

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.10.022

氨肽酶 N 在结直肠癌中的表达及其临床意义*

陈 亚¹ 崔淑香^{1△} 孟庆大² 张俊峰² 潘荣辉²

(1 山东省医学科学院药物研究所药理室 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院 山东 济南 250062;

2 济南市第六人民医院病理科 山东 济南 250200)

摘要 目的:检测结直肠癌中氨肽酶 N(APN)的表达,并通过分析其与血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的关系,探讨 APN 在结直肠癌发生、发展过程中的作用及其临床意义。**方法:**应用免疫组织化学技术,检测 40 例结直肠癌组织及 40 例癌旁正常直肠组织中 APN、VEGF 和 bFGF 的表达,并结合临床病例特征进行分析。**结果:**40 例结肠癌组织中 APN 的阳性率达 52.5%(21/40),15 例转移淋巴结组织中达 66.67%(10/15),在结直肠癌组织和转移淋巴结组织中的阳性表达率均明显高于癌旁正常直肠组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。APN、VEGF 与 bFGF 在结直肠癌中的阳性表达均与患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、分化程度无关($P>0.05$),而与肿瘤的分期和有无转移显著相关($P<0.05$)。结直肠癌组织中 APN 与 VEGF、bFGF 的表达间均呈显著正相关性($P<0.05$)。**结论:**APN 在结直肠癌组织中呈高表达,与 VEGF、bFGF 可能具有协同作用,共同参与调节结直肠癌的发展,对于评估结直肠癌的生物学行为和预测患者的预后可能具有重要价值。

关键词:氨肽酶 N;结直肠癌;淋巴结转移;Dukes 分期

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)10-1896-05

Expression and Clinical Significance of APN in Colorectal Carcinoma*

CHEN Ya¹, CUI Shu-xiang^{1△}, MENG Qing-da², ZHANG Jun-feng², PAN Rong-hui²

(1 Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences; School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong, 250062, China;

2 Department of pathology, the sixth people's Hospital of Jinan, Jinan, Shandong, 250200, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical significance of APN in colorectal carcinoma. **Methods:** Immunohistochemical technique was used to detect the expression of APN, VEGF and bFGF in 40 cases of colorectal carcinoma and 40 cases of normal colorectal mucosa, their correlation with the clinicopathological characteristics of colorectal carcinoma were analyzed. **Results:** The positive expression rates of APN were respectively 52.5%(21/40) in colorectal carcinoma and 66.67%(10/15) in metastasised lymph nodes, which were both significant higher than those in the adjacent normal tissues. The expression of APN, VEGF and bFGF were correlated with Dukes staging and lymph node metastasis ($P<0.05$), but had no correlation with gender, age, tumor size, tumor position, cell differentiation of colorectal carcinoma ($P>0.05$). The expression of APN was positively correlated with VEGF and bFGF ($P<0.01$). **Conclusion:** The expression of APN in colorectal cancer tissue was up-regulated, which mediated the development of colorectal cancer together with VEGF and bFGF and were of great importance in the estimation of biological behavior and prognosis of colorectal cancer.

Key words: Aminopeptidase N; Colorectal carcinoma; Lymph node metastasis; Dukes stage

Chinese Library Classification(CLC): R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)10-1896-05

前言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是人类常见的恶性肿瘤之一^[1],据《临床医师癌症杂志》报道,美国 2008 年结直肠癌新发病例 14120 例,死亡病例 49380 例,发病率和死亡率居消化系统恶性肿瘤的首位^[2]。在我国,结直肠癌的发病率和死亡率也呈逐年上升趋势,尤其在经济较发达的城市已成为严重危害人类生命健康的常见病和多发病^[3]。目前,虽然结直肠癌的具体发病机理尚不明确,但肿瘤的侵袭、转移仍是结直肠癌患者死

亡的主要原因。肿瘤血管是肿瘤生长、侵袭和转移的基础,肿瘤血管的形成是一个多因素级联的整体动态过程,是多种血管调节因子共同作用的结果^[4]。氨肽酶 N(APN)是一种含锌离子的膜结合型外肽酶,多种肿瘤细胞表面均呈高表达,对肿瘤的侵袭和血管生成有重要作用^[5-7],是肿瘤新血管形成的重要调节因子^[8]。已有研究表明,血管内皮生长因子(VEGF)^[9]和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)^[10]与均肿瘤血管的生成、增殖密切相关,且在结直肠癌侵袭和转移过程中具有协同作用^[11]。目前,国内研究结直肠癌较多的靶点为热休克蛋白 90 β ^[12] 和 PUMA^[13],

