

基于生物信息学筛选非酒精性脂肪性肝纤维化相关基因及潜在治疗药物

杨 婧, 赵耀伟, 牛 捷, 王 锐*

(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 利用生物信息技术检索非酒精性脂肪性肝纤维化基因芯片数据, 筛选与非酒精性脂肪性肝纤维化相关差异表达基因及潜在治疗药物, 为本病深入研究及治疗提供新思路。利用基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 检索“非酒精性脂肪肝纤维化”词条, 下载 GSE109345 芯片数据, 利用 BioJupie 分析平台筛选对照组及纤维化模型组差异表达基因, 对所获得差异基因进行 GO 功能分析、KEGG 通路分析、蛋白互作网络分析并作可视化处理; 最终通过 Connectivity Map (CMap) 数据平台, 预测对非酒精性脂肪性肝纤维化具有潜在治疗效果的化合物。共筛选到 109 个差异表达基因, 包括 70 个上调基因和 39 个下调基因; 功能分析显示差异基因主要参与蛋白激酶 B 信号转导、胞外区功能、小分子结合等功能; 通路分析显示差异基因参与视黄醇代谢通路、类固醇激素合成通路、花生四烯酸代谢通路; 蛋白互作网络分析与非酒精性脂肪性肝纤维化相关的基因主要为金属蛋白酶组织抑制因子-1 (metallopeptidase inhibitor 1, TIMP1)、CC 趋化因子配体 2 [chemokine (C-C motif) ligand 2, CCL2]、信号调节蛋白 B1 (recombinant signal regulatory protein beta 1, SIRPB1)、细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 等; CMap 分析结果显示, 吡格列酮、米多君和槟榔碱等化合物对非酒精性脂肪性肝纤维化具有潜在的治疗作用。通过筛选差异表达基因, 明确在非酒精性脂肪性肝纤维化发展过程中相关基因及潜在治疗化合物, 同时本研究为非酒精性脂肪性肝纤维化临床治疗和新药研发提供新思路和方案。

关键词: 非酒精性脂肪性肝纤维化; 生物信息技术; 差异表达基因; 潜在药物

中图分类号: R575 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)11-3091-06

Identification of non-alcoholic fatty liver fibrosis-related genes and potential therapeutic drugs based on bioinformatics

YANG Jing, ZHAO Yao-wei, NIU Jie, WANG Rui*

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: To provide new ideas for further research and treatment of nonalcoholic fatty liver fibrosis, we used bioinformatics technology to search the gene microarray data related to this disease and identified differentially expressed genes and potential therapeutic drugs. Gene Expression Omnibus (GEO) was used to search the entry of "nonalcoholic fatty liver fibrosis"; the GSE109345 microarray data was downloaded, the differentially expressed genes in the control group and the fibrosis model group were screened with the BioJupie analysis platform, and GO function, KEGG pathway, protein-protein interaction (PPI) network analysis and visualization were conducted for the differentially expressed genes. Finally, through the Connectivity Map (CMap) data platform, compounds with potential efficacy on nonalcoholic fatty liver fibrosis were predicted. A total of 109 differentially expressed genes were screened, including 70 up-regulated genes and 39 down-regulated genes. Functional analysis showed that

收稿日期: 2021-02-26; 修回日期: 2021-04-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473359); 黑龙江省自然科学基金面上资助项目 (H201472); 黑龙江省优秀青年人才项目 (2020YQ05).

*通讯作者 Tel: 86-451-87266893, E-mail: wrdx@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0279

differentially expressed genes were mainly involved in protein kinase B signal transduction, extracellular domain function, small molecule binding and other functions; pathway analysis showed that these genes participated in retinol metabolism, steroid hormone synthesis, and arachidonic acid metabolism; PPI network analysis showed that metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), recombinant signal regulatory protein beta 1 (SIRPB1), and cytochrome P450 (CYP) were the main genes related to nonalcoholic fatty liver fibrosis. CMap analysis showed that pioglitazone, midodrine, arecoline and other compounds had potential efficacy in nonalcoholic fatty liver fibrosis. Thus, by screening for differentially expressed genes, related genes and potential therapeutic compounds effective in the treatment of non-alcoholic fatty liver fibrosis can be identified, as well as new ideas and approaches for the clinical treatment of non-alcoholic fatty liver fibrosis.

