

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.08.016

IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 在口腔扁平苔藓患者中的
表达水平及临床意义*李 阳,王 琰[△]

宁夏医科大学口腔医学院,宁夏银川 750001

摘要:目的 探讨白细胞介素 17(IL-17)信使 RNA(mRNA)和前列腺素 E2(PGE2) mRNA 在口腔扁平苔藓(OLP)患者中的表达水平及临床意义。方法 选取 2020 年 3 月至 2021 年 3 月宁夏医科大学总医院口腔医院收治的 35 例 OLP 患者作为试验组,另选取同期在宁夏医科大学总医院口腔医院进行阻生牙拔除的 20 例患者作为对照组,根据组织是否糜烂,将试验组患者分为糜烂型 OLP 组和非糜烂型 OLP 组。检测并比较糜烂型 OLP 组和非糜烂型 OLP 组患者口腔黏膜病损组织及对照组患者口腔黏膜组织的 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平,并通过视觉模拟评分法(VAS)评估 OLP 患者的疼痛程度,比较不同疼痛程度的 OLP 患者 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平。采用 Pearson 相关分析 OLP 患者 IL-17 mRNA 与 PGE2 mRNA 表达水平的相关性。采用 Spearman 相关分析 OLP 患者 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平与疼痛程度的相关性。结果 非糜烂型 OLP 组有 19 例患者,糜烂型 OLP 组有 16 例患者。糜烂型 OLP 组 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平均高于非糜烂型 OLP 组和对照组,且非糜烂型 OLP 组均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。试验组中无疼痛患者有 5 例,轻度疼痛患者有 6 例,中度疼痛患者有 16 例,重度疼痛患者有 8 例。无疼痛 OLP 患者 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平均低于轻度、中度、重度疼痛 OLP 患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Pearson 相关分析结果显示,OLP 患者 IL-17 mRNA 表达水平与 PGE2 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.505, P=0.002$)。Spearman 相关分析结果显示,OLP 患者 IL-17 mRNA、PGE2 mRNA 表达水平与疼痛程度均呈正相关($r=0.710, 0.570, P<0.05$)。结论 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 参与了 OLP 的发生、发展过程,并且其表达水平与 OLP 患者疼痛程度呈正相关。

关键词:口腔扁平苔藓; 白细胞介素 17; 前列腺素 2; 疼痛程度; 信使 RNA**中图法分类号:**R781.5**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2024)08-1103-04Expression levels and clinical significance of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA
in patients with oral lichen planus*LI Yang, WANG Long[△]

School of Stomatology, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750001, China

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of interleukin-17 (IL-17) mRNA and prostaglandin E2 (PGE2) mRNA in patients with oral lichen planus (OLP). **Methods** A total of 35 OLP patients admitted to the Stomatological Hospital, General Hospital of Ningxia Medical University from March 2020 to March 2021 were selected as the experimental group, and 20 patients who underwent impacted tooth extraction in the Stomatological Hospital, General Hospital of Ningxia Medical University during the same period were selected as the control group. The patients in the experimental group were divided into erosive OLP group and non-erosive OLP group according to whether the tissue was erosive or not. The expression levels of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA in the oral mucosal lesion tissues of the erosive OLP group and the non-erosive OLP group and the control group were detected and compared, and the pain degree of OLP patients was evaluated by visual analogue scale (VAS). The expression levels of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA in OLP patients with different degrees of pain were compared. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between the expression levels of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA in patients with OLP. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation between the expression levels of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA and the degree of pain in patients with OLP. **Results** There were 19 patients in non-erosive OLP group and 16 patients in erosive OLP group. The expression levels of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA in erosive OLP group were higher than those in non-erosive OLP group and control group, and those in

* 基金项目:宁夏回族自治区高等学校科学研究项目(NGY2020039)。

作者简介:李阳,男,主治医师,主要从事口腔黏膜病的诊断和治疗方面的研究。△ 通信作者, E-mail:571549896@qq.com。

non-erosive OLP group were higher than control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). In the experimental group, there were 5 patients with no pain, 6 patients with mild pain, 16 patients with moderate pain, and 8 patients with severe pain. The expression levels of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA in OLP patients without pain were lower than those in OLP patients with mild, moderate and severe pain, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the expression level of IL-17 mRNA correlated positively with the expression level of PGE2 mRNA in OLP patients ($r = 0.505, P = 0.002$). Spearman correlation analysis showed that the expression levels of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA in OLP patients correlated positively with the degree of pain ($r = 0.710, 0.570, P < 0.05$). **Conclusion** The expression of IL-17 mRNA and PGE2 mRNA is involved in the occurrence and development of OLP, and its expression level correlates positively with the degree of pain in patients with OLP.

