

吴门肾炎口服液 I 干预 miRNA-30b-3p 介导 Wnt 信号通路对阿霉素诱导大鼠足细胞损伤的保护作用

梁国强^{1,2}, 陈伟^{1,2}, 蒋春波^{1*}

¹ 南京中医药大学附属苏州市中医医院 江苏苏州

² 苏州市吴门医派验方评价与转化重点实验室 江苏苏州

【摘要】目的 基于 miRNA-30b-3p 介导 Wnt 信号通路研究吴门肾炎口服液 I 对阿霉素诱导大鼠足细胞损伤的保护作用。**方法** 建立阿霉素肾足细胞损伤的大鼠模型, 采用生化法、电镜学和蛋白质免疫印迹等研究方法, 结合 miRNA 模拟物转染技术, 通过分组干预, 探讨吴门肾炎口服液 I 干预 miRNA-30b-3p 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路进而保护足细胞的作用。**结果** 与模型组相比, 吴门肾炎口服液 I 显著降低 24 h 蛋白尿 ($P < 0.01$); 病理学结果显示其改善阿霉素诱导大鼠足细胞损伤, 减轻肾脏病理损伤, 与其抑制阿霉素诱导的肾足细胞 Nephron 和 Podocin 的蛋白表达降低 ($P < 0.01$) 相关; 另外, 与模型组相比, miR-30b-3p 过表达质粒注射组及肾炎口服液 I + miR-30b-3p 过表达质粒注射组的大鼠肾脏中 Wnt1、 β -catenin 的表达水平明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 吴门肾炎口服液 I 可能通过上调 miR-30b-3p 表达, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活化, 从而改善阿霉素诱导的大鼠足细胞功能障碍。

【关键词】 吴门肾炎口服液 I; 大鼠足细胞损伤; Wnt/ β -catenin 信号通路; miR-30b-3p

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (编号: 82074368); 苏州第九批姑苏卫生重点人才项目 (编号: GSWS2023015); 苏州市吴门医派验方评价与转化重点实验室项目 (编号: szs2024031)

【收稿日期】 2024 年 10 月 22 日

【出刊日期】 2024 年 12 月 27 日

【DOI】 10.12208/j.ircm.20240054

The protective effect of Wumen Shenyan Oral Liquid I on adriamycin-induced podocyte injury in rats by interfering with miRNA-30b-3p-mediated Wnt signaling pathway

Guoqiang Liang^{1,2}, Wei Chen^{1,2}, Chunbo Jiang^{1*}

¹ Suzhou Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou Jiangsu

² Suzhou Wumen Medical School Key Laboratory of Prescription Evaluation and Transformation, Suzhou Jiangsu

【Abstract】Objective The protective effect of Wumen Shenyan Oral Liquid I on adriamycin-induced podocyte injury in rats was studied based on the miRNA-30b-3p-mediated Wnt signaling pathway. **Methods** The rat model of adriamycin-induced renal podocyte injury was established. Biochemical method, electron microscopy and Western blotting were used to investigate the effect of Wumen Shenyan Oral Liquid I on miRNA-30b-3p regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway and protecting podocytes by group intervention combined with miRNA mimic transfection technology. **Results** Compared with the model group, Wumen Nephritis Oral Liquid I significantly reduced 24 h proteinuria ($P < 0.01$), improved podocyte injury, and reduced renal pathological damage. The protein expression of Nephron and Podocin in renal podocytes induced by adriamycin was inhibited ($P < 0.01$). In addition, compared with the model group, the expression levels of Wnt1 and β -catenin in the kidneys of rats in the miR-30b-

作者简介: 梁国强 (1979-) 男, 蒙古族, 辽宁喀左人, 副主任中药师, 硕士研究生导师, 研究方向: 中医经方、名方及吴门医派时方、验方药效物质基础及其配伍规律研究;

*通讯作者: 蒋春波 (1983-) 男, 汉族, 江苏张家港人, 主任中医师, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向: 中西医结合肾脏疾病的基础与临床研究。

3p overexpression plasmid injection group and the nephritis oral liquid I + miR-30b-3p overexpression plasmid injection group were significantly down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Wumen Shenyan Oral Liquid I may improve adriamycin-induced podocyte dysfunction in rats by up-regulating the expression of miR-30b-3p and inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway.

