的表达模式分析

Western blotting 检测不同组织样中 $ERR\alpha$ 的表达, Dophin-Doc 凝胶成像系统测定各条带吸光值, 计算 $ERR\alpha$ 与 β -actin 条带吸光度的比值, 用 SPSS 11.0 分析数据。结果显示, $ERR\alpha$ 在肾脏中表达水平显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 在心脏中表达水平显著高于 WAT、肌肉和脾脏 ($P < 0.05$), 在 WAT 中表达水平显著高于肌肉和脾脏 ($P < 0.05$), 在肌肉中表达水平显著高于脾脏 ($P < 0.05$), 在脾脏中表达最低 (图 2)。图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

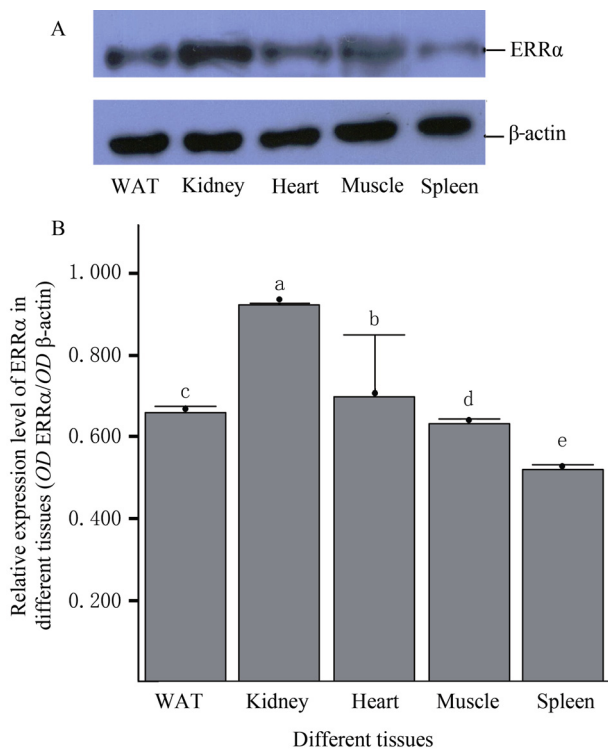


图2 猪不同组织中 **ERRα** 及内参 **β-actin** 免疫印迹结果(A) 及 **ERRα** 相对表达分析(B)

Fig. 2 Western blotting analysis of **ERRα** and **β-actin** protein (A) and the relative expression analysis of **ERRα** protein (B) in porcine tissues. Different letters show significant differences ($P < 0.05$).

2.3 猪脂肪细胞中 **ERRα** 的亚细胞定位

核受体是配体依赖性的转录因子, 当其能与相应的配体结合后会发生从细胞核向胞浆的转位, 从而发挥更为广泛的转录调控作用。迄今为止, 尚未鉴定出 **ERRα** 内源性配体, 因此其亚细胞定位尚不清楚。本研究免疫荧光化学染色结果显示, **ERRα** 蛋白的荧光(红色)除围绕在蓝色的细胞核周围并与之重叠外, 还均匀分布在成熟的脂肪细胞的胞浆中(图3)。

2.4 抑制脂肪细胞中甘油三酯的积累

XCT790 作为 **ERRα** 特异性抑制剂, 当其浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时便能显著抑制 **ERRα** 蛋白的表达, 且不会对细胞的增殖及活力产生影响^[11-12], 因此本实验采用 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 XCT790 处理原代培养的猪成熟脂肪细胞。结果显示, 在成熟的猪脂肪细胞中加入含 $10 \mu\text{mol/L}$ XCT790 的细胞培养液孵育 48 h 后, 与对照组相比, XCT790 处理组 **ERRα** 蛋白表达显著减少, 充脂细胞数目减少。油红 O 染色结果显示, 细胞内被油红 O 染成红色的脂滴数目明显减少, 脂滴体积明显变小(图4)。甘油三酯检测分析显示, 与对

