

柴胡疏肝散合并文拉法辛对抑郁症患者血清 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的影响

刘兰英^{1,2}, 冯斌^{2*}, 王佩蓉², 魏建波², 沈悦娣³, 陈炜^{1*} (1.浙江大学医学院附属邵逸夫医院精神卫生科, 杭州 310016; 2.浙江省立同德医院, 杭州 310012; 3.杭州师范大学, 杭州 310036)

摘要: 目的 研究柴胡疏肝散合并文拉法辛对抑郁症患者血清 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的影响。方法 对 20 例柴胡疏肝散合并文拉法辛治疗的抑郁症患者(研究组), 采用流式细胞仪测定治疗前、治疗 4 周后外周血 T 淋巴细胞亚群细胞浓度及自然杀伤细胞(NK 细胞)表达的百分率, 并与 21 例文拉法辛治疗的抑郁症患者(对照组)比较。结果 与对照组比较, 研究组总 T 淋巴细胞(CD3⁺)、辅助 T 淋巴细胞(CD4⁺)、自然杀伤细胞(NK 细胞)表达的百分率治疗前、后的差值有统计学意义。与治疗前比较, 研究组、对照组经 4 周的治疗, CD3⁺、CD4⁺、抑制性 T 淋巴细胞(CD8⁺)明显下降, 差异有统计学意义。相关性分析显示, 抑郁症患者血清 CD8⁺与 HAMD 评分呈负相关($P < 0.05$)。研究组 4 周后不良反应发生率比对照组少。结论 柴胡疏肝散能改善抑郁症患者免疫功能, 降低抗抑郁药物不良反应率。

关键词: 抑郁症; 柴胡疏肝散; 文拉法辛; T 淋巴细胞亚群; 自然杀伤细胞

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)05-0393-05

Effects of Chaihu Shugan Powder Combined with Venlafaxine on T Cell Subgroup and NK Cell in Patients with Depression

基金项目: 浙江省重点科技创新团队项目(2010R50049); 杭州市科技局一般项目(20100633B08); 浙江省中医药科学研究基金资助项目(2009YB011); 浙江省自然科学基金(Y2091093)

作者简介: 刘兰英, 女, 硕士生, 主治医师 Tel: (0571)89972447 E-mail: balindaliu@163.com *通信作者: 陈炜, 男, 教授, 主任医师 Tel: (0571)86006341 E-mail: srrcw@zju.edu.cn 冯斌, 男, 教授, 主任医师 Tel: (0571)89972003 E-mail: fengbintd@yahoo.com.cn

LIU Lanying^{1,2}, FENG Bin^{2*}, WANG Peirong², WEI Jianbo², SHEN Yuedi³, CHEN Wei^{1*} (1.Department of Psychiatry, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University, School of Medicine, Hangzhou 310016, China; 2.Zhejiang Province Tongde Hospital, Hangzhou 310012, China; 3.Department of Diagnostics, Hangzhou Normal University, School of Clinical Medicine, Hangzhou 310036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of Chaihu Shugan powder combined with venlafaxine on T-lymphocytes subgroup and natural killer cell (NK cell) in patients with depression. **METHODS** Twenty patients treated by chaihu Shugan powder combined with venlafaxine were assigned to trial group, and the other twenty-one patients treated by venlafaxine alone were assigned to control group. Serum levels of T-lymphocytes subgroups and express percent of NK cell between the two groups were compared before treatment and four weeks after treatment respectively in both treatment and control groups. **RESULTS** Significant difference was found in the serum levels of T cell (marker: CD3⁺), helper T cell(phenotypic marker: CD4⁺) and NK cell in the trial group after treatment($P<0.05$), CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cell declined significantly after treatment in both trial and control group($P<0.05$). In addition, serum level of CD8⁺ was negatively associated with HAMD score of patients with depression($P<0.05$). Furthermore, incidence of adverse reaction was lower in the trial group than that in the control group. **CONCLUSION** Chaihu Shugan powder can improve immune function of patients with depression and decrease the adverse reaction of antidepressants.

