

## · 基础研究 ·

TNF- $\alpha$  刺激大鼠骨髓间充质干细胞的机制研究 \*彭程飞<sup>1,2</sup> 韩雅玲<sup>2△</sup> 邓捷<sup>2</sup> 闫承慧<sup>2</sup> 康建<sup>2</sup> 李洋<sup>2</sup> 李杰<sup>1</sup> 王艳春<sup>3</sup>

(1 第四军医大学西京医院 陕西 西安 710032 2 沈阳军区总医院 辽宁 沈阳 110016 ;

3 辽宁省中医药学院 辽宁 沈阳 110016)

**摘要** 目的:研究肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )刺激大鼠骨髓间充质干细胞(marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs)的作用机制。方法:采取大鼠骨髓,以密度梯度离心分离出单个核细胞(MNCs),于体外培养并由牛垂体提取物(PEX)诱导扩增传代培养出骨髓间充质干细胞(MSCs)。经形态学和流式细胞仪检测 MSCs 表面标志物鉴定后,用 TNF- $\alpha$  刺激骨髓间充质干细胞(MSCs),通过酶联免疫吸附剂测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)观察比较不同组别细胞的生长因子分泌和蛋白印迹法(western blot)来观察细胞中蛋白的变化。结果:①经形态学观察和流式细胞仪检测 MSCs 表面标志物鉴定提示骨髓间充质干细胞的培养成功。②无 TNF- $\alpha$  刺激组与 TNF- $\alpha$  刺激组比较, TNF- $\alpha$  刺激组的生长因子分泌显著性增加,而通过磷酸化 Ik B 的表达量显著性增加提示 NF- $\kappa$  B 被激活 ( $P<0.05$ );同时 TNF- $\alpha$  刺激组与 TNF- $\alpha$  +NF- $\kappa$  B 抑制剂组比较, TNF- $\alpha$  +NF- $\kappa$  B 抑制剂组的生长因子分泌显著降低,而通过磷酸化 Ik B 的表达量显著减少提示 NF- $\kappa$  B 的活性被抑制( $P<0.05$ )。结论: NF- $\kappa$  B 对 TNF- $\alpha$  刺激下的骨髓间充质干细胞分泌生长因子有关键性作用。

**关键词** 骨髓间充质干细胞 肿瘤坏死因子- $\alpha$  核转录因子- $\kappa$  B 生长因子

中图分类号: R95-3 R54 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)07-1201-04

Mechanism of TNF- $\alpha$  in Stimulation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rats \*PENG Cheng-fei<sup>1</sup>, HAN Ya-ling<sup>2△</sup>, DENG Jie<sup>2</sup>, YAN Cheng-hui<sup>2</sup>, KANG Jian<sup>2</sup>, LI Yang<sup>2</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, WANG Yan-chun<sup>3</sup>

(1 Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 710032, Xi An, China;

2 Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Region of PLA, 110016, Shenyang, China;

3 Liaoning Traditional Chinese Medicine University, 110016, Shenyang, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the promotive effects of NF- $\kappa$  B on the marrow-derived mesenchymal stem cells. **Methods:** Mononuclear cells were isolated from rat bone marrow by density-gradient centrifugation and were cultured on fibronectin-coated plates, supplied with bovine pituitary extract. MSCs were identified by Morphology and Surface molecule markers of MSCs. After the marrow-derived mesenchymal stem cells were stimulated by TNF- $\alpha$ , the production of the growth factors and the protein expression of NF- $\kappa$  B in different groups were compared by ELISA and WESTERN BOLT. **Results:** ① The marrow-derived mesenchymal stem cells were successful cultured by observing the morphology of the marrow-derived mesenchymal stem cells and detecting the cell surface antigen by flow cytometry assays. ② The production of the growth factors had significantly increased in TNF- $\alpha$  stimulation group compared with that of no TNF- $\alpha$  stimulation group. The expression of p-Ik B increased significantly indicating the activation of NF- $\kappa$  B ( $P<0.05$ ). The production of the growth factors had significantly decreased in stimulation of TNF- $\alpha$  plus the inhibitor of NF- $\kappa$  B group compared stimulation of TNF- $\alpha$  group. And the protein expression of p-Ik B significantly decreased indicate the inhibition of NF- $\kappa$  B ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** NF- $\kappa$  B had crucially protective effects on the marrow-derived mesenchymal stem cells stimulated by TNF- $\alpha$ .