【Keywords】 Wumen Shenyan Oral Liquid I; podocyte injury; Wnt/ β -catenin signaling; miR-30b-3p

慢性肾脏病 (Chronic Kidney Disease, CKD) 是一个日益严重的公共卫生问题, 影响着全球超过 10% 的成年人群, 在中国, CKD 患者的数量已接近 2 亿, 不但增加了社会负担, 还严重影响了患者和家属的身心健康^[1]。因此, 充分了解 CKD 的发病机制并开发有效的治疗药物显得尤为迫切和关键。在肾脏损害过程中, 肾小球滤过减少和蛋白尿常与肾脏足细胞的损伤有关, 足细胞在维持肾小球滤过屏障中, 其分子异常与蛋白尿和肾小球硬化之间存在一定的因果关系^[2]。由此, 有效保护足细胞对减轻肾脏损伤具有重要意义。Wnt/ β -连环蛋白 (β -Catenin) 信号通路在介导足细胞功能障碍和蛋白尿中发挥着核心作用, 过度激活此通路会诱导足细胞去分化和间充质转化。因此, 靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路的研究可能会成为肾脏疾病的一种新的治疗策略^[3]。而微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与并调节人体的生理病理过程, 近年研究表明其在调节肾脏发育以及在维持肾脏结构和功能方面发挥了重要作用^[4], 笔者前期研究中发现 miR-30b-3p 可能是治疗 CKD 的潜在靶点^[5]。然而, miR-30b-3p 在肾脏疾病中发挥保护作用的分子机制尚未完全明了。

在临床上, 中药被广泛用于 CKD 的治疗, 并取得了令人满意的临床疗效。吴门肾炎口服液 I 为苏州市中医医院院内制剂, 治疗 CKD 疗效确切, 前期研究已证实其具有保护足细胞的作用^[6-9]。尽管如此, 吴门肾炎口服液 I 发挥保护足细胞免受损伤的具体分子机制仍不明确。因此, 笔者在本研究中, 建立阿霉素肾病大鼠模型, 在体内验证了吴门肾炎口服液 I 对大鼠足细胞的保护作用; 并利用阿霉素诱导大鼠足细胞损伤的体外模型, 探讨吴门肾炎口服液 I 对足细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路激活的影响。此外, 进一步对吴门肾炎口服液 I 的足细胞保护机制与 miR-30b-3p 表达之间的联系进行验证, 初步明确了吴门肾炎口服液 I 通过 miR-30b-3p 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路保护阿霉素足细胞损伤的效应机制。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

MK3 酶标仪 (芬兰雷勃公司); Sorvall ST 40 离心机 (赛默飞公司); D5100 光学显微镜、H-600 透射电子显微镜、C2+共聚焦显微镜系统 (日本 Nikon 公司); Forma 3111 CO2 恒温培养箱 (Thermo 公司); mini protean 3 cell 电泳仪 (BIO-RAD 公司); DHG-9023A 恒温烘箱 (上海恒一科学仪器有限公司); TE77XP 电转仪 (HOEFER 公司) 等。