KEY WORDS: depression; Chaihu Shugan powder; venlafaxine; T-lymphocytes subgroup; NK cell

抑郁症患者存在丘脑-垂体-肾上腺轴功能过度,导致免疫功能紊乱^[1]。抑郁症属中医学郁证范畴,肝郁气滞是其最常见的证型之一^[2]。有文献报道,肝郁气滞型郁证有免疫功能的变化。陈松等^[3]发现,肝气郁结大鼠模型 B 细胞分泌的 IgM 水平明显降低, T、B 淋巴细胞转化率显著升高。柴胡疏肝散是疏肝理气解郁之良方,有疏肝养肝、理气调血、调肝和胃的功效^[4]。但柴胡疏肝散是否能通过改善抑郁症患者的免疫功能而达到治疗效果仍不清楚。本研究通过对符合肝郁气滞型郁证的抑郁症患者,用文拉法辛合并或不合并柴胡疏肝散治疗,观察两组治疗前后外周血 T 淋巴细胞亚群及自然杀伤细胞(NK 细胞)浓度的变化,探讨柴胡疏肝散对抑郁症患者血清 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的影响。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 一般情况 所有病例均来自 2010 年 9 月—2011 年 5 月,浙江省立同德医院因抑郁症首次发作住院的患者共 41 例,随机分为柴胡疏肝散合并文拉法辛治疗组(研究组)20 例和文拉法辛组(对照组)21 例。其中研究组男性 7 例,女性 13 例,平均年龄为(45.5±13.3)岁;1 例因伴有强直性脊柱炎排除。对照组男性 6 例,女性 15 例,平均年龄为(36.8±15.7)岁,1 例因出现呼吸道感染而脱落。两组年龄经 *t* 检验,差异无统计学意义($P>0.05$);两组性别经 χ^2 检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.1.2 入组标准 ①符合美国精神疾病诊断统计手册第 4 版抑郁发作诊断标准^[5];排除双相障碍。

同时中医辨证为肝郁气滞型郁证^[2](主要症状:精神抑郁,胸胁作胀或脘痞,面色晦暗,暖气频作,善太息,夜寐不安;舌质淡,苔薄白,脉弦);②汉密尔顿抑郁量表(Hamilton rating scale for depression, HAMD)24 项评分>20 分;③性别不限,年龄 18~65 岁;④无严重心、肝、肾疾病,无肿瘤、血液病史、风湿病、营养不良及神经系统变性疾病;⑤无烟草、酒精及其他精神活性物质滥用史;⑥至少半年内未服用免疫调节剂和激素制剂,2 周内未服用解热镇痛类药物;⑦获得知情同意。

1.2 治疗方法

入组后研究组给予文拉法辛(怡诺思,辉瑞制药有限公司,批号:1008163,第 1 周 75 mg·d⁻¹,1 周后 150 mg·d⁻¹)+柴胡疏肝散(每日 2 次,每次 1 剂)治疗 4 周;对照组给予文拉法辛(第 1 周 75 mg·d⁻¹,1 周后 150 mg·d⁻¹)治疗 4 周。治疗期间不允许合用锂盐、其他抗抑郁药物、免疫调节剂、抗精神病药和电抽搐治疗。如果患者存在严重的睡眠问题,可合用苯二氮卓类药物(艾司唑仑 1 mg·d⁻¹),时间不超过 2 周。

1.3 外周 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的测定

每次采样在早上 7:00,患者空腹时进行,采样当天直接采用流式细胞仪(Beckman Coulter, Epics xl. Mcl)检测。具体方法如下:取 3 支流式试管,编号,采抗凝血 2~3 mL(室温放置不超过 6 h),分别取 100 μ L 全血加入每支试管中。第 1 管加入 10 μ L IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5 同型对照,第 2 管加入 10 μ L CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5,第 3

管加入 10 μL CD3-FITC/CD16+CD56-PE 荧光抗体, 混匀, 室温避光保存 20 min。每管加入 Lysing Solution 溶血素 1 mL, 混匀, 避光 20 min。待管内液体透亮, 然后 1 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 弃去上清液。每管加入 2 mL 的 PBS, 轻轻混匀, 1 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 弃去上清液。然后加入 0.5 mL PBS 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光 1 h 内上机检测。用 System II 软件进行测定和分析, 首先设定淋巴细胞门用第 1 管做同型对照, 取第 2 管 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、第 3 管 CD3-CD16CD56⁺ 数据后得出淋巴细胞各亚群表达的百分率。

每个样本均被 2 名检测人员检测, 并取均数作为实验数据, 实验过程中每周进行 1 次荧光微球校正(Flow Check), 保证实验仪器工作状态正常, 及实验条件的一致性。

1.4 疾病严重程度及不良反应的评定

在入组时和 1 周、4 周后评定 HAMD, 入组 1 周、4 周后评定副反应量表(treatment emergent symptom scale, TESS)。

1.5 统计学方法

所有数据用 SPSS 11.5 软件包进行统计学处理。将所有资料输入计算机, 建立数据库, 检测数据分类变量用 χ^2 检验, 数值变量组间采用 t 检验, 相关分析应用 Spearman 相关性分析。

