

# 伏马菌素B<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞细胞周期相关基因mRNA表达的影响

王少康, 王婷婷, 黄桂玲, 石若夫, 杨立刚, 董淑楠, 孙桂菊\*

(东南大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009)

**摘 要:** 本研究采用体外实验, 分离鉴定人正常食管上皮细胞, 用RT-PCR方法测定伏马菌素B<sub>1</sub>(fumonisin B<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub>)对细胞周期相关基因*Cyclin D1*、*Cyclin E*、*P16*、*P21*、*P27* mRNA表达的影响。结果表明: FB<sub>1</sub>作用人正常食管上皮细胞后可以在转录水平上影响*Cyclin D1*、*Cyclin E*、*P16*、*P21*、*P27*基因的表达, 导致*Cyclin D1* mRNA高表达, *Cyclin E*、*P16*、*P21*、*P27*基因mRNA低表达。提示, 细胞周期相关基因的异常表达与癌症密切相关, 该研究从体外实验进一步证实FB<sub>1</sub>可能与人类食管癌的发生有关。

**关键词:** 伏马菌素B<sub>1</sub>; 人正常食管上皮细胞; 细胞周期; 基因表达

Effect of Fumonisin B<sub>1</sub> on the mRNA Expressions of Cell Cycle-related Genes in Human Normal Esophageal Epithelial Cells

WANG Shao-kang, WANG Ting-ting, HUANG Gui-ling, SHI Ruo-fu, YANG Li-gang, DONG Shu-nan, SUN Gui-ju\*

(Key Laboratory of Environmental Medicine and Engineering of Ministry of Education, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Epidemiological studies have shown that fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), a fungal toxin, may be associated with esophageal cancer, but the laboratory evidence is still limited. In this study, human normal esophageal epithelial cells were isolated and identified *in vitro*. The influence of FB<sub>1</sub> on the mRNA expression of cell cycle-related genes including *Cyclin D1*, *Cyclin E*, *P16*, *P21*, and *P27* was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that FB<sub>1</sub> played an important role in regulating the expression of *Cyclin D1*, *Cyclin E*, *P16*, *P21*, and *P27* genes in normal human esophageal epithelial cells at the transcriptional level, leading to high mRNA expression of *Cyclin D1* but low mRNA expression of *Cyclin E*, *P16*, *P21*, and *P27* genes. The abnormal expression of cell cycle-related genes is closely related with cancer. This *in vitro* study has further confirmed that FB<sub>1</sub> is related with the occurrence of human esophageal cancer.

**Key words:** fumonisin B<sub>1</sub>; human normal esophageal epithelial cells; cell cycle; gene expression

中图分类号: R155.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0313-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323063

伏马菌素B<sub>1</sub>(fumonisin B<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub>)是一种由串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)产生的有毒双酯化合物, 主要污染玉米及其制品, 被认为是当今世界危及人类食品安全的重要因素之一。动物实验研究表明, FB<sub>1</sub>可引起大鼠肾癌、小鼠肝癌<sup>[1-4]</sup>。关于FB<sub>1</sub>和人类癌症的流行病学调查证据主要集中在FB<sub>1</sub>与食管癌的关系, 来自南非、伊朗和中国人群现况调查流行病学资料表明食管癌高发区居民粮食中FB<sub>1</sub>的污染水平或FB<sub>1</sub>摄入量或尿中生物标志物水平高于低发区居民<sup>[5-11]</sup>, 但仍缺乏FB<sub>1</sub>对人类致癌的直接证据, 国际癌症研究机构(IARC)把FB<sub>1</sub>归为2B类致癌物(在

动物中有致癌作用, 在人类中证据还不充分或没有证据的可能人类致癌物)。

体外肝细胞实验发现FB<sub>1</sub>能够影响细胞周期及相关基因的表达<sup>[12]</sup>, 动物实验发现FB<sub>1</sub>会增加SD雄性大鼠肝脏中*Cyclin E* mRNA的表达、细胞周期素D1(*Cyclin D1*)蛋白的表达以及*p21*基因的表达<sup>[13]</sup>。细胞周期调控因子在致癌因素作用下可发生突变、缺失、异位、扩增等变化, 导致细胞周期的失控, 进而异常细胞无限增殖, 形成肿瘤。细胞周期相关基因可能与FB<sub>1</sub>在食管癌发生中的作用密切相关, 本研究综合考虑细胞周期调控的全面性, 选