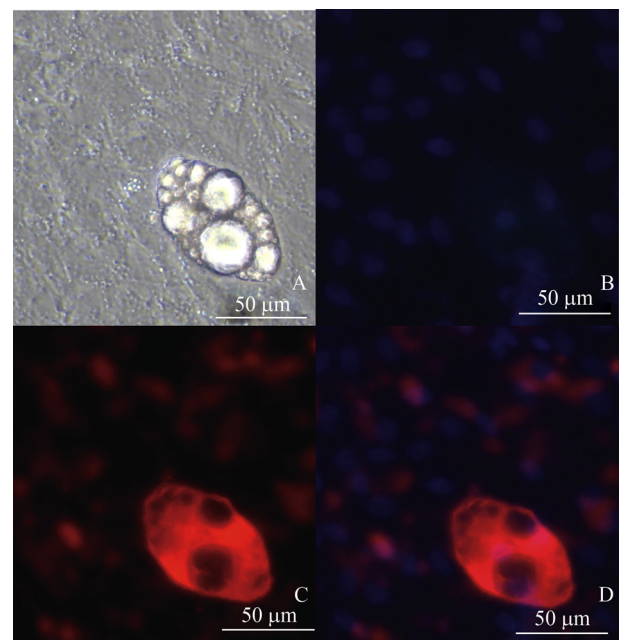


图3 猪成熟脂肪细胞中 **ERRα** 的亚细胞定位

Fig. 3 Cellular localization of porcine **ERRα** protein in mature adipocyte. (A) White light. (B) Nucleus fluorescence. (C) **ERRα** Fluorescence. (D) Overlay.

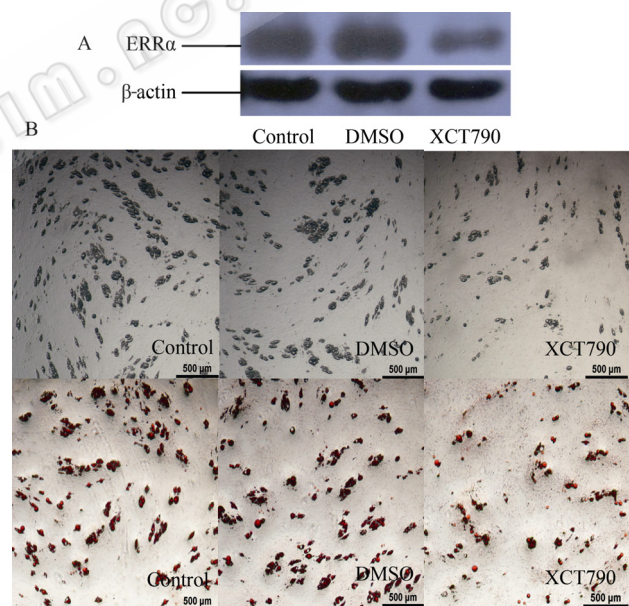


图4 **XCT790** 对猪成熟脂肪细胞 **ERRα** 蛋白表达及聚脂形态的影响

Fig. 4 Effect of **XCT790** on porcine mature adipocytes **ERRα** protein and lipid accumulation morphology. (A) Effect of **XCT790** on **ERRα** protein expression in porcine mature adipocytes. (B) Effect of **XCT790** on porcine mature adipocytes lipid accumulation morphology. The upper panels show the effect of **XCT790** on lipid accumulation morphology of porcine mature adipocytes in the light microscope. The bottom panels show the effect of **XCT790** on lipid accumulation morphology of porcine mature adipocytes after Oil Red O staining.

照组及DMSO对照组相比, XCT790处理组的甘油三酯含量显著减少为各对照组的30%(图5), DMSO处理组甘油三酯含量与对照组差异不显著。由此表明, 在成熟猪脂肪细胞中抑制 $ERR\alpha$ 活性能够抑制其甘油三酯积累。