Key words: oral lichen planus; interleukin-17; prostaglandin 2; pain degree; messenger RNA

口腔扁平苔藓(OLP)是一种常见的口腔黏膜疾病。根据组织有无糜烂分为糜烂型 OLP 和非糜烂型 OLP。其中,糜烂型 OLP 表现为口腔常伴有明显的灼烧感和疼痛,严重影响患者语言、进食和吞咽功能。此外,糜烂型 OLP 若久治不愈,可能发展为口腔癌^[1]。因此,世界卫生组织将其列为口腔潜在恶性疾病之一^[2]。虽然目前尚未完全明确 OLP 的发病机制,但是越来越多的研究证明免疫失调在 OLP 发生、发展中发挥着重要作用,特别是 T 淋巴细胞介导的免疫反应和各种炎症分子的异常表达等免疫失调^[3]。辅助性 T 细胞 17(Th17)是 Th 家族的最新成员,可分泌白细胞介素(IL)-17 等特异性细胞因子,并与炎症、肿瘤及自身免疫性疾病的发生密切相关^[4]。在 OLP 的发展过程中,浸润的 T 淋巴细胞和角质形成细胞合成并分泌多种促炎性细胞因子,促使 OLP 患者产生炎症反应,进而导致糜烂、溃疡及疼痛等临床表现,表明 OLP 的发展与促炎性细胞因子的激活有关^[5-7]。本课题组前期研究发现,OLP 患者外周血血清中 IL-17、血管表皮生长因子表达水平均高于健康者,提示 IL-17 和血管表皮生长因子可能参与 OLP 的发病过程,但具体机制尚不明确,需要进一步探究^[8]。前列腺素 E2(PGE2)作为炎症介质参与许多疾病的发生、发展过程,并可以活化树突状细胞的促炎性细胞因子/趋化因子,但在自身免疫性疾病中,PGE2 主要被认为是一种促炎性细胞因子^[9]。此外,有研究报道,IL-17 和 PGE2 在肿瘤的发生、转移、血管生成等过程中发挥重要作用^[10-11]。而 PGE2 和 IL-17 在 OLP 发生、发展中的作用机制目前仍不清楚。因此,本研究主要探讨了 IL-17 和 PGE2 的信使 RNA(mRNA)在 OLP 患者中的表达水平与临床意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 3 月至 2021 年 3 月宁夏医科大学总医院口腔医院收治的 35 例 OLP 患者作为试验组,另选取同期在宁夏医科大学总医院口腔医院进行阻生牙拔除的 20 例患者作为对照组。根据组织是否糜烂,将试验组患者分为糜烂型 OLP 组和非糜烂型 OLP 组。纳入标准:(1)符合《口腔扁平苔

藓诊疗指南(修订版)》^[3]中的相关诊断标准;(2)未接受任何相关治疗。排除标准:(1)合并全身系统性疾病或恶性肿瘤;(2)伴有牙龈炎或牙周炎等口腔疾病。试验组男 16 例,女 19 例;年龄 32~71 岁,平均(48.3±15.5)岁。对照组男 9 例,女 11 例;年龄 21~43 岁,平均(32.5±9.2)岁。试验组和对照组性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。所有患者及家属均知情同意并签署知情同意书。本研究经宁夏医科大学总医院口腔医院医学伦理委员会审核批准(宁医大伦理第 2020-270 号)。

