

# 文冠木活性成分抗衰老作用机制的网络药理学研究

杜月<sup>1</sup>, 刘佳琼<sup>2</sup>, 王晓琴<sup>2\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学附属医院 药学部, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学 药学院, 内蒙古 呼和浩特 010059)

**【摘要】**目的 利用网络药理学和分子对接技术研究文冠木活性成分的抗衰老机制。方法 基于TCMSP数据库及文献报道获取文冠木主要化学成分, 将口服生物利用度(OB)、类药性(DL)设定为筛选参数, 寻找其活性成分, 并通过Swiss Target Prediction数据库进行靶标预测; 从TTD、GAD、PharmGkb数据库收集抗衰老的靶标; 将活性成分靶标与抗衰老靶标取交集, 在STRING数据库中将该交集绘制蛋白互作PPI网络, 得到核心靶标; 对核心靶标进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析; 使用Cytoscape构建“中药-活性成分-靶标-疾病-通路”网络得到核心成分, 并对核心成分与核心靶标的结合模式进行分子对接验证。结果 获取金圣草黄素、槲皮素、山柰酚等29个化合物为文冠木抗衰老主要活性成分; 筛选到AKT1、TNF、EGFR等30个基因为文冠木抗衰老的核心靶标。核心靶标主要涉及化学反应、离子束缚、胞质部分的活动等生物过程, 通过参与PI3K-Akt信号通路, 脂质和动脉粥样硬化, 癌症蛋白聚糖, 丝裂原活化蛋白激酶信号通路, 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂抗性等等来发挥抗衰老的作用。分子对接结果显示, 排名前3的化合物与核心靶标AKT1、TNF、EGFR均能自由结合。结论 本研究证实文冠木的活性成分可通过多靶标、多通路发挥抗衰老作用, 为深入研究文冠木在抗衰老和化妆品等领域的作用提供科学依据。

**【关键词】**文冠木; 抗衰老; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R917

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)04-0364-05

文冠木(*Xanthoceras lignum*)是蒙医习用特色药材“西拉·森登”, 为无患子科植物文冠果 *Xanthoceras sorbifolia* Bunge 干燥木部。其味甘、微苦, 传统功效有消肿止痛、敛干黄水, 可祛风湿, 用于风湿性关节炎、风湿内热、皮肤风湿的治疗。现代研究发现其具有广泛的药理活性, 包括抗炎、抗肿瘤、抗氧化等。文冠木的主要化学成分类型包括黄酮、甾体、有机酸和香豆素类等<sup>[1-3]</sup>。研究表明, 文冠木富含抗氧化成分<sup>[4]</sup>, 其含有的黄酮类成分显示出强大的DPPH自由基清除作用, 并且对过氧自由基诱导下的DNA链断裂保护作用显著; 对酪氨酸酶催化L-多巴氧化速率的测定中, 文冠果壳中的黄酮类成分显示了抑制酪氨酸酶活性的作用, 且其酶活性抑制作用随浓度的增加显著增强<sup>[5, 6]</sup>。

抗衰老(anti-aging)是指基于衰老的发生机制, 综合各种方法包括生物技术、保健产品及相关药物延缓衰老进程的主动健康策略。中外学者们一直在不断探索衰老的原因、机制, 以及抗衰老的靶标、信号通路和抗衰老药物<sup>[7-9]</sup>。在《神农本

草经》等经典古籍记载中, 抗疲劳或抗衰老的中药, 以甘味和苦味的药味为主; 化学成分以黄酮类和糖类出现频数较高; 以根和茎为主要入药部位。研究结果<sup>[10]</sup>显示, 药味为甘、苦, 主要成分为黄酮和糖类, 根或茎入药的草本类药物可能具有抗衰老方面的研究价值。结合上述, 文冠木味甘、微苦, 且其含有的黄酮类成分, 具有显著的抗氧化的活性。这提示文冠木有抗衰老的潜在作用。因此本次研究采用了网络药理学方法以及分子对接技术验证, 探寻文冠木活性成分抗衰老可能的作用靶标、通路及机制。通过构建“活性成分-靶标-通路-疾病”网络, 以及充分利用基因、靶标等大数据, 系统地阐明其药效机制和作用机理, 以期为文冠木在抗衰老和化妆品等领域广阔的应用前景提供依据。