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072665)

作者简介:陈亚, E-mail:358342097@qq.com, 手机:18654511171

△通讯作者:崔淑香, E-mail: sxccui@126.com

(收稿日期:2013-11-10 接受日期:2013-11-30)

APN 在结直肠癌发生、转移过程中是否发挥了作用,其与 VEGF、bFGF 调控结直肠癌是否有关联,国内鲜有报道。本研究采用免疫组织化学的方法检测结直肠癌组织中 APN、VEGF、bFGF 的表达,旨在通过分析 APN 在结直肠癌中的表达与患者临床病理特征的关系,探讨 APN 在结直肠癌中的表达与结直肠癌发生、发展的关系及其临床意义,并进一步分析 APN、VEGF、bFGF 三者 在结直肠癌发生发展中的关系,为结直肠癌的治疗及预后判断提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源及临床资料

40 例样本均为 2011 年 1 月-2012 年 12 月济南市第六人民医院结直肠癌手术切除标本,提取其库存蜡块,重新切片进行免疫组化观察。其中男 28 例,女 12 例,平均年龄 60 岁。病理类型:Dukes A+B 19 例,Dukes C+D 21 例。有淋巴转移者 15 例,无淋巴转移者 25 例。中分化组 31 例,低分化组 9 例。正常对照组 40 例,均取自切除标本距肿瘤 10 厘米以外的正常大肠粘膜。

1.2 主要试剂

兔抗人 APN 单克隆抗体、兔抗人 VEGF 单克隆抗体购自 Bactum 公司;鼠抗人 bFGF 单克隆抗体购自 SANTA CRUZ 公司;S-P 试剂盒和 DAB 显示剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司;0.01M PBS 缓冲液(pH7.4)自配。

1.3 检测方法

手术切除标本以 10%甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇至水化后,以 0.01M,pH 值为 6.0 的柠檬酸盐抗原修复液修复,并作内源性过氧化物酶阻断,S-P 免疫组织化学法标记 APN、VEGF、bFGF,应用 DAB 显色。PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判断

APN、VEGF 和 bFGF 结果判断标准:由两位资深病理医师进行双盲阅片。阳性反应均为细胞浆出现棕黄色至棕褐色颗粒。每张切片在高倍显微镜下($\times 400$)随机选择 10 个不重复视野计数 200 个细胞,根据阳性细胞比例分为二级:阳性细胞 < 25%为阴性(-),以阳性细胞数 $\geq 25\%$ 为阳性(+).

1.5 统计学处理

应用 SPSS17.0 软件包进行统计学分析,对 APN、VEGF、bFGF 与临床病理参数间的关系进行 X^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APN 在结直肠癌组织、转移淋巴结组织及癌旁正常直肠粘膜组织中的表达

APN 阳性着色呈棕黄色或棕褐色,定位于细胞浆,见图 1。在结肠癌组织中 APN 阳性率为 52.5%(21/40),在癌旁正常粘膜组织中为 17.5%(7/40),两组比较存在显著性差异($P < 0.05$)。在有转移淋巴结转移的 15 例样本中与对应的癌组织和癌旁组织中 APN 的表达结果如表 1 所示。

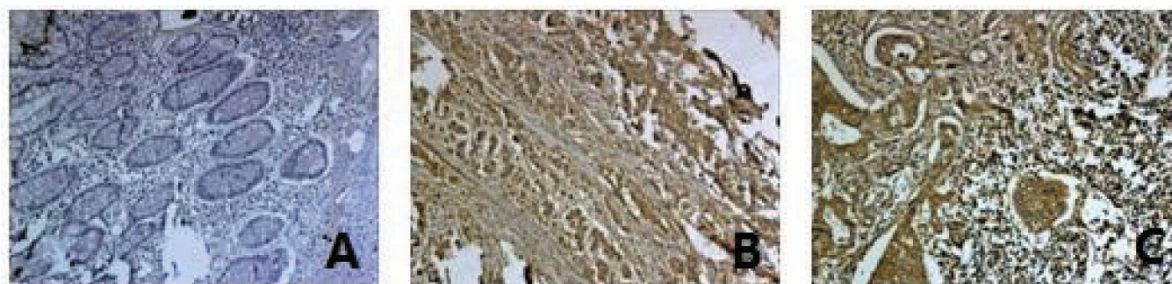


图 1 结直肠癌癌旁正常粘膜组织、癌组织和转移淋巴结中 APN 的表达(HE $\times 200$)

Fig.1 Expression of APN in adjacent tissue of colorectal cancer, colorectal cancer tissue, transfer of lymphoid tissue(HE $\times 200$)

A:APN 在癌旁正常组织中的阴性表达;B:APN 在癌组织中的阳性表达;C: APN 在转移淋巴结组织中的阳性表达

A: Negative expression of APN in normal tissue adjacent to carcinoma; B: Positive expression of APN in cancerous tissue; C: positive expression of APN in the tissue of metastasis lymph node.