**Key words:** MSCs; TNF- $\alpha$ ; NF- $\kappa$  B; the growth factors

**Chinese Library Classification:** R95-3, R54 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)07-1201-04

## 前言

心肌梗死作为危害人类健康的危重疾病受到广泛关注。而骨髓间充质干细胞(marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs)现代移植技术的快速发展为解决心肌梗死后的心力衰竭、死亡等问题提供了可能的有效的治疗手段<sup>[1-4]</sup>。有研究表明,

骨髓间充质干细胞移植的治疗作用之一是通过分泌生长因子如血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维样生长因子 2(FGF-2)等的旁分泌作用促进血管新生以达到改善心肌功能的治疗效果<sup>[5]</sup>,但是作用机制却不甚清楚。本研究用原代培养的大鼠骨髓间充质干细胞为标本,在体外实验中用 TNF- $\alpha$  刺激细胞模拟缺血心肌区域的炎症反应,观察骨髓间充质干细胞的生长因子分泌

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(30770793, 30971218, 81070097)和国家青年科学基金项目(30800465)

作者简介:彭程飞(1984-),男,硕士研究生,主要研究方向:缺血性再灌注损伤机制

△通讯作者:韩雅玲,博士生导师,教授,电话:025-28878331, E-mail: hanyaling53@Gmail.com

(收稿日期:2011-01-03 接受日期:2011-01-28)

变化,并探讨其机制与 NF- $\kappa$  B 是否相关,为将来的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

实验使用 SD 雄性大鼠 7 只,体重约 150g,由沈阳军区总医院动物实验科提供。胎牛血清由美国 GIBCOBRL 公司提供;DMEM 培养基由美国 GIBCOBRL 公司提供;胰蛋白酶、二硫代氨基甲酸吡咯烷(pyrrolidine dithiocarbamate PDTC)由 Sigma 公司提供;抗 CD90、CD105、CD73、CD34、CD45、CD14 抗体,抗核转录因子  $\kappa$  B(NF- $\kappa$  B)抗体由美国 R&D 公司提供、抗  $\beta$ -actin 抗体由晶美生物工程有限公司,VEGF、FGF-2、IGF-1 和 HGF ELISA 试剂盒由美国 R&D 公司提供。

### 1.2 实验方法和步骤

1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离 取体重约 150g 成年 SD 大鼠,雄性,过量速麻安注射处死,75%酒精浸泡 10 min。置于超净台中,解剖分离出后肢长骨,75%酒精浸泡 5 min,生理盐水冲洗 3 遍。仔细去除长骨表面肌肉及纤维组织,剪除两端关节面,以 PBS 清洗骨干。从中间剪断长骨,暴露骨髓腔,以 10 ml DMEM 完全冲洗骨髓腔及干骺端。冲洗液以 TB 针头抽吸过滤以初步剔除骨渣,然后收集至 15 ml 离心管内,离心 1 000 rpm $\times$  5 min,弃去上清,在试管内加入 DMEM 5 ml,充分吹打混匀细胞。另取 15ml 离心管,加入 Ficoll 分离液 5ml,将细胞悬液沿管壁小心加至 Ficoll 液面上层,使两层间形成明显界面,离心 1 800 rpm $\times$  30 min。吸取中间界面软层细胞(MNCs),以 DMEM 洗涤,离心 1 000 rpm $\times$  5 min,重复 3 次。

1.2.2 骨髓间充质干细胞的培养 培养皿预先行 FN 包被:取一次性塑料培养皿,加入浓度为 0.1mg/ml 的 FN,使之完全覆盖皿底,室温下静置 40min,吸净皿中 FN(可回收重复使用),室温下晾干,备用。将新鲜分离的 MNCs 以  $2 \times 10^6$ /ml 的密度接种于 FN 包被的培养皿中,培养液采用 DMEM,含 10%FBS,牛垂体提取物(PEX)20 $\mu$ g/ml,肝素钠 10 U/ml,置 5% CO<sub>2</sub>、95%空气培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养。第 4 天行半量换液,以后每 3 天换液 1 次,至贴壁细胞铺满皿底 80%~90%时消化传代。鉴于 EPCs 对胰酶耐受性较差,通常采用含 1 mmol/L EDTA 的 PBS,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 消化传代。

1.2.3 骨髓间充质干细胞的鉴定 流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞表面抗体标志 CD90, CD105, CD73, CD34, CD45 和 CD14,具体步骤参考文献<sup>[6]</sup>。