2 结果

2.1 两组治疗前后 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK 细胞水平的比较

两组治疗前 CD3⁺、CD8⁺、NK 细胞水平比较, 无统计学差异($P>0.05$), CD4⁺ 细胞水平有统计学差异。研究组治疗 4 周后 CD8⁺、CD3⁺ 和 CD4⁺ 水平下降, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。对照组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 水平下降, 也有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比, 4 周后研究组 CD3⁺、CD4⁺、NK 细胞治疗前后差值有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 结果见表 1。

2.2 血清淋巴细胞亚群水平与抑郁症严重程度的相关性分析

以 HAMD-24 ≥ 35 分作为判断重度抑郁, 应用 Spearman 相关性分析方法, 进行血清淋巴细胞亚群水平与抑郁症严重程度的相关性分析, 结果显示, 入组的抑郁症患者血清 CD8⁺ 与 HAMD 评分呈负相关($P<0.05$), 相关系数为 -0.51。CD3⁺、CD4⁺、NK 与 HAMD 评分无相关性。

表 1 两组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK 细胞基线水平的比较; 两组治疗前后 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK 细胞水平的比较; 两组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK 细胞水平 1 周、4 周治疗前后差值的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparisons of the values of CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK cell at baseline, the first week and the 4th week after treatment, differences of the first week and the 4th week before and after treatment between the trial group and the control group($\bar{x} \pm s$)

		研究组(n=19)	对照组(n=20)
CD3 ⁺	基线水平	77.6 \pm 9.1	74.0 \pm 8.2
	治疗 1 周后	75.8 \pm 5.7	72.7 \pm 8.5
	治疗 4 周后	67.4 \pm 9.2 ³⁾	71.5 \pm 8.3 ²⁾
	1 周前后差值	-1.7 \pm 8.5	-1.2 \pm 5.1
	4 周前后差值	-10.2 \pm 10.9 ⁴⁾	-2.4 \pm 4.9
CD4 ⁺	基线水平	47.8 \pm 7.5 ¹⁾	42.1 \pm 6.0
	治疗 1 周后	44.4 \pm 7.7	41.6 \pm 5.4
	治疗 4 周后	38.9 \pm 8.4 ³⁾	40.3 \pm 5.5 ²⁾
	1 周前后差值	-3.4 \pm 7.3	-0.5 \pm 3.6
	4 周前后差值	-8.9 \pm 9.2 ⁵⁾	-1.8 \pm 3.6
CD8 ⁺	基线水平	28.3 \pm 6.0	30.8 \pm 7.3
	治疗 1 周后	28.7 \pm 6.5	29.8 \pm 6.4
	治疗 4 周后	25.3 \pm 5.1 ²⁾	28.8 \pm 7.1 ²⁾
	1 周前后差值	0.3 \pm 4.9	-0.9 \pm 2.5
	4 周前后差值	-3.1 \pm 5.6	-1.6 \pm 2.9
NK 细胞	基线水平	11.1 \pm 7.4	10.6 \pm 6.4
	治疗 1 周后	12.3 \pm 5.7	9.7 \pm 6.0
	治疗 4 周后	14.3 \pm 7.9	9.3 \pm 5.0
	1 周前后差值	1.2 \pm 5.0	-0.8 \pm 4.4
	4 周前后差值	3.2 \pm 8.6 ⁴⁾	-1.2 \pm 4.2

注: 治疗前与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与本组治疗前比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与对照组治疗前后差值比较, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$

Note: Comparison with the control at baseline, ¹⁾ $P<0.05$; comparison of the primary group at baseline and present, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; comparison of differences with the control at baseline and present, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$

2.3 两组不良反应情况比较

两组治疗 4 周后用 TESS 评价不良反应, 研究组 TESS 总分(1.42 \pm 1.30), 对照组 TESS 总分(6.10 \pm 2.53), 两组在 4 周后 TESS 总分有显著差异($P<0.01$), 提示治疗 4 周后对照组不良反应大。其中便秘、出汗等植物神经功能副反应两组有显著性差异($P<0.01$), 另外, 两组头痛发生率有也差异($P<0.05$), 结果见表 2。

3 讨论

一些研究认为, 抑郁症存在免疫功能的改变^[6-7], 可能是与一些淋巴细胞亚群如 CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺、NK 细胞的增加, 免疫激活有关^[8-11]。Shen 等^[12]发现, 氟西汀治疗可改善抑郁症患者的免疫

表 2 治疗 4 周观察组与对照组副反应发生率比较(%)

