

## C 반응성 단백질이 사람 Macrophage 탐식 기능에 미치는 영향

인제대학교 보건대학 임상병리학과, 부산대학교 자연과학대학 화학과\*

김 용 호<sup>†</sup> · 강 신 원\*

국문초록: 치료목적으로 채취한 사람 복수에서 C 반응성 단백질 (CRP)을 분리 정제하여 사람 대식세포 탐식활성에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. CRP는 p-diazonium phenyl-phosphoryl choline 혹은 C-polysaccharide coupled sepharose 4B와 hydroxylapatite affinity chromatography법으로 분리정제시켰다. 대식세포는 ficoll hypaque 밀도 원심구배법으로 분리시킨 다음 부착법으로 정제시키고 탐식시험을 이용하여 확인하였다.

CRP가 대식세포의 시험관내 미생물 탐식활성에 미치는 영향은 촉진 혹은 억제시키는 경향을 보였다. 즉, CRP와 대식세포 미생물 탐식능과의 관계는 반응시킨 시간, 반응계에 가해진 CRP량, 미생물·탐식세포 및 CRP 상호간 반응시킨 순서에 따라서 다르게 나타났다. 대식세포의 시험관내 탐식활성에 미치는 CRP 자극의 특성은 한계자극 특성을 보였다.

### 서 론

C 반응성 단백질(C-reactive protein, CRP)은 페렴구균의 C 분획과 침강 반응을 일으키는 특성이 있으며, 감각류로부터 포유류에 이르는 모든 생물체에 존재하는 급성 염증성 단백질의 일종이다<sup>1)</sup>.

생물체는 외부로부터 침입해 온 이물질이나 감염성 질병 발생시에는 비특이 면역계가 일차적으로 방어작용을 나타내게 되는데, 이러한 비특이 면역체계의 중심이 되는 것이 macrophage와 CRP이다<sup>2)</sup>. 특히 미생물 침입, 조직손상 등과 같은 체내 이상 상태에서는 CRP 함량이 정상 혈액수치의 수백배까지도 급격하게 상승된다<sup>3~4)</sup>.

Macrophage는 생체내에 침입한 이물질이나 내외인성 노폐물의 제거, 탐식한 이물질에 대한 항원 정보의 제공, cytokine 생성 등 다양한 생체 방어 기능을 나타내게 된다<sup>5)</sup>. 그러나 비특이 면역계의 중심을 이루는 macrophage와 CRP 상호간의 농도 의존적, 자극 방법적 차이가 기능 조절에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연

구는 사람의 복수에서 CRP와 macrophage를 분리 정제하여 CRP의 양, 반응시킨 시간 및 CRP와 macrophage, 미생물과의 전반응 여부에 따라 macrophage가 이물질을 탐식하는 기능에 미치는 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

사용균주: *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*) ATCC (25923) 균주는 5% 면양 적혈구가 포함된 혈액한천 배지에서 확인 배양 후, tryptic soy broth (TSB), 37°C에서 4시간 동안 1차 배양한 후 다시 TSB 배지에 제대배양시켜 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 부란기에서 18~24시간 동안 진탕배양 후 1×10<sup>5-6</sup> bacteria/ml로 조정하였다.

Macrophage의 분리: 환자로 부터 치료목적으로 채취한 복수를 400×g, 20°C에서 10분 동안 원심분리시킨 후 ficoll hypaque 밀도 원심구배법 및 부착법으로 분리시킨 다음 peroxidase 염색법에 의하여 단구 혼입율을 확인하였다. 분리시킨 macrophage는 latex bead를 이용하여 phagocytic uptake 시험으로 확인하였다.