收稿日期: 2013-10-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800914; 81372985); 达能膳食营养研究与宣教基金项目(DIC2011-05);

江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ-0179)

作者简介: 王少康(1975—), 男, 讲师, 博士, 主要从事食品毒理学研究。E-mail: shaokangwang@gmail.com

\*通信作者: 孙桂菊(1963—), 女, 教授, 博士, 主要从事食品毒理与食品功效学研究。E-mail: guiju.sun@gmail.com

择了*Cyclin D1*、*Cyclin E*、*P16*、*P21*、*P27*调控因子，从基因的mRNA表达水平上分析FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

FB<sub>1</sub>、Dispace(0.5%)、BSA、0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水(无RNase水)、Tris、EDTA 美国Sigma公司；DEPC、青霉素、链霉素 碧云天生物技术有限公司；新生牛血清(FBS) 杭州四季青生物工程材料研究所；RPMI Medium 1640 美国Gibco公司；PBS、胰蛋白酶(0.25%) 南京生兴生物技术有限公司；Trizol 美国Invitrogen公司；小鼠抗人细胞角蛋白19(CK-19)的抗体、FITC标记的羊抗小鼠的IgG 美国CST公司；RT-PCR试剂盒、DNA Marker D1000 天为时代公司。

1.2 仪器与设备

CKX41型倒置显微镜 日本Olympus公司；Centrifuge 5417台式高速离心机 德国Eppendorf公司；PTC200PCR仪 美国MJ Research公司；EPS-100电泳仪 天能科技有限公司；凝胶成像仪 江苏省捷达科技发展有限公司；Gene Quant II型RNA检测仪 德国Pharmacia Biotech公司。

1.3 人正常食管上皮细胞的取材、分离与传代

参照上皮细胞分离培养方法的文献[14-15]报道，经过患者知情同意，采集患者术后正常食管组织，放入0.5%的Dispace分离液中，分离食管上皮组织，并用小镊子撕碎，加0.25%的胰蛋白酶消化液消化5min，然后加入胎牛血清终止消化，加入1640培养液打匀，分装到培养瓶中。每天观察培养细胞的生长情况，待细胞长满培养瓶底的80%时传代，进一步进行细胞鉴定和进行下一步实验。

1.4 细胞鉴定

参照上皮细胞鉴定方法的文献[14-15]报道，使用的一抗是小鼠抗人细胞角蛋白19(CK-19)的抗体，二抗是FITC标记的羊抗小鼠的IgG。鉴定设阴性对照组和样本组，其中样本组正常使用一抗和二抗孵育，阴性对照组用5% BSA代替一抗孵育，二抗照常使用。细胞图片为同一视野，一张白光照片对应一张荧光照片。样本组荧光照片的曝光时间是100ms；阴性对照组荧光照片的曝光时间是600ms。

1.5 细胞周期调控因子mRNA表达的测定

将细胞接种于六孔培养板中，待生长至对数生长期时，每孔分别加入FB<sub>1</sub> 0、5、10、20、40μmol/L，72h时终止处理，收集细胞用RT-PCR方法检测细胞周期相关基因mRNA表达水平的测定。基因引物信息具体见表1。