Key words: non-alcoholic fatty liver fibrosis; bioinformatics; differentially expressed gene; potential drug

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 作为慢性肝脏损伤的常见病症, 通常与血脂、血糖指标升高以及脂质代谢功能紊乱等代谢疾病的发生密切相关^[1]。随着生产生活方式的变化, 肝脏的代谢负荷增加, 正常生理功能严重受损, 导致 NAFLD 在我国及全球患病率剧增^[2,3]。NAFLD 依据疾病谱可分为非酒精性单纯性脂肪肝 (NAFL) 和非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。随着病情持续恶化, NASH 又分化为可逆性肝纤维化、不可逆性肝硬化甚至原发性肝癌 (HCC) 等不同病理阶段^[4]。而肝纤维化作为重要病理阶段之一, 其特征为肝脏损伤、炎症因子浸润、气球样变以及不同分期的纤维样变。纤维化会导致肝脏损伤进程更快, 且不可逆地向 HCC 发展, 如果对其进行有效防治则可阻止终末期肝病的发生^[5]。遗憾的是, 非酒精性脂肪性肝纤维化的发病机制尚未明确, 目前公认的机制为肝脏“二次打击”学说^[6], 因此通过生物信息技术从基因芯片进行挖掘可以从分子层面为该病机制研究提供新思路。

本文利用基因表达数据库 (GEO) 检索非酒精性脂肪性肝纤维化基因芯片, 筛选肝纤维化模型组与对照组差异表达基因, 进而对差异基因进行 GO 功能分析和 KEGG 通路分析, 同时构建差异基因蛋白互作网络, 明确关键基因。最后将差异基因转换为对应探针列表, 导入 Connectivity Map (CMap) 筛选潜在化合物, 以期为非酒精性脂肪性肝纤维化的临床治疗提供更多选择。最终通过上述分析, 结合生物信息学分析和基因芯片探究非酒精性脂肪性肝纤维化的分子机制及潜在治疗药物提供新研究思路。

材料和方法

微阵列分析数据 在 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库中检索词“nonalcoholic liver fibrosis”, 下载 GSE109345 基因表达谱。GSE109345 基于 Affymetrix GPL19057 平台 (Affymetrix Illumina NextSeq 500), 由 van Koppen A 等提交。GSE109345

数据集包含 78 个样本数据, 其中有 48 个纤维化样本和 24 个正常对照样本 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE109345>)。

数据处理及差异表达基因的筛选 将下载的样本数据进行分组并命名, 分别为纤维化组 and 对照组。将分组结果导入 BioJupies (<https://amp.pharm.mssm.edu/biojupies/>) 进行处理及筛选差异基因。主成分分析 (PCA) 是一种统计方法, 通常用于在 RNA-seq 数据集中探索生物样本的相似性^[7]。将经过处理数据进行下一步处理以识别差异基因 (DEGs)。|log₂ fold change| ≥ 2 且校正后 $P < 0.05$ 作为差异基因的筛选条件。

GO 功能富集和 KEGG 通路分析 GO 分析是功能富集研究中常用的方法, 基因功能包括生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞成分 (CC)。KEGG 是一个在生物信息学分析中广泛使用的数据库, 它存储大量关于基因组、生物途径和疾病的数据。使用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对本研究中的 DEGs 进行 GO 注释分析和 KEGG 通路分析。其中 GO 分析中筛选条件为 $P < 0.05$, 基因计数 > 5; KEGG 通路分析 $P < 0.05$ 。

PPI 网络构建 互作基因检索数据库 (<https://string-db.org/>) 可以将差异基因之间的关系进行可视化处理。将筛选得到的差异基因提交到 String 数据库, 选择研究物种为“Homo sapiens”, 对潜在蛋白的相互作用进行分析, 设置互作分值为高可信 (high confidence: 0.700), 隐藏蛋白网络中没有互作关系的节点, 构建疾病-蛋白互作网络, 导出 TSV 格式文件。