CRP분리: Kuwajima 등의 방법<sup>6)</sup>을 변형한 Ca<sup>2+</sup> 의존성 affinity chromatography법에 의하여 사람의 복수액 500ml를 p-diazonium phenylphosphoryl

\*논문접수: 1998년 4월 28일,  
수정재접수: 1998년 7월 13일

<sup>†</sup>별책요청저자

Table 1. Phagocytic activity of macrophage in the treatment with CRP on the macrophage

Treatment	CRP concentration		
	Low	Medium	High
CRP · macrophage + <i>S. aureus</i>	+	+++	++++
CRP · <i>S. aureus</i> + macrophage	+	+	+
macrophage · <i>S. aureus</i> + CRP	+++	+	+

-; no phagocytosis

+ ~ +++++; phagocytic activity

low; 1.0µg/ml of CRP, med; 10.0µg/ml of CRP, high; 100.0µg/ml of CRP

choline(PC) 또는 C-polysaccharide(CPS) coupled sepharose 4B column에서 용출시킨 후 hydroxylapatite column chromatography로 CRP를 분리, 정제시켰다.

CRP 반응 용량의 결정: 사람 체내에 정상적으로 존재하는 CRP 농도인 1.0µg/ml을 최소 농도로 하였으며, 감염질환에 걸렸을 경우 혈중에 증가되는 농도가 정상 혈중농도의 100배 이상임을 감안하여 최대 농도는 100.0µg/ml, 중간 농도는 정상 최소 농도의 10배인 10.0µg/ml로 하였다.

Macrophage의 세균 탐식력 측정: Macrophage를 RPMI 1640-10% fetal calf serum(FCS)에  $1 \times 10^6$  cells/ml로 조정된 다음 microplate의 각 well에 50µl 씩 넣고 CRP의 최소 농도가 1.0, 10.0 및 100.0 µg/ml이 되도록 조정하였다. Macrophage에 의한 미생물 탐식력의 측정을 위한 실험계의 구축은 다음과 같이 하였다.

1) Macrophage와 CRP를 30분, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간 동안 각각 반응시킨 후 여기에 *S. aureus*( $1 \times 10^6$  cells/ml)를 가한 CRP Pretreatment 실험군

2) CRP와 *S. aureus*를 30분 동안 먼저 반응시킨 후 여기에 macrophage를 가한 CRP · *S. aureus* Premix 실험군

3) Macrophage와 *S. aureus*를 실험관 내에서 혼합하여 30분 동안 반응시킨 후 CRP를 가한 macrophage · *S. aureus* mix 실험군

4) CRP · macrophage pretreatment 실험군에 미생물을 가하여 탐식반응을 진행시킨 60분 후 1차 시료를 채취하고, 추가로 미생물을 첨가시켜 탐식시키면서 20분, 40분, 60분에 각각 시료를 채취하여 탐식되지 않은 잔존 미생물 수를 다음과 같이 측정하였다.

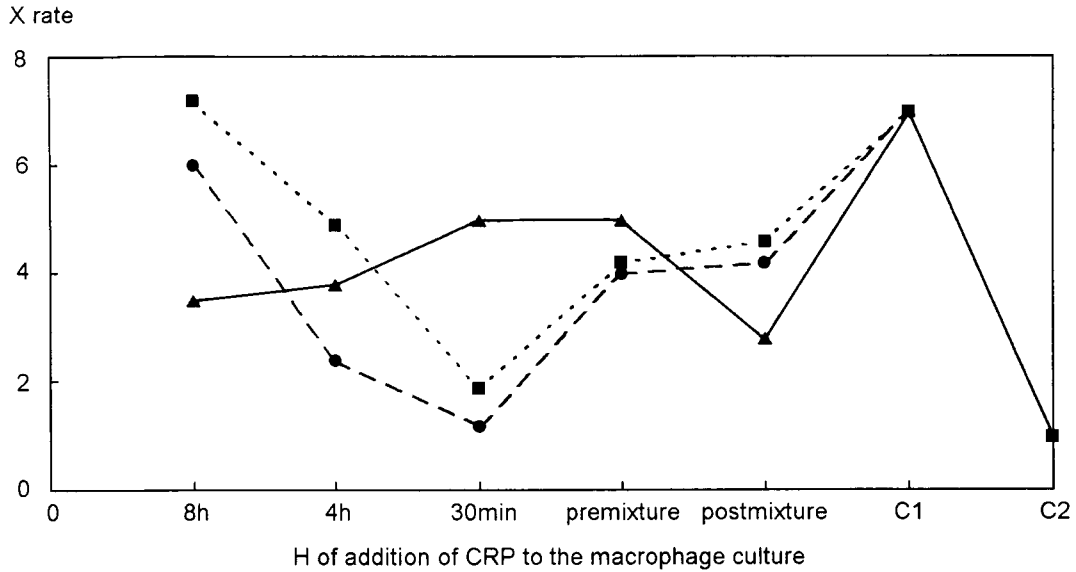
Macrophage에 탐식되지 않은 미생물 수의 측정법: 각 실험계에 혼합시켜 탐식작용을 촉진시키면서 정해진 시간에 채취된 시료를  $500 \times g$ , 4°C에서 5분 동안 원심분리시킨 후 상층액 20µl를 취하여 5.0ml의 TSB 배지에서 배양시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 6시간 동안 배양 후 OD<sub>650</sub>에서 흡광도를 비교측정하여 여러 조건하에 macrophage에 의하여 탐식된 후 상층액 중에 잔존되어 있는 세균수를 분광광도계를 이용한 흡광도법에 의하여 간접측정 하였다.