1.2 主要材料

Wistar 雄性大鼠, 体重约 200g, 购于昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司, 许可证号: SCXK (苏) 2023-0004。所有涉及动物使用的实验均按照苏州市中医医院伦理委员会批准的实验方案进行 (伦理批号: 2020012)。所有大鼠饲养于苏州大学实验动物中心, 许可证号: SYXK (苏) 2021-0065。所有大鼠均在 12 小时光暗循环、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 和湿度 $60 \pm 10\%$ 的环境中饲养, 并应用标准大鼠饲料和蒸馏水以自由饮食。吴门肾炎口服液 I 为苏州市中医医院医院制剂 (批号: 2201203), 主要由党参, 苍术, 白术, 茯苓, 蛇舌草, 石韦, 蜀羊泉, 生薏苡仁, 黄芩, 车前草, 益母草, 猪苓, 当归, 丹参, 川芎及辅料加工浓缩而成, 相当于 3.7g 生药 $\cdot\text{ml}^{-1}$, 成人日推荐剂量为 30ml , 根据动物实验要求进行相应的处理与应用^[10]; 盐酸贝那普利片 (洛丁新), 北京诺华制药有限公司生产 (货号: X2655); 盐酸阿霉素, 德国 Ruibio 生产 (货号: 25316-40-9); 戊巴比妥钠, Sigma 公司 (批号: 20089104)。尿蛋白定量测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所 (货号: C035-2-1); 苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号: C0105S)、透射扫描电镜检测 (服务编号: T3201)、miR-30-3p 特异性 miRNA 模拟物 (货号: miR10004721-1-5), Invitrogen 公司; RIPA 组织细胞裂解液 (货号: T8220), 北京索莱宝科技有限公司; NC 膜 (货号: HATF00010)、发光液 (货号: WBKLS0100), 美国默克公司; 兔克隆二抗 (货号: D-3004), 上海长

岛生物技术有限公司; Wnt 信号蛋白家族 1 (Wnt1) (货号: ab15251)、肾病蛋白 (Nephrin) (货号: ab216341)、 β -连环蛋白 (β -catenin) (货号: ab223075)、 β -actin (货号: ab227387), Abcam 公司; 足蛋白 (Podocin) (货号: PA5-79757), Invitrogen 公司。其他试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 阿霉素诱导的足细胞损伤大鼠模型建立及分组给药

大鼠在实验前适应性饲养 1 周后复制阿霉素肾病大鼠模型: 在实验的第 1 天和第 8 天, 所有制模大鼠通过尾静脉分别注射了 4 mg/kg 和 1 mg/kg 剂量的阿霉素, 总计建模剂量为 5mg/kg。实验第 14d 为模型复制完成 (24 h 尿蛋白排泄定量 ≥ 50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 为成功标准)。另外随机取 8 只大鼠设为空白组, 空白组尾静脉与模型组同步以同体积的剂量注射生理盐水。根据上面的模型判定标准选出模型大鼠 24 只, 随机分为模型组、西药组、中药组, 每组 8 只。模型组和空白组每日以等体积生理盐水灌胃给予; 西药组以洛丁新 (混悬液 0.9 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$) 的剂量灌胃; 中药组以肾炎口服液 I 相当于 10 g 生药 $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 的剂量灌胃, 连续给药 4 W 后获取 24h 尿液, 并以安乐处死各组大鼠获取肾组织标本。根据尿蛋白定量测试盒 (CBB 法) 说明测定给药前后各实验组大鼠 24h 尿蛋白总量; 通过 HE 染色和透射电子显微镜观察病理变化; 以及 Western blot 法检测 Nephrin 和 Podocin 的蛋白表达。

另取 24 只阿霉素肾病模型大鼠随机分为 3 组 (n=8), 模型组、miR-30b-3p 质粒 (30mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ 3d $^{-1}$) 组和中药 (肾炎口服液 I 相当于 10g 生药 $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$) + miR-30b-3p 质粒 (30mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ 3d $^{-1}$) 组, 同步设空白组 (n=8), 连续干预 4 W 后。对所有大鼠进行安乐死后, 收集肾脏组织冻存备用, 以 Western blot 法检测 Wnt1 会和 β -catenin 的蛋白表达。

2.2 病理光学显微镜和透射电子显微镜观察

将实验动物肾脏在 4 %多聚甲醛溶液中固定 24 h, 随后进行石蜡包埋。从蜡块中切取 4 μ m 厚的连续切片, 用 HE 染色; 此外, 将肾皮质切成 1mm 3 并用 2.5 %戊二醛溶液固定 48h, 然后用 PBS 洗涤 3 次。样品经 1.0 %锇酸钾溶液固定 1h, 梯度丙酮脱水, 包埋过夜, 超薄切片分别用醋酸铀和碱性柠檬