## 1 方法

### 1.1 文冠木活性成分的作用靶标筛选

本次研究中化学成分检索部位为文冠果的干

收稿日期: 2022-03-19; 修回日期: 2022-07-25

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2022MS08026); 内蒙古医科大学青年创新基金项目(YKD2020QNCX012);

国家中医药管理局中医药创新骨干人才项目

第一作者: 杜月(1989-), 女, 硕士, 主管药师。研究方向: 中蒙药临床药理学。E-mail: missdu89@sina.com

\*通信作者: 王晓琴, 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 中蒙药药效物质基础及质量控制。E-mail: nywangxiaojin@163.com

燥茎干、枝条、树叶,以课题组前期对文冠木化学成分系统研究的结果为根据,结合中国知网、维普、万方和PubMed等数据库检索相关文献,获取活性成分。通过PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和TCMSP(<http://p.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)平台确认了组分信息。以口服生物利用度 $OB \geq 30\%$ 且类药性 $DL \geq 0.18$ 为条件,在GeneCards、OMIM等数据库中“anti-aging”比较,筛选文冠木的活性成分。以Probability > 0.05为标准,在Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库中在线筛选并预测作用靶标。

### 1.2 文冠木抗衰老作用靶标整合

在TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、PharmGkb(<https://www.pharmgkb.org/>)、GeneCards(<https://www.genecards.org/>)等数据库中检索“anti-aging”相关靶标。在Bioinformatics & Evolutionary Genomics(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)系统进一步筛选抗衰老靶标与文冠木活性成分靶标的交集。

### 1.3 蛋白互作(PPI)网络构建

整理文冠木与抗衰老的交集靶标,上传到STRING中,选择“Homo Sapiens”选项。蛋白质相互作用置信度大于0.4被选中,隐藏没有相互联系的节点,获得蛋白互作关系,构建PPI网络。网络中节点的重要性以度值(degree)、介度中心性(BC)评价。

### 1.4 核心靶标的生物功能富集分析

将核心靶标上传至Omicshare数据库(<http://www.omicshare.com/>)进行GO富集功能和KEGG通

路分析,物种限定为人类,显著性 $P < 0.05$ ,以研究文冠木活性成分抗衰老涉及的生物功能及信号通路。

### 1.5 构建“成分-靶标-通路”网络

“文冠木-活性成分-抗衰老-作用靶标-信号通路”网络通过Cytoscape 3.7.2软件构建,并计算网络中活性成分degree值和BC值,评价活性成分在网络中的重要性。

### 1.6 分子对接

选取核心靶标中度值和介度中心性前3位的为对接靶标,检索蛋白晶体结构数据PDB库(<http://www.rcsb.org/>),下载核心靶标的蛋白结构文件。在Pymol软件中,作删除结晶水、杂链及杂原子,加氢等预处理。在TCMSP数据库中下载活性成分的3D结构文件,用Autodock软件添加原子电荷、分配原子类型。通过分子对接模拟核心靶标和活性成分结合模式。

## 2 结果

### 2.1 文冠木活性成分及靶标的筛选

通过文献收集以及PubChem和TCMSP数据库检索,结合 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 的筛选条件,获得文冠木的活性成分35个,在GeneCards、OMIM等数据库中“anti-aging”比较,筛选出29个具有抗衰老活性的化合物作为主要活性成分(见表1)。通过Swiss Target Prediction平台在线预测活性成分的作用靶标,并进行合并、去重,共筛选获得作用靶标468个。

