

吸烟大鼠肺脏 AQP4 和 MUC5AC 的表达及其与一氧化氮的关系 *

张 亮¹ 孙香蕾² 雷 蕾¹ 李 锋² 吴昌归^{1△}

(1 第四军医大学西京医院呼吸内科 陕西 西安 710032 ; 2 第四军医大学西京医院中医科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 研究烟草烟雾吸入对大鼠肺组织水通道蛋白 4(AQP4)和粘蛋白 5AC(MUC5AC)表达的影响及其与支气管肺泡灌洗液内一氧化氮代谢物水平的关系,探讨氧化应激对肺部水转运和粘液分泌的影响。方法:免疫组化法观察 AQP4 在肺组织内的表达,平均光密度法比较模型组和空白组大鼠 AQP4 的表达差异;半定量 RT-PCR 法检测肺组织内 AQP4 及 MUC5AC mRNA 的表达水平;硝酸还原酶法测定各组大鼠支气管肺泡灌洗液内一氧化氮代谢产物的浓度,分析模型组 AQP4、MUC5AC mRNA 的表达水平与支气管肺泡灌洗液内一氧化氮代谢物浓度之间的相关关系。结果:AQP4 在空白对照组呈强阳性染色,在模型组呈弱阳性染色,两者平均光密度值有显著差异($P<0.05$)。模型组动物肺组织 AQP4 mRNA 的表达降低,MUC5AC mRNA 的表达升高,与空白组比较均有显著差异($P<0.05$)。模型组动物支气管肺泡灌洗液内一氧化氮代谢产物的浓度与肺组织 AQP4 mRNA 表达水平呈负相关,相关系数 $r=-0.798$ ($P<0.05$),与 MUC5AC mRNA 的表达水平呈正相关,相关系数 $r=0.857$ ($P<0.05$)。结论:吸烟可导致肺组织 AQP4 表达下降进而影响气道内水的转运。一氧化氮可能参与了烟雾吸入动物模型中 AQP4 与 MUC5AC 基因表达的调控。

关键词 水通道蛋白; 一氧化氮; 粘蛋白 5AC; 吸烟

中图分类号: Q95-3 R56 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)13-2455-03

Expression of AQP4 and MUC5AC in Lungs of Smoking Rats and Its Relation with Nitric Oxide*

ZHANG Liang¹, SUN Xiang-lei², LEI Lei¹, LI Feng², WU Chang-gui^{1△}

(1 Department Of Respiratory Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xian, China, 710032;

2 Department Of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xian, China, 710032)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship of the expression of AQP4 and MUC5AC in tobacco-smoking and nitric oxide metabolics in BALF, and to investigate the effect of oxidative stress on water transport of lung. **Methods:** Tobacco-smoking model was established and the expression of AQP4 in lungs was examined by immunohistochemical stain and optical density analysis. AQP4 and MUC5AC mRNA expression was detected by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). Nitric oxide (NO) metabolics in BALF was detected by nitrate reductase assay and its relationship with AQP4 and MUC5AC mRNA expression was analyzed by Pearson's correlation. **Results:** There was strong positive expression of AQP4 in control group while it was a weak positive stain in smoking model group. Optical density analysis showed that their difference is statistically significant ($P<0.01$). In smoking model group the expression of AQP4 mRNA decreased and MUC5AC mRNA increased compared with that in the control group ($P<0.01$). In smoking model group, concentration of NO metabolics from BALF is negatively correlated with AQP4 mRNA level ($r=-0.849$, $P<0.01$) and positively correlated with MUC5AC mRNA level ($r=0.857$, $P<0.01$). **Conclusions:** Smoking causes the decreasing of AQP4 expression in lung tissue which influences water transport in airways. NO may play a vital role in this process through regulating AQP4 and MUC5AC mRNA expression.

