

合欢皮乙醇提取物通过调控 NF- κ B 通路减轻四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤*

杜斌, 龚蕾蕾, 蔡维维, 陈俊良, 孙海建, 邱丽颖[△]

(江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

[摘要] 目的: 研究合欢皮乙醇提取物对急性肝损伤的作用, 并对其可能的作用机制进行初步探讨。方法: 采用 25% 四氯化碳(橄榄油助溶) 单次腹腔注射诱导小鼠急性肝损伤模型, 筛选合欢皮乙醇提取物抗急性肝损伤的活性部位。通过 HE 染色观察肝组织形态结构的病理变化, 检测肝组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD) 活性和丙二醛(MDA) 含量, ELISA 检测血清中白细胞介素 6(IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平, Western blot 检测各组小鼠肝细胞中 NF- κ B p65、Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达水平。结果: 与 model 组比较, 合欢皮乙醇提取物正丁醇相低剂量(AB-L, 4 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹) 组和高剂量(AB-H, 8 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹) 组血清中 AST 水平和 ALT 水平显著降低。HE 染色病理学观察可见肝细胞坏死范围、程度和炎细胞浸润较 model 组明显减轻。与 model 组比较, AB-H 组和 AB-L 组小鼠血清中的 TNF- α 和 IL-6 水平明显下降, 小鼠肝细胞核中 NF- κ B p65 的蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。与 model 组比较, AB-H 组和 AB-L 组的肝组织中 Bax 蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高, Bcl-2/Bax 比值升高($P < 0.05$)。结论: 合欢皮乙醇提取物正丁醇相可能通过减少 NF- κ B p65 的活化而抑制 IL-6 和 TNF- α 炎性细胞因子的过度释放, 以及调控 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达减轻肝细胞的凋亡, 从而发挥对肝脏的保护作用。

[关键词] 合欢皮; 急性肝损伤; 四氯化碳; 炎症; NF- κ B p65 信号通路; 细胞凋亡

[中图分类号] R363.2; R965.1

[文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.07.027

Ethanol extract from *Cortex Albiziae* attenuates mouse acute liver injury induced by carbon tetrachloride via modulation of NF- κ B pathway

DU Bin, GONG Lei-lei, CAI Wei-wei, CHEN Jun-liang, SUN Hai-jian, QIU Li-ying

(Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214122, China. E-mail: qiylydoc@sina.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the protective effect of ethanol extract from *Cortex Albiziae* on acute liver injury, and to explore its possible mechanism. **METHODS:** Acute liver injury in mice was induced by single intraperitoneal injection of 25% carbon tetrachloride (olive oil solubilization). The effective parts of ethanol extract from *Cortex Albiziae* against acute liver injury were screened. The pathological changes of the liver tissues were examined by pathological sections with HE staining. The activity of total superoxide dismutase (T-SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) of the liver tissues were detected, the serum levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by ELISA, and the protein expression levels of NF- κ B p65, Bcl-2 and Bax in the liver cells of the mice in each group were determined by Western blot. **RESULTS:** Compared with model group, the serum levels of AST and ALT in low-dose n-butanol phase of ethanol extract from *Cortex Albiziae* (AB-L, 4 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹) group and high-dose n-butanol phase of ethanol extract from *Cortex Albiziae* (AB-H, 8 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹) group were significantly decreased. The necrosis extent and degree of the hepatocytes and infiltration of inflammatory cells were significantly lower than that in model group. Compared with model group, the serum levels of TNF- α and IL-6 in AB-H group and AB-L group were significantly decreased ($P < 0.05$). The protein level of NF- κ B p65 in the nuclei of mouse liver cells in AB-H group and AB-L group were also decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the protein expression of Bax was decreased, the protein expression of Bcl-2 was increased, and the Bcl-2/Bax ratio was increased in AB-L group and AB-H group. **CONCLUSION:** The n-butanol phase of ethanol extract from *Cortex Albiziae* may protect the liver by reducing the activation of NF- κ B p65, inhibiting the excessive release of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , and decreasing hepatocyte apoptosis via regulating Bcl-2 and Bax expression.