表 1 APN 在转移淋巴结组织和对应结直肠癌组织及癌旁正常组织中的表达

Table 1 Expression of APN in metastasis lymph nodes, colorectal cancer tissue and normal tissue adjacent to carcinoma

组织类型 Histologic type	例数 Cases	APN 阳性例数 APN positive cases
癌旁正常组织 Normal tissue adjacent to carcinoma	15	3(20.0%)
癌组织 Cancerous tissue	15	7(46.67%)
转移淋巴结组织 The tissue of metastasis lymph node	15	10(66.67%)

如表 1 所示,APN 在转移淋巴结组织的阳性表达率显著高于与癌旁正常组织($P < 0.05$),且在转移淋巴结组织与癌组织之间也存在显著性差异($P < 0.05$),表明 APN 的表达与结直肠癌

的的淋巴结转移显著相关,其表达量随着结直肠癌的淋巴转移升高。

2.2 VEGF 和 bFGF 在结直肠癌组织、转移淋巴结组织和癌旁

正常粘膜组织中的表达

在 40 例标本中, VEGF 和 bFGF 在结肠癌组织中阳性率分别为 62.5% 和 67.5%, 在正常粘膜组织中的阳性率分别为

15.0% 和 20%, 差异显著, 见表 2。同时, 两者在转移的淋巴结中着色明显加深, 见图 2 和图 3。

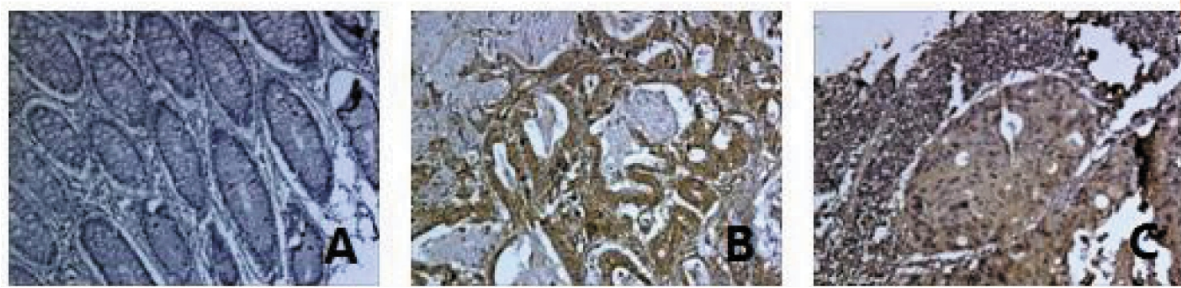


图 2 结直肠癌癌旁组织、癌组织和转移淋巴组织中 VEGF 的表达(HE× 200)

Fig.2 Expression of VEGF in adjacent tissue of colorectal cancer, colorectal cancer tissue, transfer of lymphoid tissue(HE × 200)

A: VEGF 在癌旁正常组织中的阴性表达; B: VEGF 在癌组织中的阳性表达; C: VEGF 在转移淋巴结组织中的阳性表达。

A: VEGF negative expression in normal tissue adjacent to carcinoma; B: VEGF positive expression in cancerous tissue; C: VEGF positive expression in the tissue of metastasis lymph node.