酸铅染色 15 min。由病理科医生分别使用光学显微镜和透射电子显微镜进行病理 Image 软件分析。

2.3 蛋白质印迹分析

应用 RIPA 缓冲液提取足细胞总蛋白, 蛋白样品经 12 %十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后转移至硝酸纤维素滤膜上。用 5 %牛奶在 PBST (含 0.05 % Tween-20 的 PBS) 中室温封闭 2h。将膜与一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日用 PBST 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温孵育 2h。使用增强型化学发光试剂对目标蛋白质进行可视化。用 Image 软件对条带强度进行光密度定量分析。所有实验中的蛋白质免疫印迹杂交均至少重复 3 次, 每次实验均有一个代表性的印迹结果。

2.4 数据统计分析

实验计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用 One-way ANOVA 进行多组间均数比较, 采用 LSD 法进行两组间均数比较。所有数据均采用 Graphpad Prism 软件进行统计分析与绘图。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 吴门肾炎口服液 I 改善阿霉素肾病大鼠的足细胞损伤

为了证实肾炎口服液 I 在肾病中的保护作用, 笔者建立了阿霉素肾病大鼠模型, 研究了空白组、模型组、西药 (洛丁新) 组和中药 (吴门肾炎口服液 I) 组的大鼠肾脏病理改变、24 h 蛋白尿以及肾脏组织中 Nephrin 和 Podocin 的表达情况。与空白组相比, 模型组可见明显的毛细血管充血、肾小球节段肥大、肾小球系膜细胞增生和肾小球足细胞空泡化, 足突融合。经西药或中药治疗后, 与模型组相比, 大鼠肾小球毛细血管袢开放良好, 有效改善了阿霉素诱导的肾脏毛细血管充血、系膜细胞增生和足突融合。见图 1。给药干预前, 与空白组相比, 阿霉素注射导致各组 24 h 蛋白尿定量显著增加 ($P < 0.001$)。经西药或中药治疗后, 与模型组相比, 2 组 24 h 蛋白尿定量明显减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 2。给药干预后, 与空白组相比, 模型组肾脏组织中 Nephrin 和 Podocin 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$); 与模型组相比, 西药组与中药组能上调 Nephrin 和 Podocin 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 3 和图 4。以上结果提示: 吴门肾炎口

服液 I 可减轻阿霉素肾病大鼠肾脏病理损伤、减少 24h 尿蛋白以及上调肾组织 Nephlin 和 Podocin 的蛋白表达, 从而改善足细胞损伤。

3.2 吴门肾炎口服液 I 通过上调 miR-30b-3p 表达抑制阿霉素诱导的大鼠足细胞 Wnt1 表达和 Wnt/ β -catenin 信号通路活化

笔者团队早期的研究发现, miR-30b-3p 是治疗慢性肾脏病的潜在治疗靶点以及是一个可能影响 Wnt1 表达的上游调控因子。我们通过向阿霉素处理

的大鼠尾静脉注射 miR-30b-3p 过表达质粒, 与空白组相比, 模型组 Wnt1 和 β -catenin 的表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, miR-30b-3p 过表达质粒注射组及肾炎口服液 I + miR-30b-3p 过表达质粒注射组的大鼠肾脏中 Wnt1、 β -catenin 的表达水平明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 5 和图 6。这些研究结果表明: miR-30b-3p 抑制 Wnt1 的表达并调控 Wnt/ β -catenin 信号通路, 这提示了肾炎口服液 I 对阿霉素诱导的足细胞损伤具有保护作用。

