

基因甲基化在急性白血病微小残留中的研究进展

贾计会, 贾国荣

(内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院, 内蒙古 包头 014010)

摘要:微小残留病(minimal residual disease, MRD)是白血病患者治疗达到完全缓解后复发的主要原因,而复发则是影响白血病患者生存的主要因素。监测急性白血病中肿瘤细胞的微小残留对白血病的治疗及预后具有重要意义。研究表明一些特异基因异常甲基化可作为一种生物标志物用于MRD的检测,能够较早的预测疾病复发及指导白血病的治疗。*DNK3*、*CDKN2A*、*CTGF*基因异常甲基化在多种肿瘤中均可检测到,其在急性白血病中亦存在异常基因甲基化现象。全文分析上述基因在急性白血病初发、完全缓解、尤其缓解后复发时的甲基化状态,结合患者临床症状,评价其在MRD监测中的临床价值。

关键词:急性白血病;基因甲基化;微小残留病

中图分类号:R733.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2020)08-0722-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2020.08.B012

Research Progress of Gene Methylation in Minimal Residue Disease of Acute Leukemia

JIA Ji-hui, JIA Guo-rong

(The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014010, China)

Abstract: Disease recurrence is a major problem affecting the survival of leukemia patients, while the minimal residual disease (MRD) is the main reason for recurrence in leukemia patients after complete remission. Monitoring of minimal residual tumor cells in acute leukemia is of great significance for the treatment and prognosis of leukemia. Some studies have shown that abnormal methylation of some specific genes can be used as a biomarker for the detection of MRD to predict disease recurrence and guide the treatment. The abnormal methylation of *DNK3*, *CDKN2A*, *CTGF* gene can be detected in a wide variety of malignant diseases including acute leukemia. This article reviews the gene methylation status in disease initiation, complete response, recurrence of acute leukemia, and explores its clinical value for MRD monitoring.

Subject words: acute leukemia; gene methylation; minimal residual disease

随着对白血病发病机制的不断深入研究及治疗手段不断提升,白血病的治疗效果逐步改善,完全缓解率(complete remission rate, CR)明显提高。但CR后复发仍是目前治愈白血病的难题,白血病患者治疗过程中复发的主要原因是体内的微小残留病(MRD)^[1],急性白血病患者在初步诊断时体内白血病细胞总数约 10^{12} ,诱导化疗达到完全缓解后,残留的

白血病细胞总数为 $<10^9$ 。治疗后存在的MRD可增加复发风险,使总体生存期缩短、降低患者的生存年限^[2-5]。随着对白血病表观遗传学机制的深入研究,发现许多抑癌基因的分子生物学异常改变与白血病的发生密切相关。DNA甲基化作为表观遗传学中最重要、参与白血病的发生、发展,在疾病的诊断、治疗及监测MRD等方面都具有重要价值。国内外大量研究表明,*Dnk3*、*CDKN2A*、*CTGF*基因异常甲基化存在于多种肿瘤细胞中,并可作为判断患者发病、复发、预后等的生物标志物。本文就此三个基因异常甲基化与白血病MRD之间的研究作一综述,

基金项目:包头医学院科学研究基金扬帆计划(BYJJ-YF201698)

通信作者:贾国荣,主任医师,硕士;内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院血液科,内蒙古包头市昆都仑区林荫路41号(014010);E-mail:jgr2178372@163.com

收稿日期:2019-08-10; **修回日期:**2019-11-12

评价其在白血病 MRD 监测中的临床价值。

1 DNA 甲基化与白血病的发生、发展

急性白血病是常见的恶性肿瘤,病因目前尚未明确,是导致儿童死亡的主要恶性肿瘤,严重威胁人类的健康与生命。早期诊断、治疗及疾病监测至关重要。研究急性白血病发病机制对白血病的治疗和预后具有重要意义,大量研究表明 DNA 甲基化与白血病的发生有着密切联系。

正常人基因组甲基化模式是:管家基因无甲基化,组织特异性基因在其不表达的组织中甲基化而在其表达的组织中无甲基化。白血病患者则与正常人细胞的基因甲基化模式不同,白血病细胞中普遍存在低甲基化和异常高甲基化现象,例如:BCL2、髓过氧化物酶、C-myc 等存在低甲基化,低甲基化可以引起染色体(基因组)不稳定、突变,激活多种肿瘤基因^[6]。而 *DKK3*、*CDKN2A*、*P15* 等抑癌基因启动子区 CpG 岛存在异常高甲基化,高甲基化可以引起肿瘤抑制基因沉默表达,与肿瘤发展密切相关^[7]。