[KEY WORDS] *Cortex Albiziae*; Acute liver injury; Carbon tetrachloride; Inflammation; NF- κ B p65 signaling pathway; Apoptosis

[收稿日期] 2018-11-21

[修回日期] 2019-05-28

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81700364); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20170179)

[△]通讯作者 Tel: 0510-85917007; E-mail: qiylydoc@sina.com

人类饮食结构改变及食品安全、农药残留和水质污染等因素使急性肝损伤的发病率在我国呈逐年上升趋势。合欢皮(*Cortex Albiziae*)为豆科植物合欢(*Albizia julibrissin* Durazz.)的干燥树皮,资源丰富,在我国有悠久的临床应用历史。《中国药典》及古方记载合欢皮具有活血和消痈肿之功^[1]。合欢皮提取物能有效抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)对核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的活化^[2]。霍乐乐等^[3]利用单味合欢皮煎液熏洗治疗屈指肌腱鞘炎42例临床研究证明可有效缓解屈指肌腱鞘炎引起的疼痛症状,从而改善手指关节功能,且复发率低。合欢皮具有调节免疫和炎症抑制作用,并抑制巨噬细胞的活化^[4]。乔善义等^[5]以巴豆油引起小鼠耳肿胀模型作为抗炎筛选模型,发现合欢皮乙醇提取物的正丁醇萃取部位是抗炎活性的主要部位。而急性肝损伤属于炎症反应的范畴,合欢皮可能有急性肝损伤的药理作用是本研究的选题依据。

本实验室前期研究已表明合欢皮总皂苷的含量可达63.49%,合欢皮乙醇提取物正丁醇部位富含皂苷类物质,主要集中在AJ-B-4组分。本实验室近年研究发现,合欢皮有效部位具有抑制肿瘤新生血管、抑制血管内皮细胞增殖、抑制人微血管内皮细胞凋亡、抑制脂质合成代谢和抗旋毛虫感染等作用^[6-7]。此外,合欢皮的活性成分较多,富含多种成分,其药理作用是否有协同作用?基于对合欢皮的深入研究,本研究进一步探讨合欢皮乙醇提取物对保护肝脏作用的靶向性。

材 料 和 方 法

1 实验动物

ICR小鼠,雄性,体质量20~22g,购自浙江省实验动物中心,许可证号为SCXK(浙)20140001。

2 主要试剂

天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)测试试剂盒购自桂林优利特医疗电子有限公司;白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、TNF- α 、兔抗鼠Bax抗体和兔抗鼠Bcl-2抗体购自武汉博士德生物科技有限公司;兔抗NF- κ B p65抗体购自Abcam;兔抗histone H3多克隆抗体和兔抗 β -actin多克隆抗体购自Bioworld Technology;其余试剂为国产化学分析纯。

3 主要仪器

URIT-8260全自动生化分析仪(桂林优利特医疗电子有限公司);ST5020多功能染色机、RM2245石蜡切片机和ASP200S全自动脱水机(Leica);ELx800全自动酶标仪(BioTek);Universal Hood III凝胶成像

分析系统、Mini Protean Tetra垂直电泳仪和Mini Trans Blot Cell转印仪(Bio-Rad);SHB-III A循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