CMap 分析 CMap 是药物基因组学研究领域的重要数据库, 收录 1 300 多种化合物, 该数据库是基于相关疾病基因表达转录组分析的基础, 揭示疾病基因与潜在化合物之间的关系^[8,9]。将上述筛选差异基因经 R 语言处理后转换为对应探针列表, 上传 CMap 数据库 (<https://portals.broadinstitute.org/cmap/>) 筛选潜在化合物。

结果

1 数据处理及差异基因筛选结果

PCA 分析显示数据的前三个主要成分 (PC) 的交互式三维散点图。每个点代表一个 RNA-seq 样品, 具有相似基因表达谱的样品在三维空间中更接近 (图 1)。因此, 对照组与模型组的样品表达相互独立, 进行下一步分析。将对照组和模型组进行差异基因表达分析, 共筛选得到 109 个差异表达基因, 包括 70 个上调基因和 39 个下调基因, 对结果进行可视化分析, 绘制聚类图及火山图 (图 2)。

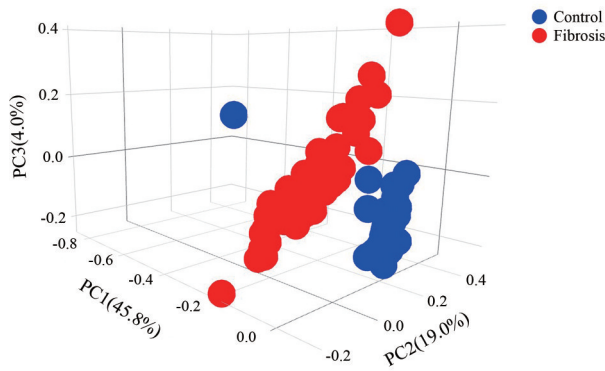


Figure 1 Principal component analysis result graph

2 差异基因 GO 功能富集和 KEGG 通路分析结果

运用 DAVID 对本研究中差异基因进行 GO、KEGG 分析。通过对 109 个差异表达基因进行分析, 得到结果如下 (图 3)。GO 富集分析显示, 差异基因主要富集的生物过程 (BP) 为蛋白激酶 B 信号转导的正调控 (positive regulation of protein kinase B signaling)、基因表达的正调控 (positive regulation of gene expression)、

对二苯乙烯类化合物的反应 (response to stilbenoid)、环氧酶 P450 途径 (epoxygenase P450 pathway) 和细胞对肿瘤坏死因子的反应 (cellular response to tumor necrosis factor) 等; 对差异基因的组分分析 (CC) 主要集中在胞外区 (extracellular region)、细胞外隙 (extracellular space)、细胞表面 (cell surface)、细胞外基质 (extracellular matrix) 和细胞器膜 (organelle membrane) 等; 差异基因的分子功能 (MF) 有转运活性 (transporter activity)、小分子结合 (small molecule binding)、信息素结合 (pheromone binding)、铁离子结合 (iron ion binding) 和血红素结合 (heme binding); KEGG 通路分析结果显示, 差异表达基因主要富集的通路有视黄醇代谢通路 (retinol metabolism)、类固醇激素合成通路 (steroid hormone biosynthesis) 和花生四烯酸代谢通路 (arachidonic acid metabolism), 各通路富集基因及数目如表所示 (表 1)。

3 差异基因 PPI 网络可视化结果

将差异基因输入 String 平台后, 经处理后共得到 104 个节点, 173 条连线, 剔除无交互关系的节点后绘制 PPI 图 (图 4)。依据图中所示, 与非酒精性脂肪性肝纤维化发生发展较为密切的基因主要为金属蛋白酶组织抑制因子 1 (TIMP1)、CC 趋化因子配体 2 (CCL2)、信号调节蛋白 B1 (SIRPB1) 和细胞色素 P450 (CYP) 等。