1.2.4 酶联免疫吸附剂测定法(ELISA) 加被检样品:用稀释液(DS01、AS01、AS02、AS03、AS04)将被检样品按实验设计稀释,每孔 100 $\mu$ l,同时用稀释液作空白对照,封板封膜,室温放置 2 小时。洗涤,倒尽孔中液体,加满洗涤液(WS03),静置 10 秒,洗四次。加检测抗体,将生物素标记的检测抗体稀释适当浓度(稀释液 DS01),每孔 100 $\mu$ l,封板封膜,室温放置一个小时。再洗涤四次。加亲和素辣根过氧化物酶稀释适当浓度(稀释液 HD01)每孔 100 $\mu$ l,封板封膜,室温放置 30 分钟。加底物:新鲜配制的四甲基苯胺溶液,每孔 100 $\mu$ l,室温暗处放 30 分钟。加终止液(SS01):每孔 100 $\mu$ l,立即读值。观察结果:酶标仪记录 450nm 读数并换算。

1.2.5 蛋白印迹分析(Western blot) 采用 BCA 比色法试剂盒测

定裂解液中蛋白质的浓度,将 30  $\mu$ g 总蛋白加入 4 $\times$  Loading buffer,95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 后,经 10%分离胶行 SDS-PAGE 电泳,并以预染蛋白 maker 为标志,判定电泳终止时间。在 4 $^{\circ}$ C 的循环水浴内以 350 mA 电流将样品转至硝酸纤维素滤膜上,时间为 80 min;于 5%的脱脂奶粉 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h;TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min;加入 1:3500 Anti-myc (或 1:2500 Anti-His,或 1:5000 Anti-hCREG 单克隆抗体)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的羊抗小鼠抗体(1:2000 稀释),室温孵育 2 h;TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,ECL 化学发光显影。

1.2.4 TNF- $\alpha$  刺激骨髓间充质干细胞通过 NF- $\kappa$  B 分泌生长因子 实验分 3 组:①对照组(无 TNF- $\alpha$  刺激):即在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中培养的细胞;②损伤组(TNF- $\alpha$  刺激组):即在 20ng/mlTNF- $\alpha$  和 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中培养的细胞;③ NF- $\kappa$  B 抑制剂组(PDTC+TNF- $\alpha$  组):即在 20ng/mlTNF- $\alpha$  和 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中再加 200  $\mu$  M PDTC200  $\mu$  M。以上 3 组均取原代培养 15 天的细胞。对 10 小时后的细胞上清液进行 ELISA 检测和 30 分钟后的细胞进行 western blot 检测。以上各项检测均严格按照操作规程。

### 1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准误( $\bar{X} \pm SE$ )表示,用 SPSS17.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ , $p < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原代 MSCs 培养生长观察

收集骨髓 MNCs 后接种于 FN 包被的培养皿中,细胞大多呈悬浮生长。第 2 天可见少数细胞贴壁,呈梭形,形态较为均一,细胞体饱满,胞浆清澈、透明,细胞核位于细胞中央。培养第 1~3 天贴壁细胞分裂、增殖缓慢,主要表现为细胞伸展趋于完全,体积有所增大。至第 4 天起,细胞有丝分裂速度呈几何基数增长,培养皿中贴壁细胞数量增多,悬浮细胞明显减少。经换液后,可见小圆形高折光度的骨髓间充质干细胞粘附在贴壁细胞上。培养至第 7 天后,细胞分裂、增殖速明显变慢,大部分贴壁细胞保持梭形或多角形态。培养至 2~3 周后,有少数细胞折光度降低,呈融合片状生长(图 1)。

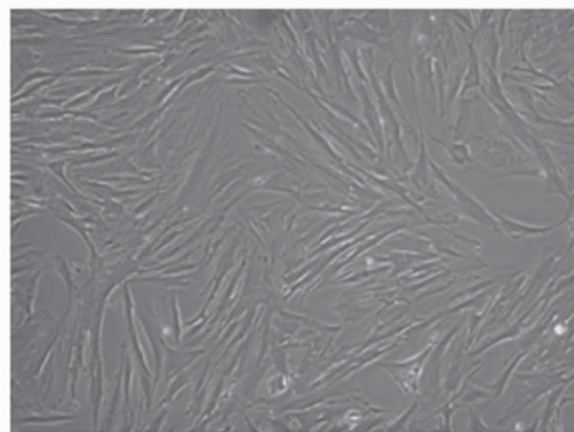


图 1 相差显微镜观察培养 15 d 生长良好的骨髓间充质干细胞 (400 $\times$ )  
Fig. 1 marrow-derived mesenchymal stem cells cultivated for fifteen days (400 $\times$ )

