

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.010

尿源干细胞对神经源性膀胱大鼠膀胱功能及 Notch1、Jagged1 蛋白表达的影响 *

郭 宇¹ 陈 伟² 殷祥瑞¹ 杨兴智¹ 徐 斌¹ 熊 伟^{1Δ}

(1 重庆市中医院泌尿外科 重庆 400011; 2 陆军军医大学新桥医院泌尿外科 重庆 400037)

摘要 目的:研究尿源干细胞对神经源性膀胱大鼠膀胱功能及 Notch1、Jagged1 蛋白表达的影响。**方法:**纳入 60 只健康雌性清洁 SD 大鼠作为实验对象,将其按照随机抽签法分为正常对照组、研究组以及损伤组,每组各 20 只。其中研究组和损伤组大鼠均建立神经源性膀胱模型,研究组在造模成功后予以尿源性干细胞尾静脉注射。28 d 后,比较三组大鼠膀胱功能相关指标水平,膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量,Notch1、Jagged1 蛋白表达水平。**结果:**损伤组收缩时间、排尿量、膀胱峰压均低于正常对照组,而研究组收缩时间、排尿量、膀胱峰压均高于损伤组(均 $P<0.05$);损伤组膀胱基压高于正常对照组,而研究组膀胱基压低于损伤组(均 $P<0.05$)。损伤组膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量均高于正常对照组,而研究组膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量低于损伤组(均 $P<0.05$)。损伤组 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平均高于正常对照组,而研究组 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平低于损伤组(均 $P<0.05$)。**结论:**尿源干细胞的应用可显著改善神经源性膀胱大鼠膀胱功能,同时可下调 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平。

关键词:神经源性膀胱;膀胱功能;尿源干细胞;Notch1;Jagged1

中图分类号:R-33;R694.5;R334.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)06-1047-04

Effects of Urine Stem Cells on Bladder Function and Expression of Notch1 and Jagged1 Proteins in Neurogenic Bladder Rats*

GUO Yu¹, CHEN Wei², YIN Xiang-rui¹, YANG Xing-zhi¹, XU Bin¹, XIONG Wei^{1Δ}

(1 Department of Urology Surgery, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing, 400011, China;

2 Department of Urology Surgery, Xinqiao Hospital of Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of urine stem cells on bladder function and expression of Notch1 and Jagged1 proteins in neurogenic bladder rats. **Methods:** 60 healthy female clean SD rats were included as the study subjects, and they were divided into normal control group, study group and injury group by random lottery, with 20 rats in each group. Neurogenic bladder models were established in the study group and the injury group, and urine stem cells were injected into the tail vein after successful modeling in the study group. After 28 days, the levels of indicators related to bladder function, bladder wet mass and bladder wet mass/body mass, protein expression levels of Notch1 and Jagged1 in the three groups of rats were compared. **Results:** The contraction time, urine output and bladder peak pressure in the injury group were lower than those in the normal control group, while the contraction time, urine output and bladder peak pressure in the study group were higher than those in the injury group (all $P<0.05$). The bladder basal pressure in the injury group was higher than that in the normal control group, while the bladder basal pressure in the study group was lower than that in the injury group (all $P<0.05$). The wet bladder mass and wet bladder mass/body mass in the injury group were higher than those in the normal control group, while the wet bladder mass and wet bladder mass/body mass in the study group were lower than those in the injury group (all $P<0.05$). The protein expression levels of Notch1 and Jagged1 in the injury group were higher than those in the normal control group, while the protein expression levels of Notch1 and Jagged1 in the study group were lower than those in the injury group (all $P<0.05$). **Conclusion:** The application of urine stem cells can significantly improve the bladder function of neurogenic bladder rats, and it can down-regulate the protein expression levels of Notch1 and Jagged1.