4 主要方法

4.1 合欢皮乙醇提取物混悬液的制备 合欢皮购自无锡山禾集团中药饮片有限公司,南京中医药大学陈健伟教授鉴定为*Albizia julibrissin* Durazz.的干燥树皮。称量合欢皮100g,破碎过60目筛,将其用1:10料液比的85%乙醇(65℃)回流提取3h,3次,滤后合并滤液,旋蒸至无醇味,真空干燥,得合欢皮总提取物浸膏或干粉。称其93g,于2500mL梨形漏斗水中,充分溶解。根据极性提取,收集正丁醇相。分别萃取3次,每次2h,分别合并萃取液,旋蒸真空干燥,浸膏或干粉,放入-20℃冰箱保存备用。取合欢皮正丁醇相萃取物适量,0.9%氯化钠配制混悬液。紫外分光光度法测得合欢皮乙醇提取物正丁醇相黄酮的含量为65.2mg/g。

4.2 实验分组及给药 32只雄性小鼠随机分为4组,每组8只,分别为正常(control)组、模型(model)组、合欢皮乙醇提取物正丁醇相低剂量(AB-L,4mg·kg⁻¹·d⁻¹)组和合欢皮乙醇提取物正丁醇相高剂量(AB-H,8mg·kg⁻¹·d⁻¹)组^[8]。Model组四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)和橄榄油根据体积比混合,配制成25%CCl₄,根据小鼠体重换算药物剂量,腹腔注射给药5mL/kg。Control组给予同体积橄榄油。给药组造模2h后给药,连续给药10d。

4.3 生化指标的测定 对各组小鼠眼球内眦静脉丛取血,分离血清。根据试剂盒及全自动生化分析仪使用要求,检测血清中ALT和AST水平。

4.4 HE染色 取小鼠部分肝右叶置于4%多聚甲醛溶液中浸泡固定,脱水透明、浸蜡包埋,切片厚度为4 μ m,连续切片。脱蜡染色、脱水透明封片,在显微镜下摄片观察。

4.5 肝组织中总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的检测 -80℃超低温冰箱中快速取出冻存的肝脏组织,冰块上低温研磨并配制成10%肝组织匀浆液。低温冷冻离心后吸取上清液适量,按1:9生理盐水稀释成1%肝组织匀浆液,根据试剂盒说明书检测。

4.6 测定小鼠血清中IL-6和TNF- α 的水平 试剂盒自然解冻(冰盒上);血清样本2倍稀释;所需酶标板孔数目=样品数+9;做双份检测时 \times 2。根据ELISA试剂盒说明书检测。

4.7 Western blot检测 各组小鼠肝细胞中NF- κ B p65、Bax和Bcl-2的蛋白表达水平 取各组小鼠肝

左叶组织 100 mg 左右,剪碎后置于玻璃匀浆器最底部,按每 100 mg 肝组织,加入 PMSF 酶抑制剂和 RI-PA 裂解液(1:100)混合液 600 μ L,冰上手动匀浆 10 min 左右。裂解后的组织匀浆移到 1.5 mL EP 管中,4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 10 min 后收集上清,分装并转移到 1.5 mL EP 管中。根据试剂盒说明书检测。采用 ImageJ 软件分析条带灰度,以 NF- κ B p65 灰度与 histone H3 灰度的比值反映 NF- κ B p65 蛋白的表达水平;以 Bax 和 Bcl-2 灰度分别与 β -actin 灰度的比值反映 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平。

5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。数据

均采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病理学观察

Control 组肝细胞基本形态结构正常,肝小叶形态完整,肝细胞核仁清晰。Model 组肝细胞呈现肿胀、变形,可见炎症细胞部分浸润。与 model 组比较,AB-L 组和 AB-H 组的肝细胞肿胀、变形明显减轻,见图 1。