我们之前的研究发现,在初诊急性白血病患者中 *DKK3*、*CDKN2A* 基因甲基化发生率较高,且在急性白血病中 CTGF 呈蛋白高表达^[8-9]。此外国内外学者研究较多的还有 *p15*、*ID4*、*ZO-1* 等基因在白血病中呈基因异常甲基化状态,也可能成为一种新的基因标志应用于白血病的病情监测及微小残留病的检测^[10-13]。

2 基因甲基化与急性白血病 MRD

2.1 *DKK3* 基因甲基化异常与急性白血病 MRD

Wnt 信号转导通路(wingless pathway)是一条参与调节细胞的生长、迁移、分化及凋亡的信号通路,是肿瘤发生过程中的关键信号通路之一,Wnt 通路的异常活化与肿瘤的形成密切相关^[14]。*DKK3* 基因为 Wnt 信号传导通路的拮抗剂,可抑制 Wnt 信号途径的活化,具有调控细胞增殖和凋亡的功能,与多种肿瘤的发病机制、病情及预后有密切联系^[15]。*DKK3* 基因是抑癌基因,其蛋白质有抑制细胞增殖的能力,*DKK3* 启动子区富含 CPG 岛,启动子区的异常甲基化状态导致 *DKK3* 的表达下调、沉默,

DKK3 基因的沉默导致其失去对通路的抑制作用,致细胞无限增殖,肿瘤形成。国内外研究表明 *DKK3* 基因启动子区 CPG 岛甲基化水平在癌组织中高于正常组织,且 *DKK3* 基因高甲基化状态在多个恶性肿瘤(直肠癌、乳腺癌、肝癌)中均被检测到^[16-18],且 *DKK3* 基因高甲基化、低表达与癌症的预后有关。*DKK3* 在急性白血病中亦存在基因异常甲基化。

徐濛濛等^[19]利用 MSP 法检测显示初发急性髓系白血病(AML)患者中 *DKK3* 启动子甲基化发生率可达 55.36%,运用 Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示:*DKK3* 基因甲基化的 AML 患者总生存时间短于 *DKK3* 基因非甲基化的 AML 患者。在儿童 AML 中,罗海燕等^[20]研究显示初诊 AML 检测到骨髓 *DKK3* 基因启动子甲基化率为 62.5%,在化疗缓解时的甲基化率为 52.5%,随访后发现 *DKK3* 基因启动子甲基化患者 3 年生存率及中位生存期均低于 *DKK3* 基因启动子未甲基化患者,且 *DKK3* 基因启动子甲基化为 AML 患者病情严重及预后差的标志,在 AML 患者病情及预后评估中具有一定价值。

Roman-Gomez 等^[21-22]研究发现 *DKK3* 基因甲基化发生在急性淋巴细胞白血病(ALL)发病的早期阶段,在初诊成人 ALL 患者可达 33%,儿童达 32%,且白血病患者中有 *DKK3* 基因甲基化患者复发率(59%)与无甲基化患者复发率(29%)相比明显增加,并且 *DKK3* 基因甲基化与患者 10 年无病生存率和总体生存率降低相关。

综上 *DKK3* 基因在初诊的急性白血病中高甲基化表达且与病情及预后密切相关,而在白血病化疗缓解后、复发患者中的 *DKK3* 基因甲基化状态报道甚少,有待进一步检测、研究,因此 *DKK3* 基因甲基化作为急性白血病监测 MRD 的一项指标对判断病情、预后,对指导白血病的治疗具有潜在的临床意义。

2.2 *CDKN2A* 基因甲基化异常与 MRD

CDKN2A (*p16*) 基因位于 9p21 染色体,是一种肿瘤抑制基因,特异地抑制周期性依赖激酶 4/6 (CDK4/6),阻止细胞进入增殖周期。*CDKN2A* 在多种人类肿瘤细胞中均有缺失或突变,近几年的研究发现 *CDKN2A* 基因 CpG 岛的高度甲基化是其在白血病中的一种失活方式,且发生率也较高,与白血病有密切关系。

范丽萍等^[23]用巢式 MSP 法检测 AML 患者 *p16*

基因甲基化等为 41.4%, ALL 患者 *p16* 基因甲基化率为 33.3%, 初诊急性白血病 (AL) 患者 *p16* 基因甲基化率为 36.6%, 而缓解后复发的则为 54.5%。Hsiao 等^[24]报道 26 例白血病患者中有较高的 *p16* 基因甲基化率, 85% 的 ALL 检测到 *p16* 的启动子甲基化, 在 AML 中检测到 83%。

