

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.06.015
文章编号: 1005-8982(2020)06-0080-05

新进展研究·论著

HMGB1、维生素 D₃ 水平与多发性骨髓瘤的相关性*

贺冠强, 郭敏, 索晓慧, 刘洪峰, 李俊东

(邯郸市中心医院 血液内科, 河北 邯郸 056001)

摘要:目的 检测多发性骨髓瘤(MM)患者血清高迁移率族蛋白B1(HMGB1)、维生素D₃水平变化,分析其与病情进展的关系。**方法** 选取2012年1月—2013年12月在邯郸市中心医院治疗的MM患者145例作为研究组,以及150例健康体检者作为对照组。采用酶联免疫吸附试验检测血清HMGB1、维生素D₃、β2微球蛋白(β2-M)及乳酸脱氢酶(LDH)水平;比较MM不同分期及随访后不同预后[完全缓解(CR)及部分缓解后复发]患者血清HMGB1、维生素D₃、β2-M及LDH水平。分析血清HMGB1、维生素D₃水平与β2-M、LDH的相关性,绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析血清HMGB1、维生素D₃对MM患者预后的预测价值。**结果** 与对照组比较,研究组血清HMGB1、β2-M及LDH升高,而维生素D₃降低($P < 0.05$);研究组I期、II期、III期组MM血清HMGB1、β2-M及LDH逐渐升高,而维生素D₃逐渐降低($P < 0.05$)。CR患者血清HMGB1、β2-M及LDH低于部分缓解后复发患者,而维生素D₃高于部分缓解后复发患者($P < 0.05$)。MM患者血清HMGB1水平与β2-M、LDH呈正相关($r = 0.524$ 和 0.412 , $P < 0.05$),而维生素D₃水平与β2-M、LDH呈负相关($r = -0.401$ 和 -0.382 , $P < 0.05$)。ROC曲线分析显示,联合检测血清HMGB1、VD₃对MM患者预后预测的敏感性、特异性分别为77.6%和74.5%,高于2指标单独检测。**结论** MM患者血清HMGB1水平升高,维生素D₃水平降低,HMGB1、维生素D₃可能影响疾病的发生、发展,可作为MM病情评估和预后预测的辅助指标。

关键词: 多发性骨髓瘤;高迁移率族蛋白质类;维生素类;预后

中图分类号: R733.3

文献标识码: A

Correlation between the levels of HMGB1, vitamin D₃ and multiple myeloma*

Guan-qiang He, Min Guo, Xiao-hui Suo, Hong-feng Liu, Jun-dong Li

(Department of Hematology, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China)

Abstract: Objective To detect the serum levels of high mobility group protein B1 (HMGB1), Vitamin D₃, and to explore their correlations with the progress of patients with multiple myeloma (MM). **Methods** The serum samples from 145 cases of MM patients and 150 cases of healthy volunteers were collected, the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of serum HMGB1, vitamin D₃, 2-microglobulin (β2-M) and lactate dehydrogenase (LDH). The levels of serum HMGB1, Vitamin D₃, β2-M, LDH in MM patients in different stages and with different prognosis (totally recover and relapse after partially recover) after follow-up were compared. The correlation between the levels of serum HMGB1/Vitamin D₃ with levels of serum β2-M / LDH were analyzed. Predictive values of serum HMGB1 and vitamin D₃ on prognosis of MM patients were evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. **Results** Compared to the healthy volunteers, the levels of serum HMGB1, β2-M, LDH in MM patients increased, while the level of serum vitamin D₃ decreased ($P < 0.05$). The levels of serum HMGB1, β2-M and LDH in MM patients with stage I, II and III increased gradually. The level