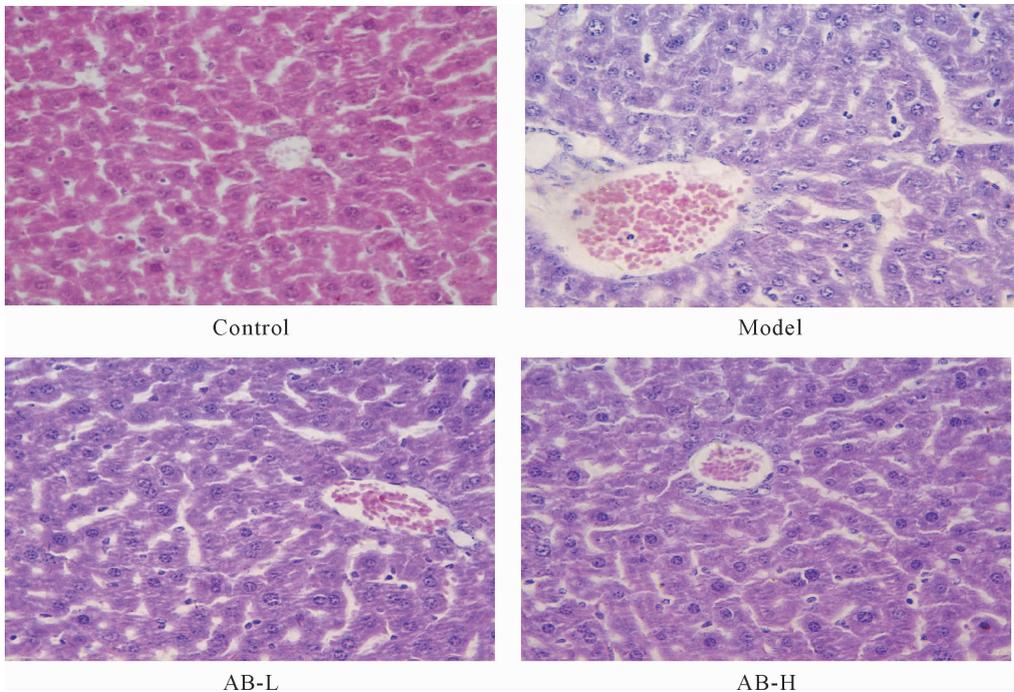


Figure 1. The pathological observation of mouse liver in each group (HE staining, $\times 40$).

图 1 各组小鼠肝脏病理形态学观察

2 各组小鼠血清 ALT 和 AST 水平的变化

与 control 组比较,model 组血清中 ALT 和 AST 水平显著升高;与 model 组比较,AB-H 组和 AB-L 组血清的 ALT 和 AST 水平显著降低($P < 0.05$),见表 1。

3 各组小鼠血清中 IL-6 和 TNF α 的影响

与 control 组比较,model 组小鼠血清中 TNF- α

和 IL-6 水平明显升高($P < 0.05$),与 model 组比较,AB-H 组和 AB-L 组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 水平均明显降低($P < 0.05$),提示合欢皮可能通过抑制炎症而发挥保护肝脏的作用,见表 1。

4 各组小鼠肝组织中 SOD 活性和 MDA 水平的影

响与 control 组比较,model 组小鼠 SOD 活性明显

表 1 各组小鼠 AST、ALT 和 IL-6、TNF- α 的变化

Table 1. The serum levels of AST, ALT, IL-6 and TNF- α in the mice in each group (Mean \pm SD. $n = 8$)

Group	AST (U/L)	ALT (U/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
Control	47.6 \pm 11.4	132.4 \pm 22.6	4.03 \pm 0.11	14.24 \pm 4.98
Model	448.7 \pm 35.2 *	834.5 \pm 67.2 *	5.88 \pm 0.17 *	63.84 \pm 8.79 *
AB-L	177.6 \pm 58.4 *#	282.4 \pm 62.1 *#	4.29 \pm 0.24 **	29.41 \pm 10.87 **
AB-H	123.6 \pm 35.2 *# Δ	202.4 \pm 42.3 *# Δ	4.23 \pm 0.11 **	24.63 \pm 8.57 **

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs AB-L group.