而在儿童 ALL 患者中, Sulong 等^[25]发现 *p16* 甲基化是罕见的, 而基因组缺失发生在 21% 的 B 细胞前体 ALL 和 50% 的 T-ALL 患者中。韩国学者 Hahn 等^[26]发现, 在 43 例初诊儿童 ALL 患者中, 仅有 2 例 (4.6%) 发生 *p16* 甲基化, 而 Kim 等^[27]在新诊断的 B-ALL 患者中发现 *p16* 的启动子甲基化发生率在儿童中为 34.4%, 在成人中为 26.7%, 且两者之间差异无统计学意义。

Jiang 等^[28]对急性白血病 *p16* 异常 DNA 甲基化所做的 Mate 分析结果显示, *p16* 基因的异常 DNA 甲基化是白血病的危险因素, 尤其对于 AML, *p16* 高甲基化与 AML 风险增加相关 (OR=8.63, 95%CI: 1.52~48.91, $P=0.01$)。

综上 *p16* 基因异常甲基化在初发急性白血病中发生频率亦较高, 在缓解后复发患者中发生率甚至高于初发患者, 同样在白血病化疗缓解后、复发患者中的 *p16* 基因甲基化程度研究亦甚少, 因此用来监测白血病患者化疗缓解后复发的风险有待进一步加大研究, 其作为患者一种潜在的预后判断指标和临床辅助评估指标具有重要的临床价值。

2.3 CTGF 基因甲基化异常与 MRD

结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF/CCN2) 是一种分泌蛋白, 属于 CCN 家族成员。CCN 家族蛋白分泌细胞外基质联合蛋白, 参与细胞增殖、发育、黏附、迁移、血管生成, 调节细胞生长、体内复杂的生物过程等。CTGF 的表达与多种癌症的发生发展相关, 且能预测预后, 而 CTGF/CCN2 蛋白的表达在不同恶性肿瘤中存在差异, 并且发挥不同的作用, 例如在侵袭性结直肠癌中高表达, 并作为其标志物^[29], 在宫颈癌、卵巢癌中低表达, 并作为抑癌因子在癌症的发生发展中发挥作用^[30-31], 而且在卵巢癌组织中经常观察到 CTGF 呈基因高甲基化状态 (59%), 与 CTGF mRNA 表达呈负相关^[32]。在急性白血病中, 我们之前的研究发现 CTGF 蛋白呈高表达^[9]。Sala-Torra 等^[33]研究发现在成人 ALL 中

CTGF 高表达, 并且 CTGF 高表达与患者较差的预后相关。

Mathew 等^[34]研究发现, 在儿童急性前 B 淋巴细胞白血病患者中 CTGF 基因呈低甲基化状态, 而蛋白呈现高表达, 可达 75%, 并且与患者不良预后相关, 且 CTGF 基因的低甲基化是前 B 淋巴细胞中 CTGF 蛋白高表达的先决条件, 在不表达 CTGF 的 ALL 中而又表现出独特的高甲基化模式。CTGF 在其他类型白血病中基因甲基化水平未见有相关文献报道, 而其蛋白表达在急性白血病中可见。

Vorwerk 等^[35]采用 RT-PCR 方法对儿童 ALL 患者进行研究, 有 61% (65/107) 患者的 CTGF 表达呈阳性, 在对照组外周血中未检测到 CTGF 的表达。最近 Battula 等^[36]实验发现 AML 细胞在骨髓间充质基质细胞 (BM-MSCs) 中可诱导结缔组织生长因子 (CTGF) 表达, 在对转基因小鼠模型的实验研究后得出 CTGF 的过表达可极大地增强体内白血病植入。Boag 等^[37]研究证明重组 CTGF 蛋白可以增加白血病细胞对基质细胞的黏附, 并增加人骨髓基质细胞的增殖, 发现高 CTGF 表达与较短的存活亦相关。

综上, CTGF 异常基因甲基化在除儿童急性前 B 淋巴细胞白血病外的其他类型的急性白血病的是否存在还未明确, 其与 CTGF 蛋白表达之间存在的联系更需探索。相信将来随着对 CTGF 与急性白血病发病机制的深入研究, 其在白血病 MRD 的监测中定会发现其潜在的临床用途。

3 小结与展望

白血病作为一种恶性肿瘤, 复发是影响患者生存的主要问题。MRD 是白血病患者治疗达到完全缓解后复发的主要原因, 及时精确检测到微小残留病灶并予以彻底清除是白血病治疗的关键, 但绝大多数患者缺乏能够早期诊断白血病的特异性强、通用性好的分子标志物, 因此选择合适的指标监测 MRD 是目前临床所面临的重要问题。越来越多的研究表明 DNA 甲基化在白血病发生发展中起着重要作用, 在初诊、复发的白血病患者中基因甲基化发生频率高, 这为 MRD 在分子水平上的检测找到了新方向。但目前用于检测 MRD 的白血病相关基因甲基化数量有限, 相信未来随着对 DNA 甲基化研究的