收稿日期: 2019-09-25

* 基金项目: 河北省2018年度医学科学研究重点课题计划(No: 20182694)

of serum vitamin D₃ decreased gradually ($P < 0.05$). In the patients who totally recover, the levels of serum HMGB1, β 2-M, LDH were lower than those in the patients who suffer a relapse after partially recover, and the level of serum Vitamin D₃ was higher ($P < 0.05$). In MM patients, the level of serum HMGB1 was positively related with levels of serum β 2-M and LDH, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There were positive correlations between serum HMGB1 and β 2-M, LDH in MM patients ($r = 0.524$ and 0.412 , $P < 0.05$); the level of serum vitamin D₃ was negatively related with level of serum β 2-M and LDH, the difference was statistically significant ($r = -0.401$ or -0.382 , $P < 0.05$). The results of ROC curve showed that the sensitivity and specificity of combined detection of serum HMGB1 and vitamin D₃ for predicting the prognosis of MM patients were 0.776 and 0.745, respectively, which were higher than those of single detection of them. **Conclusions** The level of serum HMGB1 increased and the level of serum vitamin D₃ decreased, which has influence on the occurrence and progress of MM. They may be used as an auxiliary index for evaluating MM condition and predicting prognosis.

Keywords: multiple myeloma; HMGB1 protein; vitamins; prognosis

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是一种浆细胞恶性肿瘤, 多发于中老年患者, 约占血液肿瘤的10%, 全身恶性肿瘤的1%^[1]。在临床, 随着干细胞移植、免疫调节剂及蛋白酶体抑制剂的广泛应用, MM 患者的治疗疗效、预后均得到改善, 精准的治疗方案及准确的预后评估在 MM 患者的临床治疗中显得尤为重要^[2]。

血清高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 基因定位于染色体 13q12, 编码由 215 个氨基酸残基构成的序列高度保守的蛋白质^[3]。HMGB1 在炎症、创伤、免疫系统疾病及恶性肿瘤等发病过程中发挥作用^[4], 如 HMGB1 在多种恶性肿瘤组织中呈阳性表达, 且与肿瘤的浸润、转移相关, 是鉴别肿瘤的潜在生物学标志物^[5]。维生素 D₃ 是一种脂溶性维生素, 具有调节钙磷代谢、抗增殖、抗分化及免疫调节等功能。维生素 D₃ 缺乏与消化道肿瘤、前列腺癌及乳腺癌等不良预后关系密切^[6-8]。本研究通过检测 MM 患者血清 HMGB1、维生素 D₃ 水平, 以期临床预测 MM 患者病情进展提供较为可靠的评价指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 1 月—2013 年 12 月在邯郸市中心医院治疗的 MM 患者 145 例作为研究组。其中, 男性 102 例, 女性 43 例; 年龄 42 ~ 87 岁, 平均 (54.61 ± 9.87) 岁。根据 MM 国际分期系统 (international staging system, ISS)^[9]: I 期 50 例, II 期 55 例, III 期 40 例。34 例采用长春地辛 + 阿霉素 + 地塞米松治疗方案, 36 例采用硼替佐米 + 地塞米松 + 沙利度胺治疗方案, 75 例采用其他治疗方案。选取同期健康体检者 150 例作为对照组。其中, 男性 105 例, 女性 45 例;

年龄 43 ~ 89 岁, 平均 (53.98 ± 8.21) 岁。纳入标准: ①签署知情同意书; ②具备完整的病历资料和随访资料; ③符合 2015 年修订的《中国多发性骨髓瘤诊治指南》^[10]; ④采集血清样本前未接受抗肿瘤治疗。排除标准: ①失访; ②严重肝、肾功能异常; ③合并糖尿病、严重皮肤病及其他恶性肿瘤; ④原发性骨质疏松症; ⑤近 3 个月内使用过激素和免疫抑制剂; ⑥近 1 个月内使用过活性维生素 D₃、降钙素等; ⑦化疗前或化疗过程中发生感染; ⑧持续腹泻、慢性感染及自身免疫性疾病。本研究通过医院伦理委员会批准。两组性别、年龄比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

收集纳入对象 10 ml 晨起空腹外周静脉血, 室温静置 1 h 后, 低温 2 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 保存于 -80 °C 冰箱。采用酶联免疫吸附试验检测血清样本中 HMGB1、维生素 D₃、 β 2 微球蛋白 (β 2-microglobulin, β 2-M) 及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平, 每个样本检测 4 个平行复孔, 取平均值后进行统计分析。