## 2.2 骨髓间充质干细胞的鉴定

流式细胞仪对标本细胞表面分子标记物进行 2 期和 3 期检测, 检测出分离培养细胞的表面阳性标记物 CD90 :96.4%,

CD105 :82.1%和 CD73 :88.3%; 以及阴性标记物 CD34 :1.71%和 CD45 :1.14%, CD14 :1.59%(图 2)。结果证明分离培养细胞为骨髓间充质干细胞(MSCs)。

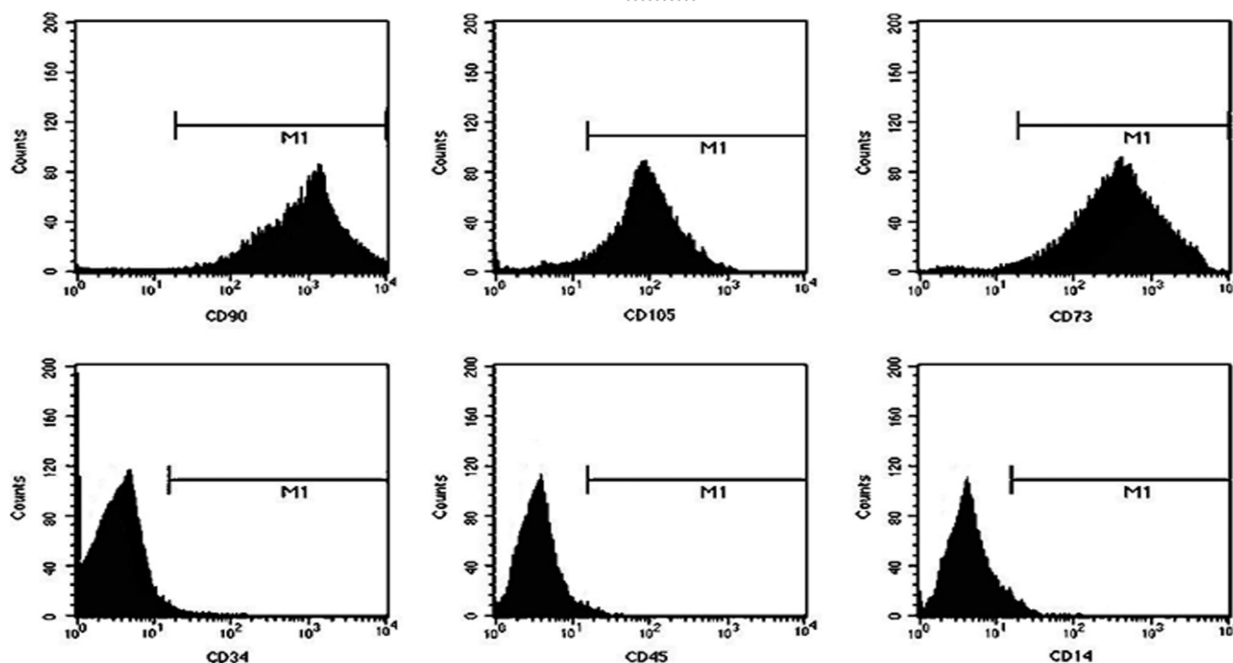


图 2 骨髓间充质干细胞表面抗体流式细胞仪分析图

Fig. 2 Analysis of surface molecule markers in MSCs by flow cytometry.

## 2.3 无 TNF- $\alpha$ 刺激或刺激 10h 后, 骨髓间充质干细胞的生长因子分泌和细胞蛋白的检测

无 TNF- $\alpha$  刺激或刺激 10h 后, 各组骨髓间充质干细胞分泌的生长因子 (血管内皮生长因子 VEGF、成纤维生长因子 2 FGF-2) 指标的检测和蛋白表达分别(图 3、图 4)。NF- $\kappa$  B 与 I $\kappa$  B 结合成三聚体, 在胞浆中以静息状态存在, 通过外界物质刺激, I $\kappa$  B 的磷酸化能使 NF- $\kappa$  B 活化发挥作用<sup>[7]</sup>, 所以实验选择观察磷酸化 I $\kappa$  B 的变化来分析 NF- $\kappa$  B 是否活化。结果表明: TNF- $\alpha$  刺激使骨髓间充质干细胞生长因子的分泌显著增加, 并且发现是 NF- $\kappa$  B 激活影响了这个非常重要的关键作用。