PCR反应条件为：94℃预变性2min，然后94℃、1min，55℃、1min，72℃、2min进行28个循环扩增，再以72℃延伸8min。

表1 人正常食管上皮细胞周期相关基因PCR反应引物序列

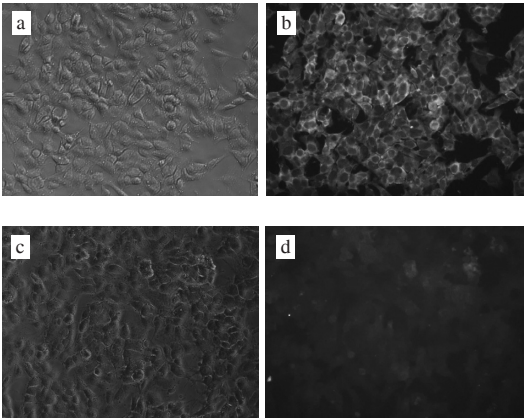
Table 1 PCR Primer sequences of cell cycle-related genes		
引物	序列	片段长度/bp
<i>Cyclin D1</i>	5'-CTG TCC TAC TAC CGC CTC AC-3'	274
	5'-CAC CTC CTC CTC CTC CTC TT-3'	
<i>Cyclin E</i>	5'-ATA CAG ACC CAC AGA GAC AG-3'	301
	5'-TGC CAT CCA CAG AAA TAC TT-3'	
<i>P16</i>	5'-TTA TTT GAG CTT TGG TTC TG-3'	355
	5'-CCC GCT TTC GTA GTT TTC AT-3'	
<i>P21</i>	5'-CAG GGG ACA GCA GAG GAA GA-3'	335
	5'-GGG CGG CCA GGG TAT GTA C-3'	
<i>P27</i>	5'-GAG GCC AAG TAC GAG TGG CAA-3'	238
	5'-CTG CGC ATT GCT CCG CTA ACC-3'	
<i>PKC</i>	5'-GCT GAG GTT GCT GAT GAA-3'	497
	5'-AGG TTG TTG GAA GGT TGT T-3'	
<i>GAPDH</i>	5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG-3'	414
	5'-TGA TCT TGA GGC TGT TGT C-3'	

1.6 统计学分析

SAS8.2统计软件对实验数据进行方差分析，各实验组与阴性对照组的实验结果以Dunnett's *t*检验进行比较。

2 结果与分析

2.1 人正常食管上皮细胞鉴定



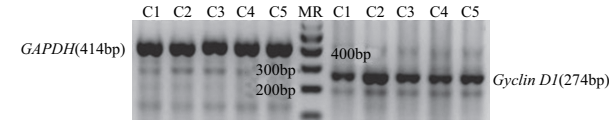
a.样品组(白光照片); b.样品组(荧光照片); c.阴性对照(白光照片); d.阴性对照(荧光照片)。

图1 人正常食管上皮组织角蛋白19(CK-19)荧光鉴定照片(×100)  
Fig. 1 Fluorescent photographs for identification of CK-19 in the human normal esophageal epithelial tissue (× 100)

研究应用的来源于人正常食管组织的细胞含有大量上皮细胞蛋白-角蛋白19(CK-19)，由图1可知，本研究所采用的实验材料为人正常食管上皮细胞。

## 2.2 FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞周期调控因子mRNA表达的影响

1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品,电泳图谱可见28S rRNA和18S rRNA的亮度比值约为2:1,且无弥散,表明RNA没有被降解。FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞周期调控因子mRNA表达影响的RT-PCR产物的电泳图谱如图2~6所示。



C1. 阴性对照组(FB<sub>1</sub> 0μmol/L); C2. 处理1组(FB<sub>1</sub> 5μmol/L); C3. 处理2组(FB<sub>1</sub> 10μmol/L); C4. 处理3组(FB<sub>1</sub> 20μmol/L); C5. 处理4组(FB<sub>1</sub> 40μmol/L); MR. Marker。下同。

图2 FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞Cyclin D1基因mRNA表达的影响

Fig.2 Effect of FB<sub>1</sub> on the mRNA expression of Cyclin D1 gene in human normal esophageal epithelial cells

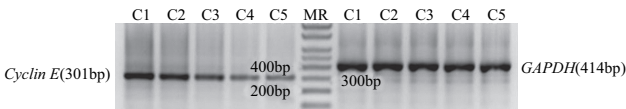


图3 FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞Cyclin E基因mRNA表达的影响

Fig.3 Effect of FB<sub>1</sub> on the mRNA expression of Cyclin E gene in human normal esophageal epithelial cells