Key words: Neurogenic bladder; Bladder function; Urine stem cells; Notch1; Jagged1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R694.5; R334.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)06-1047-04

前言

神经源性膀胱属于泌尿科临床较为常见的疾病之一,主要是指因调控排尿功能的中枢神经系统及其周围神经遭受损害

* 基金项目:重庆市卫生计生委医学科研项目(2016MSXM074)

作者简介:郭宇(1982-),男,硕士研究生,副主任医师,研究方向:泌尿系损伤及修复, E-mail: gy19821016@163.com

Δ 通讯作者:熊伟(1971-),男,本科,主任医师,研究方向:泌尿系损伤及修复、尿控学, E-mail: 511714439@qq.com

(收稿日期:2019-10-06 接受日期:2019-10-28)

导致的膀胱尿道功能障碍^[1,2]。该病患者主要临床症状表现为尿潴留、尿痛、尿急、尿频以及排尿困难等,如不予以及时有效的治疗,随着病情的不断进展可能会引发泌尿系统结石或感染,病情严重者甚至可能出现肾衰竭,严重威胁患者的生命健康安全^[3,4]。不同的神经节段以及损伤程度,神经源性膀胱临床表现存在一定差异。干细胞是一种具有增殖分化潜能以及更新复制能力的细胞,可高度分化成人体功能细胞。干细胞研究属于一个浩大且复杂的研究类别,目前已有不少的干细胞被应用于治疗及修复,具有一定的应用前景^[5,6]。尿源干细胞是近年来所发现的一种从自然排出尿液中提取而来的细胞,存在分化、自我更新能力^[7,8]。鉴于此,本文通过研究尿源干细胞对神经源性膀胱大鼠膀胱功能及 Notch1、Jagged1 蛋白表达的影响,旨在探讨尿源干细胞治疗神经源性膀胱的作用机制,现作以下报道。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源与分组

选取健康雌性清洁 SD 大鼠 60 只,体质量为 180~220 g,均购自重庆市疾病预防控制中心,许可证号:SYXK(渝)2017-0021,均实施单笼饲养,自由饮水,控制室温在 24℃ 左右。将所有大鼠按照随机抽签法分为正常对照组、研究组以及损伤组,每组各 20 只。

1.2 实验仪器与试剂

(1)仪器:超低温保存箱购自青岛海尔公司;微量台式高速冷冻离心机购自美国 Thermo 公司;超净台购自苏州苏洁净化有限公司;电子天平购自北京赛多利斯科学仪器;电泳仪电源购自美国 BIO-RAD 公司;KS-130 型水平振荡摇床购自广州仪科技术有限公司;光学显微镜购自日本 Olympus 公司;无菌注射器购自山东高威集团。(2)试剂:水合氯醛(购自美国 Sigma 公司),乌拉坦(购自美国 Sigma 公司),75%医用酒精(第三军医大学新桥医院),乙醇及甲醛(购自重庆化学试剂厂),相关抗体(购自碧云天生物技术研究所)。

1.3 神经源性膀胱大鼠模型建立与干预

取研究组以及损伤组大鼠,采用浓度为 10%的水合氯醛实施腹腔麻醉。按照俯卧位标准固定大鼠,以背部正中部位作为切口,完成 T9-T11 棘突的暴露,并于直视条件下完成 T10 全椎板的咬除处理,暴露脊髓。通过 Allen, s 打击装置,通过自由落体运动进行硬囊膜撞击,撞击物件为 10 g 的砝码,自由落体高度设置为 5 cm。然后依次对肌肉、筋膜及皮肤实施缝合、消毒。造模成功标准:(1)撞击完成后大鼠脊髓马上出现明显水肿,身