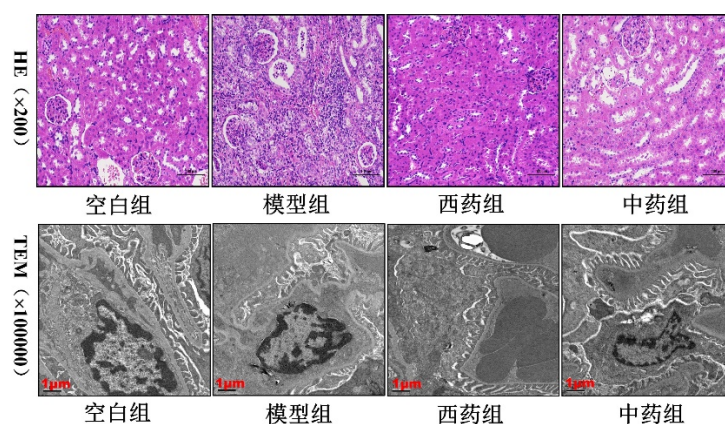


图 1 各组实验大鼠肾脏组织 HE、TEM 病理学观察比较

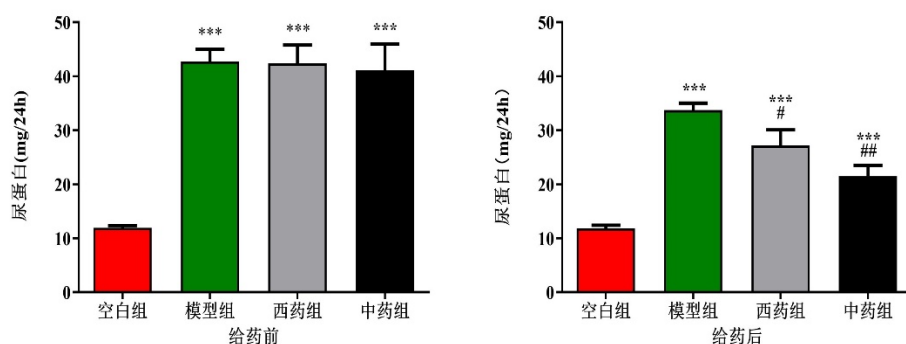


图 2 各组实验大鼠给药前后 24 蛋白尿定量比较 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

注: *** 与空白组比较, $P < 0.001$; # 与模型组比较, $P < 0.05$; ## 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

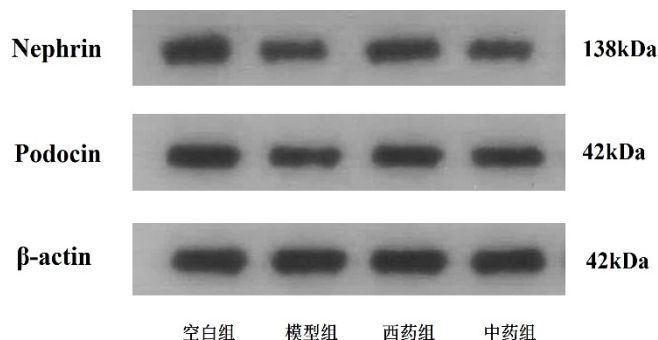


图 3 各组实验大鼠肾脏组织 Nephlin 和 Podocin 蛋白表达比较

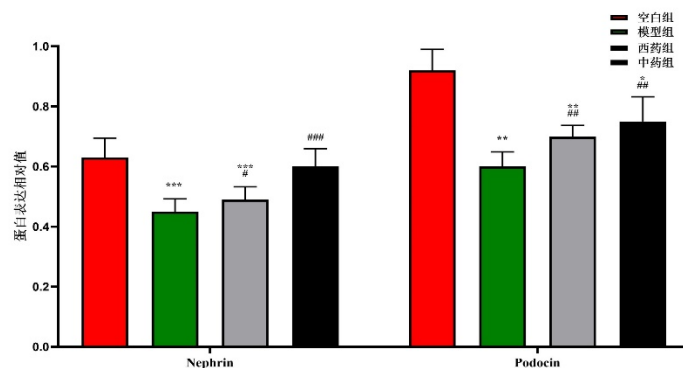


图4 各组实验大鼠肾组织 Nephryn 和 Podocin 蛋白表达量比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