1.2 仪器与试剂 美国赛默飞世尔 NanoDrop One 超微量紫外分光光度计,美国赛默飞 ProFlex 聚合酶链反应(PCR)仪。RNAlater 液和 RNAeasyTMRNA 抽提试剂盒均购自中国碧云天生物技术有限公司;PCR 引物均由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成;反转录试剂盒 Time PrimeScript[®] RT kit 和荧光定量试剂盒 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 均购自北京宝日医生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR 采集试验组患者口腔黏膜病损组织及对照组患者口腔黏膜组织标本,置于 RNAlater 液,在 4℃ 冰箱过夜后,再置于-80℃ 冰箱中保存备用;液氮研磨组织后,使用 RNAeasyTMRNA 抽提试剂盒,提取 RNA。美国赛默飞世尔 NanoDrop One 超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度后合成互补 DNA(cDNA),根据 RNA 浓度,配制反转录体系,按照产品说明书,将合成的 cDNA 存于-20℃ 冰箱中备用。IL-17 正向引物序列为 5'-CTGAATATC-CATAACCGGAATACC-3',反向引物序列为 5'-AGCGTTGATGCAGCCCAAG-3';PGE2 正向引物序列为 5'-CACAATCTCAAAGGGCCATC-3',反向引物序列为 5'-ATGGTACACACCGTGGCATA-3';GAPDH 正向引物序列为 5'-GGTGTGAACCAT-GAGAAGTATGA-3',反向引物序列为 5'-GAGTC-CTTCCACGATACCAAAG-3'。PCR 反应体系为 TB Green Fast qPCR Mix(2X) 10.0 μL,PCR Forward Primer(10 μmol/L) 0.5 μL,PCR Reverse Primer(10 μmol/L) 0.5 μL,cDNA 2.0 μL,碳酸二乙

酯(DEPC)水 7.0 μ L。PCR 反应参数为 95 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 IL-17 和 PGE2 在试验组患者口腔黏膜病损组织及对照组患者口腔黏膜组织中 mRNA 的表达水平,重复 3 次取平均值。

1.3.2 评估患者疼痛程度 根据中华口腔医学会黏膜病专业委员会于 2022 年制定的《口腔扁平苔藓诊疗指南(修订版)》^[3],采用视觉模拟评分法(VAS)评估患者的疼痛程度,让患者在 0~10 分自行选择一个最能代表其疼痛程度的分数,0 分代表无疼痛,1~3 分代表轻度疼痛,4~6 分代表中度疼痛,7~10 分代表重度疼痛。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用 Pearson 相关分析 OLP 患者 IL-17 mRNA 与 PGE2 mRNA 表达水平的相关性;采用 Spearman 相关分析 OLP 患者 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平与疼痛程度的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组、非糜烂型 OLP 组、糜烂型 OLP 组 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平比较 非糜烂型 OLP 组有 19 例患者,糜烂型 OLP 组有 16 例患者。糜烂型 OLP 组 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平均高于非糜烂型 OLP 组和对照组,且非糜烂型 OLP 组均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 对照组、非糜烂型 OLP 组、糜烂型 OLP 组 IL-17 和 PGE2 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	IL-17 mRNA	PGE2 mRNA
对照组	20	11.94 $\pm$ 2.69	4.91 $\pm$ 1.43
非糜烂型 OLP 组	19	26.31 $\pm$ 6.99 [*]	12.31 $\pm$ 3.25 [*]
糜烂型 OLP 组	16	46.63 $\pm$ 8.70 ^{*#}	28.64 $\pm$ 8.83 ^{*#}
<i>F</i>		6.718	8.634
<i>P</i>		0.002	<0.001

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与非糜烂型 OLP 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.2 OLP 患者 IL-17 mRNA 与 PGE2 mRNA 表达水平的相关性 Pearson 相关分析结果显示,OLP 患者 IL-17 mRNA 表达水平与 PGE2 mRNA 表达水平呈正相关($r = 0.505, P = 0.002$)。

2.3 不同疼痛程度的 OLP 患者 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平比较 试验组中无疼痛患者有 5 例,轻度疼痛患者有 6 例,中度疼痛患者有 16 例,重度疼痛患者有 8 例。无疼痛 OLP 患者 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平均低于轻度、中度、重度疼痛 OLP 患者,差异均有统计学意义($P <$

0.05)。见表 2。

表 2 不同疼痛程度的 OLP 患者 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)			
疼痛程度	<i>n</i>	IL-17 mRNA	PGE2 mRNA
无疼痛	5	20.83 $\pm$ 2.58	8.42 $\pm$ 2.21
轻度疼痛	6	32.12 $\pm$ 3.34 [*]	13.71 $\pm$ 3.63 [*]
中度疼痛	16	43.62 $\pm$ 3.12 [*]	24.13 $\pm$ 3.58 [*]
重度疼痛	8	59.83 $\pm$ 4.18 [*]	36.23 $\pm$ 4.25 [*]
<i>F</i>		1.199	2.036
<i>P</i>		<0.05	<0.05