4 潜在药物筛选

CMap 中的 mean 值、富集得分范围为: -1~1, 分数正值表示该药物与疾病发展呈正相关, 负值表示该药物能够抑制疾病发展, 绝对值越大则表明药物与疾病相关性越高^[9]。将处理后的差异基因探针列表提交至 CMap 数据库, 筛选出关联强度居前 5 位的负相关化

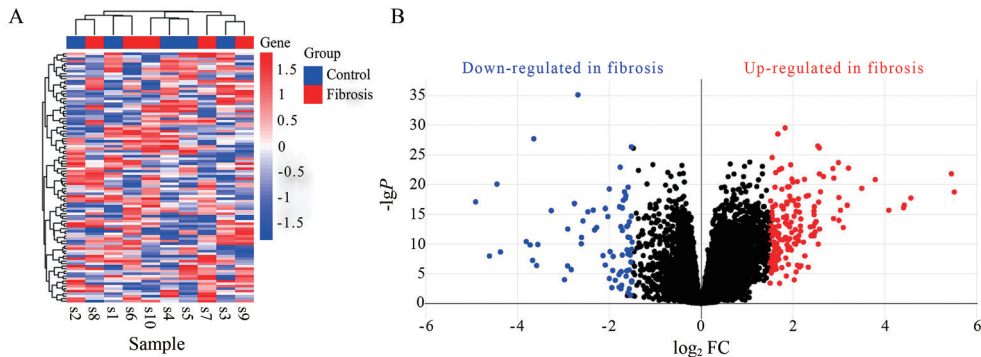


Figure 2 Differential gene clustering heat map and volcano map. A: Differential gene heat map between normal group and liver fibrosis patients; B: Volcanic map of different genes between normal group and liver fibrosis patients

Table 1 KEGG pathways analysis

Term	Description	Gene	Count
mmu00830	Retinol metabolism	CYP2B9, CYP26A1, CYP4A12B, CYP2B13, CYP2A4, CYP2B10, CYP2C40	7
mmu00140	Steroid hormone biosynthesis	CYP2B9, CYP2B13, HSD3B5, SULT1E1, CYP2B10, CYP2C40	6
mmu00590	Arachidonic acid metabolism	CYP2B9, CYP4A12B, CYP2B13, CYP2B10, CYP2C40	5

率的升高、2型糖尿病患病率的攀升以及人口老龄化等因素的影响, 预计未来NAFLD的患病率以及进展期肝病患者的比例将持续增加^[10]。研究表明, 晚期纤维化的NAFLD患者死亡率明显高于早期患者, 因此对于非酒精性脂肪性肝纤维化的机制研究及临床防治显得极为重要^[11]。随着基因芯片技术的发展, 一方面利用生物信息技术能够精确阐明疾病发病机制, 另一方面能够借助生物信息的数据优势作为药物研发的新途径。

本研究利用GEO数据库丰富的数据信息, 以“NASH”、“nonalcoholic fatty liver fibrosis”作为关键词检索并筛选芯片数据, 获取GSE109345数据集数据。将数据分为纤维化组和对照组, 利用生物信息学分析筛选得到差异表达基因109个, 其中上调表达70个, 下调表达39个。进一步对得到差异基因进行功能富集分析(GO)及通路分析(KEGG), 明确差异基因所参与及富集的功能和通路, 同时构建差异基因蛋白互作网络, 将其进行可视化分析, 以明确与非酒精性脂肪性肝纤维化相关的主要基因。最后利用CMap筛选潜在化合物, 为非酒精性脂肪性肝纤维化的临床防治提供候选治疗药物。

研究发现, 慢性肝脏疾病均伴随代谢紊乱症, 非酒精性脂肪性肝纤维化的发生与脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和慢性氧化应激等密切相关。相关临床及实验研究表明, 表3中的潜在药物通过改善代谢紊乱达到治疗肝纤维化的效果。