体不由自主抖动,尾巴不停甩动,后肢持续抽搐;(2)休克期渡过后,大鼠完全依靠前肢行走,后肢处于拖行状态;(3)对膀胱进行挤压发现无尿液或仅有少量尿液排出。

造模结束后将大鼠予以分组饲养,并连续肌注 3 d 的青霉素预防感染,使用剂量为 20 万 IU/kg。大鼠定时排尿,3 次/d,均为人工进行,待大鼠自主排尿功能恢复为止。在造模成功后 7 d,对研究组大鼠予以麻醉处理,经胃静脉注射悬浮于 500 μ L 的 PBS 中的 1×10^6 尿源干细胞。

1.4 膀胱功能相关指标检测

相关指标包括收缩时间、排尿量、膀胱基压以及膀胱峰压,具体操作如下:腹腔注射 20%的乌拉坦实施麻醉,固定大鼠采用标准仰卧位。尿道外口、下腹部采用 75%酒精消毒。随后膀胱插入 PE50 导管(长度 15 cm),轻压其腹部,膀胱排空。随后连接导管、压力传感器、微量灌注泵,以 10 mL/h 的速度持续泵入进行人体正常体温的生理盐水至膀胱内,并以 RM6240C 型多通道生理信号采集处理系统记录膀胱压力曲线,最后进行上述指标水平的分析。

1.5 膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量检测

三组大鼠分别处死,采用断颈法处死,48 h 内称取体质量,并取出膀胱,称取膀胱湿质量,并计算膀胱湿质量/体质量。

1.6 Notch1、Jagged1 蛋白表达检测

采用免疫印迹法进行相关操作,取大鼠膀胱组织剪碎,根据 100 mg/mL 的比例加入裂解液,以 12000 r/min 作为离心速率,进行低温离心 15 min 处理,随后予以凝胶电泳分离,并将其转移到 PVDF 膜上。以 5%的脱脂奶粉于 37℃ 下封闭 1.5h,加入 I 抗孵育,在 4℃ 环境下过夜,次日加入 II 抗孵育 2h。采用 ECL 显色液予以曝光,借助 Image J 软件予以分析,并以 β -actin 作为内参,实施 Notch1、Jagged1 蛋白的半定量分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS25.0 进行数据分析,计数资料以率表示,行 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 的形式表示,两组比较行 t 检验,多组比较行单因素方差分析。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 三组膀胱功能相关指标水平对比

损伤组收缩时间、排尿量、膀胱峰压均低于正常对照组,而研究组收缩时间、排尿量、膀胱峰压均高于损伤组(均 $P<0.05$);损伤组膀胱基压高于正常对照组,而研究组膀胱基压低于损伤组(均 $P<0.05$),见表 1。

表 1 三组膀胱功能相关指标水平对比($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the levels of related indicators of bladder function in three groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Contraction time(s)	Urine output (ml)	Bladder basal pressure (cmH ₂ O)	Bladder peak pressure (cmH ₂ O)
Normal control group	20	254.22 $\pm$ 30.32	0.72 $\pm$ 0.10	3.82 $\pm$ 0.71	37.22 $\pm$ 2.19
Study group	20	113.29 $\pm$ 16.28*	0.32 $\pm$ 0.06*	29.15 $\pm$ 4.80*	52.11 $\pm$ 7.32*
Injury group	20	60.12 $\pm$ 5.77 [#]	0.17 $\pm$ 0.03 [#]	32.55 $\pm$ 4.69 [#]	32.01 $\pm$ 2.88 [#]
F	--	10.259	6.345	5.287	9.446
P	-	0.000	0.000	0.001	0.000

Note: Compared with the normal control group, [#] $P<0.05$; Compared with the injury group, * $P<0.05$.