Key words: Aquaporin; Nitric oxide; Mucousin 5AC; Tobacco smoking

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R56 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)13-2455-03

前言

吸烟被认为是慢性阻塞性肺疾病最重要的危险因素。烟草烟雾通过多种化学物质引起肺组织复杂的炎症反应,多种免疫细胞、炎症介质、蛋白酶、活性氧化物参与其中,导致了以气道

慢性炎症和阻塞为中心的肺部病变。在这个过程中粘液产生过多和排出障碍在气道阻塞中的作用不可忽视,而粘液的成分和纤毛功能又与气道表面含水量有密切关系。水通道蛋白 4 表达于气道粘膜上皮组织,是水在跨上皮转运中的重要通道蛋白,对气道表面液体平衡产生重要的调节作用^[1],因此研究吸烟所

* 基金项目 国家重点基础发展规划项目(973 项目)(2009CB522706)

作者简介 张亮(1983-) 男,硕士研究生,主要研究方向: COPD 的发病机制及治疗。E-mail: 249389409@qq.com

△通讯作者 吴昌归 电话: 029-84775237 E-mail: changgui@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-04-05 接受日期: 2011-04-29)

致的肺部炎症环境中 AQP4 表达的变化对进一步阐明慢性阻塞性肺疾病气道中粘液分泌和排出机制具有重要意义。

活性氧 - 抗氧化物失衡的重要性在吸烟致炎的诸多机制中业已得到公认,香烟烟雾本身含有以及炎症细胞产生的活性氧化性物质广泛参与了组织的损伤过程^[9]。气道上皮组织增殖活跃,更新速度快,因而更易受到氧化物质的损伤,初步探讨表达于气道上皮组织的水通道蛋白及粘蛋白 5AC 与活性氧化物的关系可为今后进一步明确活性氧 - 抗氧化物失衡在慢性阻塞性肺疾病中的地位和水通道蛋白在肺组织表达调控的机制提供研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级 Spradue-Dawly 大鼠 24 只,雌雄各半,体重 200-250 克,购自第四军医大学实验动物中心,免抗鼠 AQP-4 多克隆抗体为美国 Santa Cruze 产品,辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, RNA 提取试剂购自天根生化科技(北京)有限公司,逆转录试剂盒为日本 TAKARA 产品,一氧化氮检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 实验动物购入后适应性饲养 1 周,自由取食饮水。动物编号并按随机数字表平均分为空白对照组和模型组,每组 12 只。模型组大鼠置于自制的 80 cm×50 cm×50 cm 的熏烟室中,点燃市售某牌香烟 10 支进行熏烟,每次 50 分钟,每日 2 次,持续 30 日,熏烟间隔期间置正常环境饲养,自由采食、饮水。空白对照组不熏烟,置于正常无烟环境中饲养,自由采食、饮水。

1.2.2 取材 造模第 30 天,分别断头处死空白对照组和模型组大鼠,取出心肺。右肺上、中叶用 4%多聚甲醛固定,用于苏木素 - 伊红(HE)染色和免疫组织化学检测。取右肺下叶洗净血迹后立即置液氮中冻存,用于 AQP4 和 MUC5AC RT-PCR 检测。左主支气管插管,用 10ml PBS 进行支气管肺泡灌洗,回收灌洗液,1500 转 / 分离心 10 分钟,取上清液检测一氧化氮代谢产物。

1.2.3 肺组织 HE 染色及 AQP4 免疫组织化学染色 取固定后的肺组织按常规方法包埋、切片,进行 HE 染色。石蜡切片常规脱蜡、水化后微波抗原修复,3%H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭,滴加免抗鼠 AQP-4 多克隆抗体,置于 4℃ 冰箱过夜。次日复温后按 DAB 显色试剂盒说明加二抗、DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明,中性树胶封片。光学显微镜观察两组标本的组织病理变化和 AQP-4 蛋白的表达分布,每标本随机选取 3 张切片,每片随机选取 6 个视野,用 Qcapture 图像采集系统分别计算两组染色标本的平均光密度值。

1.2.4 肺组织内 AQP4 及 MUC5AC mRNA 的表达 取冷冻的肺组织约 100mg,按试剂盒说明用 Trizol 法提取肺组织总 RNA,紫外分光法测定 RNA 浓度。用 Oligo 6.71 软件设计并合成 AQP4、MUC5AC 和 β -actin 引物序列: AQP-4 上游: 5' CATCGGAGCTGGGATCCTCTA3', AQP-4 下游: 5' GAGCTC-CACGTCAGGACAGAA3', MUC5AC 上游: 5' ACTCTGTAC-