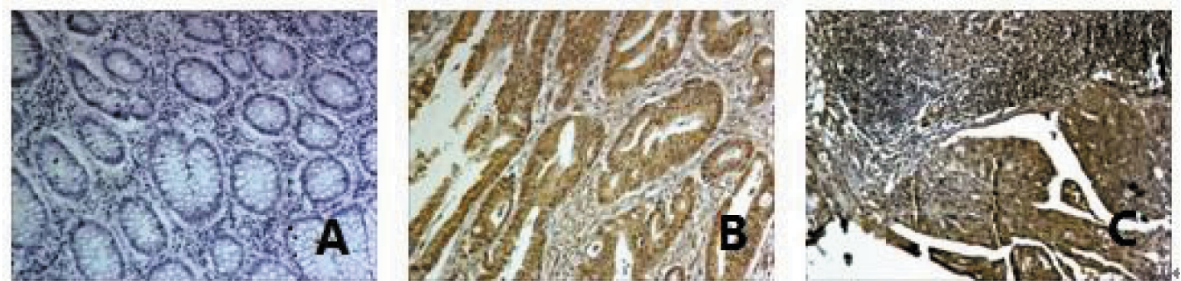


图 3 结直肠癌癌旁组织、癌组织和转移淋巴组织中 bFGF 的表达(HE× 200)

Fig.3 Expression of bFGF in adjacent tissue of colorectal cancer, colorectal cancer tissue, transfer of lymphoid tissue(HE × 200)

A: bFGF 在癌旁正常组织中的阴性表达; B: bFGF 在癌组织中的阳性表达; C: bFGF 在转移淋巴结组织中的阳性表达。

A: bFGF negative expression in normal tissue adjacent to carcinoma; B: bFGF positive expression in cancerous tissue; C: bFGF positive expression in the tissue of metastasis lymph node.

表 2 VEGF 和 bFGF 在结直肠癌组织及癌旁正常组织中的表达

Table 2 Expression of VEGF and bFGF in colorectal cancer tissue and normal tissue adjacent to carcinoma

组织类型	例数	VEGF 阳性例(%)	bFGF 阳性例(%)
Histologic type	Cases	VEGF positive cases	bFGF positive cases
结直肠癌	40	25(62.5)**	27(67.5)***
Colorectal cancer tissue			
癌旁正常粘膜	40	6(15.0)	8(20.0)
Normal mucosal tissue adjacent to carcinoma			

注: 癌组织与癌旁正常粘膜组织表达率比较 **P<0.01, ***P<0.001。

Note: Compared with the expression of VEGF and bFGF in colorectal cancer tissue, normal mucosal tissue adjacent to carcinoma(P<0.01).

2.3 APN、VEGF 和 bFGF 蛋白的表达与结直肠癌临床病理参数的关系

APN、VEGF 和 bFGF 在结直肠癌中阳性表达与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、分化程度均无关, 与肿瘤的 Dukes 分期和有无淋巴转移有关, 见表 3。

2.4 结直肠癌组织中 APN、VEGF 和 bFGF 表达间的关系

APN 阳性表达的 21 例结直肠癌组织中, VEGF 和 bFGF 阳性表达例数分别为 18 例(85.7%) 和 19 例(90.5%); APN 阴性表达的 19 例结直肠癌组织中, VEGF 和 bFGF 阳性表达例数分别为 12 例(63.2%) 和 11 例(57.9%); APN 阳性表达的结直肠癌

组织中 VEGF 和 bFGF 阳性表达率均高于 APN 阴性表达的结直肠癌组织, 差异有显著性(P<0.01); VEGF 阳性表达的 25 例结直肠癌组织中, bFGF 阳性表达 23 例(92%); VEGF 阴性表达的 15 例中, bFGF 阳性表达 11 例(73.3%); VEGF 表达阳性的结直肠癌组织中 bFGF 阳性表达率高于 VEGF 阴性表达的结直肠癌组织, 差异有显著性(P<0.01); 见表 3。上述结果表明, 结直肠癌组织中 APN、VEGF 和 bFGF 三者的表达之间呈显著性正相关关系(均 P<0.01), 三者在结直肠癌的发生发展过程中可能起着协同作用。

表 3 APN、VEGF 和 bFGF 蛋白的表达与结直肠癌临床病理参数的关系

Table 3 The relationship between APN, VEGF and bFGF protein expression and clinicopathological parameters of colorectal cancer