## 결 과

CRP처리 방법이 macrophage 탐식력에 미치는 영향

CRP가 macrophage를 자극시키는 방법에 따라서 macrophage에 의한 이물질 탐식 기능이 어떻게 변화되는가를 측정하기 위하여 CRP · macrophage를 30분간 반응시킨 후 *S. aureus*를 가한 군, CRP · *S. aureus*를 30분 동안 반응시킨 후 macrophage를 가한 군 및 macrophage와 *S. aureus*를 30분 동안 반응시킨 후 CRP를 가한 후 각각 60분 동안 탐식 반응을 계속시킨 후 탐식력을 평가한 결과는 Table 1과 같다.

CRP의 양을 저, 중, 고농도로 나누어 반응시켰다. 저농도의 CRP를 반응시킨 경우에는 macrophage와 *S. aureus*를 먼저 반응시켜 자극시킨 실험군의 탐식력이 +++로 가장 높았다. 중, 고농도 CRP 처리군에서는 모두 CRP와 macrophage를 미리 반응시킨 실험군에서 +++ 및 ++++로 높은 탐식력을 보였고, CRP 농도 증가에 비례하여 탐식력도 다소 증가하였다. 그러나 CRP를 *S. aureus*에 미리 작용시킨 실험군에서는 저, 중, 고



**Fig. 1.** Enhancement of phagocytic activities by CRP added in different time to macrophage  
 ▲; Low concentration of CRP (1.0µg/ml)  
 ■; Medium concentration of CRP (10.0µg/ml)  
 ●; High concentration of CRP (100.0µg/ml)  
 X rate; expressed as residual bacteria number after phagocytosis compared to C2 group  
 Premixture; macrophage added on the CRP · *S. aureus* mixture (exposed for 30min.)  
 Postmixture; CRP added on the macrophage · *S. aureus* mixture (exposed for 30min.)  
 C1; control 1, bacteria suspension  
 C2; control 2, macrophage suspension

농도 CRP에서 모두 동일한 실험결과를 나타내었다.

#### CRP의 양적, 반응시간별 처리가 macrophage 탐식력에 미치는 영향

감염증이나 조직 손상시 생체 내에 급격하게 증가되는 CRP가 macrophage 탐식력에 미치는 영향과 반응시킨 시간의 변화에 따른 macrophage 탐식력을 측정해 보고자 하였다. 생체 내에서 CRP가 생성된 초기 및 장시간 동안의 반응으로 구분하여 30분 이상 72시간까지 7단계로 나누어 반응시켜본 결과, 8시간 이후부터 72시간 사이에서는 모두 유사한 반응을 보였기 때문에 도표상에서는 8시간까지만 표시하였다.

고농도의 CRP 첨가군에서는 CRP를 30분 동안 반응시킨 실험군이 C2 대식세포 부유대조군과 유사한 1.2배의 흡광도를 보여 가장 높은 대식세포 탐식력을 나타내었고, 중농도에서도 고농도에 비하여 탐식력은 다소 낮았지만 전체적인 탐식력의 경향은 고농도와 유사하였다.