IR能够导致肝脏脂肪过量沉积, 诱发游离脂肪酸(FFA)过量释放, 导致肝星状细胞(HSC)活化和细胞外基质(ECM)在肝脏堆积, 加速肝脏纤维因子的合成^[12]。吡格列酮是临床治疗糖尿病的常用药, 能明显改善IR, 实验证明应用吡格列酮干预可明显提高IGT-OETF大鼠对外源性胰岛素的反应性, 改善其高胰岛素血症, 使胰岛素敏感指数基本恢复正常。同时甘油三酯(TG)和FFA水平降低, 提示吡格列酮能够降低肝脂含量, 减轻肝脏脂质沉积, 改善脂肪组织正常代谢功能^[13,14]。为进一步明确吡格列酮治疗纤维化的具体机制, 通过构建吡格列酮干预非酒精性脂肪性肝纤维化模型, 结果表明吡格列酮通过调控Toll样受体4(TLR4)/细胞核因子 κ B(NF- κ B)及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smad3蛋白(Smad3)信号通路, 抑制TLR4、I κ B激酶 β (IKK- β)、NF- κ B等基因的表达, 进而抑制HSC活化、肝细胞炎症、纤维化相关信号通路, 延缓或阻止非酒精性脂肪性肝纤维化的进展^[15,16]。

米多君是 α 1肾上腺素能受体激动剂, 研究发现在常规治疗基础上加用米多君可提高肝硬化患者的生存

率, 有助于控制肝硬化造成的腹水^[17]。肝纤维化作为肝硬化进展过程中的重要病理阶段, 若能在肝纤维化早期进行干预, 能有效阻止终末期肝病的发生。目前尚未有米多君治疗肝纤维化的临床报道, 但CMap结果提示米多君具有干预纤维化进展的可能。

槟榔碱是槟榔所含的主要生物碱, 研究发现其对胰岛B细胞分泌功能具有直接保护作用, 能够促进胰岛素分泌, 维持肝细胞正常生理功能。文献报道槟榔碱能通过“外源性化合物感受器”组成性雄甾烷受体(CAR)、孕烷x受体(PXR)改善2型糖尿病模型大鼠肝糖代谢紊乱, 具体机制为槟榔碱通过CAR、PXR直接作用于叉头状转录因子O1(FoxO1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α), 调节肝糖代谢关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因(PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)基因表达; 同时通过NF- κ B降低2型糖尿病大鼠肝炎性因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)表达, 改善肝胰岛素敏感性^[18,19]。

曲格列酮是一种噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂, 临床主要用于治疗2型糖尿病和胰岛素抵抗。研究提示, 曲格列酮毒性作用机制可能与其诱导活性氧簇(ROS)生成有关, 过量ROS不仅可以改变基因和蛋白表达, 影响细胞的功能与表型, 还可以攻击细胞内的核酸、蛋白质和脂质等重要成分, 抑制线粒体生物合成, 进一步加剧线粒体功能障碍, 最终引发细胞的凋亡^[20,21]。

小白菊内酯是从中草药小白菊中提取到的一种倍半萜内酯类化合物, 具有抗炎和抗肿瘤等药理作用。在高脂饮食诱导大鼠NAFLD模型中, 应用小白菊内酯干预后胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)水平降低, 高密度脂蛋白(HLD)水平升高, 提示其可以降低高血糖, 改善胰岛素敏感性, 调节肝脏血脂异常, 增强细胞的抗氧化能力, 延缓NAFLD进展^[22]。此外, 小白菊内酯能够与NF- κ B通路结合发挥抗炎作用, 值得注意的是该通路与HSC的活化、ECM的合成密切相关。因此, 小白菊内酯可能通过与NF- κ B通路结合发挥抗纤维化的药理作用^[23]。

综上所述, 本实验运用生物信息学结合基因芯片, 探究非酒精性脂肪性肝纤维化的差异表达基因, 并对其初步分析, 得到差异基因主要参与的信号通路及其功能, 进一步挖掘其潜在治疗药物。为未来肝纤维化的临床治疗和机制研究提供理论依据, 但仍需要更加严谨的实验对其加以验证。