不断深入以及 MRD 监测方法的不断提高,将会发现更多更理想的分子标志物用于检测 MRD,以指导临床个体化治疗,降低白血病患者的复发率,提高患者生存质量。

参考文献:

- [1] Zhao XS, Qin YZ, Liu YR, et al. The impact of minimal residual disease prior to unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia in complete remission[J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58 (5): 1135–1143.
- [2] Gökbuget N, Kneba M, Raff T, et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies [J]. *Blood*, 2012, 120(9): 1868–1876.
- [3] Patel B, Rai L, Buck G, et al. Minimal residual disease is a significant predictor of treatment failure in non T-lineage adult acute lymphoblastic leukemia: final results of the international trial UKALL XII/ECOG2993 [J]. *Br J Haematol*, 2010, 148(1): 80–89.
- [4] Ravandi F, Jorgensen JL, O'Brien SM, et al. Minimal residual disease assessed by multi-parameter flow cytometry is highly prognostic in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2016, 172(3): 392–400.
- [5] Berry DA, Zhou S, Higley H, et al. Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: a metaanalysis [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(7): e170580.
- [6] Brookes E, Shi Y. Diverse epigenetic mechanisms of human disease[J]. *Annu Rev Genet*, 2014, 48: 237–268.
- [7] Hattori N, Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 455(1–2): 3–9.
- [8] Li ZQ, Lu Y, Jia GR. Methylation of DKK3, DAPK and CDKN2A in acute leukemia [J]. *Journal of Clinical Medical*, 2017, 4(77): 15065, 15067. [李志芹, 卢艳, 贾国荣. 急性白血病中 DKK3、DAPK、CDKN2A 甲基化表达的研究 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(77): 15065, 15067.]
- [9] He QT, Bai XQ, Liu XW, et al. Protein and mRNA expression of CTGF, CYR61, VEGF-C and VEGFR -2 in bone marrow of leukemia patients and its correlation with clinical features [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2014, 22(3): 653–659. [贺其图, 白学琴, 刘学文, 等. 白血病患者骨髓中 CTGF、CYR61、VEGF-C、VEGFR-2 mRNA、蛋白的表达及其临床相关性研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(3): 653–659.]
- [10] Mai H, Liu X, Chen Y, et al. Hypermethylation of p15 gene associated with an inferior poor long-term outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(2): 497–504.
- [11] Baba SM, Azad NA, Shah ZA, et al. P15ink4b loss of expression by promoter hypermethylation adds to leukemogenesis and confers a poor prognosis in acute promyelocytic leukemia patients [J]. *Cancer Res Treat*, 2017, 49(3): 790–797.
- [12] Kang HY, Wang XR, Gao L, et al. Clinical implications on ZO-1 gene methylation in myelodysplastic syndrome progression [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2015, 23(3): 746–749. [康慧媛, 王新荣, 高丽, 等. ZO-1 基因甲基化在 MDS 进展中的意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(3): 746–749.]
- [13] Liu Y, Zhong WW, Kang HY, et al. Clinical significance of ID4 methylation detection by quantitative methylation-specific PCR in acute leukemia [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2014, 22(3): 675–680. [刘洋, 钟文雯, 康慧媛, 等. ID4 基因甲基化定量 PCR 检测在急性白血病中的临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(3): 675–680.]
- [14] Serman L, Nikuseva Martic T, Serman A, et al. Epigenetic alterations of the Wnt signaling pathway in cancer: a mini review [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2014, 14(4): 191–194.
- [15] Hayashi T, Asano H, Toyooka S, et al. DNA methylation status of REIC/Dkk-3 gene in human malignancies [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(5): 799–809.
- [16] Safari E, Mosayebi G, Khorram S, Dkk-3 as a potential biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer [J]. *Med J Islam Repub Iran*, 2018, 32: 86.
- [17] Xiang T, Li L, Yin X, et al. Epigenetic silencing of the Wnt antagonist Dickkopf 3 disrupts normal Wnt/ β -catenin signalling and apoptosis regulation in breast cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(10): 1236–1246.
- [18] Li J. Methylation of DKK3 and ITIH5 as a potential biomarker for hepatocellular carcinoma [D]. Jinan: Shandong University, 2018. [李佳. DKK3 甲基化、ITIH5 甲基化对肝细胞肝癌诊断价值的研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.]
- [19] Xu MM, Yang YL, Geng YH, et al. Methylation status and mRNA expression of DKK-3 and WIF-1 in acute myeloid leukemia patients [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2017, 25(5): 1314–1320. [徐濛濛, 杨艳丽, 耿英华, 等. 急

- 性髓系白血病中 DKK-3 和 WIF-1 甲基化状态和 mRNA 表达的研究 [J]. 中国实验血液学杂志,2017,25(5):1314-1320.]
- [20] Luo HY,Xu LZ. Clinical value of the promoter hypermethylation of DKK3 gene in children with acute myeloid leukemia[J]. Oncology Progress,2016,14(10):982-985.[罗海燕,徐之良.急性髓系白血病儿童 DKK3 基因启动子高甲基化的临床价值[J]. 癌症进展,2016,14(10):982-985.]
- [21] Roman-Gomez J,Jimenez-Velasco A,Agirre X,et al. Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia [J]. Br J Cancer,2004,91(4):707-713.
- [22] Roman-Gomez J,Cordeu L,Agirre X,et al. Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood,2007,109(8):3462-3469.
- [23] Fan LP, Detection of p16 gene methylation status in adult patients with acute leukemia by using n-MSP[D].Fuzhou: Fujian Medical University,2007.[范丽萍. 急性白血病 P16 基因甲基化状态检测及 EGCG 逆转 U937 细胞 P16 基因甲基化的实验研究[D].福州:福建医科大学,2007.]
- [24] Hsiao PC ,Liu MC,Chen LM,et al. Promoter methylation of p16 and EDNRB gene in leukemia patients in Taiwan [J]. Chin J Physiol,2008,51(1):27-31.
- [25] Sulong S,Moorman AV,Irving JA,et al. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion,copy number neutral loss of heterozygosity,and association with specific cytogenetic subgroups [J]. Blood,2009,113(1):100-1007.
- [26] Hahn SM,Kwon SY,Kim HS,et al. Aberrant DNA methylation of CDH1,p16 and DAPK in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Clin Pediatr Hematol Oncol,2015,22:60-66.
- [27] Kim M,Yim SH,Cho NS,et al. Homozygous deletion of CDKN2A (p16,p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia:a comparative deletion and hypermethylation study [J]. Cancer Genet Cytogenet,2009,195(1):59-65.
- [28] Jiang D,Hong Q,Shen Y,et al. The diagnostic value of DNA methylation in leukemia;a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One,2014,9(5):e96822.
- [29] Ubink I,Verhaar ER,Kranenburg O,et al. A potential role for CCN2/CTGF in aggressive colorectal cancer [J]. J Cell Commun Signal,2016,10(3):223-227.
- [30] Lian XY,Zheng XY,Hao YT,et al. Expression of connective tissue growth factor in cervical cancer tissues and its correlative factors [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology,2017,33 (17):1641-1643.[连相尧,郑小影,郝云涛,等.宫颈癌中结缔组织生长因子的表达及其相关因素分析 [J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(17):1641-1643.]
- [31] Chen XW,Ma JQ,Zhang RY,et al. The expression and clinical significance of CTGF and VEGF in ovarian cancer [J]. Oncology Progress,2017,15 (8):907-910.[陈秀玮,马敬全,张瑞颖,等.CTGF、VEGF 在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 癌症进展,2017,15(8):907-910.]
- [32] Kikuchi R,Tsuda H,Kanai Y,et al. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in ovariancancer [J]. Cancer Res,2007,67(15):7095-7105.
- [33] Sala-Torra O,Gundacker HM,Stirewalt DL,et al. Connective tissue growth factor(CTGF) expression and outcome in adult patients with acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood,2007,109(7):3080-3083.
- [34] Welch MD,Green WK,Kees UR. Hypomethylation of the CTGF gene locus is a common feature of paediatric pre-B acute lymphoblastic leukaemia [J]. Br J Haematol,2013,162(4):537-541.
- [35] Vorwerk P,Wex H,Hohmann B,et al. CTGF (IGFBP-rP2) is specifically expressed In malignant lymphoblasts of patients with acute lymphoblastic leukaemia (ALL)[J]. Br J Cancer,2000,83(6):756-760.
- [36] Battula VL,Le PM,Sun JC,et al. AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth[J]. JCI Insight,2017,2(13):pii:90036.
- [37] Boag JM,Beesley AH,Firth MJ,et al. High expression of connective tissue growth factor in pre-B acute lymphoblastic leukaemia[J]. Br J Haematol,2007,138(6):740-748.