注: * 与空白组比较, $P < 0.05$; ** 与空白组比较, $P < 0.01$; *** 与空白组比较, $P < 0.001$; # 与模型组比较, $P < 0.05$; ## 与模型组比较, $P < 0.01$; ### 与模型组比较, $P < 0.001$

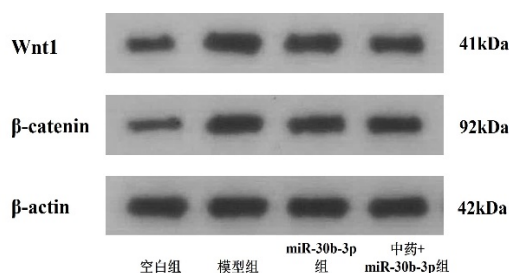


图5 体内注射 miR-30b-3p 质粒对各实验组大鼠肾脏中 Wnt1、β-catenin 蛋白表达的影响

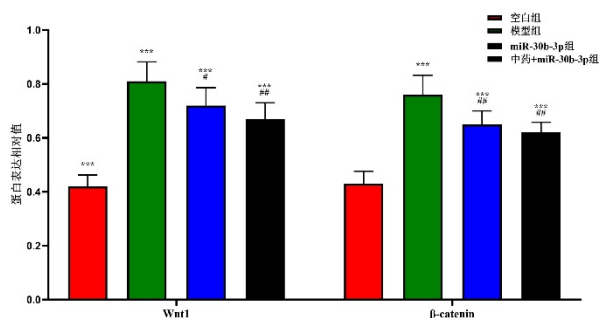


图6 体内注射 miR-30b-3p 质粒对各实验组大鼠肾脏中 Wnt1、β-catenin 蛋白表达量的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

注: *** 与空白组比较, $P < 0.001$; # 与模型组比较, $P < 0.05$; ### 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

4 讨论

在祖国医学中, CKD 可归属于“水肿”、“肾风”等讨论范畴, 为本虚标实之证, 其发病基础与脾肾功能失调相关, 湿热、邪毒为疾病进展的重要因素。治疗以标本兼顾为原则, 脾气虚者补其气为治其本, 湿热蕴结者清利湿热为治其标^[11]。而肾炎口服液 I 即依此病机特点创制, 方中以党参、苍术、白术、茯苓培补脾土, 温运阳气, 健脾化湿, 如四君子汤之意; 以蛇舌草、石韦、蜀羊泉清热解毒利湿; 以生薏苡仁、黄芩、车前草清利三焦湿热; 益母草活

血化瘀以利水湿; 猪苓利湿不伤阴液; 当归、丹参、川芎行气养血活血。诸药合用, 攻补兼施, 共奏健脾渗湿、活血清利之功效。在本研究中, 笔者观察到了肾炎口服液 I 能改善阿霉素肾病大鼠的 24-蛋白尿, 上调肾组织中 Nephryn 蛋白的表达, 这证明了肾炎口服液 I 的足细胞保护作用。

足细胞是肾小球滤过膜的重要组成部分, 足细胞损伤和修复的分子机制已成为肾脏病的研究热点^[12]。经典的 Wnt 信号转导通路 Wnt/β-catenin 对肾脏生长发育起着重要作用, 正常机体肾脏中 Wnt 信号

是沉默的,当肾脏发生损伤时,足细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路也会被激活,足细胞中 β -catenin 的持续激活会导致蛋白尿和肾小球硬化^[13]。基于越来越多的证据表明 miRNAs 参与了 CKD 的病理生理过程,笔者团队的前期研究也发现了 miR-30b-3p 可能是 CKD 治疗的潜在治疗靶点^[14]。在本研究中,笔者发现肾炎口服液 I 在阿霉素诱导的足细胞损伤体内模型中表现出保护作用,这种保护作用与降低大鼠足细胞 Wnt1 的表达和抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,在阿霉素肾病大鼠尾静脉注射 miR-30b-3p 过表达质粒导致大鼠肾脏组织中 Wnt1 表达下调和 β -catenin 抑制与吴门肾炎口服液 I 组相当。提示了吴门肾炎口服液 I 和其它靶向 miR-30b-3p-Wnt1-Wnt/ β -catenin 轴的治疗策略可能是减轻某些病理条件下肾脏损伤的有效方法。