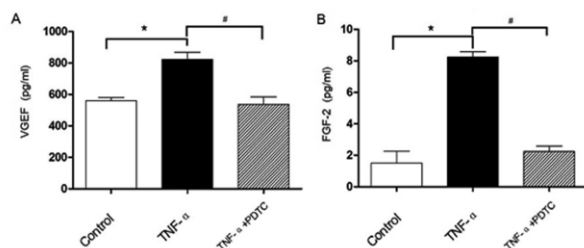


图 3 骨髓间充质干细胞生长因子分泌比较。A: VEGF 的分泌, B: FGF-2 的分泌。数据采用均数 $\pm$ 标准误( $\pm$  SE)表示。空白组与 TNF- $\alpha$  组比较,  $P<0.05$ ; TNF- $\alpha$  组与 TNF- $\alpha$  +PDTC 组比较,  $P<0.05$

Fig. 3 Effect of stimuli on MSCs production of paracrine growth factor. A: VEGF, B: FGF-2. Result are mean $\pm$  SE. The group of TNF- $\alpha$  compare with the group of control and the group of TNF- $\alpha$  +PDTC respectively. \*  
# $P<0.05$  N=3

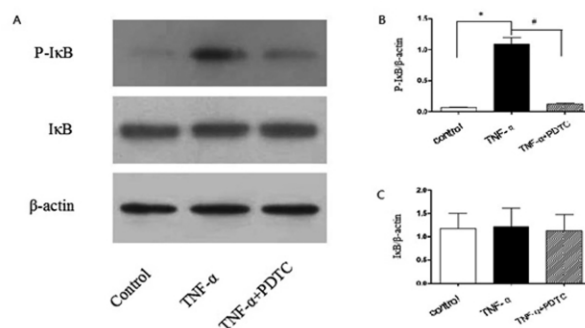


图 4 骨髓间充质干细胞细胞蛋白印迹分析图。A: 3 组细胞中 P-I $\kappa$  B 和 I $\kappa$  B 的比较, WESTERN BLOT 图,  $\beta$ -actin 是内参。B, C 为统计分析图。数据采用均数 $\pm$ 标准误( $\pm$  SE)表示。\* $P<0.05$

Fig. 4 Expression of the P-I $\kappa$  B and I $\kappa$  B. Result are mean $\pm$  SE. The group of TNF- $\alpha$  compare with the group of control and the group of TNF- $\alpha$  +PDTC respectively. \* $P<0.05$  N=3

## 3 讨论

干细胞移植到损伤组织部位通过旁分泌一些因子修复损伤组织的细胞, 改善组织的功能, 这样的因子包括: 细胞因子, 趋化因子和生长因子<sup>[8]</sup>。其中更有个关键的重要作用就是能够改善慢性缺血再灌注损伤组织的功能<sup>[9-12]</sup>。尽管还有研究认为是通过自体细胞的信号分子自分泌作用而改善功能, 但是可以肯定发挥作用的生物因子中肯定是包含有血管内皮生长因子 (VEGF) 和成纤维生长因子 2 (FGF-2) 的<sup>[13, 14]</sup>。血管内皮生长因子 (VEGF) 具有非常强的促血管新生作用。成纤维生长因子 2



(FGF-2)是成纤维生长因子信号家族一个很特殊的成员,它与内皮细胞的增殖有非常紧密的联系,同时有研究表明它的促血管新生作用可能比 VEGF 还强<sup>[15]</sup>。本实验证实骨髓间充质干细胞体外培养在受到炎症因子 TNF- $\alpha$  刺激后 VEGF 和 FGF-2 的分泌增加。这些增加的因子可以促进局部血流和自体分泌,提高损伤组织细胞的生存率<sup>[16]</sup>。另有研究发现过表达 VEGF 的骨髓间充质干细胞可以更有效地保护损伤组织<sup>[17]</sup>。所以,血管内皮生长因子和成纤维生长因子 2 是重要的旁分泌信号分子,它们在血管新生,细胞保护和组织存活中起到非常重要的作用。