Tab 2 Incidence of adverse reaction between trial group and control group at 4 th week(%)

不良反应	研究组/例(%)	对照组/例(%)
失眠	0(0)	3(15)
嗜睡	1(5)	4(20)
震颤	0(0)	2(10)
口干	0(0)	1(5)
视力模糊	1(5)	2(10)
便秘	3(16) ¹⁾	12(80)
出汗	2(11) ¹⁾	12(80)
恶心、呕吐	2(11)	4(20)
高血压	3(16)	5(25)
头痛	1(5) ²⁾	6(30)

注: 对照组比较, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05

功能的改变,从而达到治疗效果。Basterzi 等^[13]报道,与健康对照组相比,抑郁症组的 CD16/56 水平更低,CD45 水平升高,抗抑郁药物文拉法辛和氟西汀治疗 6 周后 CD16/CD56 水平均提高,CD45 水平降低,同时 CD45 水平与抑郁严重程度正相关,认为抗抑郁药物可以改善抑郁症患者的免疫功能。同时,通过改善抑郁症患者的免疫功能也起到抗抑郁作用^[14]。本研究显示,基线时研究组 CD4⁺与对照组 CD4⁺有统计学差异,CD3⁺、CD8⁺、NK 细胞无统计学差异,这可能与入组时患者的严重程度有关,因此只对组内进行统计分析。本研究结果发现,治疗 4 周后,两组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺水平下降,差异有统计学意义。Fazzino 对 20 例抑郁症患者经文拉法辛治疗 6 周后 CD4 明显减少,与本研究的结果一致^[15],但 CD8⁺在治疗后无改变;Pavón 等对 33 例门诊抑郁病人与 33 例健康对照组进行比较,发现抑郁症组的 CD8⁺百分率升高^[9]。但也有少数不一致的研究结果,如汤艳清等^[16]检测到抑郁症患者 CD4⁺降低;Pavón 等^[9]认为抑郁症患者与健康对照组相比 CD4⁺没有差异。笔者认为不一致的原因可能与样本是否同质性有关,因此需要严格排除双相抑郁。经 4 周治疗,研究组 NK 细胞水平增加,这与 Jozuka^[17]、楚兰^[18]的研究结果一致,他们认为,抑郁症患者与健康对照组相比,NK 细胞活性明显降低,抗抑郁药可以提高 NK 细胞活性。而对照组治疗后 NK 细胞活性比治疗前下降,与 Michael^[11]认为抑郁症患者 NK 水平较健康对照组升高一致,可能与年龄、性别、样本量有关。

有报道^[13],抑郁程度越严重,对免疫功能的损害更明显。本实验以 HAMD-24≥35 分作为判断重度抑郁,应用 Spearman 相关性分析方法,进行血清淋巴细胞亚群水平与抑郁症严重程度的相关性分析,结果显示:入组的抑郁症患者血清 CD8⁺与 HAMD 评分呈负相关(P<0.05),这一结果与杜巧琳等^[19]发现肝郁气滞型郁证的 CD8⁺和 HAMD 评分呈负相关的结果一致,提示应及时积极治疗抑郁症,尤其对程度较严重的意义更大。

中医理论认为,抑郁症由于情志不舒、气机郁滞所引起的一类病证。主要表现为心情抑郁、情绪不宁、胁肋胀痛、或易怒善哭,以及咽中如有异物梗阻、失眠等各种复杂症状,肝郁气滞是抑郁症最常见的中医证型之一^[20],基本病机肝失疏泄有关。现代医学研究认为免疫学异常,免疫力低下是郁证的重要发病环节,是神经-内分泌-免疫网络失调的结果。对肝郁气滞型郁证的治疗,柴胡疏肝散为常用的方药,方中柴胡与枳壳升降调气,既能调理肝胆气机,又能调理脾胃气机;香附配合郁金入血分,协助柴胡疏肝解郁;当归、川芎活血化痰^[21]。有人认为中药治疗抑郁症的作用是通过多途径、多靶点、多层次来实现的^[22]。有研究显示,氟西汀加用柴胡疏肝散后比单用氟西汀的起效快,具有统计学意义^[23]。本研究用柴胡疏肝散组合并文拉法辛组与对照组比较,治疗 4 周后 NK 水平增高,提示柴胡疏肝散可以改善抑郁症患者免疫功能。对药物治疗的不良反应分析发现,4 周时两组 TESS 总分比较有显著差异(P<0.01),柴胡疏肝散后可明显减轻文拉法辛的不良反应,尤其是便秘、出汗、头痛明显减少,对提高病人的依从性有重要的意义。