2.2 三组膀胱湿质量和膀胱湿质量 / 体质量对比 对照组, 而研究组膀胱湿质量和膀胱湿质量 / 体质量低于损伤组
损伤组膀胱湿质量和膀胱湿质量 / 体质量均高于正常对 (均 $P < 0.05$), 见表 2。

表 2 三组膀胱湿质量和膀胱湿质量 / 体质量对比($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of bladder wet mass and bladder wet mass/body mass in three groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Wet bladder mass(g)	Wet bladder mass/body mass
Normal control group	20	0.15 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.12
Study group	20	0.32 $\pm$ 0.02*	1.20 $\pm$ 0.3#*
Injury group	20	0.67 $\pm$ 0.06#	2.28 $\pm$ 0.25#
F	-	4.326	5.249
P	-	0.027	0.001

Note: Compared with the normal control group, # $P < 0.05$; Compared with the injury group, * $P < 0.05$.

2.3 三组 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平对比 组, 而研究组 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平低于损伤组 (均
损伤组 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平均高于正常对照 $P < 0.05$), 见表 3。

表 3 三组 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平对比($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of protein expression levels of Notch1 and Jagged1 in three groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Notch1	Jagged1
Normal control group	20	0.524 $\pm$ 0.017	0.672 $\pm$ 0.020
Study group	20	1.123 $\pm$ 0.021*	1.047 $\pm$ 0.024*
Injury group	20	1.794 $\pm$ 0.033#	1.688 $\pm$ 0.027#
F	-	6.877	8.924
P	-	0.000	0.000

Note: Compared with the normal control group, # $P < 0.05$; Compared with the injury group, * $P < 0.05$.

3 讨论

神经源性膀胱主要是因相关神经机制异常, 导致下尿路功能障碍, 往往合并一定程度的神经系统创伤^[9,10]。其中骶髓以下神经损伤会引起骶髓排尿中枢无法支配膀胱, 增加膀胱容量, 造成尿液潴留以及压力下降^[11-13]。因此, 有效治疗神经源性膀胱, 对改善患者生活质量显得尤为重要。目前, 临床上针对干细胞的研究不少, 其已被应用在各个器官、组织的基础与临床研究^[14-16]。其中成体干细胞因在分化组织中广泛存在, 在组织器官结构以及功能的稳态维持过程中起着至关重要的作用, 且可在一定条件下分化产生各类组织细胞类型, 已成为重点研究的对象^[17-19]。成体干细胞获取难度不大, 且有效避免了伦理限制、免疫排斥等影响因素, 已得到基础与临床研究的广泛重视, 包括骨髓间充质干细胞、肌源性干细胞、脂肪干细胞以及尿源干细胞等^[20-22]。尿源干细胞是一类干细胞, 源自泌尿系统, 于新鲜尿液中提取, 取材方便。目前, 尿源干细胞已被应用于泌尿系统的器官重建, 并获得较为理想的效果^[23-25]。

本文结果发现, 损伤组收缩时间、排尿量、膀胱峰压均低于正常对照组, 而研究组收缩时间、排尿量、膀胱峰压均高于损伤组; 损伤组膀胱基压高于正常对照组, 而研究组膀胱基压低于损伤组 (均 $P < 0.05$)。其中张腾等人的研究报道表明^[26], 尿源干细胞可有效促进脊髓损伤后大鼠神经源性膀胱的膀胱功能恢复。分析原因, 笔者认为可能是尿源干细胞促进多种神经营养

因子的分泌, 从而为受损神经的修复起到积极促进作用, 进一步促进其分化成为相关神经细胞, 最终加强大脑排尿系统和膀胱之间的联系^[27-29]。此外, 损伤组膀胱湿质量和膀胱湿质量 / 体质量均高于正常对照组, 而研究组膀胱湿质量和膀胱湿质量 / 体质量低于损伤组 (均 $P < 0.05$)。这表明了尿源干细胞可有效降低膀胱湿质量, 其中主要原因可能是尿源干细胞对泌尿系统具有较好的组织相容性, 可在膀胱中转分化成为相应成体细胞, 继而发挥膀胱再生作用。另外, Notch 信号通路的相关因子在细胞增殖、分化过程中起着至关重要的作用, 其中 Notch1 以及 Jagged1 作为上述信号通路的代表性因子, 在细胞转分化过程中均发挥了不可替代的作用^[30]。而本文结果发现, 损伤组 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平均高于正常对照组, 而研究组 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平低于损伤组 (均 $P < 0.05$)。这提示了尿源干细胞可下调 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平, 笔者推测这可能是其治疗神经源性膀胱的主要机制之一。究其原因, 笔者认为尿源干细胞是一类多功能细胞, 具有较强的自我更新以及多方向分化能力, 可对组织结构以及功能予以修复。