降低($P < 0.05$),MDA 含量明显升高($P < 0.05$);与 model 组比较,AB-H 组和 AB-L 组的肝组织中 SOD 的活性均明显升高($P < 0.05$),MDA 的含量明显降低($P < 0.05$)。AB-H 组和 AB-L 组的 SOD 活性和 MDA 含量呈剂量依赖性($P < 0.05$),见表 2。上述实验结果表明,合欢皮乙醇提取物正丁醇相可能通过抑制肝细胞脂质过氧化从而发挥保肝降酶作用。

表 2 各组小鼠肝组织中 SOD 活性和 MDA 水平的影响

Table 2. The activity of SOD and content of MDA of mouse liver tissues in each group (Mean \pm SD. $n = 8$)

Group	SOD(U/mg)	MDA (μ mol/g)
Control	38.80 \pm 2.69	5.09 \pm 0.29
Model	13.86 \pm 1.62 *	14.66 \pm 0.69 *
AB-L	19.83 \pm 2.15 *#	10.84 \pm 0.46 *#
AB-H	26.50 \pm 3.71 *# Δ	7.16 \pm 0.21 *# Δ

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs AB-L group.

5 Western blot 检测各组小鼠肝细胞核中 NF- κ B p65 的蛋白表达水平

各组小鼠肝细胞核中 NF- κ B p65 蛋白表达水平实验结果显示,与 control 组比较,model 组中 NF- κ B p65 的蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),而 AB-H 组和 AB-L 组的小鼠肝细胞核中 NF- κ B p65 的蛋白表达水平较 model 组显著降低($P < 0.05$),见图 2。

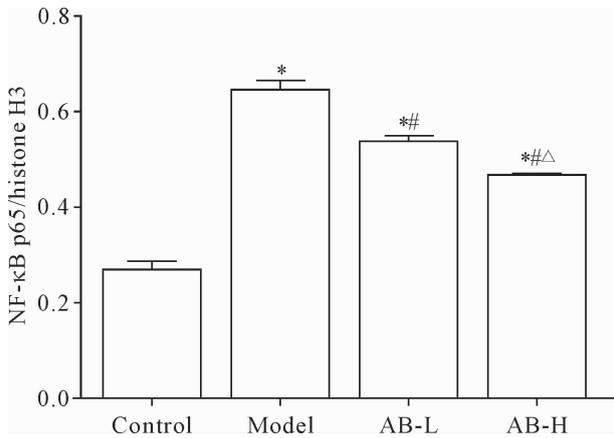


Figure 2. The protein expression of NF- κ B p65 in the nuclei of the mouse hepatocytes in each group. Mean \pm SD. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs AB-L group.

图 2 各组小鼠肝细胞核中 NF- κ B p65 蛋白表达水平

6 Western blot 检测各组小鼠肝细胞 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达水平

与 control 组比较,model 组肝脏组织中 Bax 蛋白表达水平升高($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),Bcl-2/Bax 比值降低($P < 0.05$)。与

model 组比较,AB-H 组和 AB-L 组的肝组织中 Bax 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达水平升高($P < 0.05$),Bcl-2/Bax 比值升高($P < 0.05$),见图 3。