중·고농도에서 대식세포에 8시간 이상 CRP를 작용시키면 미생물 대조군인 C1 대조군과 거의 유사한 6배 및 7.5배의 흡광도 값을 보여 거의 탐식작용이 일어나지 못함을 알 수 있었다.

저농도 CRP 첨가군에서는 중·고농도에 비하여 4시간 이상 CRP를 대식세포에 작용시켜야 탐식력이 증가되기 시작하였으며, 대식세포에 미생물을 먼저 작용시킨 후 CRP를 반응시킨 postmixture culture 군에서 잔존 미생물 수가 C1 대조군에 비하여 2.5배로 가장 낮았다. 따라서 본 실험결과 CRP 농도가 증가될수록 반응시간이 짧아야 대식세포의 탐식력이 증가되었다 (Fig. 1).

#### 미생물 재첨가가 macrophage 탐식력에 미치는 영향

생체 내에서의 미생물 증식, 동일한 미생물의 2차 침입을 받은 경우 CRP나 미생물 자극을 이미 받은 macrophage가 어떻게 대응하는가를 알아보기 위한 실험계이다.

CRP · macrophage 및 미생물을 첨가시켜 일정

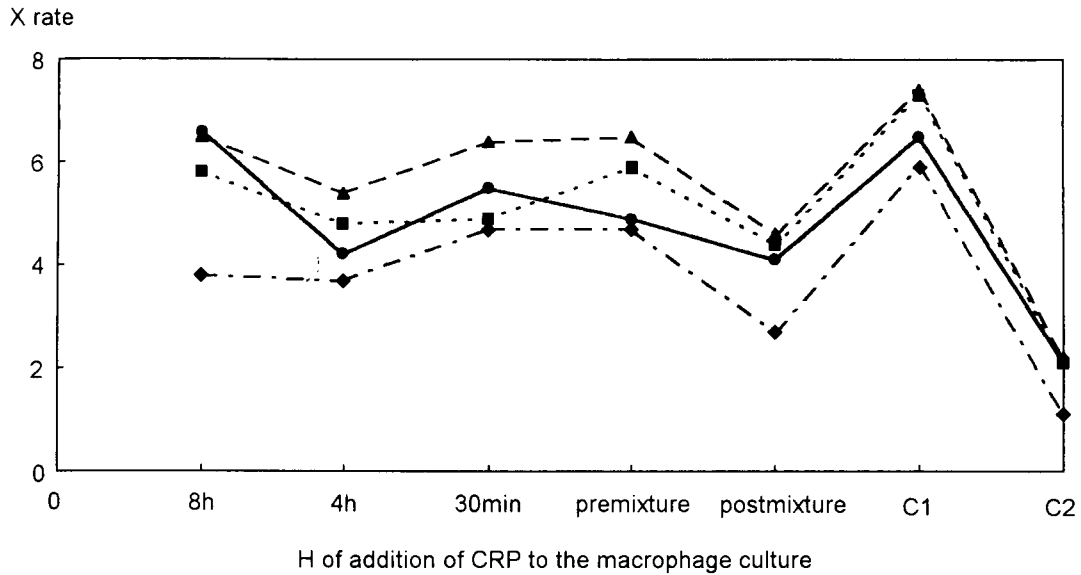


Fig. 2. Enhancement of phagocytic activities by CRP (1.0 $\mu$ g/ml) added in different time and 1st, 2nd added bacteria to macrophage · CRP mixture.

- ◆; Residual bacteria number after 60min. in which 1st added bacteria to the CRP · macrophage mixture
- ; Residual bacteria number after 20min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture
- ; Residual bacteria number after 40min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture
- ▲; Residual bacteria number after 60min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture

X rate; expressed as residual bacteria number after phagocytosis compared to C1 group  
 Premixture; macrophage added on the CRP · *S. aureus* mixture (exposures for 30min.)  
 Postmixture; CRP added on the macrophage · *S. aureus* mixture (exposures for 30min.)  
 C1; bacterial suspension  
 C2; macrophage suspension

시간 탐식시킨 후 동일한 미생물을 실험계에 추가, 첨가 탐식작용을 시킨 후 배지 상층 중의 잔존 미생물 수는 저농도 CRP 실험군에서 대조군을 포함한 모든 군에서 20분 간격으로 채취된 검체의 잔존 미생물 수는 0.5배씩 계속 증가하여 더 이상 탐식작용이 증가되지 못하고 미생물이 증균되어지는 현상을 보이고 있다 (Fig. 2).

