

【实验研究】

卢建民 张珍珍 郑玥 马翔 秦秀虹

也开始融合呈铺路石样,单层生长,铺满瓶底,并可见接触抑制现象。成功构建 PARP-EGFP 的基因 呈瘤性并增殖较明显。PARP-1 和 NEK-R 是相互作用的蛋白质,高糖组 NEK-R

显微镜结果显示 PARP 和 NF- κ B 均表达于正常的人 RVEC 的细胞核和核周区域,当受到高浓度葡萄糖影响后,PARP-1 和 NF- κ B 均集中表达于细胞核内,尤以 NF- κ B 最显著。结论 PARP-1 和 NF- κ B 是相互作用的蛋白质,血糖增高时,PARP-1 可能进入细胞核内并结合同时进入细胞核的 NF- κ B,激活 NF- κ B 信号通路,引起 RVEC 凋亡,导致 DR 的发生。

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病主要并发症之一,常引起视力下降,最终可导致失明^[1]。血糖增高是导致 DR 病理变化的直接原因^[2],血糖升高引起的视网膜病变血管紊乱以异常血流、血管渗透性增加及毛细血管的低灌注或无灌注为主要特征,并主要与高糖引起的视网膜各细胞的凋亡有关^[3]。多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1[poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase-1, PARP-1]是一类存在于多数真核细胞中的蛋白质翻译后修饰酶,被认为与 DR 的病理过程密切相关^[4]。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种多向性核转录调节因子,能调节许多靶基因的表达,参与了感染、炎症、免疫反应、细胞凋亡和肿瘤等病理过程以及细胞周期调控与细胞分化等^[5]。研究表明 PARP-1 和 NF- κ B 信号通路参与了 DR 病理过程的发生,引起细胞凋亡^[6]。Hassa 等^[7]发现,高糖会增加细胞 NF- κ B 活性,但在 PARP-1 活性被抑制的细胞中 NF- κ B 表达下降。本实验对人视网膜血管内皮细胞(retinal vascular endothelial cells, RVEC)进行高糖培养,并体外构建 PARP-EGFP 及 Flag-NF- κ B 质粒,转染高糖人 RVEC,应用免疫共沉淀及激光共聚焦显微镜法探讨 PARP-1 和 NF- κ B 的相互作用和作用部位及机制,为进一步研究 DR 的发生机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料 人 RVEC(美国 Sciencell 实验室), HEK293T 细胞(同济大学医学院干细胞实验室,上海), pFlag-CMV(美国 Sigma 公司), pEGFP-C1(美国 Clontech 公司), Anti-PARP 抗体(CABT-30420MH), Anti-NF- κ B 抗体(MAB3026), Rhodamine 荧光标记二抗、羊抗鼠二抗(美国 Santa 公司);胎牛血清、L-DMEM 培养基(Hyclone 公司),青链霉素(上海索莱宝生物有限公司),磷酸钙转染试剂盒(北京迈晨科技有限公司),RNA 提取试剂盒、DL2000 DNA marker、RT-PCR 试剂盒(北京天根生化科技有限公司), PIPA 裂解液(美国 Sigma 公司), PVDF 转印膜、Bradford 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司), ECL 试剂盒(美国 Invitrogen 公司), DAB 显色试剂盒(北京天根生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 RVEC 及 HEK293T 细胞的传代与培养

取冻存的人 RVEC,复苏后培养于含体积分数 10% 胎牛血清、 100×10^3 U \cdot L⁻¹ 青链霉素的 L-DMEM 培养基中,2~3 d 换液 1 次。人 RVEC 为贴壁细胞,细胞密度达到 50% 时可进行传代。超净台内,倒掉人 RVEC 的培养基, PBS 漂洗 1 次,加入 4

mL 胰蛋白酶,2 min;终止消化后细胞悬液移至 15 mL 离心管中, $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清;加入 10 mL 新鲜 L-DMEM 混匀细胞,并分别均匀地加入到 5 个细胞培养瓶中,每个培养瓶含 10 mL 新鲜培养基,放入含体积分数 5% CO₂、37℃ 的 CO₂ 培养箱中继续培养,2~3 d 换液 1 次,每天观察细胞密度,细胞融合度不应超过 50%。高糖培养的人 RVEC 葡萄糖浓度为 30 mmol \cdot L⁻¹。HEK293T 细胞的传代与培养同人 RVEC。

1.2.2 PARP-EGFP 及 Flag-NF- κ B 质粒构建、转染及鉴定 应用 RNA 提取试剂盒提取 HEK293T 细胞总 RNA, -80℃ 保存。设计并合成引物, PARP-1 引物: 5'-AGATCTGCGGAGTCTTCGGATAAGCTC-3'; 5'-GAATTCTTACCACAGGGAGGTCTTAAA-3'; NF- κ B 引物: 5'-AAGCTTGCAGAAGATGATCCA-TATT-3'; 5'-AGATCTCTAAATTTGCCTTCTAGA-3' (上海生工生物工程有限公司)。应用 RT-PCR 试剂盒进行扩增反应,将目的基因与载体 pFlag-CMV、pEGFP-C1 酶切后分别进行连接、转化及酶切鉴定。应用磷酸钙转染试剂盒将 PARP-EGFP 质粒和 Flag-NF- κ B 质粒转染人 RVEC, Western blot 法检测重组质粒目的基因的表达。

1.2.3 Western blot 及免疫共沉淀方法检测高糖人 RVEC 中 NF- κ B 与 PARP-1 相互作用 提取人 RVEC 细胞总蛋白,测定蛋白浓度后 -80℃ 保存。将实验组样品调整浓度后,加上样缓冲液进行 SDS 凝胶电泳,电泳后进行转膜 1.5 h。转膜完毕后,用 TBS 室温洗膜 5 min,然后用 30 g \cdot L⁻¹ BSA 封闭过夜。一抗室温孵育 2 h 后, TBST 洗 3 次,每次 10 min。二抗室温孵育 1 h 后, TBST 洗 3 次,每次 10 min,最后进行 ECL 显色。每组实验分别重复 3 次。免疫共沉淀法立即将提取的细胞总蛋白与 protein A-Sepharose 孵育 1 h, 4℃;加入一抗孵育, 4℃ 过夜,形成的免疫复合物经过处理后进行 SDS 凝胶电泳。

1.2.4 激光共聚焦扫描显微镜观察 PARP-1 和 NF- κ B 在高糖人 RVEC 的表达变化 取培养的人 RVEC,分为对照组及高糖组(葡萄糖浓度为 30 mmol \cdot L⁻¹),当细胞融合度达到 70%~80% 时,应用磷酸钙转染试剂盒进行 PARP-EGFP 及 Flag-NF- κ B 质粒转染。40 g \cdot L⁻¹ 多聚甲醛固定细胞,山羊血清封闭 1 h,加入 Anti-NF- κ B 抗体(1:1000)孵育 2 h,再加入罗丹明标记的二抗(1:5000)孵育 1 h。最后 DAPI 染核,并在激光共聚焦扫描显微镜下观察。

2 结果

2.1 人 RVEC 的形态学特点 倒置相差显微镜下

观察,人 RVEC 复苏后 24 h 贴壁,细胞呈扁平梭形,3 d 左右细胞开始融合呈铺路石样,单层生长,铺满瓶底,并可见接触抑制现象。

2.2 PARP-EGFP、Flag-NF-κB 质粒构建酶切鉴定

PARP-EGFP、Flag-NF-κB 质粒构建后酶切鉴定见图 1。PARP-EGFP 质粒经 EcoRI 及 Bgl II 双酶切后,凝胶电泳可见大小约 3054 bp 的片段,符合 PCR 产物条带大小;Flag-NF-κB 质粒经 Hind III 及 Bgl II 双酶切后,凝胶电泳可见大小约 2916 bp 的片段,符合 PCR 产物条带大小。

Figure 1 Electrophoresis map after PARP-EGFP and Flag-NF-κB plasmid digestion (DNA marker was DL2000) PARP-EGFP 及 Flag-NF-κB 质粒酶切后电泳检测图(DNA marker 为 DL2000)

2.3 PARP-GFP 质粒转染结果 将带 GFP 的空质粒和 PARP-EGFP 质粒转染人 RVEC,对照组和 PARP-EGFP 质粒转染组细胞在荧光显微镜下均出现明亮的绿色荧光,表明转染成功(图 2);Flag-NF-κB 由于没有 GFP 标记,则以带 GFP 的空质粒为对照来判定 Flag-NF-κB 质粒转染结果。

Figure 2 PARP-EGFP plasmid was transfected into human RVEC PARP-EGFP 质粒转染人 RVEC

2.4 PARP-EGFP 和 Flag-NF-κB 质粒功能鉴定

分别将对照组空质粒、PARP-EGFP 和 Flag-NF-κB 质粒转染人 RVEC,检测重组质粒表达目的基因的效果,结果显示:PARP-EGFP 和 Flag-NF-κB 质粒转染组其 PARP-1 和 NF-κB 表达量比相应对照组显著增加(图 3),说明重组质粒能有效上调目的基因的表达。

2.5 免疫共沉淀法检测高糖人 RVEC 中 NF-κB 与 PARP-1 相互作用 为了研究高糖情况下 PARP-1 是否与 NF-κB 具有相互作用,应用 IgG 做阴性对照,免疫共沉淀结果显示:高糖组 NF-κB p50 的条带比

正常对照组明显增粗,说明 PARP 与 NF-κB 是相互作用的蛋白质,且高糖培养的人 RVEC 中与 PARP-1 结合的 NF-κB 量显著增加(图 4)。

Figure 3 Expression of target gene of recombinant plasmid was detected by Western blot. A: PARP-EGFP plasmid; B: Flag-NF-κB plasmid Western blot 法检测重组质粒目的基因的表达式。A: PARP-EGFP 质粒;B:Flag-NF-κB 质粒

Figure 4 Interaction of PARP-1 and NF-κB in high-glucose-cultured human RVEC was examined by co-immunoprecipitation method 免疫共沉淀法检测高糖人 RVEC 中 NF-κB 与 PARP-1 相互作用

2.6 激光共聚焦扫描显微镜观察结果 PARP-EGFP 和 Flag-NF-κB 质粒共转染人 RVEC,正常组 PARP-1 和 NF-κB p50 蛋白在细胞核和细胞质均有表达,融合后可见青色为二者共同表达区域。高糖组 PARP-1 和 NF-κB p50 蛋白基本表达于细胞核,融合后可见青色为二者共同表达区域,均位于细胞核,说明高糖时 PARP-1 和 NF-κB p50 表达从核周转入到核内(图 5)。

3 讨论

DR 是糖尿病的晚期眼部并发症,是目前主要的致盲眼病之一,是一种微血管病变,随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变,我国糖尿病的患病率日益增高,DR 的发病几率也明显增加,其发病率随年龄增长和糖尿病病程延长而增加。其发病机制包括氧化应激、糖基化终末产物形成、多元醇途径亢进、蛋白激酶 C 激活、多种生长因子的过量表达等^[1],并且许多信号通路被认为参与了 DR 的发生,

Figure 5 Location changes of PARP and NF- κ B p50 in high-glucose-cultured human RVEC were tested under confocal laser scanning microscope after co-transfection of EGFP-PARP and Flag-NF- κ B p50 plasmid 激光共聚焦扫描显微镜检测 EGFP-PARP 及 Flag-NF- κ B p50 共转染不同细胞后 PARP 及 NF- κ B p50 在人 RVEC 表达位置的变化

包括 PARP-1 和 NF- κ B 信号通路等。PARP-1 是一类存在于多数真核细胞中的蛋白质翻译后修饰酶,参与 DNA 的损伤修复^[8]。NF- κ B 是普遍存在于细胞浆中以 p50/p65 异二聚体为形式的一种多向性核转录调节因子,与 NF- κ B 的抑制性蛋白结合而呈非活性状态,在调控细胞增殖、分化和凋亡方面具有重要作用^[9],二者均被认为参与了 DR 的病理过程^[6]。研究发现,在 STZ 诱导 12 周大鼠的视网膜神经节细胞层、内核层、外核层及视网膜血管的内皮细胞及周细胞的细胞核内均有 PARP-1 的高表达^[10]。Zheng 等^[6]通过糖尿病大鼠模型的体内实验以及体外高糖培养牛视网膜内皮细胞和视网膜血管的研究发现,糖尿病可以明显激活 PARP 的活性,诱导视网膜发生微血管病变。PARP-1 还可能通过其他途径引起细胞凋亡,如调节 Bcl-2、Bcl-xl 磷酸化和凋亡诱导因子从线粒体进入细胞核,引起细胞凋亡^[11]。并且我们之前实验证明,在糖尿病小鼠视网膜及高糖培养的人 RVEC 中 PARP-1 和 caspase-3 的表达量明显增加,推测高糖情况下 PARP 表达促进了 caspase 的表达上调,进而导致内皮细胞凋亡,最终引起了视网膜微血管病变^[12]。

另外,早已有文献^[13]证明激活 NF- κ B 是导致糖尿病患者周细胞凋亡的重要原因,在糖尿病患者大量凋亡的周细胞内均可检测到激活的 NF- κ B,因此认为由高血糖引起的 NF- κ B 激活是导致糖尿病患者周细胞凋亡的重要原因。研究发现,在高糖环境下,周细胞内 NF- κ B 被激活,促凋亡因子 Bax 发生过表达,并且用 NF- κ B 抑制剂可以抑制 Bax 蛋白的过表达,而转染 NF- κ B p65 亚基同样可以使 Bax 发生过表达,促进周细胞凋亡^[13]。因此,随着糖尿病病程

的进展,血糖增高可激活 NF- κ B 引起周细胞凋亡,视网膜正常灌注破坏,加重低氧缺血,进一步激活 NF- κ B,形成恶性循环。Ho 等^[14]研究发现高糖可激活 NF- κ B 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡。并且体外研究发现,与普通水平血糖浓度相比,高糖聚合物能诱导更多的 PARP-1 与 NF- κ B p50 亚单位结合^[7],这说明 PARP-1 是通过与 NF- κ B 结合而引起细胞凋亡的。因此,我们建立高糖培养的人 RVEC,构建 PARP-EGFP 及 Flag-NF- κ B 质粒,分别转染高糖培养的人 RVEC,应用免疫共沉淀法检测 PARP-1 与 NF- κ B 的相互作用,发现高糖下 PARP-1 结合的 NF- κ B 的量明显高于正常对照组,说明在血糖增高的情况下,PARP-1 和 NF- κ B 是相互作用的蛋白质,PARP-1 是通过与 NF- κ B 结合来激活 NF- κ B 信号,引起 RVEC 凋亡。同时,我们将 PARP-EGFP 和 Flag-NF- κ B 质粒转染高糖培养的人 RVEC,应用激光共聚焦显微镜的方法检测 PARP-1 和 NF- κ B 在内皮细胞内表达定位及作用方式,结果发现 PARP-1 和 NF- κ B 均表达于正常人 RVEC 的细胞核和核周区域,当受到高浓度葡萄糖影响后,PARP-1 和 NF- κ B 表达均集中于细胞核内,尤以 NF- κ B 最显著,说明高糖刺激下,PARP-1 进入细胞核,并与转位到细胞核内的 NF- κ B 相结合而激活转录,引起细胞凋亡,最终引起微血管的改变,共同介导了 DR 的发生。

综上所述,我们证明了血糖增高时,PARP-1 与进入细胞核内的 NF- κ B 结合并激活 NF- κ B,启动靶基因转录,引起细胞凋亡,参与了 DR 的发生与发展,为进一步探讨 DR 发病机制及治疗提供了坚实的理论和实验依据。

参考文献

- 1 Stitt AW, Lois N, Medina RJ, Adamson P, Curtis TM. Advances in our understanding of diabetic retinopathy [J]. *Clin Sci*, 2013 , 125 (1) : 1-17.
- 2 CHO NH, Kim TH, Woo SJ, Park KH, Lim S, Cho YM, *et al.* Optimal HbA1c cutoff for detecting diabetic retinopathy [J]. *Acta Diabetol*, 2013 , 50 (6) : 837-842.
- 3 Shah CP, Chen C. Review of therapeutic advances in diabetic retinopathy [J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2011 , 2 (1) : 39-53.
- 4 Zhao HS, Shi XY, Wei WB, Wang NL. Effect of the regimen of Gaoshan Hongjingtiao on the mechanism of poly (ADP-ribose) polymerase regulation of nuclear factor kappa B in the experimental diabetic retinopathy [J]. *Curr Mol Med*, 2013 , 13 (6) : 946-958.
- 5 Bradford JW, Baldwin AS. IKK/ nuclear factor-kappaB and oncogenesis; roles in tumor-initiating cells and in the tumor microenvironment [J]. *Adv Cancer Res*, 2014 , 121 : 125-145.
- 6 Zheng L, Szabo C, Kem TS. Poly (ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor-kappa B [J]. *Diabetes*, 2004 , 53 (11) : 2960-2967.
- 7 Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, Hottiger MO. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappa B dependent gene expression by p300 is regulated by poly (ADP)-ribose polymerase-1 [J]. *J Biol Chem*, 2003 , 278 (46) : 45145-45153.
- 8 Matsushima S, Okita N, Oku M, Nagai W, Kobayashi M, Higami Y. An Mdm2 antagonist, Nutlin-3a, induces p53-dependent and

- proteasome-mediated poly (ADP-ribose) polymerase1 degradation in mouse fibroblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407 (3) : 557-561.
- 9 Casanelles E, Gozzelino R, Marques-Fernandez, Iglesias-Guimaraes V, Garcia-Belinchon M, Sanchez-Osuna M, *et al*. NF- κ B activation fails to protect cells to TNF- α induced apoptosis in the absence of Bcl-xL, but not Mcl-1, Bcl-2 or Bcl-w [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1883 (5) : 1085-1095.
- 10 Kaur H, Chen S, Xin X, Chiu J, Khan ZA, Chakrabarti S. Diabetes induced extracellular matrix protein expression is mediated by transcription coactivator P300 [J]. *Diabetes*, 2006, 55 (11) : 3104-3111.
- 11 Xu Y, Huang S, Liu ZG, Han J. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/ TRAF2 mediated JNK1 activation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (13) : 8788-8795.
- 12 秦秀虹, 张珍珍, 许海涛, 张丽红, 吴雅臻. Notch1 和多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1 在糖尿病小鼠视网膜中的表达 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32 (4) : 340-344.
- 13 Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. Activation of nuclear factor-kappa B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes [J]. *Diabetes*, 2002, 51 (7) : 2241-2248.
- 14 Ho FM, Lin WW, Chon BC, Chao CM, Yang CR, Lin LY, *et al*. High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF-kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNos pathway [J]. *Cell Signal*, 2006, 18 (3) : 391-399.

(上接第 110 页)

- 17 Aguzzi A, Falsig J. Prion propagation, toxicity and degradation [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15 (7) :936-939.
- 18 Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts[J]. *Cell*, 2004, 116 (2) :313-327.
- 19 Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation[J]. *Nat Med*, 2004, 10: s63-67.
- 20 Christen B, Damberger FF, Pérez DR, Hornemann S, Wüthrich K. Structural plasticity of the cellular prion protein and implications in health and disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (21) :8549-8554.
- 21 Tycko R, Wickner RB. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy [J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46 (7) :1487-1496.
- 22 Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers [J]. *Nature*, 2009, 457 (7233) : 1128-1132.
- 23 Nygaard HB, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates the toxicity of β -amyloid[J]. *Arch Neurol*, 2009, 66 (11) :1325-1328.
- 24 Chung E, Ji Y, Sun Y, Kascsak RJ, Kascsak RB, Mehta PD, *et al.* Anti-PrP^c monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an alzheimer's disease model mouse [J]. *BMC Neurosci*, 2010, 11 (2) :130.
- 25 Chan KY, Wang W, Wu JJ, Liu L, Theodoratou E, Car J, *et al.* Global health epidemiology reference group (GHERG). Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis [J]. *Lancet*, 2013, 381 (9882) :2016-2023.
- 26 Head MW. Human prion diseases: Molecular, cellular and population biology[J]. *Neuropathology*, 2013, 33 (2) :221-236.
- 27 Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Sclip A, Biasini E, *et al.* Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein [J]. *Proc Natl Acad*

- 28 Calella AM, Farinelli M, Nuvolone M, Mirante O, Moos R, Falsig J, *et al*. Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. [J]. *EMBO Mol Med*, 2010, 2(8) :306-314.
- 29 Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S. The prion protein as a receptor for amyloid- beta[J]. *Nature*, 2010, 466(7308) :3-4.
- 30 Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Laurén J, Gimbel ZA, *et al*. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein[J]. *Neurosci*, 2010, 30(18) :6367-6374.
- 31 Velayos JL, Irujo A, Cuadrado-Tejedor M, Paternain B, Moleres FJ, Ferrer V. The cellular prion protein and its role in Alzheimer disease[J]. *Prion*, 2009, 32(2) :110-117.
- 32 Frigg R, Wenzel A, Samardzija M, Oesch B, Wariwoda H, Navarini AA, *et al*. The prion protein is neuroprotective against retinal degeneration *in vivo*[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(6) :1350-1358.
- 33 Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J. Amyloid- β deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(11) :5136-5143.
- 34 Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, *et al*. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein[J]. *Neurosci*, 1999, 19(20) :8866-8875.
- 35 Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals[J]. *Embo*, 2002, 21(13) :3317-3326.
- 36 Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, *et al*. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular protein that triggers neuroprotection[J]. *EMBO*, 2002, 21(13) :3307-3316.
- 37 Park SW, Kim JH, Mook-Jung I, Kim KW, Park WJ, Park KH, *et al*. Intracellular amyloid beta alters the tight junction of retinal pigment epithelium in 5XFAD mice[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(9) :242-245.