表1 文冠木活性成分

NO.	中文名	英文名	分子式	Pubchem ID
1	(-)-表阿夫儿茶精	(-)-epiafzelechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	443639
2	24-亚甲基环菠萝烷-3-醇	24-methylenecycloartan-3-ol	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> O	94204
3	3-氧甘遂烷-7,24-二亚乙基三胺-21-羧酸	3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	158100
4	5,7-二羟基色原酮	5,7-dihydroxychromone	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	5281343
5	白藜素D	ampelopsin D	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	10095475
6	金圣草黄素	chrysoeriol	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5280666
7	大黄酚	chrysophanol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	10208
8	胡萝卜苷	daucoesterol	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>6</sub>	5742590
9	二氢杨梅素	dihydromyricetin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	161557
10	圣草酚	eriodictyol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	440735
11	七叶内酯	esculetin	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	5281416
12	异绿原酸B	isochlorogenic acid B	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	5281780
13	异槲皮素	isoquercitrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	5280804
14	山柰酚	kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	5280863
15	山柰酚-3-O-芸香糖苷	kaempferol-3-O-rutinoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	5318767
16	杨梅素	myricetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	5281672
17	杨梅苷	myricitrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	5281673
18	柚皮素	naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	932

表1 文冠木活性成分(续)

NO.	中文名	英文名	分子式	Pubchem ID
19	十九烷酸	nonadecanoic acid	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	12591
20	齐墩果酸	oleanolic acid	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	10494
21	对羟基苯乙酸	p-hydroxyphenylacetic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	127
22	大黄素甲醚	physcion	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	10639
23	原花青素A2	proanthocyanidin A2	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	124025
24	槲皮素	quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	5280343
25	鼠李柠檬素	rhamnocitrin	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5320946
26	豆甾醇	stigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	5280794
27	β-谷甾醇	β-sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	222284
28	文冠果壳酸	xanthocerasic acid	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	10695717
29	文冠果壳苷	xanthoceraside	C <sub>57</sub> H <sub>88</sub> O <sub>23</sub>	102336202

2.2 文冠木抗衰老的作用靶标筛选

在TTD、PharmGkb及GeneCards数据库共检索到“anti-aging”相关抗衰老靶标766个。将文冠木活性成分468个作用靶标与766个抗衰老靶标进行映射,得到78个交集基因,即为文冠木抗衰老的潜在作用靶标(见图1)。

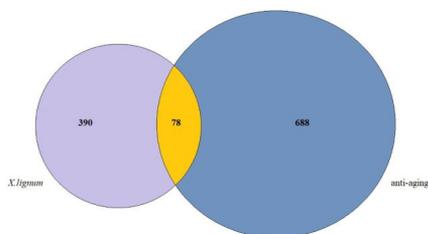


图1 文冠木活性成分与抗衰老的交集靶标

2.3 构建与分析PPI网络

将78个交集靶标上传到STRING数据库中,构建蛋白互作PPI网络,物种设置为“Homo sapiens”,置信度>0.4,隐藏没有相互联系的节点,获得蛋白互作关系(见图2)。共有78个节点,904条边。将PPI网络导入中Cytoscape3.7.2软件中,计算节点的度值(degree)、介度中心性(BC),度值及中心性越大,该节点对应的蛋白质之间的关系就越强。最终筛选出30个文冠木抗衰老的靶标,其中AKT1、TNF、EGFR为核心靶标,如图3所示。

2.4 GO和KEGG生物功能富集分析

GO分析可描述文冠木抗衰老所涉及的生物学效应,借助Omicshare数据库对文冠木抗衰老的78个作用靶标,分别在生物过程(BP)、细胞成分(CC)、分子功能(MF)中进行GO富集分析,设定P<0.05,共获得5894条信息。其中BP得到4865条,包括化学反应、对有机物的反应、细胞凋亡过程等;CC得到

423条,包括胞质部分、膜包围腔和细胞器腔等;MF得到606条,包括离子结合、催化活性等(见图4)。KEGG通路富集分析显示核心靶标富集在152条通路,主要为PI3K-Akt信号通路、脂质和动脉粥样硬化、癌症蛋白聚糖、丝裂原活化蛋白激酶MAPK信号通路等(见图5)。本文展示了PI3K-Akt信号通路富集结果(见图6)。