중농도의 CRP 실험군에서는 C1 대조군 및 premixture 실험군을 제외한 모든 실험군으로부터 정해진 시간 간격으로 채취된 검체 중의 잔존 미생물 수는 일차 미생물 첨가 후 얻어진 그래프와 거의 중복된 경향을 보여, 추가 미생물 투여 후에도 CRP 자극을 받은 macrophage에 의한 탐식작용이 활발하게 일어나고 있음을 보여주었다. 그러나 premixture 실험군은 초기 탐식 후 남은 미생물 3.5배에 비하여 추가 미생물 투여 후 60분에 채취된 검체의 잔존 미생물 수는 1.5배가 증가되어

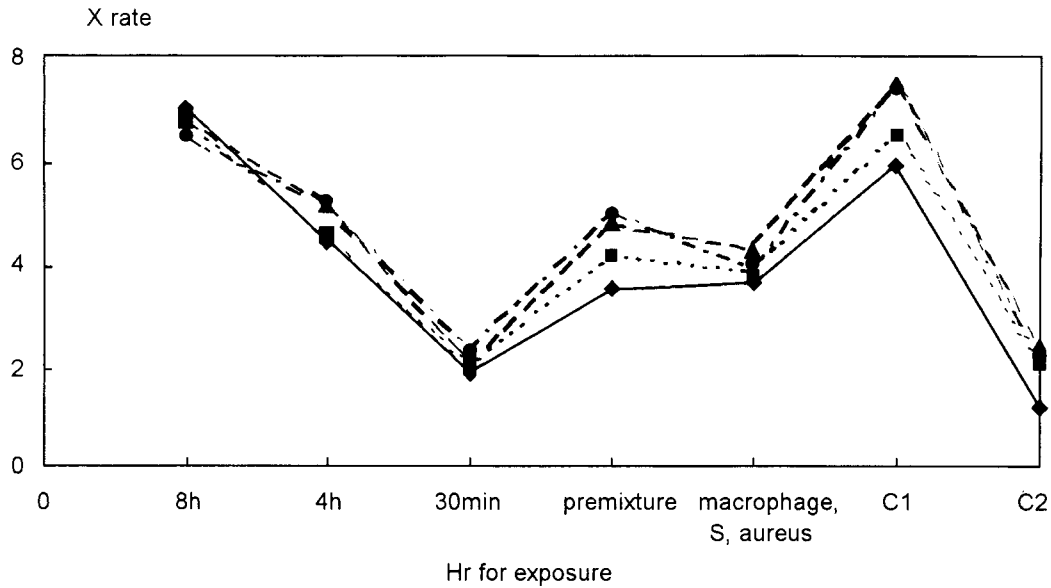
C2 대조군에 비하여 5배가 증가되었다 (Fig. 3).

고농도의 CRP 실험군은 저, 중, 고농도 CRP 실험군 중 추가 미생물 투여 후에도 탐식작용이 가장 활발하게 일어난 경향을 보였다. 고농도 CRP 실험계 전체적인 잔존 미생물 수의 패턴은 중농도의 CRP 실험계와 유사하였으나 중농도 CRP 실험계에 비하여 탐식력이 증가되었다.

그러나 고농도 CRP 실험계의 1차 미생물 첨가 시에 비하여 추가 미생물 투여 후에는 거의 모든 실험군에서 1배 이상의 잔존 미생물 수의 증가를 나타내었다 (Fig. 4).