作者贡献: 本文设计思路由杨婧、王锐提供; 赵耀伟负责

靶点筛选、通路富集、网络构建及CMap药物筛选; 牛捷负责数据可视化处理。

利益冲突: 本文不存在利益冲突。

References

- [1] Williamson RM, Price JF, Glancy S, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh type 2 diabetes study [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34: 1139-1144.
- [2] Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2008, 49: 608-612.
- [3] Xiao J, Guo R, Fung ML, et al. Therapeutic approaches to non-alcoholic fatty liver disease: past achievements and future challenges [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2013, 12: 125-135.
- [4] Zhang YG, Wang BE, Wang TL, et al. Assessment of hepatic fibrosis by transient elastography in patients with chronic hepatitis B [J]. *Pathol Int*, 2010, 60: 284-290.
- [5] Dong ZC, Gao Q, Mao JN. The regulatory effect of bilobalide on hepatic fibrosis of nonalcoholic steatohepatitis rat *via* TLR4/TAK1/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2019, 36: 716-722.
- [6] Li Q, Wang BE. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome [J]. *Chin Hepatol (肝脏)*, 2010, 15: 385-387.
- [7] Torre D, Lachmann A, Ma'ayan A. BioJupies: automated generation of interactive notebooks for RNA-Seq data analysis in the cloud [J]. *Cell Systems*, 2018, 7: 556-561.e3.
- [8] Gao Y, Kim S, Lee YI, et al. Cellular stress-modulating drugs can potentially be identified by *in silico* screening with connectivity map (CMap) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 5601.
- [9] Liu YQ, Lei Y, Yang J, et al. Bioinformatics screening of cardiac senescence related genes and therapeutic drugs [J]. *Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis (中西医结合心脑血管病杂志)*, 2021, 19: 358-364.
- [10] Jin Q, Yang Q, Fan JG. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin Hepatol (肝脏)*, 2021, 26: 87-88.
- [11] Dulai PS, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis [J]. *Hepatology*, 2017, 65: 1557-1565.
- [12] Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome [J]. *Diabetes*, 2001, 50: 1844-1850.
- [13] Ren J, Wang JH, Tang JD, et al. Effect of liraglutide injection combined with pioglitazone hydrochloride tablets in the treatment of obese T2DM and its influence on visfatin, leptin and insulin resistance [J]. *Clin Res Pract (临床医学研究与实践)*, 2020, 5: 58-60.
- [14] Ding SY, Shen LF, Chen YT, et al. Ameliorations of pioglitazone on insulin resistance in spontaneous IGT-OLETF rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2004, 39: 514-517.
- [15] Gbr AA, Baky NAA, Mohamed EA, et al. Cardioprotective effect of pioglitazone and curcumin against diabetic cardiomyopathy in type 1 diabetes mellitus: impact on CaMKII/NF- κ B/TGF- β 1 and PPAR- γ signaling pathway [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394: 394-360.
- [16] Du JH. Pioglitazone Ameliorates Nutritional Hepatic Fibrosis by Inhibiting Regulating TLR 4/NF- κ B Signaling Pathway in Mice 吡格列酮调控TLR4/NF- κ B信号通路阻止非酒精性脂肪性肝纤维化进展的研究 [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2013.
- [17] Tong YN, Huang YC, Zheng JM. Treatment of refractory ascites in liver cirrhosis [J]. *Clin Focus (临床荟萃)*, 2021, 36: 70-74.
- [18] Huang XT, Xiao RM, Wang MF, et al. Induction of rat hepatic CYP2E1 expression by arecoline *in vivo* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 153-156.
- [19] Yang YJ, Kong WJ, Sun L, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effect and clinical application of Areca catechu [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med (世界科学技术-中医药现代化)*, 2019, 21: 2583-2591.
- [20] Li FX, Zhang C, Tang Y, et al. Troglitazone induces oxidative stress and autophagy in human cardiomyocytes [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2020, 34: 24-29.
- [21] Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—a step towards mitochondria based therapeutic strategies [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863: 1066-1077.
- [22] Wang Z, Wang JH. Advances in studies on pharmacological effect of parthenolide [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharmacol (中医药导报)*, 2019, 25: 112-115.
- [23] Hao QF, Wang BB, Zhang W, et al. NF- κ B inhibitor parthenolide promotes renal tubules albumin uptake in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Chin Med Sci J (中国医学科学杂志-英文版)*, 2020, 35: 31-42, 110.