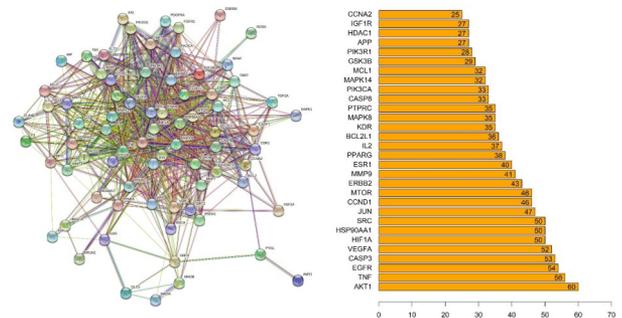


图2 交集靶蛋白互作网络 图3 PPI网络核心靶标

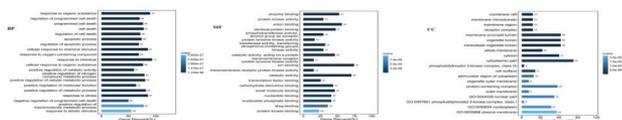


图4 GO富集分析

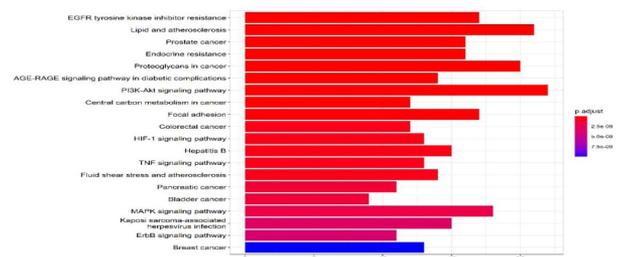


图5 KEGG通路富集分析

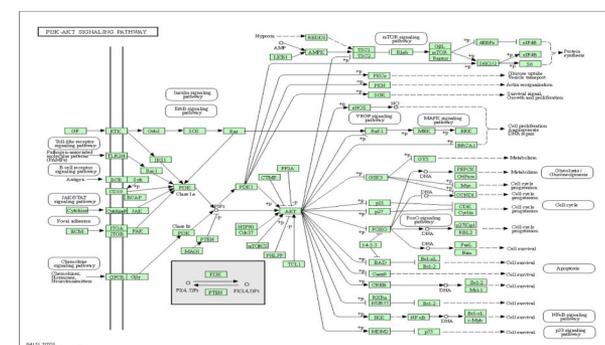


图6 重要的信号通路图

2.5 构建“成分-靶标-通路”网络

借助Cytoscape 3.7.2软件构建“文冠木-活性成分-抗衰老-作用靶标-信号通路”网络(见图7)。粉色代表文冠木的活性成分,蓝色代表这些活性成分

对应的抗衰老靶标,橙色代表信号通路,边代表相互作用。计算网络中活性成分的度值(degree)、介度中心性(BC),度值和中心性越大,该成分在网络中的重要性就越高。金圣草黄素(chrysoeriol)、槲皮素(querعتin)、山柰酚(kaempferol)可作为文冠木衰老的核心成分(见表2)。

表2 文冠木抗衰老的核心成分

名称	Degree	BC
金圣草黄素(chrysoeriol)	27	0.02239709
槲皮素(querعتin)	27	0.02217488
山柰酚(kaempferol)	26	0.02032939
杨梅素(myricetin)	26	0.02008479
鼠李柠檬素(rhamnocitrin)	24	0.01758899
大黄酚(chrysophanol)	22	0.02595151
柚皮素(naringenin)	21	0.02334319
二氢杨梅素(dihydromyricetin)	19	0.01610513
圣草酚(eriodyctiol)	18	0.0135784
七叶内酯(esculetin)	18	0.01736076
大黄素甲醚(phycion)	18	0.01612637
3-氧甘遂烷-7,24-二亚乙基三胺-21-羧酸(3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid)	14	0.01012383
(-)-表阿夫儿茶精(-)-epiafzelechin	12	0.0065498
文冠果壳酸(xanthocerasic acid)	12	0.00645664
豆甾醇(stigmasterol)	11	0.00512227
β-谷甾醇(β-sitosterol)	11	0.00512227

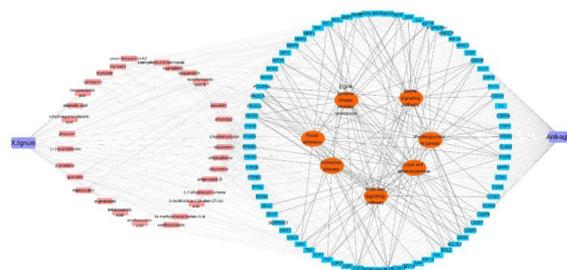


图7 文冠木抗衰老的“活性成分-作用靶标-信号通路”网络

### 2.6 分子对接

根据“成分-靶标-通路”网络分析结果,度值、介度中心性排名前3的核心成分为金圣草黄素、槲皮素、山柰酚;经PPI互作网络筛选前3的核心靶标为AKT1、TNF、EGFR。该核心成分与核心靶标进行分子对接,若结合能小于0,则表明二者能够自发结合。对接结果显示核心成分与核心靶标均能自发结合。研究分别绘制了金圣草黄素与EGFR、槲皮素与AKT1、山柰酚与TNF的分子对接图,如图8所示。对接结果见表3。

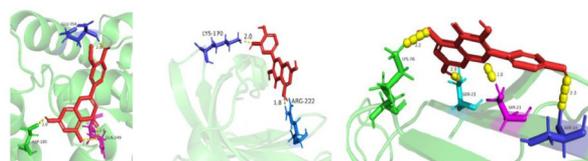


图8 部分分子对接图

表3 目标化合物与靶标蛋白对接得分情况

对接成分	靶标	PDB-ID	坐标(x,y,z,spacing)	结合能/(kJ·mol <sup>-1</sup> )	结合位点
金圣草黄素	AKT1	6NPZ	118,86,100,0.847	-2.31	HIS-143
	TNF	5M2I	108,152,186,0.906	-1.69	SER-7、LYS-76
	EGFR	5HKX	116,110,124,0.569	-3.57	ASP-185、GLU-354、GLN-249
槲皮素	AKT1	6NPZ	148,104,126,0.675	-1.85	LYS-170、ARG-222
	TNF	5M2I	102,166,190,0.903	-1.41	SER-71、LYS-76
	EGFR	5HKX	126,136,130,0.531	-1.45	VAL-363、GLU-211
山柰酚	AKT1	6NPZ	104,78,86,0.961	-1.74	MET-446(2)、LYS-158
	TNF	5M2I	106,164,190,0.922	-2.56	SER-21、LYS-76、SER-23、SER-19
	EGFR	5HKX	114,100,112,0.653	-2.03	ASN-105

### 3 讨论

本次研究结果表明金圣草黄素、槲皮素、山柰酚为文冠木抗衰老的核心成分。研究已经证实,槲皮素具有很强的抗氧化作用,其心血管保护作用、抗动脉粥样硬化也与抗氧化作用密切相关<sup>[11,12]</sup>。山

柰酚能显著增加黑素合成基因的表达并提高酪氨酸酶活性,能将Nrf2表达上调,从而使AAPH诱导的HaCaT细胞氧化应激损伤减轻<sup>[13]</sup>;其对DPPH和ABTS自由基均有较好的清除能力<sup>[14]</sup>。山柰酚具有抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化和骨质疏松,保护神经、肝脏和心肌以及抑制蛋白激酶等活性<sup>[15]</sup>,能减

缓神经退行性疾病的发展,抑制神经元凋亡并促进神经再生,能够减轻过氧化氢对神经元的氧化损伤,可使抑郁症模型大鼠血清中抗氧化酶的活性显著升高,使脂质过氧化中间产物减少;能抑制抑郁症大鼠的神经炎症,使TNF- $\alpha$ 等炎症因子在海马体中的表达显著抑制,并具量效相关<sup>[16]</sup>。

PPI蛋白互作网络分析认为AKT1、TNF、EGFR是文冠木抗衰老的核心靶蛋白。AKT1又称AKT激酶,AKT磷酸化后可发挥包括调节血管的生成以及调节细胞生长、增殖、代谢、凋亡等多种生物学效应<sup>[17]</sup>。研究表明肿瘤坏死因子(TNF)上调NF- $\kappa$ B、MAPK、ERK等信号通路,介导多种功能如内毒素休克、调节炎症、激活白细胞和免疫应答等<sup>[18]</sup>。EGFR主要参与调控细胞增殖、细胞分化及细胞凋亡。这说明文冠木可能通过调节细胞周期和调控机体免疫因子水平从而延缓衰老。

KEGG通路富集分析显示潜在基因主要富集在PI3K-Akt信号通路,脂质和动脉粥样硬化,癌症蛋白聚糖,MAPK信号通路等。PI3K-Akt信号通路在多种细胞中广泛分布,是参与细胞衰老过程的经典途径,其作用涉及糖原代谢及细胞生长、增殖、运动过程,多种类型的细胞刺激物和毒素可使其激活。氧化应激产生的活性氧抑制PI3K-AKT炎症通路可促进细胞凋亡,使细胞的存活率降低,是导致细胞衰老的重要原因<sup>[19-21]</sup>。MAPK信号通路可控制多种基本的细胞进程,包括细胞增殖、存活和凋亡、氧化应激等。在细胞生长、增殖和存活等途径的调控中这些通路至关重要。由此可见,文冠木活性成分可通过多种信号通路抑制炎症反应的发生、调控细胞生命周期、抑制细胞凋亡从而达到抗衰老的作用。

综上所述,本次研究通过系统的网络药理学方法和分子对接技术验证,探究文冠木活性成分抗衰老的作用机制。文冠木通过多成分、多靶标、多通路的作用机制发挥抗衰老作用,金圣草黄素、槲皮素、山柰酚是这一过程中的重要化合物,AKT1、TNF、EGFR等是其核心靶标。文冠木活性成分可能通过PI3K-Akt、MAPK等相关信号通路调控细胞生物功能。分子对接结果显示文冠木主要活性成分与其抗衰老核心靶标可以自由结合,有较强亲和能力。

#### 参考文献

[1]中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志(第五册). 北京:人民卫生出版社,1994:551

- [2]内蒙古植物药志编辑委员会. 内蒙古植物药志(第二卷). 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1993:175
- [3]杨倩,王晓琴,丁艳霞. 文冠木化学成分研究[J]. 中成药, 2020, 42(8):2062-2066
- [4]张玉. 文冠木中10种有效成分的定量和活性测定[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2015
- [5]张洪梅,耿杰,周泉城. 文冠果壳黄酮提取物抑制酪氨酸酶活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(10):96-100
- [6]张洪梅,周泉城. 文冠果壳皂苷提取物抑制酪氨酸酶活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(5):53-56
- [7]李焜,王秀娟,康学,等. 抗衰老机制及中药复方抗衰老研究进展[J]. 北京中医药, 2011, 30(10):794-796
- [8]Magalhães JPD. How aging processes influence cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13:357-365
- [9]周若宇,孙曼婷,刘静,等. 中药有效成分在抗衰老与抗肿瘤作用机制中的研究进展[J]. 药学学报, 2021, 56(7):1856-1864
- [10]张丝雨,邓剑冷,赵程程,等. 抗疲劳、抗衰老中药的性味及主要成分的研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(7):74-76
- [11]刘明学,魏光辉. 槲皮素的药理学作用及临床应用前景[J]. 中国药房, 2010, 21(27):2581-2583
- [12]冯亚莉,李浩,刘娟,等. 槲皮素研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20):5185-5193
- [13]邹雪莲,胡雯,雷子贤,等. 山柰酚减轻角质形成细胞氧化应激损伤[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(8):1103-1108
- [14]王荣,罗倩,冯怡. DPPH、ABTS和FRAP微量法测定山柰酚的抗氧化能力[J]. 广州化工, 2021, 49(3):58-59+63
- [15]张雅雯,邵东燕,师俊玲,等. 山柰酚生物功能研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(4):400-405
- [16]张胜,张尧,李彪,等. 山柰酚对CUMS抑郁模型大鼠海马神经元过度自噬和氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(2):146-150+155
- [17]Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(7):489-501
- [18]李承宗. RIP1与TNF- $\alpha$ 诱导信号通路关系的研究进展[J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(19):66-69
- [19]Li H, Wang R. Blocking SIRT1 inhibits cell proliferation and promote aging through the PI3K/AKT pathway[J]. Life Sci, 2017, 190:84-90
- [20]Kim YY, Jee HJ, Um JH, et al. Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence[J]. Aging Cell, 2017, 16(5):1094-1103
- [21]Qi S, Xin Y, Guo Y, et al. Ampelopsin reduces endotoxic inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 12(1):278