CAGCCT GGTGAC3', MUC5AC 下游: 5' ACAGTTGATCTTG-GGGCACTC3', β -actin 上游: 5' TGTGGCATCCATGAAACT-ACA3', β -actin 下游: 5' CCACCAATCCACACAGAGTAC3', β -actin 下游: 5' CCACCAATCCACACAGAGTAC3'。取 0.5 μ g 总 RNA,按试剂盒说明进行逆转录 PCR 扩增。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,测定 AQP-4 和 MUC5AC 扩增条带灰度值,以其与 β -actin 条带的灰度的比值作为表达水平的量化指标。

1.2.5 支气管肺泡灌洗液内一氧化氮代谢产物浓度测定 按一氧化氮试剂盒说明,硝酸还原酶法测定支气管肺泡灌洗液内一氧化氮代谢产物浓度。以 PBS 配制标准品, PBS 作阴性对照,每样品重复 3 次,按标准曲线计算各检测样本一氧化氮代谢产物的浓度。

1.2.6 统计学处理 各组数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS13.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。相关性分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色

空白对照组大鼠肺泡结构清晰,肺泡壁无增厚和破坏,腔内外无炎性细胞浸润。模型组大鼠肺泡壁结构紊乱,肺泡壁增厚并有大量炎性细胞浸润(图 1A,B)。

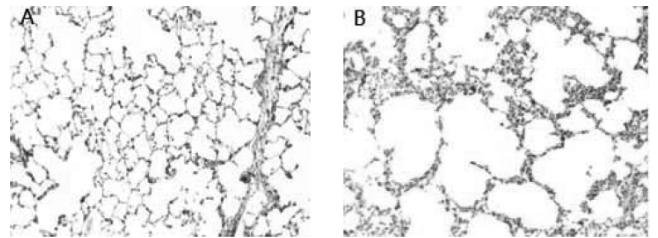


图 1 大鼠肺组织 HE 染色, $\times 100$ A: 空白对照组, B: 模型组

Fig.1 HE stain of rat lung tissue, $\times 100$. A: control group, B: model group

2.2 免疫组织化学染色

AQP4 表达于气道粘膜上皮细胞基底侧,空白对照组呈深棕褐色强阳性染色,模型组呈棕色阳性染色(图 2A,B),其平均光密度值分别为 35.39 ± 5.37 , 26.07 ± 4.35 , 两组均数差异具有显著性($P < 0.05$)。

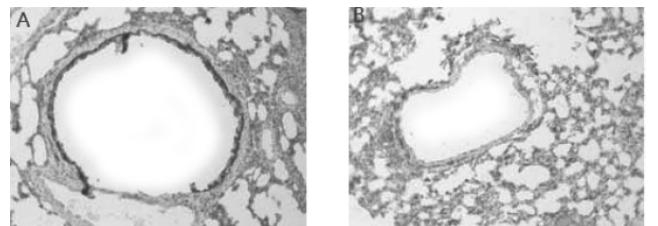


图 2 大鼠肺组织 AQP4 免疫组化染色, $\times 100$ 。 A: 空白对照组, B: 模型组

Fig.2 Immunohistochemical stain of AQP4 in rat lung tissue, $\times 100$.

A: control group, B: model group

2.3 AQP4、MUC5AC 特异性扩增产物琼脂糖凝胶电泳及条带分析

两组标本 AQP4、MUC5AC 特异性扩增产物凝胶电泳如(图 3A,B)所示。空白对照组与模型组 AQP4 与 β -actin 扩增产物条带灰度值的比值分别为 0.750 ± 0.111 , 0.420 ± 0.328 , 两均数的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

空白对照组与模型组 MUC5AC 与 β -actin 扩增产物条带灰度值的比值分别为 0.464 ± 0.093 , 0.800 ± 0.059 , 两均数的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