1.3 随访

随访时间 4 ~ 60 个月, 中位随访时间 21 个月, 以患者死亡或随访时间截止为随访终点。根据国际骨髓瘤工作组标准^[11]评价 MM 疗效分为完全缓解 (complete response, CR)、非常好的部分缓解 (very good partial response, VGPR)、部分缓解 (partial response, PR)、疾病稳定 (stable disease, SD)、病情进展 (progressive disease, PD)。本研究将 VGPR、PR、SD 及 PD 患者的预后列为部分缓解后复发。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以

均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 t 检验或方差分析,进一步两两比较用 LSD- q 检验;相关分析用 Pearson 法,绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC curve), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 HMGB1、维生素 D₃、 β 2-M 及 LDH 比较

研究组各亚组(I期、II期、III期)和对照组血清 HMGB1、维生素 D₃、 β 2-M 及 LDH 比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,研究组各亚组(I期、II期、III期)血清 HMGB1、

β 2-M、LDH 水平升高,而维生素 D₃ 低于对照组;研究组 III 期血清 HMGB1、 β 2-M 及 LDH 高于 I 期和 II 期,II 期血清 HMGB1、 β 2-M 及 LDH 高于 I 期($P < 0.05$),III 期维生素 D₃ 低于 I 期和 II 期,II 期维生素 D₃ 低于 I 期($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 不同预后患者血清 HMGB1、维生素 D₃、 β 2-M 及 LDH 比较

经随访,CR 患者 98 例,部分缓解后复发 47 例。CR 组与部分缓解后复发组血清 HMGB1、维生素 D₃、 β 2-M 及 LDH 比较,经 t 检验,差异有统计学意义($P < 0.05$),CR 组血清 HMGB1、 β 2-M 及 LDH 低于部分缓解后复发组,而维生素 D₃ 高于部分缓解后复发组。见表 2。

表 1 各组血清 HMGB1、维生素 D₃、 β 2-M 及 LDH 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HMGB1/ (pg/ml)	维生素 D ₃ / (μg/L)	β 2-M/ (mg/L)	LDH/ (u/L)
对照组	150	50.46 \pm 21.82	28.74 \pm 3.20	2.06 \pm 0.29	327.43 \pm 117.27
研究组					
I 期	50	156.65 \pm 86.75 ^①	19.30 \pm 3.24 ^①	2.78 \pm 0.81 ^①	407.94 \pm 149.93 ^①
II 期	55	378.55 \pm 143.72 ^{①②}	17.16 \pm 3.04 ^{①②}	5.80 \pm 2.42 ^{①②}	603.03 \pm 239.36 ^{①②}
III 期	40	828.39 \pm 203.68 ^{①②③}	10.55 \pm 2.83 ^{①②③}	13.79 \pm 3.42 ^{①②③}	1 018.88 \pm 268.73 ^{①②③}
<i>F</i> 值		630.752	462.583	544.233	173.298
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与研究组 I 期比较, $P < 0.05$;③研究组与 II 期比较, $P < 0.05$ 。

表 2 不同预后患者血清 HMGB1、维生素 D₃、 β 2-M 及 LDH 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HMGB1/ (pg/ml)	维生素 D ₃ / (μg/L)	β 2-M/ (mg/L)	LDH/ (u/L)
CR 组	98	303.54 \pm 62.49	18.24 \pm 3.34	3.87 \pm 1.41	596.48 \pm 115.74
部分缓解后复发组	47	682.85 \pm 249.57	11.64 \pm 2.89	13.40 \pm 2.04	761.16 \pm 164.43
<i>t</i> 值		10.266	11.617	28.888	6.172
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 MM 患者血清 HMGB1、维生素 D₃ 与 β 2-M、LDH 的相关性

MM 患者血清 HMGB1 与 β 2-M、LDH 呈正相关($P < 0.05$);而维生素 D₃ 与 β 2-M、LDH 呈负相关($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 血清 HMGB1、维生素 D₃ 对 MM 患者预后的预测价值

以 CR 患者为阳性样本(98 例),以部分缓解后复发患者为阴性样本(47 例),将血清 HMGB1、维生素 D₃ 划分为 8 ~ 9 个组段,建立 ROC 诊断分析模型。结果显示单独检测 HMGB1、维生素 D₃ 对 MM 患者预