移植干细胞的旁分泌作用还包括修复受损伤细胞,及激活损伤周围的血液循环和自体干细胞。间充质干细胞可以在移植到心肌梗塞边缘而激活抗凋亡信号,保护缺血心肌的存活。最近有研究发现,内源性干细胞通过循环系统存在于心、肝、脑、肾<sup>[18]</sup>。这些内源性干细胞可能具有生长因子受体,可以被激活后诱导它们的迁移、增殖和受损组织的修复和功能改善。研究表明 VEGF 和 FGF-2 具有这样的功能<sup>[19]</sup>。本研究证明面对损伤因素之一的炎症因子(TNF- $\alpha$ ),骨髓间充质干细胞的生长因子分泌明显增加。而进一步了解这些旁分泌生长因子分泌的机制,可以有助于我们去最大限度的发挥干细胞移植的治疗作用。

目前对于损伤因素刺激骨髓间充质干细胞分泌生长因子的机制还不是很清楚。而 NF- $\kappa$  B 作为核转录因子几乎存在所有类型的组织细胞中,激活后参与许多基因的调控,在免疫、炎症、氧化应激、细胞增殖和细胞凋亡等生理病理过程中发挥作用<sup>[20,21]</sup>。最近有研究发现, NF- $\kappa$  B 在干细胞的增殖、迁移和分化中有重要作用<sup>[13]</sup>。我们的研究结果进一步说明, NF- $\kappa$  B 在干细胞旁分泌生长因子介导的细胞保护中有重要作用。TNF- $\alpha$  刺激通过 Ik B 磷酸化活化 NF- $\kappa$  B。并进一步,通过 NF- $\kappa$  B 抑制剂降低了 VEGF 和 FGF-2 的分泌得以证实其实参与了干细胞的旁分泌作用。所以,未来能否通过某种药物在干细胞移植前激活 NF- $\kappa$  B,从而使干细胞更好的发挥旁分泌作用提高移植的治疗效果是有很大前景的。

#### 参考文献(References)

- [1] Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005,102(32): 11474-9
- [2] Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction [J]. Am J Cardiol, 2004, 94(1): 92-5
- [3] Kovacic JC, Graham RM. Stem-cell therapy for myocardial diseases [J]. Lancet, 2004, 363(9422): 1735-6
- [4] Liu J, Hu Q, Wang Z, et al. Autologous stem cell transplantation for myocardial repair [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(2): H501-11
- [5] Patel KM, Crisostomo P, Lahm T, et al. Mesenchymal stem cells attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction by a paracrine mechanism

- [J]. J Surg Res, 2007, 143(2): 281-5
- [6] Li W, Ma N, Ong, LL, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. Stem Cells, 2007, 25(8): 2118-27
- [7] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 621-63
- [8] Ozawa K, Sato K, Oh I, et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. J Autoimmun, 2008,30(3): 121-7
- [9] Behfar A, Perez-Terzic C, Faustino RS, et al. Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair [J]. J Exp Med, 2007,204(2): 405-20
- [10] Behfar A, Terzic A. Cardioprotective repair through stem cell-based cardiopoiesis[J]. J Appl Physiol, 2007. 103(4): p. 1438-40
- [11] Behfar A, Terzic A. Optimizing adult mesenchymal stem cells for heart repair[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(2): 283-4
- [12] Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, et al. Gender differences in injury induced mesenchymal stem cell apoptosis and VEGF, TNF, IL-6 expression: role of the 55 kDa TNF receptor (TNFR1) [J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(1): 142-9
- [13] Wang M, Crisostomo PR, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 291(4): R880-4
- [14] Wang M, Tsai BM, Crisostomo PR, et al. Pretreatment with adult progenitor cells improves recovery and decreases native myocardial proinflammatory signaling after ischemia [J]. Shock, 2006,25 (5): 454-9
- [15] Kano MR, Morishita Y, Iwata C, et al. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling [J]. J Cell Sci, 2005,118 (Pt 16): 3759-68
- [16] Houchen CW, George RJ, Sturmoski MA, et al. FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 1999, 276: G249-G258
- [17] Wang Y, Haider HK, Ahmad N, et al. Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006,40(5): 736-45
- [18] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella, D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration [J]. Cell, 2003, 114(6): 763-76
- [19] Urbanek K, Rota M, Cascapera S, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival[J]. Circ Res, 2005,97(7): 663-73
- [20] Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights[J]. Annu Rev Immunol, 1996, 14: 649-83
- [21] Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease[J]. J Clin Invest, 2001,107(1): 3-6