综上所述, 尿源干细胞可对神经源性膀胱大鼠膀胱功能发挥改善作用, 其主要作用机制可能与下调 Notch1、Jagged1 蛋白表达水平有关, 尿源干细胞可能成为临床神经源性膀胱的治疗新手段。

参考文献 (References)

[1] Gupta S, Preece J, Haynes A, et al. Differentiating Asymptomatic Bac-

- teruria From Urinary Tract Infection in the Pediatric Neurogenic Bladder Population: NGAL As a Promising Biomarker[J]. *Top Spinal Cord Inj Rehabil*, 2019, 25(3): 214-221
- [2] Ozdemir Koken Z, Sezer RE, Tosun K, et al. Nursing Care of the Patient with Neurogenic Bladder After Kidney Transplantation: A Case Report[J]. *Transplant Proc*, 2019, 51(7): 2501-2502
- [3] Shi L, Ye L, Liu P, et al. Ulinastatin inhibits apoptosis induced by serum deprivation in mesenchymal stem cells[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 2397-2406
- [4] Dong Y, Peng T, Wu W, et al. Efficient introduction of an isogenic homozygous mutation to induced pluripotent stem cells from a hereditary hearing loss family using CRISPR/Cas9 and single-stranded donor oligonucleotides[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(4): 1717-1730
- [5] 杜灿灿, 张卓亚, 宋骅, 等. 间充质干细胞上调系统性红斑狼疮外周血来源巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白 8 样分子 2 的作用研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2019, 23(3): 160-164
- [6] Wu R, Huang C, Wu Q, et al. Exosomes secreted by urine-derived stem cells improve stress urinary incontinence by promoting repair of pubococcygeus muscle injury in rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 80
- [7] 姜之歆, 王从容. 人尿源干细胞的分离培养及体外成神经细胞分化研究[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2019, 18(4): 295-299
- [8] Yasuda S, Najima Y, Konishi T, et al. Disseminated adenovirus infection in a patient with relapsed refractory multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation and pomalidomide/dexamethasone as salvage regimens [J]. *J Infect Chemother*, 2019, 25(5): 371-375
- [9] Kim JY, Chun SY, Park JS, et al. Laminin and Platelet-Derived Growth Factor-BB Promote Neuronal Differentiation of Human Urine-Derived Stem Cells [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2017, 15(2): 195-209
- [10] 王小雪, 张健, 丛双, 等. 针刺联合生物反馈治疗脊髓损伤后神经源性膀胱的疗效观察 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(22): 4303-4307
- [11] El-Dakhkhny AS, El-Karamany TM, El-Atrebi M, et al. Efficacy and safety of intradetrusor onabotulinumtoxinA injection for managing paediatric non-neurogenic overactive bladder: A prospective case-series study[J]. *Arab J Urol*, 2019, 17(2): 143-149
- [12] Ichikawa K, Momose H, Ohmori C, et al. Misdirection of a Catheter for Clean Intermittent Catheterization into the Upper Ureter in a Female Patient with Neurogenic Bladder Due to Myelomeningocele : A Case Report[J]. *Hinyokika Kyo*, 2019, 65(4): 123-126
- [13] Kavanagh A, Baverstock R, Campeau L, et al. Canadian Urological Association guideline: Diagnosis, management, and surveillance of neurogenic lower urinary tract dysfunction - Executive summary[J]. *Can Urol Assoc J*, 2019, 13(6): 156-165
- [14] Bavani AG, Hanafi MG, Sarkarian M, et al. An investigation into the sensitivity of shear wave ultrasound elastography to measure the anterior bladder wall pressure in patients with neurogenic bladder [J]. *J Family Med Prim Care*, 2019, 8(4): 1342-1346