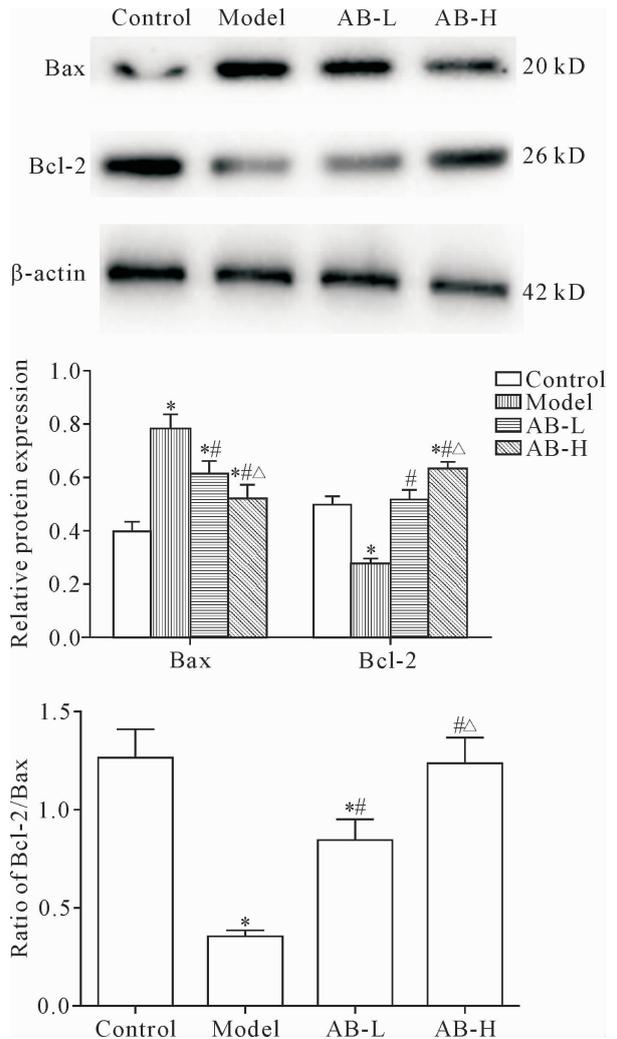


Figure 3. The protein expression of Bax and Bcl-2 in the liver tissues of the mice in each group. Mean \pm SD. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs AB-L group

图 3 各组小鼠肝组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平

讨 论

急性肝损伤的发病机制比较复杂,大致可分为免疫性损伤和化学性损伤。不同的致病因素或病因引起急性肝损伤的发病机制也不尽相同。急性肝损伤的发生机制可能有单一因素或多个因素组成,它们之间相互联系、相互影响或互为因果等。急性肝损伤时使肝细胞膜的通透性增加,肝细胞内的 AST 和 ALT 溢出,从而导致血清中 AST 和 ALT 升高,其活性可作为评价肝损伤程度的指标^[9-10]。MDA 的高低可反映机体内脂质氧化的程度,间接地反映出机体细胞受自由基攻击的严重程度。SOD 对机体的

氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,具有清除自由基、防止自由基发生脂质过氧化的作用,其活力的高低可间接地反映机体清除氧自由基的能力^[11]。本研究中,AB-H组和AB-L组可明显降低小鼠血清中AST和ALT水平。AB-H组和AB-L组提高肝组织中SOD的活性,降低了MDA含量。通过HE染色的病理学观察,肝细胞炎细胞浸润和变性坏死的程度都较model组有明显减轻,初步说明合欢皮乙醇提取物正丁醇相可以降低CCl₄诱导的小鼠急性肝损伤,其作用机制可能与促进肝细胞细胞对抗氧化应激损伤有关。

TNF- α 是同时具有促炎和免疫调节双重功能的细胞因子,肝脏是TNF- α 的重要靶器官之一。IL-6作为炎症反应的主要调节介质,在炎症反应中起到关键的作用。TNF- α 在病理状态下能诱导IL-6等炎症因子的产生。NF- κ B已经被证实是具有多种功能的转录因子,p65是涉及NF- κ B激活的一个重要亚基^[12]。NF- κ B介导的Bcl-2家族蛋白被认为是线粒体凋亡途径中的主要调控蛋白^[13]。线粒体膜上承载着Bcl-2家族,并能监管肝细胞凋亡的过程^[14]。抗凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡蛋白Bax之间的比值大小直接关系着机体细胞凋亡的变化,其比值升高提示抑制肝细胞凋亡发展,反之则提示促进肝细胞凋亡发展。本研究中,与model组比较AB-H组和AB-L组小鼠血清中TNF- α 和IL-6水平明显下降,提示合欢皮正丁醇相可能通过抑制炎症细胞因子TNF- α 和IL-6而发挥保护肝脏的作用。Western blot检测各组小鼠肝细胞核中NF- κ B p65的蛋白表达水平,AB-H组和AB-L组的小鼠肝细胞核中NF- κ B p65的蛋白表达水平较model组显著降低,提示合欢皮乙醇提取物正丁醇相可能通过减少NF- κ B的活化,抑制IL-6和TNF- α 炎症细胞因子的进一步释放而发挥保肝降酶的作用。与model组比较,AB-H组和AB-L组抑制促凋亡Bax蛋白表达和增加抗凋亡Bcl-2蛋白表达,Bcl-2/Bax比值升高,表明肝细胞凋亡减少。肝细胞凋亡的发生可能与氧化应激和促进肝细胞凋亡的TNF- α 有关^[15]。实验结果表明合欢皮乙醇提取物正丁醇相可能通过调控Bcl-2和Bax蛋白的表达减轻肝细胞的凋亡,从而发挥对肝脏的保护作用。