总之,加用柴胡疏肝散可以加速 CD3⁺、CD4⁺水平下降,改善抑郁症患者免疫功能,同时降低抗抑郁药物不良反应。

REFERENCES

- [1] MICHAEL R I, ANDREW H M. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery [J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(4): 374-383.
- [2] CHEN Z Q, HU S Y, ZHANG H N, et al. Study on criteria for commonly-seen TCM syndromes of depression [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2005, 46(1): 47-49.
- [3] CHEN S, LI J B, ZHU S L, et al. The experiment observation of alteration of activity of T- and B- lymphocytes and influence of dispersing stagnated Hepato-qi treatment [J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan(湖南中医学院学报), 2001,

- 21(6): 7-8.
- [4] YOU J L. The experience of Sini san [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*(中国中医基础医学杂志), 2007, 13(6): 465-475.
- [5] American Psychiatry Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* [M]. 4th ed. Washington DC: American Psychiatry Association, 1994.
- [6] ANISMAN H, MERALI Z. Cytokines, stress, and depressive illness [J]. *Brain Behav Immun*, 2002, 16(5): 513-524.
- [7] SCHIEPERS O, WICHERS M, MAES M. Cytokines and major depression. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry* [J]. 2005, 29(2): 201-217.
- [8] CHEN P, HONG L, ZHAO Y M. The change of T cell subpopulation in patients with depression [J]. *J Zhengzhou Univ(Med Sci)*(河南医科大学学报), 2000, 35(6): 548-549.
- [9] PAVÓN L, SANDOVAL-LÓPEZ G, HERNÁNDEZ M, et al. The cytokine response in major depressive disorder patients before treatment [J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 172(1/2): 156-165.
- [10] RAVINDRAN A V, GRIFFITHS J, MERALI Z, et al. Circulating lymphocyte subsets in major depression and dysthymia with typical or atypical features [J]. *Psychosom Med*, 1998, 60(3): 283-289.
- [11] GONZÁLEZ A, FAZZINO F, CASTILLO M, et al. 5-HT1A serotonin receptors and proliferation of lymphocytes in major depression patients [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2007, 14(1): 8-15.
- [12] SHEN Y D, LU P L, WEI L L, et al. Fluoxetine treatment for major depression decreases the plasma levels of cytokines [J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(43): 7346-7351.
- [13] BASTERZI A D, YAZICI K, BUTURAK V, et al. Effects of venlafaxine and fluoxetine on lymphocyte subsets in patients with major depressive disorder: a flow cytometric analysis [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2010, 34(1): 70-75.
- [14] GUO S W, XIAO H, FU Q. A comparative study of interleukin-2, 6 among depression and neuroses [J]. *J Clin Psychiatry*(临床精神医学杂志), 2001, 11(5): 274-275.
- [15] FAZZINO F, OBREGÓN F, MORLES M, et al. Taurine transporter in lymphocytes of patients with major depression treated with venlafaxine plus psychotherapy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009(643): 217-224.
- [16] TANG Y Q, XIE G R, LI Y L, et al. Study on the number of T cell subpopulations and relevant factors for depression patients [J]. *Chin J Clin Psychol*(中国临床心理学杂志), 2004, 12(3): 279-283.
- [17] JOZUKA H, JOZUKA E, TAKEUCHI S, et al. Comparison of immunological and endocrinological markers associated with major depression [J]. *J Int Med Res*, 2003, 31(1): 36-41.
- [18] CHU L, TIAN S F, CHEN H Q, et al. Study on natural killer cell subset and activity in patients with depression [J]. *Natl Med J China*(中华医学杂志), 2002, 82(12): 830-831.
- [19] DU Q L, WANG X Y, HAN L L. Research the relationship between endocrine, immunity and symptoms of TCM for women depression [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中医学药刊), 2004, 22(10): 1836-1838.
- [20] ZHANG H L, WANG T F, GUO W, et al. Analysis on documents of TCM symptom types of depression in recent ten years [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*(北京中医药大学学报), 2005, 28(3): 79-81.
- [21] CHEN Y H, ZHOU Y. The experiment study of pharmacological with antidepressant effect in Chaihu Shugansan [J]. *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med*(江西中医学院学报), 2004, 16(4): 59-60.
- [22] MAO Q Q, HUANG Z. Research progress on therapeutic mechanism of depression treated by traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32(10): 877-880.
- [23] CHENG S Y, LI L, LI J M. The study of treatment in depression with western medicine combined with Chinese medicine [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2007, 34(7): 957-958.