## 고 찰

유해한 환경, 이물질 침입 등에 대한 생물체 방어는 신경계, 내분비계 및 제3의 조절계로서 면역계 작용에 의한다. 이러한 생물체 방어체계는



**Fig. 3.** The effect of exposure to the irritated macrophage with CRP (10.0 $\mu$ g/ml) in various time intervals, measured with the phagocytic activity

- ◆; Residual bacteria number after 60min. in which 1st added bacteria to the CRP · macrophage mixture
- ; Residual bacteria number after 20min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture
- ; Residual bacteria number after 40min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture
- ▲; Residual bacteria number after 60min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture

X rate; expressed as residual bacteria number after phagocytosis compared to C1 group

Premixture; macrophage added on the CRP · *S. aureus* mixture (exposures for 30min.)

Postmixture; CRP added on the macrophage · *S. aureus* mixture (exposures for 30min.)

C1; bacterial suspension

C2; macrophage suspension

생체 내 여러 조절계의 상호작용에 의하여, 생체 내 조절계의 공통적인 특징은 각각 정보를 수용 처리하고, 어떠한 생체 내 정보처리계도 인식상과 행동상으로 구분된 시스템을 가진다<sup>7)</sup>.

제3의 생물체방어 체계에 속하는 면역계를 구성하고 있는 여러 면역세포 중 macrophage는 이물질 침입이나 내인성 유해물질에 대하여 초기에 탐식작용을 일으키고 interleukin I과 같은 생리 활성 cytokine을 생성한다<sup>8)</sup>. Macrophage에 의하여 생성된 interleukin I은 생체 내 염증 발생시 간장세포에 작용하여 CRP를 생성하며, CRP는 급성 염증 후 보통 6시간 경부터 생성되어 다른 비특이 면역계와 함께 염증 및 염증 초래 요인에 대하여 조기 생체방어 역할을 담당한다<sup>9)</sup>. 병원성 미생물과 같은 유해 이물질 침입에 의한 생체 내 염증 발생시 초기 방어는 주로 macrophage에 의한 탐식작용과

급성염증 반응성 단백질인 CRP 상호작용이 예상되지만 지금까지의 연구보고는 Gautam 등<sup>10)</sup>에 의하여 CRP는 macrophage의 탐식작용을 증강시키는 것으로만 보고되어 있다. 그러나 저자의 실험결과 CRP를 macrophage나 미생물과 반응시킨 후의 탐식력의 변화는 저농도 CRP에서는 적어도 4시간 이상은 macrophage와 미리 반응시켜야 macrophage의 탐식력이 증가되었다. CRP 농도를 정상 농도의 10배, 100배로 증가시킨 경우에는 농도증가와는 역비례적으로 시간의 경과에 따라 오히려 macrophage 탐식력은 저하되고, 반응시간이 짧은 30분 처리군에서 탐식력이 가장 높았으며, 이는 peritoneal exudate macrophage 및 neutrophil에 고농도 CRP를 반응시킨 경우 이들 세포내 O<sub>2</sub> 생성량이 증가한다고 한 Hokama 등<sup>11)</sup>의 연구 보고와 Phytohemagglutinin induced lymphocyte prolife-