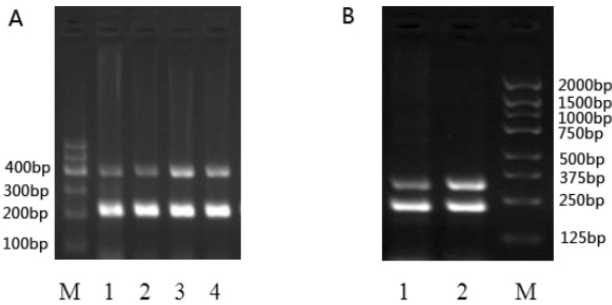


图 3 两组标本 AQP4、MUC5AC 扩增产物凝胶电泳。A. AQP4, 泳道 1、2 : 模型组; 泳道 3、4 : 空白对照组; M: marker。B. MUC5AC, 泳道 1 空白对照组; 泳道 2 模型组; M: marker

Fig.3 Gel electrophoresis of AQP4 and MUC5AC PCR products.

A. AQP4, Lane 1 and 2: model group; lane 3 and 4: control group;

M: marker. B. MUC5AC, lane 1: control group; lane 2: model group; M: marker

2.4 支气管肺泡灌洗液内一氧化氮代谢产物浓度与 AQP4、MUC5AC mRNA 表达水平的相关关系

两组支气管肺泡灌洗液标本一氧化氮代谢产物含量分别为 7.04 ± 1.50 , 18.52 ± 5.89 , 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

模型组动物支气管肺泡灌洗液标本一氧化氮代谢产物含量与 AQP4 特异性扩增产物条带的相对灰度值之间有显著的负相关关系, 相关系数 $r = -0.798$ ($P < 0.05$)。与 MUC5AC 扩增产物条带的相对灰度值之间有正相关关系, 相关系数 $r = 0.857$, ($P < 0.05$)。

3 讨论

AQP4 最早发现表达于肺部, 研究发现在中枢神经系统内表达十分广泛, 其在中枢神经系统内的分布具有明显的空间特征, 即高度集中分布于靠近蛛网膜下腔的胶质细胞、室管膜细胞以及血管周围的胶质细胞膜上, 且在细胞上的表达也是靠近脑脊液的一侧^[3]。Koyama Y 等发现 AQP4 在消化道粘膜表达于上皮细胞膜基底侧^[4]。在泪腺内的同样具有这种靠近基底膜的极化表达特性^[5]。这些研究认为, 这种靠近基底侧高度极化的分布特征对细胞或组织内水的外排起重要作用, 本实验研究发现 AQP4 在正常大鼠和烟雾吸入大鼠肺组织表达定位于气道粘膜上皮细胞基底侧, 这与 Carter 等的研究结论一致^[6]。AQP4 在肺组织内的空间分布恰是 COPD 病理变化最为显著、对肺脏功能影响最大的部位^[7]。本实验研究发现 AQP4 在烟雾吸入大鼠肺组织内的表达显著降低, 这一变化可能对粘膜表面水的跨膜转运和粘膜表面液层的保持有一定影响, 在 COPD 的发生发展过程中可能起重要作用。

水通道蛋白的表达受激素、pH 值、渗透压、细胞因子等一系列体液因素的调节^[8], 这些因素中有相当一部分与香烟烟雾所致肺部慢性炎症的病理过程相关, 例如促炎细胞因子可以下调 AQP 的表达^[9], 糖皮质激素则表现为上调^[10]。深入分析这些调控因素的机制可发现糖皮质激素受体、MAPK 途径、NF- κ B 都可能参与其基因表达^[10-12]。这些机制与 NO 参与炎症反应的机制有相当部分的重合^[13,14], 因此在香烟烟雾及其导致的肺部慢性炎症这一复杂的炎症性环境下 AQP4 的基因表达可能会由于这些因素的影响而变得不确定。本实验结果发现 AQP4 mRNA 在香烟烟雾吸入模型大鼠肺组织内的表达降低, 与免疫组化染色分析结果一致。NO 浓度与 AQP4 mRNA 的表达水平有显著的负相关关系。结合目前对香烟烟雾对肺部慢性致炎机制的认识, 可以推测本实验观察到 AQP4 mRNA 表达下调的可能机制, 例如香烟烟雾中的有害物质对糖皮质激素受体活性的影响是否参与了这种表达下调, 炎症因子及其诱导产生的转录因子是否参与其表达调控等。这些推测有待于今后进一步研究和探索。