- [15] Dogan HS, Stein R, 't Hoen LA, et al. Are EAU/ESPU pediatric urology guideline recommendations on neurogenic bladder well received by the patients? Results of a survey on awareness in spina bifida patients and caregivers[J]. *Neurourol Urodyn*, 2019, 38(6): 1625-1631
- [16] Cifticiler R, Goker H, Buyukas® k Y, et al. Impact of bone marrow plasma cells percentage on survival at diagnosis and pre-transplant period in newly diagnosed multiple myeloma: Experience of a single center from Turkey[J]. *Transfus Apher Sci*, 2019, 58(3): 313-317
- [17] Overeem AW, Klappe K, Parisi S, et al. Pluripotent stem cell-derived bile canaliculi-forming hepatocytes to study genetic liver diseases involving hepatocyte polarity[J]. *J Hepatol*, 2019, 71(2): 344-356
- [18] Ouyang B, Xie Y, Zhang C, et al. Extracellular Vesicles From Human Urine-Derived Stem Cells Ameliorate Erectile Dysfunction in a Diabetic Rat Model by Delivering Proangiogenic MicroRNA [J]. *Sex Med*, 2019, 7(2): 241-250
- [19] Jin J, Shi Y, Gong J, et al. Exosome secreted from adipose-derived stem cells attenuates diabetic nephropathy by promoting autophagy flux and inhibiting apoptosis in podocyte [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 95
- [20] Xiong G, Tang W, Zhang D, et al. Impaired Regeneration Potential in Urinary Stem Cells Diagnosed from the Patients with Diabetic Nephropathy[J]. *Theranostics*, 2019, 9(14): 4221-4232
- [21] Tsoumakas K, Giamaiou K, Goussetis E, et al. Epidemiology of viral infections among children undergoing hematopoietic stem cell transplant: A prospective single-center study [J]. *Transpl Infect Dis*, 2019, 21(4): 13095-13096
- [22] Wiafe B, Adesida AB, Churchill T, et al. Mesenchymal stem cell therapy inhibited inflammatory and profibrotic pathways induced by partial bladder outlet obstruction and prevented high-pressure urine storage[J]. *J Pediatr Urol*, 2019, 15(3): 254
- [23] 张协武. 尿源性干细胞治疗阴茎勃起功能障碍的研究进展[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2019, 39(2): 360-362
- [24] 陈婉媚, 杨其运, 卞军, 等. 尿源干细胞治疗海绵体神经损伤性勃起功能障碍大鼠模型的实验研究[J]. *中华男科学杂志*, 2018, 24(6): 483-490
- [25] 孙贺元. 人尿液干细胞移植治疗大鼠心肌损伤[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(33): 5303-5308
- [26] 张腾, 董兴有, 刘莺, 等. 尿源干细胞促进脊髓损伤后神经源性膀胱恢复[J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(10): 1073-1077
- [27] Shi Y, Xie J, Yang M, et al. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells into mice with focal segmental glomerulosclerosis delayed disease manifestation [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(16): 383
- [28] Ou M, Li C, Tang D, et al. Genotyping, generation and proteomic profiling of the first human autosomal dominant osteopetrosis type I-I-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 251
- [29] Alexandersson A, Koskenvuo M, Tiderman A, et al. Viral infections and immune reconstitution interaction after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Infect Dis (Lond)*, 2019, 51(10): 772-778
- [30] 郭彩霞, 于洪涛, 石红梅, 等. COX-2 基因对 TGF- β 1 诱导的人胚肺成纤维细胞生长及 Notch 信号通路的影响及其作用机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(3): 54-59