临床病理参数 clinicopathological parameters	例数 Cases	APN 表达	APN	VEGF 表达	VEGF	bFGF 表达	bFGF
		expression		expression		expression	
		阳性(例, %) Positive(case, percent)	p	阳性(例, %) Positive(case, percent)	p	阳性(例, %) Positive(case, percent)	p
性别 Gender							
男 M	28	15(53.6)	>0.05	16(64.0)	>0.05	20(71.4)	>0.05
女 F	12	6(50.0)		9(75.0)		7(58.3)	
年龄 Year							
< 60 岁 y	13	7(53.8)	>0.05	8(61.5)	>0.05	8(61.5)	>0.05
≥60 岁 y	27	14(51.9)		17(62.9)		17(62.9)	
肿瘤大小 Tumor size							
< 5cm	22	12(54.5)	>0.05	13(59.1)	>0.05	15(68.2)	>0.05
≥5cm	18	9(50.0)		12(66.7)		12(66.7)	
肿瘤位置 Tumor location							
结肠 colon	17	8(47.0)	>0.05	11(64.7)	>0.05	11(64.7)	>0.05
直肠 rectum	23	13(56.5)		14(60.9)		16(69.6)	
分化程度 differentiated degree							
中分化 moderately differentiated	31	18(58.1)	>0.05	19(61.3)	>0.05	21(67.7)	>0.05
低分化 poorly differentiated	9	3(33.3)		6(66.7)		6(66.7)	
Dukes 分期 Dukes staging							
A+B	19	7(36.8)	<0.05	9(47.4)	<0.05	9(47.4)	<0.05
C+D	21	14(66.7)		16(76.2)		18(85.7)	
淋巴转移 lymphatic metastasis							
无 N	25	10(40.0)	<0.05	12(48.0)	<0.05	14(56.0)	<0.05
有 Y	15	11(73.3)		13(86.7)		13(86.7)	

表 4 结直肠癌组织中 APN、VEGF、bFGF 表达的关系

Table 4 The relationship between APN, VEGF, bFGF expression in colorectal cancer tissues

检测指标 Testing indexs	阳性数 Positive	共同阳性表达(%) Positive expression together	阴性数 Negative cases	共同阴性表达(%) Negative expression together	r	p
APN and VEGF	21	18(85.7)	19	12(63.2)	0.814	<0.01
APN and bFGF	21	19(90.5)	19	11(57.9)	0.729	<0.01
VEGF and bFGF	25	23(92.0)	15	11(73.3)	0.896	<0.01

3 讨论

APN 是一种与肿瘤的发生发展、侵袭转移和血管生成等密切相关的肿瘤标志物,在多种肿瘤组织中均呈高水平表达^[14,15],还能够表达于抗原递呈细胞表面,降解多种免疫活性物质,使机体免疫力下降,削弱巨噬细胞和 NK 细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤能力^[16,17]。APN 还可降解细胞外基质(ECM)的主要成分,促进肿瘤细胞的生长和转移^[18,19]。APN 是肿瘤新血管生成的重要调节因子,降解细胞外基质为新生血管的生长提供空间^[20],在结肠癌中高表达于结肠癌淋巴转移灶血管内皮细胞。本实验结果显示,APN 在结直肠癌组织中有较高表达,尤其在转移淋巴组织中,与结直肠癌患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、分化程度均无关,但与肿瘤的分期和淋巴结有无转移显著相关,表明 APN 在结直肠癌的发展与侵袭转移过程中有重要作用,可能是结直肠癌患者预后较差的标志。

在肿瘤发生的癌基因组学研究中,有学者提出多基因协同作用观点,认为肿瘤的发生发展过程是多基因共同作用的整体动态过程,其中肿瘤血管形成是其中极为关键的步骤。APN 可降解细胞外基质为新生血管的生长提供空间,同时可把贮存在基质中与血管生成有关的重要因子如 bFGF、VEGF 等释放出来,使其发挥作用。已有研究表明 VEGF、bFGF 在肿瘤组织中表达水平较高,可促使肿瘤血管生成,在维持肿瘤的持续生长中起着重要作用,同时也是肿瘤转移的基础^[21]。本研究结果表明结直肠癌组织中 VEGF、bFGF 的表达与 Dukes 分期及淋巴转移显著性相关,也印证了这一理论。另外,本次实验结果通过相关性分析发现结直肠癌组织中 APN 与 VEGF、bFGF 的表达均呈显著正相关,说明 APN 与 VEGF、bFGF 在参与肿瘤血管新生过程中可能具有相互协同效应,但对于这种作用产生的机理还需进一步研究。