综上所述,合欢皮乙醇提取物正丁醇相可减轻小鼠急性肝损伤,AB-H组和AB-L组呈现量效关系。合欢皮乙醇提取物正丁醇相可能通过减少NF- κ B p65的活化而抑制IL-6和TNF- α 炎性细胞因子的过度释放,以及调控Bcl-2和Bax蛋白的表达减轻肝细胞的凋亡,从而发挥对肝脏的保护作用。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:134.
- [2] Rozema E, Atanasov AG, Fakhrudin N, et al. Selected extracts of chinese herbal medicines: their effect on NF- κ B, PPAR α and PPAR γ and the respective bioactive compounds[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012:983023.
- [3] 霍乐乐, 李晓峰, 张晓东, 等. 单味合欢皮煎液熏洗治疗屈指肌腱鞘炎42例临床研究[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(11):142-143.
- [4] 姜丽莎, 张晓东, 张国斌, 等. 17味中药对豚鼠皮肤TNF- α 、IL-10作用的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2016, 15(3):169-171.
- [5] 乔善义, 蔚冬红, 郭继芬, 等. 组合LC-MS-MS鉴定技术的生物活性导向研究合欢皮抗炎活性部位[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19):2021-2025.
- [6] 朱雪雪, 蔡维维, 龚蕾蕾, 等. 合欢皮皂苷治疗旋毛虫感染小鼠的疗效观察[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(1):39-43.
- [7] 蔡维维, 杜斌, 刘艳玲, 等. 合欢皮皂苷物质的分离、纯化及其抗血管活性的研究[J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(6):617-619.
- [8] 易清清, 刘玲艳, 冯磊, 等. 合欢皮中抗肿瘤新生血管高效低毒组分的筛选及药效学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(8):1046-1051.
- [9] Zhong M, Gao Y, Chen Y, et al. Protective effects of total flavonoids in *Polygonum perfoliatum* L. on the acute liver injury of mice induced by CCl₄ and its action mechanism[J]. Med Plant, 2015, 6(3/4):12-13,17.
- [10] 黄强, 夏明珠, 阳文杰, 等. 右美托咪定减轻酒精诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(10):1891-1895.
- [11] Wang Q, Song Y, He Y, et al. Structural characterisation of algae *Costaria costata* fucoidan and its effects on CCl₄-induced liver injury[J]. Carbohydr Polym, 2014, 107:247-254.
- [12] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling[J]. Annu Rev Biophys, 2013, 42:443-468.
- [13] Bonneau B, Prudent J, Popgeorgiev N, et al. Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(7):1755-1765.
- [14] Chen Q, Zhan Q, Li Y, et al. *Schisandra* lignan extract protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice by inhibiting oxidative stress and regulating the NF- κ B and JNK signaling pathways[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017:5140297.
- [15] Omar HA, Mohamed WR, Arab HH, et al. Tangeretin alleviates cisplatin-induced acute hepatic injury in rats: targeting MAPKs and apoptosis[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0151649.