高浓度 NO 对组织造成的损伤广泛且严重, 影响到细胞各方面正常功能的发挥, 其中对细胞膜的损伤可以导致膜上各类蛋白的失活、脱落, 对 DNA 的损伤可能影响蛋白基因的转录。本实验结果表明, NO 代谢产物浓度与 MUC5AC mRNA 的表达有显著的正相关关系。文献报道糖皮质激素可下调 MUC5AC mRNA 的表达^[15], 体外实验发现 NF- κ B 与 MUC5AC mRNA 表达的上调有关^[16], 而这两种因素均参与吸烟导致的肺部炎症的发生和发展, 其功能也受体内氧化-抗氧化平衡机制的调节^[17,18], 由此可以推测本实验所观察到的 NO 代谢产物浓度与 MUC5AC mRNA 表达水平的相关关系可能有 NO 的参与。尽管这个结果对我们有这样的提示, 但由于 NO 作用的广泛性以及基因表达调控机制的多样性, 今后还需寻找其参与 MUC5AC 基因表达调控的更直接的证据。

参考文献(References)

- [1] Nielsen S, King LS, Christensen BM, et al. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat[J]. Am J Physiol, 1997, 273: 1549-1561
- [2] Nakajima Y, Aoshiba K, Yasui S, et al. H₂O₂ induces apoptosis in bovine tracheal epithelial cells in vitro[J]. Life Sci, 1999, 64: 2489-2496
- [3] Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry MM, et al. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain [J]. J Neurosci, 1997, 17 (1): 171-180
- [4] Koyama Y, Amanoto T, Tani T, et al. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract[J]. Am J Physiol, 1999, 276(1): 621-627
- [5] Ishida N, Hirai SI, Mita S. Immunolocalization of aquaporin homologs in mouse lacrimal glands [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238(3): 891-895
- [6] Carter EP, Matthay MA, Farinas J, et al. Transalveolar osmotic and diffusional water permeability in intact mouse lung measured by an over surface fluorescence method[J]. Gen. Physiol, 1996, 108, 133-142
- [7] Kreda SM. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(3): 224-234

(下转第 2434 页)

学差异($P < 0.05$) ,术后皮肤质地好 ,关节功能好 ,仅见轻度瘢痕 ,未见溃烂等不良反应 ,具有较好的疗效 ,解决了自体皮肤来源有限的问题 ,且没有伦理学方面的问题 ,值得临床借鉴 ,但其愈合机制及远期疗效尚需进一步地观察研究。

参考文献(References)

- [1] 刘雄昊,戴国胜,冯劭,等.胎膜来源的间充质干细胞促进烧伤愈合的研究[J].现代生物医学进展, 2010, 10(9): 1618-1621
Liu Xiong-Hao, Dai Guo-Sheng, Feng Mai, et al. Acceleration of Burn Wound Healing by Mesenchymal Stem Cells from Fetal Membranes [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10(9):1618-1621
- [2] 蔡景龙. 现代瘢痕学 [M]. 北京 : 人民卫生出版社, 2008, 333-336.
Cai Jing-long. Modern Cicatrix [M]. Beijing: People's Medical Press, 2008, 333-336.
- [3] Sabry A, El-Din AB, El-Hadidy AM, et al. Markers of tubular and glomerular injury in predicting acute renal injury outcome in thermal burn patients: a prospective study [J]. Ren Fail, 2009, 31(6):457-63
- [4] Anlatıcı R, Ozerdem OR, Dalay C, et al. A retrospective analysis of 1083 Turkish patients with serious burns [J]. Burns, 2002, 28 (3):231-237
- [5] 贺斌, 赵柏程, 钱利. 烧伤合并急性肾功能衰竭的早期指标检测[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(22): 4333-4335
He Bin, Zhao Bai-Cheng, Qian Li. Early indicators of acute renal failure in burned patients [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10 (22):4333-4335
- [6] Perkins BA, Ficociello LH, Ostrander BE, et al. Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes [J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(4):1353-1361
- [7] Ge L, Zheng S, Wei H. Comparison of histological structure and biocompatibility between human acellular dermal matrix(ADM)and porcine