综上所述,我们的研究结果表明吴门肾炎口服液 I 可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的过度激活来保护足细胞。此外,吴门肾炎口服液 I 改善阿霉素诱导的足细胞功能障碍,其机制与增加足细胞 miR-30b-3p 表达,进而抑制 Wnt1 表达有关。尽管这些观点可能需要更多临床研究进一步来证实,但本研究仍然为开发针对 miR-30b-3p-Wnt1 轴和 Wnt/ β -catenin 信号通路的治疗药物提供了重要的启示。

参考文献

- [1] 贺小娜,马欣,樊均明,等. 慢性肾脏病病人心血管疾病风险预测模型的研究进展[J]. 循证护理,2023,9(15):2757-2763.
- [2] Nagata M. Podocyte injury and its consequences[J]. *Kidney Int*,2016,89(6):1221-1230.
- [3] 李鑫,刘锐,蒙建华,等.Wnt/ β -catenin 信号通路在肺纤维化中的作用及中医药调控研究进展[J]. 中医药临床杂志,2024,36(01):182-187.
- [4] Mahtal N, Lenoir O, Tinel C, et al. Micrnas in kidney injury and disease[J]. *Nat Rev Nephrol*,2022,18(10):643-662.
- [5] Jiang CB, Wei MG, Tu Y, et al. Triptolide attenuates podocyte injury by regulating expression of mirna-344b-3p and mirna-30b-3p in rats with adriamycin-induced nephropathy[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2015,2015:107814.
- [6] 陈伟,梁国强,蒋春波. 肾炎 1 号方治疗慢性肾炎大鼠的血清代谢组学研究[J]. 西北药学杂志,2023,38(03):49-53.
- [7] 蒋春波,於佳伟,林静,等. 肾炎 1 号方联合西药治疗肾病综合征疗效及对患者凝血指标、免疫功能的影响[J]. 陕西中医,2020,41(12):1743-1746.
- [8] 梁国强,徐夏莲,吉俊,等. 基于“自噬-炎症反应”探讨肾炎口服液 I 对阿霉素肾病大鼠的肾保护作用[J]. 中华中医药学刊,2019,37(11):2601-2605+2820-2821.
- [9] 蒋春波,宋永亮,许田俊,等. 肾炎 1 号口服液治疗慢性肾炎脾虚湿热证 35 例临床研究[J]. 江苏中医药,2015,47(10): 38-40.
- [10] Jiang C, Liang G, Ren Y, et al. An UPLC-MS/MS method for simultaneous quantification of the components of shenyanyihao oral solution in rat plasma[J]. *Biomed Res Int*,2020,2020:4769267.
- [11] 梁国强,倪道磊,周岚,等. 基于线粒体自噬途径探讨黄芪甲苷对阿霉素肾病大鼠的肾保护作用[J]. 中华中医药学刊,2022,40(09):35-39+264-265.
- [12] Gyarmati G, Jacob CO, Peti-Peterdi J. New endothelial mechanisms in glomerular (patho)biology and proteinuria development captured by intravital multiphoton imaging[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021,8:765356.
- [13] Zhou D, Tan RJ, Fu H, et al. Wnt/ β -catenin signaling in kidney injury and repair: a double-edged sword[J]. *Lab Invest*,2016,96(2):156-167.
- [14] Donderski R, Szczepanek J, Narusiewicz N, et al. Analysis of profibrogenic micrnas (mirnas) expression in urine and serum of chronic kidney disease (CKD) stage 1-4 patients and their relationship with proteinuria and kidney function[J]. *Int Urol Nephrol*,2022,54(4):937-947.

版权声明: ©2024 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS