

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0253-05

层黏连蛋白受体反义核酸对卵巢癌细胞侵袭能力的影响

李晓翠¹, 傅艺冰², 王 斌¹, 王希芝¹, 傅庆诏¹, 张向宁¹(1. 山东大学齐鲁医院妇产科, 济南 250012; 2. 山东大学省立医院妇产科, 济南 250012)

[摘 要] 目的: 研究 67 kD 层黏连蛋白受体(67kD LN-R)反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)对卵巢癌细胞 HRA 体外侵袭转移能力的影响。方法: 采用流式细胞仪、RT-PCR 及 Transwell 小室的方法检测反义核酸对 67 kD LN-R 基因和蛋白表达影响, 及转染前后细胞体外侵袭转移能力变化。结果: 67 kD LN-R ASODN 可从蛋白质和 mRNA 水平下调 67 kD LN-R 的表达, 且下调作用呈剂量依赖性。与正义组及对照组相比差异有显著性($P < 0.05$)。体外侵袭实验证实转染后 HRA 穿透人工基底膜的能力显著降低并呈现剂量依赖性。结论: 67 kD LN-R ASODN 可降卵巢癌细胞体外侵袭转移能力, 有望为卵巢癌治疗提供新方向。

[关键词] 层黏连蛋白受体; 反义寡核苷酸; 卵巢癌; 基因治疗

[中图分类号] R737.31 [文献标识码] A

The Inhibitory Effect of 67 kD LN-R Antisense Oligonucleotides on Invasion and Metastasis of Ovarian Carcinoma Cells

LI Xiao-cui¹, FU Yi-bing², WANG Bin¹, WANG Xi-zhi¹, FU Qing-zhao¹, ZHANG Xiang-ning¹(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Ji'nan, 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of 67 kD laminin receptor antisense oligonucleotides (67kD LN-R ASODN) on the invasion and metastasis abilities of ovarian carcinoma cell line HRA. **Methods:** The ASODN of 67 kD laminin receptor and its control, sense oligonucleotides (SODN) were synthesized and transfected into the target cells. RT-PCR and FCM methods were performed to evaluate the 67 kD LN-R gene and protein expression levels to identify the efficiency of ASODN. The invasiveness of transfected cells was measured quantitatively by matrigel invasion assays (transwell chamber). **Results:** The 67 kD LN-R gene and protein expression and invasiveness of HRA cells treated with ASODN of different final concentration were significantly decreased compared with that transfected with SODN and the controls($P < 0.05$). **Conclusion:** 67 kD LN-R ASODN has a significant inhibitory effect on the invasiveness of human ovarian carcinoma cell line HRA in a dose-dependent manner. It may become a new gene therapeutic agent for ovarian carcinoma.

[Key words] laminin receptor; antisense oligonucleotides (ASODN); ovarian carcinoma; gene therapy

卵巢癌由于其早期发生侵袭转移的特性, 就诊时 2/3 已属晚期, 多见有腹水及盆腹腔广泛的种植转移, 病死率居妇科恶性肿瘤首位。近年, 在肿瘤侵袭转移研究中发现层黏连蛋白(Laminin, LN)与分子量为 67 kD 的层黏连蛋白受体(67 kD laminin receptor, 67 kD LN-R)的相互作用是肿瘤实现侵袭、转移的关键步骤。已有研究表明卵巢癌组织中 67 kD LN-R 蛋白表达和 mRNA 含量均增加并与卵巢肿瘤分期分级明显相关, 且腹水患者阳性表达率明显高于阴性者, 检测其表达

情况可作为预测肿瘤转移及判断预后的可靠指标^[1-2]。提示 67 kD LN-R 与卵巢癌侵袭转移具有相关性, 但具体机制不清。本研究运用 67 kD LN-R 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASODN)抑制其在卵巢癌细

[基金项目] 山东省科技厅 2004 年度国际科技合作计划资助课题

[作者简介] 李晓翠(1977), 女, 山东烟台人, 博士研究生, 主要从事妇科肿瘤的研究

[通讯作者] 张向宁, E-mail: sisi1113@163.com

胞 HRA 的表达,探讨 67 kD LN-R ASODN 对卵巢癌细胞 HRA 体外侵袭转移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人卵巢癌细胞株 HRA 由日本国防医科大学馈赠,由山东大学齐鲁医院肿瘤中心实验室冻存。脂质体 (Lipofect-2000, LF) 购自美国 Invitrogen 公司, RNA 提取试剂盒为 MBI 公司产品, RT-PCR 试剂盒为上海生工生物技术公司产品, LN-R 基因 PCR 扩增引物引物序列为: P1 5'-ACGGATCCTCTCACGGAGGCAT CT-3', P2 5'-ACAAGCTTCAGTGGCCTGAGCACT-3', 内参 β -actin 引物为 P1 5'-ACCACAGCTGAGAGGGAAATC-3' P2 5'-AGAGTCCCTTACGGATCAACG-3', 67 kD LN-R ASODN 序列为 5'-GGCTCCGGACATTGTGAA-3', SODN 序列为: 5'-TTCACAATGTCCGGAGCC-3', 均由上海生物工程公司合成, 67 kD LN-R 鼠抗人抗体、免疫组化试剂盒购自福建迈新, Transwell 细胞培养小室及人工基底膜胶 (Matrigel) 为美国 BD 公司产品。

1.2 细胞培养

HRA 细胞置于含 10% 新生牛血清, 1×10^5 IU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 于 37°C、5% 二氧化碳培养箱中常规培养, 隔天传代。

1.3 脂质体包裹寡核苷酸片段转染靶细胞

待 HRA 细胞生长至对数生长期且融合 80% ~ 90%, 吸去培养液, 无血清 OptiMEM (sigma) 培养基洗 1 次, 将无血清培养基稀释的 6% 脂质体 Lipofect-2000 和等体积 ASODN 混和 45 min 后转染 HRA 细胞, 使 ASODN 终浓度为 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。以 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ SODN 及空白转染作为对照。具体步骤按照 Lipofect-2000 说明书进行操作。

1.4 RT-PCR 检测转染前后 HRA 67 kD LN-R mRNA 表达量

分别收集转染 3 种浓度 ASODN、SODN 及对照组 10^6 个细胞, 提取总 RNA。RT-PCR 按照试剂盒说明书分两步进行: (1) 合成 cDNA, 短暂离心混匀, 37°C 反应 30 min, 95°C 放置 10 min 灭活 AMV 逆转录酶, 冰浴 5 min。(2) 将 20 μl RT 产物加入 PCR 反应体系共 80 μl 混匀, 短暂离心。于下列条件下进行 PCR 扩增: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min。取 10 μl PCR 产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 运用凝胶分析系统进行分析。用以下公式计算相对抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}}/A_{\text{内参}}}{A_{\text{O样品}}/A_{\text{O内参}}}\right) \times 100\%$$

1.5 流式细胞术检测转染前后 HRA 67 kD LN-R 蛋白

表达量

依上述方法分别将 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 ASODN 转入 HRA 细胞, 转染成功后以胰酶消化收集细胞数为 1×10^6 。67 kD LN-R 单克隆抗体 (一抗) 加入含待测细胞管内 (抗体浓度为 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 于 4°C 避光反应 30 min 离心, PBS 洗 2 遍, 然后离心去上清液加入 200 μl FITC 标记的羊抗鼠二抗, 其稀释度为 1:50, 于 4°C 避光反应 30 min 离心、PBS 洗 2 遍。最后重悬于 500 μl PBS 中, 全部结果由计算机得出。阴性对照管不加一抗, 其余步骤相同。

1.6 转染前后细胞侵袭能力检测

1.6.1 趋化因子的制备

取对数生长期的 NIH3T3 细胞, 用无血清的 DMEM 培养液冲洗 2 遍后, 更换无血清培养液, 继续培养 24 h 后, 收集其上清液, 离心过滤去除细胞成分后 -20°C 保存备用。

1.6.2 Transwell 小室法检测细胞体外侵袭力

在 Transwell 小室聚碳酸酯微孔滤膜上包被人工基底膜胶 (matrigel, 每孔 50 μg) 置于 37°C 培养箱中聚合 1 h, 在下室加入 600 μl 趋化因子, 在上室接种不同处理组 HRA 细胞 ($5 \times 10^5/\text{ml}$) 100 μl , 置 37°C, 5% CO_2 培养箱中培养 20 h 后取出, 用棉签仔细擦掉位于膜内表面的未穿过膜的细胞, 将滤膜用甲醇固定 1 min, Giemsa 染色 2 ~ 4 min, 水洗, 二甲苯透明, 封片, 于 200 倍显微镜下每膜计数上下左右中 5 个视野的侵袭细胞数, 每组设 5 个滤膜, 计算平均值。以侵袭细胞相对数目表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.7 统计学处理

统计学方法采用 *t* 检验, 由 SPSS10.0 统计软件完成, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般形态学结果

转染 ASODN, SODN 后均出现部分细胞变圆、脱离瓶壁甚至凋亡, 且随着转染浓度增加更加明显。而 48 h 更换培养液后细胞生长逐渐恢复 (图 1)。

2.2 转染前后 HRA 67 kD LN-R mRNA 表达的变化

正常情况下 RT-PCR 能够扩增出 281 bp 的 β -action DNA 片段和 474 bp 的 67 kD LN-R 基因片段^[4]。对照组与转染 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ HRA 细胞的 67 kD LN-R mRNA 均呈高表达, 差异无显著性, 而随着反义寡核苷酸浓度的增加, 67 kD LN-R mRNA 的抑制率也随之升高。当浓度达到 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时抑制率达 95.5%。结果表明 ASODN 可有效抑制 67 kD LN-R mRNA 的表达并呈现较好的剂量依赖关系 (图 2, 3)。

图1 转染前后 HRA 一般形态学结果(×100)

Fig. 1 The morphological changes of HRA after transfection(×100)

A: Control group; B: 0.4 μg/μl ASODN; C: 0.08 μg/μl ASODN; D: 48 h after ending transfection

过滤膜的细胞数差别不明显,透膜细胞数分别为 68.5 ± 8.5 和 67.3 ± 7.8 ,转染 0.02, 0.04, 0.08 μg/μl 的 ASODN 后;穿透滤膜细胞数分别为 50.3 ± 7.0 , 36.4 ± 6.5 , 29.6 ± 5.3 ,统计分析各组间差别有显著性意义($P < 0.05$)。这说明 67 kD LN-R ASODN 可以降低 HRA 细胞的侵袭力,且呈现剂量依赖性。

图2 RT-PCR 检测转染前后 HRA 细胞 67 kD LN-R mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of 67 kD LN-R mRNA detected by RT-PCR assay

1: 0.08 μg/μl ASODN; 2: 0.04 μg/μl ASODN; 3: 0.02 μg/μl ASODN; 4: 0.04 μg/μl SODN; 5: Control group; M: Marker;

图3 转染后 67 kD LN-R mRNA 的抑制率

Fig. 3 The inhibition rate of 67 kD LN-R mRNA after transfected with SODN and ASODN

2.3 转染前后蛋白表达的变化

流式细胞术结果显示,转染 3 种浓度 ASODN 后 67 kD LN-R 的蛋白表达量亦呈下降趋势,且出现剂量依赖性。而 0.02 μg/μl ASODN 对蛋白的抑制明显大于对 mRNA 的抑制,分析寡核苷酸的抑制作用主要体现在蛋白水平(图 4)。

2.4 TRANSWELL 小室法检测转染前后 HRA 侵袭力的变化

转染 3 种浓度 ASODN 与转染 SODN 及对照组 HRA 细胞相比,各组均有不同数量的细胞可以穿透有 Matrigel 胶的滤膜,其中正常对照细胞组和 SODN 组穿

3 讨论

LN 与 LN-R 结合后诱导分泌 IV 型胶原酶在内的蛋白水解酶,从而促进基底膜的降解,导致肿瘤细胞的黏着和侵袭、转移是诸多肿瘤侵袭转移机制中较明确的一种。迄今已知有 15 种 LN-R,按结构可分为整合素家族和非整合素家族两大类。67 kD LN-R 属于非整合素类,是迄今研究最多的一种。Saton 等^[3]通过 67 kD 层黏连蛋白受体前体(37LBP)反义寡核苷酸转染小鼠肺癌细胞,得到稳定的 37LBP 低表达细胞株,并发现该细胞株生长缓慢,诱导血管生成能力下降,发生凋亡细

胞数增多。67 kD 层黏连蛋白受体在肿瘤转移中的作用亦为体外相关抗肿瘤转移实验所证实^[4]。

图4 转染前后卵巢癌细胞 HRA 67 kD LN-R 的蛋白表达

Fig. 4 The protein expression of 67 kD LN-R in HRA

A: Control HRA; B: 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ASODN-transfected HRA;
C: 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ASODN-transfected HRA; D: 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ASODN-transfected HRA

反义基因治疗作为一种可特异性阻断或调节致病基因表达的技术手段,20 余年来不断发展、完善,在多学科疾病的治疗方面显示了广阔的发展前景^[5]。为研究 67 kD LN-R 在卵巢癌侵袭转移中的作用机制,本研究以 67 kD LN-R 基因为靶,检索 GENE BANK 数据库获得 67 kD LN-R 的基因序列,设计互补于起始密码区及其下游 18 个核苷酸序列,并核实无其它与此重复序列。经全硫代修饰后,以阳离子脂质体(Lipofect-2000, LF)作为载体,进行转染。半定量 RT-PCR 结果显示对照组与正义寡核苷酸组 HRA 细胞 67 kD LN-R mRNA 表达量无明显差别;而转染 ASODN 组 67 kD LN-R 的 mRNA 表达随 ASODN 的浓度而受到不同程度的抑制,当 ASODN 达 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时几乎无表达。流式细胞术检测处理前后受体的表达情况,不仅证实了这一趋势,而且量化了这一封闭效果,更直观的看出 ASODN 的有效性,即其在 mRNA 和蛋白质水平均可下调 67 kD LN-R 的表达,且下调效果呈现 ASODN 浓度剂量依赖性。

体外侵袭的研究方法主要有单层细胞侵袭试验、培养细胞的三维球体侵袭试验、器官培养、人工基底膜侵袭试验等。其中人工基底膜试验具有操作简单、方便、快捷等优点,现在已成为国内外应用最为广泛的体外侵袭模型。目前人工基底膜侵袭试验所用的侵袭小室多参照 Albini 的 Boyden 小室^[6],主要是将基底膜胶铺在聚碳酸酯微孔滤膜上,制成与天然基底膜结构相似人工基底膜。本实验应用的 Transwell 小室是一种改良的 Boyden 小室,此模型所用的基底膜胶(Matrigel)是从小鼠 EHS 肉瘤中提取的基质成份,含有 LN、IV 型胶原、接触蛋白和硫酸肝素多糖,铺在聚碳酸酯微

孔滤膜上,能在细胞培养基中重建形成类似基底膜的结构。Albini 等^[6]观察到正常细胞不能穿过这种基底膜,而肿瘤细胞穿过重组基底膜的能力与其体内侵袭力表现出较好的相关性,可以用来研究体外细胞的侵袭能力。Pinkas 等^[7]利用改良 Boyden 小室测定鼠的乳腺上皮细胞 EpH4 的运动能力和侵袭力也取得满意效果。本研究采用小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞无血清培养 24 h 的上清做为趋化因子置于 Boyden 小室下室,对上室的肿瘤起到趋化作用。在转染 0.02、0.04、0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 ASODN 后,HRA 穿透滤膜细胞数逐渐减少,而对照组与 SODN 组之间无显著差异。提示 67 kD 层黏连蛋白受体 ASODN 可以降低 HRA 细胞的侵袭力,且呈现剂量依赖性。与之前转染效应检测结果结合可以推断下调 67 kD LN-R 的表达可以降低卵巢癌细胞体外侵袭力,可为抑制卵巢癌侵袭转移提供新的靶点。

反义技术是继基因克隆和重组技术后分子生物学领域的一种全新的技术。利用这一技术所研制的药物称为反义药物,通常是指反义寡核苷酸(ASODN)。经过 20 多年的研究,反义治疗已在病毒性疾病、寄生虫感染、遗传性疾病尤其是恶性肿瘤的诊治方面显示出广阔的前景^[8]。目前已有多种反义药物进入了 II/III 期临床试验,在美国反义基因治疗白血病已进入 II 期临床^[9-10]。但 ASODN 自身的稳定性、给药途径及与非靶 DNA 或 mRNA 杂交而出现对机体毒副作用等问题尚未最终解决,相信随着对 mRNA 结构研究的深入、生物芯片技术的发展及多种药物靶向转运系统的应用,反义药物在卵巢癌治疗的应用前景也会更加广阔。

[参考文献]

- [1] Appierto V, Cavadini E, Pergolizzi R, *et al.* Decrease in drug accumulation and in tumor aggressiveness marker expression in a fenretinide-induced resistant ovarian tumor cell line [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84 (11): 1528-1534.
- [2] 龙娟, 陈刚, 吴明富, 等. 层黏连蛋白及其受体在卵巢癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *中华妇产科杂志*, 2003, 38 (12): 763-764.
- [3] Satoh K, Narumi K, Abe T, *et al.* Diminution of 37-kDa laminin binding protein expression reduces tumor formation of murine lung cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80 (8): 1115-1122.
- [4] Ardini E, Sporchia B, Pollegioni L, *et al.* Identification of a novel function for 67kDa laminin receptor: Increase in laminin degradation rate and release of motility fragments [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (5): 1321-1325.
- [5] Yildiz D, Oztas H, Hilal Ates B. Antisense oligonucleotides and prevention of tumor growth: A different approach and proposal for a new method [J]. *Med Hypotheses*, 2005, 64 (2): 328-332.
- [6] Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, *et al.* A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1987, 47 (12): 3239-3245.
- [7] Pinkas J, Leder P. MEK1 signaling mediates transformation and metastasis of EpH4 mammary epithelial cells independent of an epithelial to mesenchymal transition [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (16): 4781-4790.
- [8] Sommer W, Heilig M. Antisense oligonucleotides are clinically tested. They inhibit the expression of disease-related genes [J]. *Lakartidningen*, 1999, 96 (4): 348-354.
- [9] Tamm I, Dorken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology: New hope for an old idea [J]. *Lancet* 2001, 358 (9280): 489-497.
- [10] Grooke ST. Antisense strategies [J]. *Curr Mol Med*, 2004, 4 (5): 465-487.