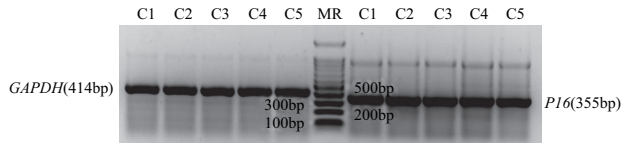


图4 FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞P16基因mRNA表达的影响

Fig.4 Effect of FB<sub>1</sub> on the mRNA expression of P16 gene in human normal esophageal epithelial cells

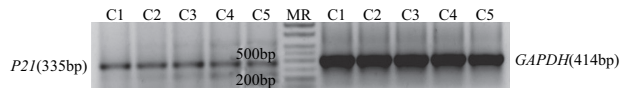


图5 FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞P21基因mRNA表达的影响

Fig.5 Effect of FB<sub>1</sub> on the mRNA expression of P21 gene in human normal esophageal epithelial cells

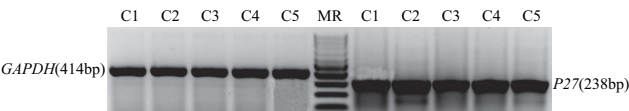


图6 FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞P27基因mRNA表达的影响

Fig.6 Effect of FB<sub>1</sub> on the mRNA expression of P27 gene in human normal esophageal epithelial cells

FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞周期调控因子mRNA表达的影响结果见表2。用10、20、40μmol/L FB<sub>1</sub>处理人正常食管上皮细胞72h,均可上调Cyclin D1基因的mRNA

表达,下调Cyclin E、P16、P21、P27基因的mRNA表达;用5μmol/L FB<sub>1</sub>处理人正常食管上皮细胞72h,可上调Cyclin D1基因的mRNA表达,下调Cyclin E、P21基因的mRNA表达,但对P16、P27基因的mRNA表达无显著作用。分析不同剂量FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞周期调节因子mRNA表达作用的变化,发现FB<sub>1</sub>处理72h时,随着处理剂量的增加,对细胞周期调节因子Cyclin E、P16、P21、P27基因mRNA表达的影响有逐渐加强的趋势,而FB<sub>1</sub>上调Cyclin D1基因的表达在5μmol/L FB<sub>1</sub>处理组效果最明显。

表2 FB<sub>1</sub>对人正常食管上皮细胞周期调节因子mRNA表达的影响(相对灰度值)( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 2 Effects of FB<sub>1</sub> on the mRNA expression of cell cycle-related genes in human normal esophageal epithelial cells (relative gray value ( $\bar{x} \pm s$ , n=3))

组别	Cyclin D1	Cyclin E	P16	P21	P27
阴性对照组(FB <sub>1</sub> 0μmol/L)	0.999±0.012	1.000±0.026	1.000±0.014	1.000±0.026	1.000±0.003
处理1组(FB <sub>1</sub> 5μmol/L)	1.887±0.046*	0.828±0.011*	1.014±0.009	0.930±0.035*	0.992±0.007
处理2组(FB <sub>1</sub> 10μmol/L)	1.245±0.008*	0.624±0.011*	0.930±0.012*	0.842±0.023*	0.904±0.003*
处理3组(FB <sub>1</sub> 20μmol/L)	1.218±0.008*	0.340±0.027*	0.930±0.008*	0.820±0.013*	0.909±0.005*
处理4组(FB <sub>1</sub> 40μmol/L)	1.288±0.009*	0.317±0.059*	0.860±0.008*	0.722±0.013*	0.898±0.024*

注:\*. 与阴性对照组比较,有显著性差异(P<0.05)。

## 3 讨论

本实验采用RT-PCR的方法检测基因表达产物的改变是否发生在转录水平。由于mRNA的变化早于蛋白变化,通过实验观察到FB<sub>1</sub>作用人正常食管上皮细胞后可以在转录水平上影响Cyclin D1、Cyclin E、P16、P21、P27基因的mRNA表达,导致Cyclin D1 mRNA高表达, Cyclin E、P16、P21、P27基因mRNA低表达。

Cyclin D1是细胞周期调控中Cyclin 蛋白家族的最重要的成员之一,主要在G1期起作用,被看做是生长因子感受器。如Cyclin D1基因激活,则Cyclin D1持续高表达,将导致G1期缩短,提前进入S期,使细胞增殖失控,最终形成肿瘤<sup>[16-17]</sup>。4-(N-甲基-N-亚硝胺)-1-(3-吡啶基)-丁酮(NNK)是香烟中的一种特殊的致癌物, Ho等<sup>[18]</sup>应用NNK刺激正常人支气管上皮细胞和小呼吸道上皮细胞增殖时,发现其可以提高Cyclin D1表达的水平,与本实验FB<sub>1</sub>上调人正常食管上皮细胞Cyclin D1表达的结果一致。

Cyclin E为G1期细胞周期蛋白,与CDK2结合进而调控细胞周期,在控制细胞由G1期到S期中起限速作用, Cyclin E与CDK2结合形成Cyclin E- CDK2复合物,促使细胞G1/S 期的进行<sup>[19]</sup>。Cyclin E异常表达与一些肿瘤发生和预后有关<sup>[20-22]</sup>。异常情况下, Cyclin E蛋白失去周期性表达,而在整个细胞周期中激活CDK2,促使G1/S期转换,使细胞发生异常增殖,形成肿瘤。Bondy等<sup>[13]</sup>在动物实验中发现经FB<sub>1</sub>处理后的动物其肝组织中Cyclin E mRNA表



达与对照组相比显著增加,与本实验结果不一致,其原因有待进一步探讨。

P16主要作用是抑制CDK4/6介导的*RB*基因的磷酸化,阻止细胞从G1期进入S期。P16不仅可直接抑制Cyclin D1-CDK4、Cyclin D1-CDK6复合体的活性,还可通过活化CIP/KIP家族蛋白,间接抑制Cyclin E、Cyclin A-CDK2复合体的活性。到目前为止,已经在人类的许多种恶性肿瘤及头颈肿瘤内检测到*P16*基因的改变<sup>[23]</sup>。本实验结果显示,FB<sub>1</sub>处理人正常食管上皮细胞,能够抑制*P16*基因的mRNA表达。

P21作为一个可诱导的生长抑制剂,其高表达结合Cyclin E/CDK2则阻止细胞周期于G1期,从而抑制DNA复制,使细胞脱离细胞周期,发生分化,在个体发育中有重要意义。本实验结果显示,用FB<sub>1</sub>处理人正常食管上皮细胞,*P21*基因的mRNA表达水平降低。关于FB<sub>1</sub>是如何对mRNA产生影响作用的,经基因序列分析发现,FB<sub>1</sub>可能是通过结合了两个SP-1结合位点而启动了*P21* mRNA的表达<sup>[24]</sup>。

P27既能抑制在正常细胞已结合到Cyclin并激活的CDK,也能抑制CDK的激活过程。本研究结果显示,FB<sub>1</sub>能够抑制人正常食管上皮细胞*P27*基因mRNA的表达。Zhang Weiguo等<sup>[25]</sup>通过在裸鼠体内构建食道癌模型,发现通过腺病毒载体构建高表达的P27,可以导致存活素水平下降,进一步导致食道癌细胞的凋亡。

细胞周期相关基因的异常表达与癌症密切相关,本研究结果从体外实验进一步证实FB<sub>1</sub>可能与人类食管癌的发生有关。

#### 参考文献:

- GELDERBLUM W C, RHEEDER J P, LEGGOTT N, et al. Fumonisin contamination of a corn sample associated with the induction of hepatocarcinogenesis in rats-role of dietary deficiencies[J]. Food Chem Toxicol, 2004, 42(3): 471-479.
- MARNEWICK J L, van der WESTHUIZEN F H, JOUBERT E, et al. Chemoprotective properties of rooibos (*Aspalathus linearis*), honeybush (*Cyclopia intermedia*) herbal and green and black (*Camellia sinensis*) teas against cancer promotion induced by fumonisin B<sub>1</sub> in rat liver[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(1): 220-229.
- GELDERBLUM W C, MARASAS W F, LEBEPE-MAZUR S, et al. Cancer initiating properties of fumonisin B<sub>1</sub> in a short-term rat liver carcinogenesis assay[J]. Toxicology, 2008, 250(2/3): 89-95.
- MULLER S, DEKANT W, MALLY A. Fumonisin B<sub>1</sub> and the kidney: modes of action for renal tumor formation by fumonisin B<sub>1</sub> in rodents[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(10): 3833-3846.
- MARASAS W F, JASKIEWICZ K, VENTER F S, et al. Fusarium moniliforme contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei[J]. S Afr Med J, 1988, 74(3): 110-114.
- YOSHIZAWA T, YAMASHITA A, LUO Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(5): 1626-1629.
- CHU F S, LI G Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(3): 847-852.
- SUN Guiju, WANG Shaokang, HU Xu, et al. Fumonisin B<sub>1</sub> contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China[J]. Food Addit Contam, 2007, 24(2): 181-185.
- 邱茂锋, 刘秀梅, 王玉华, 等. 某食管癌高发区人群伏马菌素摄入量及尿二氢神经鞘氨醇/神经鞘氨醇比值的调查[J]. 卫生研究, 2001, 30(6): 365-367.
- WANG H, WEI H, MA J, et al. The fumonisin B<sub>1</sub> content in corn from North China, a high-risk area of esophageal cancer[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2000, 19(1/2): 139-141.
- ALIZADEH A M, ROHANDEL G, ROUDBARMOHAMMADI S, et al. Fumonisin B<sub>1</sub> contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6): 2625-2628.
- WANG Shaokang, LIU Sha, YANG Ligang, et al. Effect of fumonisin B<sub>1</sub> on the cell cycle of normal human liver cells[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(6): 1970-1976.
- BONDY G S, BARKER M G, LOMBAERT G A, et al. A comparison of clinical, histopathological and cell-cycle markers in rats receiving the fungal toxins fumonisin B<sub>1</sub> or fumonisin B<sub>2</sub> by intraperitoneal injection[J]. Food Chem Toxicol, 2000, 38(10): 873-886.
- 孙玉竹, 刘迪文, 吴旧生. 豚鼠肾小管上皮原代细胞的培养[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1): 84-86.
- ELBERG G, GURUSWAMY S, LOGAN C J, et al. Plasticity of epithelial cells derived from human normal and ADPKD kidneys in primary cultures[J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(2): 495-508.
- KATO J, MATSUSHIME H, HIEBERT S W, et al. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4[J]. Genes Dev, 1993, 7(3): 331-342.
- FUKAMI-KOBAYASHI J, MITSUI Y. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2[J]. Exp Cell Res, 1999, 246(2): 338-347.
- HO Y S, CHEN C H, WANG Y J, et al. Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NFκappaB activation and cyclin D1 up-regulation[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 205(2): 133-148.
- HWANG H C, CLURMAN B E. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles[J]. Oncogene, 2005, 24(17): 2776-2786.
- NANOS-WEBB A, JABBOUR N A, MULTANI A S, et al. Targeting low molecular weight cyclin E (LMW-E) in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(2): 575-588.
- RISCH H A. Cyclin E overexpression relates to ovarian cancer histology but not to risk factors[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(7): 1841-1842.
- 刘传勇, 王琳琳, 孙玉萍, 等. 食管鳞癌组织中cyclin D1和cyclin E的表达及意义[J]. 山东医药, 2007, 47(24): 50-51.
- O'REGAN E M, TONER M E, FINN S P, et al. p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Hum Pathol, 2008, 39(3): 452-458.
- ZHANG Y, DICKMAN M B, JONES C. The mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> transcriptionally activates the p21 promoter through a cis-acting element containing two Sp1 binding sites[J]. J Biol Chem, 1999, 274(18): 12367-12371.
- ZHANG Weiguo, WU Qingming, YU Jieping, et al. Adenovirus expressing p27kip1 suppresses growth of established esophageal carcinoma xenografts[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(42): 6582-6586.