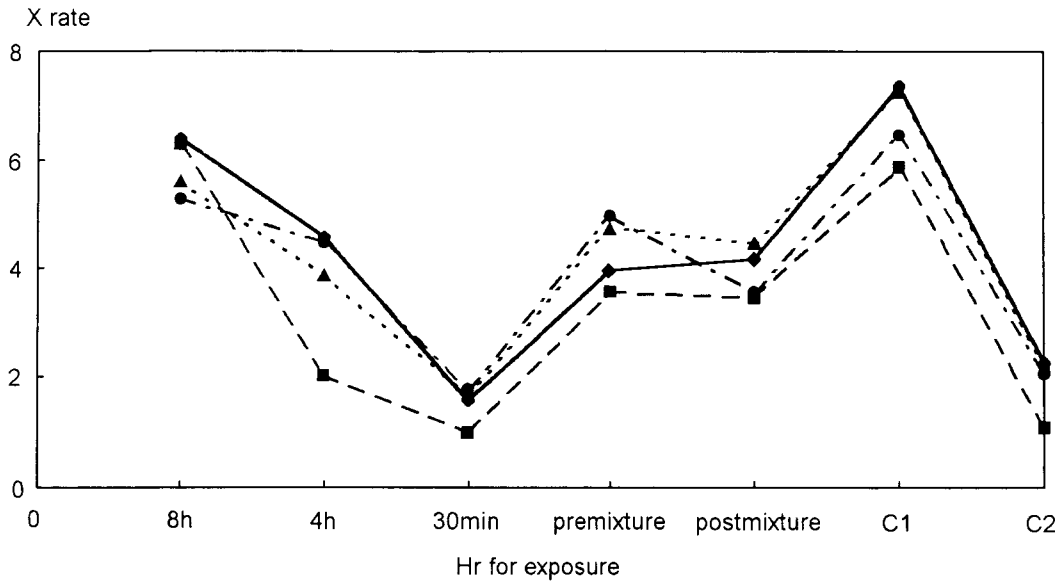


Fig. 4. The effect of exposure to the irritated macrophage with CRP (100.0µg/ml) in various time intervals, measured with the phagocytic activity

- ◆; Residual bacteria number after 60min. in which 1st added bacteria to the CRP · macrophage mixture
- ; Residual bacteria number after 20min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture
- ; Residual bacteria number after 40min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture
- ▲; Residual bacteria number after 60min. in which 2nd added bacteria to the CRP · macrophage and bacteria mixture

X rate; expressed as residual bacteria number after phagocytosis compared to C1 group  
 Premixture; macrophage added on the CRP · *S. aureus* mixture (exposures for 30min.)  
 Postmixture; CRP added on the macrophage · *S. aureus* mixture (exposures for 30min.)  
 C1; bacterial suspension  
 C2; macrophage suspension

ration에 실험에서 CRP의 양, 반응시킨 시간에 따라서 림프구의 수명이 연장, 혹은 단축되었다고 한 Mackiewicz 등<sup>12)</sup>의 연구 보고와 같은 경향을 보였다. 또한 CRP의 농도를 정상농도의 10배 증가시킨 경우와 100배 증가시킨 실험군 사이의 탐식력에는 거의 차이가 없었다. 따라서 macrophage는 CRP 자극에 대하여 일정한 농도 이상에서는 아무리 높은 자극을 가하여도 이에 비례하여 증가된 탐식력을 나타내지 못하는 한계자극 (threshold stimulus)이 있음을 밝혔다.

CRP를 macrophage, 미생물과 반응시키는 방법적 차이에 따라서 탐식력이 크게 달라졌다. 즉, CRP를 미생물과 먼저 반응시킨 경우 CRP를 macrophage에 먼저 반응시킨 실험군에 비하여 CRP 농도와 무관하게 모두 탐식력이 저하되었다. 이는 macrophage 및 tumor cell을 lipopolysaccharide와

pretreatment 시킨 결과 tumoricidal 활성 저하 및 cell mediated cytotoxicity 등이 저해 받았다고 한 Barna 등<sup>13)</sup>, Vetter 등<sup>14)</sup>의 실험결과와 유사하였다.

CRP는 주로 macrophage의 interleukin I이나 tumor necrosis factor와 같은 mediator에 의하여 간에서 생성된다<sup>8)</sup>. 그러나 생성된 CRP를 다시 macrophage에 작용시킨 결과 반응시키는 양, 시간 및 방법에 따라서 positive 혹은 negative feed back regulator로서 작용하였다.

즉, 동일한 물질에 의하여 단순히 농도 (dose), 반응시키는 자극방법 차이만으로 up regulator 혹은 down regulator시키는 양면적 기능을 가진 immunomodulator로써 작용한다. 또한 macrophage에 CRP를 이용하여 자극시킴으로써 탐식력에 현저한 변화를 보이는 사실로부터 CRP는 macrophage의 여러 기능 중 이물질의 탐식, 제거 기능 등의