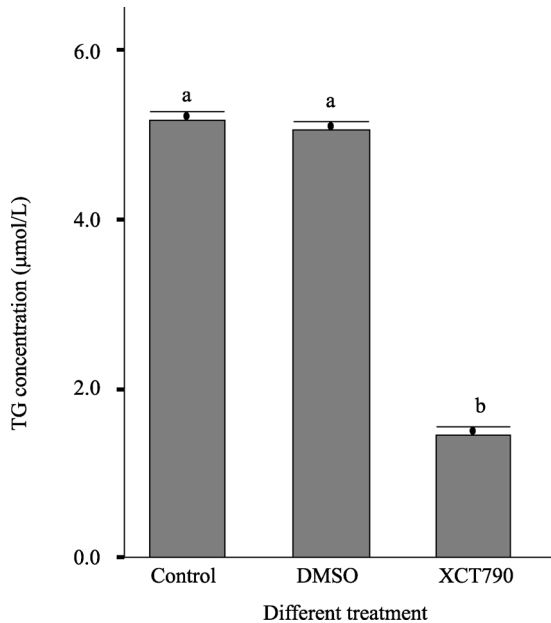


图5 XCT790对猪成熟脂肪细胞甘油三酯含量的影响

Fig. 5 Effect of XCT790 on porcine mature adipocytes TG concentration. Different letters show significant differences ($P<0.05$), same letters do not show significant differences ($P>0.05$).

3 讨论

$ERR\alpha$ 是机体能量代谢网络中的关键调控因子。在高能量消耗组织中, $ERR\alpha$ 能够通过调控线粒体的生物合成、氧化磷酸化以及脂肪酸的 β -氧化途径影响机体的能量平衡^[2-3]。尽管在其他物种中关于 $ERR\alpha$ 调控机体能量代谢的研究已经较深入, 但由于猪 $ERR\alpha$ 序列尚未公布, 因而其对猪机体能量代谢调控的研究工作尚属空白。本实验利用 $ERR\alpha$ 基因在许多物种中具有较高的保守性, 采用改良 touchdown PCR 法首次成功获得猪 $ERR\alpha$ 基因 ORF 序列。同源性比较发现, 猪 $ERR\alpha$ 与人、大鼠等都有高度的相似性, 预示与其他物种的基因功能相似。

尽管最初 Sladek 等利用 Northern blotting 的方法研究认为 $ERR\alpha$ 在 WAT 中表达量很低^[4], 但作为核孤儿受体和转录调节因子的 $ERR\alpha$ 执行功能是在

蛋白水平实现的, 因而在 WAT 中对其蛋白表达水平的检测能更好地了解其作用。本实验中通过 Western blotting 方法分析猪 $ERR\alpha$ 在 WAT 和高能量代谢组织间表达差异发现, $ERR\alpha$ 高表达于猪 WAT 中, 这与 Angie 等^[5]和 KunikoHorie-Inoue 等^[12]在 3T3 细胞系中的研究结果相一致。同时, 在 SD 大鼠上的研究表明, $ERR\alpha$ 在不同性别成年大鼠的 WAT 中表达差异并不显著(结果未显示)。由此提示, $ERR\alpha$ 很可能在 WAT 中具有重要的作用, 并且在不同性别个体中具有普遍的调节功能。进一步对 $ERR\alpha$ 在成熟脂肪细胞中亚细胞定位发现, $ERR\alpha$ 在胞浆和胞核中均有表达, 提示 $ERR\alpha$ 很可能在脂肪细胞的细胞核以及胞浆中发挥广泛的调节作用。