表 3 MM 患者血清 HMGB1、维生素 D₃ 与 β 2-M、LDH 的相关性分析

指标	HMGB1		维生素 D ₃	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
β 2-M	0.524	0.001	-0.401	0.006
LDH	0.412	0.011	-0.382	0.014

后的预测价值,AUC 分别为 0.701 和 0.748。在各指标对应的理论阈值点处,敏感性均 $> 70\%$,特异性为 $65\% \sim 72\%$ 。见表 4 和图 1。

再建立 HMGB1、维生素 D₃ 联合诊断模型,仍应用血清 HMGB1、维生素 D₃ 指标的各自阈值,对 MM

患者预后做预测诊断。若两者均为阳性或阴性即做阳性或阴性的预测诊断,否则予以重测,并与临床专家

会商确定。经本研究样本实测,其敏感性和特异性分别为 77.6% 和 74.5%。见表 4。

表 4 血清 HMGB1、维生素 D₃ 对 MM 患者预后预测价值的 ROC 分析参数

指标	AUC	理论阈值	敏感性	95% CI		特异性	95% CI		约登指数
				下限	上限		下限	上限	
单独检测									
HMGB1	0.701	450 pg/ml	0.704	0.616	0.792	0.652	0.594	0.710	0.356
维生素 D ₃	0.748	15.5 μg/L	0.732	0.661	0.803	0.716	0.618	0.814	0.448
联合检测									
HMGB1+ 维生素 D ₃	-	上述对应值	0.776			0.745			0.511

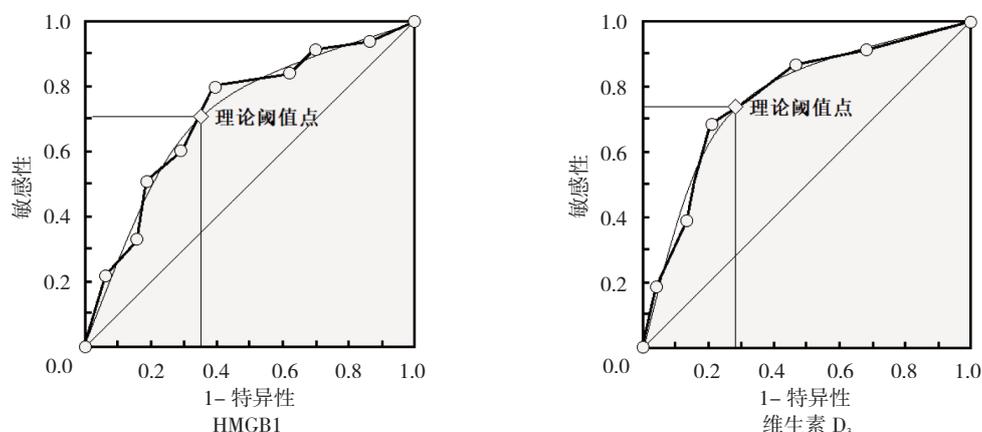


图 1 血清 HMGB1、维生素 D₃ 对 MM 患者预后预测价值的 ROC 曲线

3 讨论

骨髓瘤细胞具有高度特异性,导致 MM 患者的临床表现呈现多样性,主要有贫血、高血钙、骨痛、病理性骨折及反复感染等^[12]。目前,临床常用的 MM 分期以血红蛋白、血肌酐及血钙含量为基础的 Durie-Salmon 分期系统;以 β 2-M、血清白蛋白水平为基础的 ISS 分期系统;遗传学异常、LDH 水平纳入后的 R-ISS 系统。以上各分期系统均可在一定程度上评估患者病情,但在临床应用中均存在一定的局限性^[13],如 I 期 MM 患者的临床症状隐匿,无高钙血症、骨质破坏等症状,寻找简单、便捷的评估 MM 病情进展及预后的辅助指标,是临床研究的热点和难点^[14]。

β 2-M 是一种非特异性肿瘤标志物,主要以游离形式存在于细胞外液。肿瘤细胞可大量合成和分泌 β 2-M,MM 患者体内肿瘤细胞大量增殖,同时存在大量破坏细胞,导致患者血清 β 2-M 水平升高。 β 2-M 水平能够反映 MM 患者体内骨髓瘤细胞总量,是 MM 患者 ISS 分期标准的参考因素之一,血清 β 2-M 水平

可提示 MM 疾病进展^[15]。LDH 是机体糖酵解过程中的重要代谢酶,肿瘤细胞可释放 LDH 至血液,血清 LDH 水平升高与 MM 患者预后密切相关,在 MM 预后评估中具有重要的参考价值^[16]。

HMGB1 广泛分布在心、肺、肾等组织的细胞核中,与 DNA 结合后参与基因转录调控,并能够维持核小体结构的稳定,又被称为 DNA 伴侣,参与组织再生及肿瘤转移等^[17];而肝、脑等组织中,HMGB1 定位于细胞外,主要参与机体炎症反应。研究表明,各种白血病患者血清 HMGB1 呈高表达状态^[18]。本研究发现,与对照组比较,研究组血清 HMGB1 水平升高,初步证实 HMGB1 在 MM 患者血清存在异常表达,与 MM 疾病发生相关,具有作为 MM 相关生物学标志物的潜能。此外,MM I 期、II 期、III 期患者血清 HMGB1 水平逐渐升高,且与 MM 疾病进展指标 β 2-M、LDH 呈正相关,提示 HMGB1 可能是 MM 发生、发展的影响因素,血清 HMGB1 水平可作为反映 MM 患者病情进展,可为临床医生判断和评估患者病情提供参考价值。

维生素 D₃ 是一种免疫调节剂,在肿瘤发生、发

展中扮演重要角色^[19]。大量研究证实, 维生素 D₃ 缺乏与急性淋巴细胞白血病、淋巴瘤肿瘤患者的不良预后相关^[20-21], 但目前有关维生素 D₃ 缺乏与 MM 疾病活动、进展的关系, 尚无明确结论^[22-23]。本研究发现, MM 患者血清维生素 D₃ 水平低于健康体检者, 且随疾病分期增加而逐渐降低, 初步推测 MM 患者维生素 D₃ 缺乏与 MM 好发于合并骨病的老年患者等疾病本身特点有关; 此外, MM 患者血清维生素 D₃ 水平与 MM 疾病进展指标 β 2-M、LDH 呈负相关, 维生素 D₃ 缺乏可能促进 MM 疾病进展。

MM 患者不同预后的血清 HMGB1、维生素 D₃ 水平比较有差异。与部分缓解后复发患者相比, CR 患者血清 HMGB1 水平降低, 维生素 D₃ 缺乏症状得到改善, 且 ROC 分析结果显示, 血清 HMGB1、维生素 D₃ 在预测 MM 患者预后的方面具有较高的临床价值, 满足临床实际应用的要求, 血清 HMGB1、维生素 D₃ 是 MM 患者病情评估、预后预测的良好辅助指标, 但因本研究为单中心研究, 样本数量有限, 后期仍需继续扩大样本量进行验证。

综上所述, MM 患者血清 HMGB1 水平升高且普遍存在维生素 D₃ 缺乏。血清 HMGB1、维生素 D₃ 水平与 MM 疾病进展指标 β 2-M、LDH 呈相关性, 血清 HMGB1、维生素 D₃ 水平检测在 MM 患者病情诊断、预后预测中具有一定的应用价值, 值得临床上进行深入研究。

参 考 文 献:

- [1] 王得印, 郝云良, 肖萌, 等. 多发性骨髓瘤流行病学及病因分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2018, 45(4): 277-280.
- [2] ALJAMA M A, SIDIQI M H, DINGLI D. Therapy for relapsed multiple myeloma[J]. Panminerva Med, 2018, 60(4): 174-184.
- [3] WU T, ZHANG W, YANG G, et al. HMGB1 overexpression as a prognostic factor for survival in cancer: a meta-analysis and systematic review[J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 50417-50427.
- [4] CEBRIÁN M J, BAUDEN M, ANDERSSON R, et al. Paradoxical role of hmgbl in pancreatic cancer: tumor suppressor or tumor promoter[J]. Anticancer Res, 2016, 36(9): 4381-4389.
- [5] WU L, YANG L. The function and mechanism of HMGB1 in lung cancer and its potential therapeutic implications[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 6799-6805.
- [6] MAHENDRA A, KARISHMA, CHOUDHURY B K, et al. Vitamin D and gastrointestinal cancer[J]. J Lab Physicians, 2018, 10(1): 1-5.
- [7] TRUMP D L, ARAGON-CHING J B. Vitamin D in prostate cancer[J]. Asian J Androl, 2018, 20(3): 244-252.
- [8] de LA PUENTE-YAGÜE M, CUADRADO-CENZUAL M A, CIUDAD-CABAÑAS M J, et al. Vitamin D and its role in breast cancer[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2018, 34(8): 423-427.
- [9] SHAIKH S P, IRFAN S M, SHEIKH S S. Disease staging according

- to international scoring system in newly diagnosed patients with multiple myeloma[J]. Pak J Med Sci, 2019, 35(1): 90-94.
- [10] 路瑾. 立足中国实际的骨髓瘤诊治——《中国多发性骨髓瘤诊治指南(第四版)》解读[J]. 中国实用内科杂志, 2016, 36(5): 376-378.
 - [11] KUMAR S, PAIVA B, ANDERSON K C, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma[J]. Lancet Oncol, 2016, DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.
 - [12] 王宁, 孙继芹, 李晓东, 等. 43 例多发性骨髓瘤临床特征分析[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(4): 595-597.
 - [13] VALKOVIC T, GACIC V, NACINOVIC-DULETIC A. Multiple myeloma index for risk of infection[J]. J Cancer, 2018, 9(12): 2211-2214.
 - [14] TACCHETTI P, PEZZI A, ZAMAGNI E, et al. Role of serum free light chain assay in the detection of early relapse and prediction of prognosis after relapse in multiple myeloma patients treated upfront with novel agents[J]. Haematologica, 2017, DOI: 10.3324/haematol.2016.154070.
 - [15] D'ANASTASI M, NOTOHAMIPRODJO M, SCHMIDT G P, et al. Tumor load in patients with multiple myeloma: β 2-microglobulin levels versus whole-body MRI[J]. AJR Am J Roentgenol, 2014, 203(4): 854-862.
 - [16] GU Y, YUAN Y H, XU J, et al. High serum lactate dehydrogenase predicts an unfavorable outcome in Chinese elderly patients with multiple myeloma[J]. Oncotarget, 2017, 8(29): 48350-48361.
 - [17] TESAROVA P, KALOUSOVA M, ZIMA T, et al. HMGB1, S100 proteins and other RAGE ligands in cancer - markers, mediators and putative therapeutic targets[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2016, 160(1): 1-10.
 - [18] ROY M, LIANG L, XIAO X, et al. Lycorine Downregulates HMGB1 to Inhibit autophagy and enhances bortezomib activity in multiple myeloma[J]. Theranostics, 2016, 6(12): 2209-2224.
 - [19] MAIER G S, HORAS K, KURTH A A, et al. Prevalence of vitamin d deficiency in patients with bone metastases and multiple myeloma[J]. Anticancer Res, 2015, 35(11): 6281-6285.
 - [20] JIANG L, ZHANG X, CHEN Y, et al. Alteration of serum 25(OH) vitamin D, vitamin D binding protein, and C-reactive protein levels in acute leukemia patients[J]. Clin Lab, 2018, 64(9): 1553-1559.
 - [21] TRACY S I, MAURER M J, WITZIG T E, et al. Vitamin D insufficiency is associated with an increased risk of early clinical failure in follicular lymphoma[J]. Blood Cancer J, 2017, DOI: org/10.1038/bcj.2017.70.
 - [22] WANG J, UDD K A, VIDISHEVA A, et al. Low serum vitamin D occurs commonly among multiple myeloma patients treated with bortezomib and/or thalidomide and is associated with severe neuropathy[J]. Support Care Cancer, 2016, 24(7): 3105-3110.
 - [23] ONG MW, SALOTA R, REEMAN T, et al. Artefactual 25-OH vitamin D concentration in multiple myeloma[J]. Ann Clin Biochem, 2017, 54(6): 716-720.

(唐勇 编辑)

本文引用格式: 贺冠强, 郭敏, 索晓慧, 等. HMGB1、维生素 D₃ 水平与多发性骨髓瘤的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(6): 80-84.