[收稿日期] 2005 - 07 - 26

[修回日期] 2005 - 08 - 30

[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

IL-4 诱导小鼠 pDC 产生 IFN- γ

DC 是骨髓来源白细胞的一个迁移群,鼠的脾脏中至少有 3 个 DC 亚型:CD8⁺ DC, CD11b⁺ DC 和 B220⁺ DC (pDC)。其中 pDC 是未成熟 DC, 抗原提呈功能很弱, 但病毒或细菌感染时分泌大量 I 型干扰素, 因此在天然免疫中发挥重要的作用。研究表明天然免疫反应影响 Th 分化, 本文阐述了经典 Th2 型细胞因子 IL-4 诱导小鼠 B220⁺ pDC 产生经典 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的独特作用及可能机制。

实验发现 IL-4 能够刺激小鼠脾脏的一群细胞产生 IFN- γ , 表型分析此细胞群为 pDC (B220^{high}CD11^{clow}DX5⁻CD19⁻CD3⁻CD11b⁻)。IL-4 分别刺激 CD8⁺ DC, CD11b⁺ DC 和 pDC, ELISA 结果显示仅 pDC 分泌较高水平的 IFN- γ (>600 pg/ml), 而其他细胞并不产生 IFN- γ 。rIL-4 静脉注射 Rag2^{-/-} 小鼠, 24, 48 h 后血清中可测得 IFN- γ , 用抗 Ly6G/C 去除了 pDC 后, 则 IFN- γ 产量明显下降。病毒或细菌感染时可刺激 pDC 分泌 IFN- α 和 IL-12, 但 IL-4 不能刺激 pDC 产生 IFN- α 和 IL-12。FACS 分析, IL-4 不改变 pDC 表面分子的表达水平 (I-Ad 低水平, CD80⁻), 不影响 pDC 的成熟过程。

实验进一步发现, IL-4 分别刺激 Stat6^{-/-} 与野生型小鼠 pDC, 结果显示 Stat6^{-/-} pDC 不产生 IFN- γ , 野生型 pDC 产生 IFN- γ 的量与 CpG ODN (阳性对照) 刺激 2 组 pDC 产生 IFN- γ 的量相当 (650 ~ 700 pg/ml), 证明 IL-4 通过 Stat6 依赖机制诱导 pDC 分泌 IFN- γ 。流式细胞仪分析 Stat6^{-/-} 小鼠与野生型小鼠 pDC (CD19⁻ B220⁺ CD11^{clow} 细胞) 数量相当 (WT0. 38% , Stat6^{-/-} 0. 39%), 即 Stat6 不影响 pDC 发育。RT-PCR 分析 IL-4 刺激前后 pDC 提高了 Stat4 mRNA 表达水平。胞内染色显示, IL-4 诱导 ~ 50% 野生型 pDC 表达 Stat4 但不能诱导 Stat6^{-/-} pDC 表达 Stat4, 而产生 IFN- γ 的 pDC 均表达 Stat4。ELISA 结果显示 IL-4 不能刺激 Stat4^{-/-} pDC 产生 IFN- γ 。表明 IL-4-Stat6 信号途径诱导 pDC 表达 Stat4, 并产生 IFN- γ 。T-bet 是 Th1 分泌 IFN- γ 过程中的重要信号分子, GATA3 是 IFN- γ 的重要负调节因子, 但 R-PCR 检测 IL-4 刺激前后 pDC 中 T-bet mRNA 和 GATA3 mRNA 的水平, 显示 IL-4 不影响二者的表达, 即 T-bet 不参与 IL-4 诱导 pDC 分泌 IFN- γ 。单独和联合应用抗 IL-12 (p70)、IL-2R β 链、IL-18 的阻断抗体, 及抗 I 类 IFN 的混和抗体, 均不能阻断 IFN- γ 的产生, 表明 pDC 内源性细胞因子不参与此过程。

综上所述, 经典 Th2 细胞因子 IL-4 通过 Stat6 依赖途径诱导 pDC 表达 Stat4, 并产生经典 Th1 细胞因子 IFN- γ , 此过程可能执行着对 Th2 的负反馈调节功能。对其生理学的研究将开创细胞因子网络中 pDC 介导免疫调节的新思路。

[李丽 摘译 刘书逊审阅 Suto, A., *et al.*, *J Immunol*, 2005, 175: 5681 - 5689]