ADM [J]. Burns, 2009, 35(1): 46-50

- [8] Livesey SA, Hemdon DN, Hollyoak MA, et al. Transplanted acellular allograft dermal matrix Potential as a template for the reconstruction of viable dennis [J]. Transplantation, 1995, 60(1): 1-9
- [9] Li A, Dearman BL, Crompton KE , et al. Evaluation of a novel biodegradable polymer for the generation of a dermal matrix [J]. J Bum Care Res, 2009, 30(4): 717-728
- [10] Wain Wright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (Allo-Derm) in management of full-thickness [J]. Burns, 1995, 21 (4): 243-248
- [11] Scuderi N, Anniboletti T, Carlesimo B, et al. Clinical application of autologous three-cellular cultured skin substitutes based on esterified hyaluronic acid scaffold: our experience [J]. In Vivo, 2009, 23(6): 991-1003
- [12] Jiong C, Jiake C, Chunmao H, et al. Clinical application and long-term follow-up study of porcine acellular dermal matrix combined with autoskin grafting [J]. J Bum Care Res, 2010, 31(2): 280-285
- [13] Yannas, I.V., Studies on the biological activity of the dermal regeneration template[J]. Wound Repair Regen, 1998, 6(6): 518-523
- [14] V. Yannas., I., Tissue and organ regeneration [M]. New York, Springer, 2001: 219-242
- [15] 李智, 张宝林, 贾赤宇. 脱细胞异体真皮与自体微粒皮复合移植治疗深度烧伤愈合后皮肤质量观察 [J]. 中国美容医学, 2009, 18(6): 817-819
Li Zhi, Zhang Bao-lin, Jia Chi-yu. The observation of the quality after the wound healing of composite transplantation of acellular allo-dermis with auto-microskin on deep burn wound [J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2009, 18(6): 817-819

(上接第 2457 页)

- [8] 蒲春霞. 水通道蛋白研究进展 [J]. 成都大学学报 (自然科学版), 2010,29(2):104-106
PU Chun-xia. Research progress in aquaporins[J]. Journal Of Chengdu University(Natural Science Edition) , 2010, 29(2):104-106
- [9] Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276(22):18657-18664
- [10] Stoenoiu M, Ni J, Verkaeren C, et al. Corticosteroids induce expression of aquaporin-1 and increase transcellular water transport in rat peritoneum[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(3): 555-565
- [11] Umenishi FRW. Schrier, Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the activation of MAPK pathways and hypertonicity-responsive element in the AQP1 gene[J]. J Biol Chem, 2003. 78(18): 15765-15770
- [12] Hasler U, Leroy V, Jeon S, et al. NF- κ B modulates aquaporin-2 transcription in renal collecting duct principal cells [J]. J Biol Chem, 2008. 283(42): 28095-280105
- [13] Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and

reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12:64-76

- [14] Adcock IM, Brown CR, Kwon O. et al. Oxidative stress induces NF κ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994; 199: 1518-1524
- [15] Ichinose M. Differences of inflammatory mechanisms in asthma and COPD[J]. Allergol Int, 2009, 58(3): 307-13
- [16] Hewson. CA, Haas JJ, Bartlett NW, et al. Rhinovirus induces MUC5-AC in a human infection model and in vitro via NF- κ B and EGFR pathways[J]. Eur Respir J, 2010. 36(6): 1425-1435
- [17] Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases[J]. Thorax, 1998, 53:601-612
- [18] Wang HC, Zentner MD, Deng HT. Oxidative stress disrupts glucocorticoid hormone-dependent transcription of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel α -subunit in lung epithelial cells through ERK-dependent and thioredoxin-sensitive pathways[J]. J Biol Chem, 2000. 275(12): 8600-8609