조절에 우선적으로 관여하는 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Barna BP, James K, Deodhar SD (1987): Activation of human monocyte tumoricidal activity by C-reactive protein. *Cancer Res*, **47**(15): 3959-3963.
- 2) Buchta R, Fridkin M, Pontet M, Contessi E, Scagiante B, Romeo D (1987): Modulation of human neutrophil function by C-reactive protein. *Eur J Biochem*, **163**(1): 141-146.
- 3) Gautam S, Barna B, Chiang T, Pettay J, Deodhars (1987): Use of resealed erythrocytes as delivery system for C-reactive protein (CRP) to generate macrophage mediated tumoricidal activity. *J Biol Response Mod*, **6**(3): 9346-9354.
- 4) Goldman ND, Liu TY (1987): Biosynthesis of human C-reactive protein in cultured hepatoma cells is induced by a monocyte factor (s) other than interleukin-I. *J Biol Chem*, **262**(5): 2363-2368.
- 5) Ivan M, Roitt Peter J, Delves (1992): 1187, Encyclopedia of Immunology, Academic press, London.
- 6) Ivan Roitt David Male Jonathan Brosto (1996): Immunology, 4th ed., 881.5, Mosby, USA.
- 7) J.M.L. playfair (1996): Immunology at a Glance pp. 16-17, 6th ed., Blackwell Science Ltd. London.
- 8) Kuwajima S, Okuda K (1987): Affinity chromatography for C-reactive protein using p-nitrophenyl phosphorylcholine as a ligand. *Clin Chim Acta*, **166**(1): 101-102.
- 9) Liu XS, Yang ZC, Luo ZH, Li A (1994): Clinical significance of the change of blood monocytic interleukin-I production in-vitro in severely burned patients. *Burns*, **20**(4): 302-306.
- 10) Miyagawd N, Okamoto Y, Hakano H (1988): Effect of C-reactive protein on peritoneal macrophages. II. Human C-reactive protein activates peritoneal macrophages of guinea pigs to release superoxide anion in-vitro. *Microbiol Immunol*, **32**(7): 721-723.
- 11) Ronald B, Herberman Denis M, Gallewaert (1985): Mechanisms of Cytotoxicity by NK cells pp. 68-75, Academic press. Inc. London.
- 12) Ronald M. atlas (1995): Principles of Microbiology, pp. 384-390, Mosby-year book, Inc.
- 13) Salzer HR, Genger H, Muhar U, Lischka A, Schatten C, Pollak A (1987): C-reactive protein; an early marker for neonatal bacterial infection due to prolonged rupture of amniotic membrane and/or amnionitis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **66**(4): 365-367.
- 14) Mackiewicz S, Wiktorowicz K and Mackiewicz A (1985): The effect of C-reactive protein on the PHA-induced proliferation of human peripheral blood lymphocytes. *Arc Immunol Ther Exp*, **33**, 603.
- 15) Vetter ML, Gewurz H, Baum LL (1986): The effects of C-reactive protein on human cell-mediated cytotoxicity. *J Leuko Biol*, **39**(1): 13-25.

=Abstract=

## **Modulation of Human Macrophage Phagocytic Activity by C-reactive Protein**

**Yong-Ho Kim<sup>†</sup> and Shin-Won Kang<sup>\*</sup>**

*Department of Medical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-7499, Korea*

*\*Department of Chemistry, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*

The effects of CRP purified from human ascites fluid on phagocytic activity of the human macrophage were investigated. CRP was purified using affinity chromatography including absorption on p-diazonium phosphocholine or C-polysaccharide coupled sepharose 4B and gel filtration on hydroxylapatite column chromatography.

Macrophage was separated ficoll hypaque gradient density and absorption method, and then was confirmed phagocytic uptake test using latex method.

CRP was able either to inhibit or to enhance phagocytic activity of human macrophage against bacteria *in vitro*. The effects of CRP on phagocytic activity of human macrophage were in time and dose-dependent manners.

The additional sequence of reaction mixture against bacteria *in vitro* shows a threshold stimulus on the activation of phagocytic response upon the CRP.

**Key Words:** CRP, Macrophage, Phagocytosis, Threshold stimulus

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 4(1): 35-42, June, 1998]

---

<sup>†</sup>Corresponding author