$ERR\alpha$ 基因敲除鼠模型的产生^[6]使人们认识到, $ERR\alpha$ 在脂肪沉积中具有重要作用, 目前为止关于 $ERR\alpha$ 在脂质沉积方面的研究还很少, 其作用机制尚不清楚。近两年研究者发现, $ERR\alpha$ 能够参与 3T3-L1 脂肪细胞的分化和成熟脂肪细胞中甘油三酯的蓄积过程^[12-13], 提示 $ERR\alpha$ 敲除鼠很可能由于脂肪细胞分化或成熟脂肪细胞中甘油三酯的蓄积过程发生障碍而导致体脂沉积减少。但 3T3-L1 脂肪细胞系与原代培养的脂肪细胞在结构以及微环境等方面存在一定的差异^[14], 到目前为止尚未见有关 $ERR\alpha$ 在原代脂肪中的研究报道, 因此 $ERR\alpha$ 在 WAT 中是否与其在 3T3-L1 细胞中对甘油三酯聚集具有相同作用仍需要进一步阐明。为阐明 $ERR\alpha$ 能否在原代培养的脂肪细胞中对甘油三酯的聚集产生影响, 本研究参考 Olivia Lanvin^[11]的实验结果, 利用 $ERR\alpha$ 特异性抑制剂 XCT790 处理猪原代培养的成熟脂肪细胞。结果表明, XCT790 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度时显著抑制了 $ERR\alpha$ 蛋白的表达, 脂肪细胞中脂滴变小, 甘油三酯含量分析发现脂肪细胞中的甘油三酯浓度下降为对照组的 30%, 这与 Nie 等^[12]在 3T3-L1 细胞系上的研究结果一致。表明 $ERR\alpha$ 在原代培养的脂肪细胞中也能够促进甘油三酯的积累。脂肪细胞内 TG 的积累量是其合成和分解的结果, 这一过程中涉及脂肪细胞分化、脂肪细胞内甘油三酯水解和游离脂肪酸代谢等过程^[15], $ERR\alpha$ 是否通过这三条途径调控脂肪细胞内 TG 的积累还有待进一步研究。

综上所述,本研究首次克隆得到猪 *ERR α* 基因 ORF 序列,分析了其组织表达模式及其在脂肪细胞中的亚细胞定位,发现 *ERR α* 可促进脂肪细胞中的脂质积聚。本研究将为有效调控动物体脂沉积、防治人类脂代谢相关疾病提供新的靶点和理论参考。

REFERENCES

- [1] Giguere V, Yang N, Segui P, *et al.* Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, 1988, **331**: 91–94.
- [2] Giguere V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen related receptors (ERRs). *Endocr Rev*, 2008, **29**: 677–696.
- [3] Hummasti S, Tontonoz P. Adopting new orphans into the family of metabolic regulators. *Mol Endocrinol*, 2008, **22**: 1743–1753.
- [4] Sladerk R, Bader JA, Giguere V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme a dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 5400–5409.
- [5] Fu MG, Sun TW, Angie L, *et al.* A nuclear receptor atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol*, 2005, **19**(10): 2437–2450.
- [6] Luo JM, Robert Sladek, Vincent Giguere, *et al.* Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α . *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(22): 7947–7956.
- [7] Yang GS, Zhang HW, Bai L, *et al.* Pig—a ideal study animal model of obesity and diabetes. *Prog Nat Sci*, 2008, **18**(5): 481–487.
- 杨公社, 张浩卫, 白亮, 等. 猪—研究肥胖和糖尿病的理想模式动物. *自然科学进展*, 2008, **18**(5): 481–487.
- [8] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. *分子克隆实验指南*. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Lin YQ, Zhuang HL, Yang GS. Effects of RXR α gene silencing on the porcine adipocyte differentiation *in vitro*. *Comp Biochem Phys D*, 2007, **2**(3): 207–214.
- [10] Bai L, Pang WJ, Yang YJ, *et al.* Effects of nicotinamide on proliferation and differentiation in primarily cultured porcine preadipocytes. *Acta Zool Sin*, 2007, **53**(6): 1063–1068.
- 白亮, 庞卫军, 杨燕军, 等. 烟酰胺在原代培养的猪前体脂肪细胞增殖分化中的作用. *动物学报*, 2007, **53**(6): 1063–1068.
- [11] Lanvin O, Bianco S, Kersual N, *et al.* Potentiation of ICI182, 780 (Fulvestrant)-induced estrogen receptor- α degradation by the estrogen receptor-related receptor- α inverse agonist XCT790. *J Biol Chem*, 2007, **282**(39): 28328–28334.
- [12] Nie YH, Wong CW. Suppressing the activity of *ERR α* in 3T3-L1 adipocytes reduces mitochondrial biogenesis but enhances glycolysis and basal glucose uptake. *J Cell Mol Med*, 2008, **11**: 813–818.
- [13] Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, *et al.* Estrogen-related receptor α modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **358**: 813–818.
- [14] Wang S, Soni KG, Semache M, *et al.* Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol Genet Metab*, 2008, **95**(3): 117–126.
- [15] Nicole AD, Perry EB. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *J Endocrinol*, 2008, **149**(3): 942–949.