总之,本次实验结果表明 APN 在结直肠癌组织中呈高表达,与 VEGF、bFGF 可能具有协同作用,共同参与调节结直肠癌的发展,对于评估结直肠癌的生物学行为和预测患者的预后可能具有重要价值,值得进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Alberto Fantin, Giuseppe Chiarioni. Colorectal cancer screening: where are we and where are we going? [J]. *Recenti Prog Med*, 2013, 104(2): 45-48
- [2] 姚宇宙, 邢荣春, 谭超, 等. 结直肠癌诊断方法的应用与评价 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(11):2188-2190
Yao Yu-zhou, Xing Rong-chun, Tan Chao, et al. The application of colorectal cancer diagnosis and evaluation [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(11):2188-2190
- [3] 王成, 唐衡, 刘志红, 等. ATF2 与 ATF3 在结直肠癌中表达及临床病理意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(8):1505-1508
Wang Cheng, Tang Heng, Liu Zhi-hong, et al. ATF2 and ATF3 expression in colorectal cancer and its clinical pathological significance [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(8):1505-1508
- [4] 蒋金玲, 刘卫仁, 于颖彦, 等. 肿瘤血管形成的模型建立与显微图像定量分析研究 [J]. *中华病理学杂志*, 2011, 40(7):475-479
Jiang Jin-ling, Liu Wei-ren, Yu Ying-yan, et al. Tumor angiogenesis modeling and quantitative analysis of microscopic image [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2011, 40(7):475-479
- [5] Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, et al. Aminopeptidase N(APN)/CD13 inhibitor Ubenimex, enhances radiation sensitivity in human cervical cancer [J]. *BMC Cancer*, 2008, 6(8):74-74
- [6] Antczak C, De Meester I, Bauvois B. Ecto-peptidases in pathophysiology [J]. *Bioessays*, 2001, 23(3): 251-260
- [7] Held-Warmkessel J. Hot topics in colorectal cancer for the oncology APN [J]. *ONS Connect*, 2007, 22(8 Suppl):49-50
- [8] Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, et al. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation [J]. *Blood*, 2001, 97(3): 652-659
- [9] Martinelli E, Troiani T, Morgillo F, et al. Emerging VEGF-receptor inhibitors for colorectal cancer [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2013, 18(1):25-37
- [10] Wang C, Lin S, Nie Y, et al. Mechanism of antitumor effect of a novel bFGF binding peptide on human colon cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(5):1212-1218
- [11] Rmali KA, Puntis MC, Jiang WC. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal [J]. *Colorectal Dis*, 2007, 9(1): 3-3
- [12] Zhu Qin, Zhang Yang-de, Hu Yu, et al. Expression and Significance of Heat Shock Protein9013 in Colon Carcinoma Tissues [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007, 7(7):1042-1044
- [13] Hu Yu, Zhang Yang-de, Zhu Qin, et al. The Expression of PUMA in Colon Carcinoma Cells and its Effect in Cell Apoptosis [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007, 7(7):1058-1060
- [14] 黄惠明, 梁辉, 李敏, 等. 甘氨酸衍生物氨基肽酶抑制剂的合成 [J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2011, 51(3):8-12
Huang Hui-ming, Liang Hui, Li Min, et al. Glycine derivative aminopeptidase inhibitor synthesis [J]. *Journal of Nanchang University (Medical Sciences)*, 2011, 51(3): 8-12
- [15] 高凌雁, 卢萍, 李振, 等. 噻吩类氨基肽酶 N 抑制剂的合成及初步活性 [J]. *泰山医学院学报*, 2009, 30(1):12-14
Gao Ling-yan, Lu Ping, Li Zhen, et al. Thiophene aminopeptidase N inhibitor synthesis and preliminary activity [J]. *Taishan Medical College*, 2009, 30(1):12-14
- [16] Mitsui T, Nomura S, Itakura A, et al. Role of aminopeptidases in the blood pressure regulation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27 960: 768-771
- [17] 裴可灵, 张厚莉, 崔淑香, 等. 氨基肽酶 N 及其抑制剂与肿瘤 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012, 39(3):169-171, 233
Pei Ke-ling, Zhang Hou-li, Cui Shu-xiang, et al. Aminopeptidase N and their inhibitors and cancer [J]. *Journal of International Oncology*, 2012, 39(3):169-171, 233
- [18] Fukasawa K, Fujii H, Saitoh Y, et al. Aminopeptidase N(APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2006, 243(1):135-143
- [19] Bauvois B, Dauzon D. Aminopeptidase N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects [J]. *Med Res Rev*, 2006, 26(1):88-130
- [20] 张厚莉, 裴可灵, 崔淑香, 等. CIP-13F 抗肿瘤转移作用及机制的探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(6):405-410
Zhang Hou-li, Pei Ke-ling, Cui Shu-xiang, et al. CIP-13F anti-metastatic effect and mechanism of [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2013, 20(6):405-410