注:与无疼痛 OLP 患者比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.4 OLP 患者 IL-17 mRNA 和 PGE2 mRNA 表达水平与疼痛程度的相关性 Spearman 相关分析结果显示,OLP 患者 IL-17 mRNA、PGE2 mRNA 表达水平与疼痛程度均呈正相关($r = 0.710, 0.570, P < 0.05$)。

3 讨 论

OLP 是临床常见的与免疫相关的慢性炎症性口腔黏膜病。糜烂型 OLP 有转化为口腔鳞癌的风险,一旦发生癌变,会严重影响患者的身心健康。OLP 的病理特点为固有层有大量的淋巴细胞浸润及基底细胞发生液化变性,提示 T 淋巴细胞参与 OLP 的发生、发展过程^[2]。有研究报道,Th17 会产生多种促炎性细胞因子,在银屑病和类风湿关节炎等慢性炎症性疾病中发挥了重要作用,并与疾病的严重程度有关^[12]。此外,Th17 分泌的 IL-17 会促使上皮细胞、固有层中的成纤维细胞、树突状细胞、巨噬细胞等产生多种细胞因子,从而协同促进炎症的发生、发展^[13]。

本研究发现,糜烂型 OLP 组、非糜烂型 OLP 组 IL-17 mRNA 表达水平均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示 OLP 患者体内的 Th17 数量增加。糜烂型 OLP 组 IL-17 mRNA 表达水平高于非糜烂 OLP 组($P < 0.05$),提示与非糜烂型 OLP 患者相比,糜烂型 OLP 患者体内含有更多的 IL-17 细胞。谢三祥等^[14]研究发现 OLP 患者体内存在大量的 Th17 细胞浸润。CD8⁺ T 淋巴细胞在糜烂型 OLP 患者的糜烂部位聚集增多、活性增强,并通过分泌干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 、IL-17 等细胞因子加重 OLP 患者口腔部位糜烂^[15]。因此,笔者推断 OLP 患者 IL-17 mRNA 表达水平升高是因为局部环境中淋巴细胞的浸润。本研究结果显示,OLP 患者 IL-17 mRNA 表达水平与疼痛程度呈正比($r = 0.710, P < 0.05$),提示 OLP 患者 IL-17 mRNA 表达水平越高,疼痛症状越明显。表明 OLP 患者上皮和固有层中的 Th17 被抗原呈递细胞激活并释放 IL-17 并促进炎症反应,引起相应的疼痛等生物学效应。提示 Th17 产生的 IL-17 在 OLP 中发挥了关键作用。

本研究发现,糜烂型 OLP 组、非糜烂型 OLP 组 PGE2 mRNA 表达水平均高于对照组,差异均有统计

学意义($P<0.05$),并且与 OLP 患者的疼痛程度呈正相关($r=0.570, P<0.05$),提示 PGE2 mRNA 表达水平越高,OLP 患者疼痛越明显。而且糜烂型 OLP 组 PGE2 mRNA 表达水平比非糜烂型 OLP 组高($P<0.05$)。分析因为在 OLP 患者体内的 Th17 刺激固有层中的树突状细胞从而分泌大量的 PGE2,并募集固有层的细胞产生大量炎症因子,导致基底细胞发生空泡性变,上皮细胞发生糜烂,这可能是临床 OLP 患者口腔组织发生糜烂并伴疼痛的原因之一。Th17 通过分泌环氧化酶-2 诱导 PGE2 发挥扩血管作用,也能促进炎症细胞分泌炎症因子,从而促进炎症反应的进一步发生和发展^[11]。MUKAE 等^[16]通过免疫组化反应检测 OLP 患者的环氧化酶-2 和微粒体前列腺素 E 合酶-1(mPGES-1)表达水平发现,OLP 病变的角质形成细胞中环氧化酶-2 和 mPGES-1 的表达水平较正常的口腔上皮细胞高,与本研究结果相似。在研究小鼠类风湿关节炎的模型中 PGE2 类似物(米索前列醇)的作用机制时发现,PGE2 促进了树突状细胞产生 IL-6,并诱导 IL-23/IL-12 平衡的转变,导致 IL-17 水平上升,提示 PGE2 可能是通过放大自身反应性 Th17 细胞作用,从而加重小鼠关节炎的炎症反应^[17]。此外,IL-17 和 PEG2 还可能与乳腺癌、肺癌等肿瘤的发生、发展和转移等密切相关^[18-20]。

综上所述,OLP 患者口腔黏膜病损组织中 IL-17 mRNA、PGE2 mRNA 表达水平均高于正常的口腔黏膜组织,且糜烂型 OLP 组织 IL-17 mRNA、PGE2 mRNA 表达水平均高于非糜烂型 OLP 组织,并且与 OLP 患者的疼痛程度呈正相关,提示其可能参与了 OLP 的发生和发展过程。因此,阐明 IL-17/PGE2 轴在 OLP 中发生、发展机制,寻找可能有效的治疗靶点,减少 OLP 发展为口腔癌的风险,有助于预防和管理 OLP。

参考文献

[1] RIVERA C,CRISÓSTOMO M F,PEÑA C,et al. Oral lichen planus interactome reveals CXCR4 and CXCL12 as candidate therapeutic targets[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 5454.

[2] DE LANNA C A,DA SILVA B N M,DE MELO A C,et al. Oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma share key oncogenic signatures[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 20645.

[3] 中华口腔医学会口腔黏膜病学专业委员会,中华口腔医学会中西医结合专业委员会. 口腔扁平苔藓诊疗指南(修订版)[J]. 中华口腔医学杂志, 2022, 57(2): 115-121.

[4] KANG Y Z,CHEN J,LI X Y,et al. Salivary KLK5 and uPA are potential biomarkers for malignant transformation of OLK and OLP[J]. Cancer Biomark, 2021, 31(4): 317-328.

[5] DENG J,PAN W Y,JI N,et al. Cell-free DNA promotes

inflammation in patients with oral lichen planus via the sting pathway[J]. Front Immunol, 2022, 13: 838109.

[6] MIOSSEC P,KOLLS J K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 763-776.

[7] NOGUEIRA P A,CARNEIRO S,RAMOS-E-SILVA M. Oral lichen planus: an update on its pathogenesis[J]. Int J Dermatol, 2015, 54(9): 1005-1010.

[8] 李阳. 白芍总苷联合枸杞对口腔扁平苔藓患者血清中 IL-17 和 VEGF 表达的影响[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2016.

[9] EL-HOWATI A,THORNHILL M H,COLLEY H E,et al. Immune mechanisms in oral lichen planus[J]. Oral Dis, 2023, 29(4): 1400-1415.

[10] NAKANISHI M,ROSENBERG D W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer[J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(2): 123-137.

[11] 孔利心,任彪,程磊. 环氧合酶 2/前列腺素 E2 通路调控口腔肿瘤机制的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2020, 47(4): 431-438.

[12] BLAUVELT A,CHIRICOZZI A. The immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2018, 55(3): 379-390.

[13] UENO A,JEFFERY L,KOBAYASHI T,et al. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease[J]. J Autoimmun, 2018, 87: 38-49.

[14] 谢三祥,丰琳,朱声荣,等. IL-17 在口腔扁平苔藓病损中的表达及其对趋化因子 CCL20 表达的促进作用[J]. 实用医学杂志, 2014, 33(14): 2225-2227.

[15] QING M,YANG D,SHANG Q H,et al. CD8⁺ tissue-resident memory T cells induce oral lichen planus erosion via cytokine network[J]. Elife, 2023, 12: e83981.

[16] MUKAE S,OKAZAKI Y,TSUDA H,et al. Detection of fascin and CCR-7 positive mature dendritic cells in oral lichen planus[J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(4): 334-342.

[17] SHEIBANIE A F,KHAYRULLINA T,SAFADI F F,et al. Prostaglandin E₂ exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(8): 2608-2619.

[18] MERINGA A D,HERNÁNDEZ-LÓPEZ P,CLEVEN A,et al. Strategies to improve γδTCRs engineered T-cell therapies for the treatment of solid malignancies[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1159337.

[19] LIANG X H,WANG J,LIU Y S,et al. Polymorphisms of COX/PEG2 pathway-related genes are associated with the risk of lung cancer: a case-control study in China[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 108: 108763.

[20] COFFELT S B,KERSTEN K,DOORNEBAL C W,et al. IL-17-producing γδ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis[J]. Nature, 2015, 522(7556): 345-348.