



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150024

组蛋白乙酰转移酶 p300 对人乳腺癌细胞迁移的影响

王丹丹, 何红鹏, 张同存
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 在人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中转染 p300 表达质粒过表达 p300, 及利用 siRNA 干扰技术下调 p300 的表达, 以此研究组蛋白乙酰转移酶 p300 对肿瘤细胞迁移的影响。体外细胞划痕实验表明, 过表达 p300 可以促进 MDA-MB-231 细胞的迁移。RT-PCR 和免疫印迹实验 (Western blot) 结果表明, 过表达 p300 导致肿瘤迁移相关基因 MYL9、CYR61 和 MYH9 的 mRNA 和蛋白表达水平的上升。与过表达 p300 相反, 干扰 p300 的表达引起肿瘤迁移相关基因 MYL9、CYR61 和 MYH9 的 mRNA 和蛋白表达水平的下调。

关键词: 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; p300; 细胞迁移

中图分类号: R737.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2015)06-0001-06

Effect of Histone Acetyltransferase p300 on the Migration of Human Breast Cancer Cells

WANG Dandan, HE Hongpeng, ZHANG Tongcun
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To investigate the effect of p300 on tumor cell migration, p300 was overexpressed by transfecting p300 expression plasmid or depleted by transfecting p300-siRNA in human breast cancer cell MDA-MB-231. Wound healing assay showed that p300 can promote the migration of MDA-MB-231 cells. RT-PCR and Western blotting analysis proved that overexpression of p300 led to the up-regulation of MYL9, CYR61 and MYH9 genes which are known to be metastasis-related. On the contrary, knockdown of p300 resulted in the down-regulation of MYL9, CYR61 and MYH9 genes.

Key words: breast cancer; MDA-MB-231 cells; p300; cell migration

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 已成为全球范围内危害女性身体健康的头号杀手, 其发病率在欧美及亚洲地区都逐渐呈现上升趋势, 且发病年龄日趋年轻化^[1-4]。乳腺癌主要是由于乳腺导管上皮或小叶乳腺组织出现恶性改变而产生的^[5], 转移引起的并发症是患者死亡的主要原因^[6], 而肿瘤细胞的迁移能力又是肿瘤转移扩散的关键。

腺病毒 E1A 结合蛋白 p300 (E1A binding protein p300, EP300) 是具有多个结构域的大分子蛋白质, 在生物进化中高度保守, 因其相对分子量接近 3×10^5 而被命名为 p300^[7]。p300 作为特殊的转录辅因子, 本身具有组蛋白乙酰转移酶活性, 能通过多种机

制参与许多基因的转录调控过程。p300 基因的改变导致许多人类癌症的形成^[8]。在结直肠癌和前列腺癌中, 野生型 p300 的过表达与癌细胞向血管转移和不良预后有关^[9-11], 表明 p300 可能在某些癌症的发展进程中起促进作用。Yokomizo 等^[12]评估了肝细胞型肝癌 (HCC) 患者中 p300 过表达的预后值, 发现 p300 过表达与血管侵袭增强、肝内转移和生存期缩短密切相关; 另外, 在培养的 HCC 细胞中通过 siRNA 沉默技术干扰掉 p300 的表达后, 发现随着上皮-间质转化相关蛋白 Snail 和 Twist 表达量的减少及 E-cadherin 表达的增加, 细胞的侵袭迁移受到抑制, 表明 p300 在 HCC 的侵袭转移中发挥着重要作用。研究显示^[13],

收稿日期: 2015-03-04; 修回日期: 2015-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31301073); 天津市应用基础与前沿技术研究计划资助项目 (13JCYBJC38000)

作者简介: 王丹丹 (1987—), 女, 山东济宁人, 硕士研究生; 通信作者: 张同存, 教授, tony@tust.edu.cn.

数字出版日期: 2015-07-08; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20150708.1508.001.html>.

用小分子乙酰转移酶抑制剂 C646 抑制 p300/CBP 的活性,或通过 siRNA 干扰 p300/CBP 的表达后,前列腺癌细胞倾向于凋亡且侵袭和迁移能力明显下降,揭示出 p300 抑制剂可作为未来癌症治疗的发展方向. Xiao 等^[14]研究乳腺癌病人标本时发现 p300 在乳腺癌细胞中的表达强于非乳腺癌细胞以及癌旁组织,此结果提示 p300 的过表达与乳腺癌的发生、发展存在相关性. 另外有研究报道 p300 可募集 MTA1 蛋白到乳腺癌增强子序列 3(BCAS3),促进乳腺肿瘤细胞的癌性表型^[15]. 目前 p300 对乳腺癌细胞迁移的影响尚无报道.

非肌细胞肌球蛋白 II (Nonmuscle myosin II, NM II) 是细胞骨架的组成成分,参与细胞极性的产生、迁移与黏附等过程,在肿瘤转移过程中具有重要作用. NM II 分子是由两条重链和两对轻链组成的六聚体. MYH9(myosin heavy chain 9)是 NM II 重链的一种亚型. Betapudi 等^[16]研究发现 MYH9 对细胞的迁移发挥着关键作用,干扰其表达将抑制细胞的迁移. MYL9(myosin regulatory light chain 9)是肌球蛋白调节轻链的一个亚型,其表达上调与人乳腺癌细胞的侵袭迁移呈正相关^[17-18]. CYR61(cysteine-rich 61)与肿瘤发生相关的生长因子、趋化因子及基质金属蛋白酶等分子之间有相互作用,参与肿瘤细胞的迁移、侵袭、黏附、细胞外基质降解、新生血管生成等转移过程. 所以,本研究选取上述 3 个基因作为乳腺癌细胞迁移标志基因.

本研究在人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中过表达 p300,再用靶向 p300 的 siRNA 干扰掉 p300,运用分子生物学方法检测了肿瘤迁移相关基因 MYL9、CYR61 和 MYH9 在 mRNA 和蛋白水平的变化情况,探讨了 p300 对乳腺癌细胞迁移的调控作用,为研究乳腺癌转移机制和防治乳腺癌转移提供了理论基础.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

青链霉素、L-谷氨酸, Gibco 公司;胎牛血清,天津康源生物技术有限公司; p300 抗体、MYH9 抗体、GAPDH 单克隆抗体, Santa 公司; MYL9 抗体、CYR61 抗体, Abcam 公司; p300 siRNA 及阴性对照 siRNA, 广州锐博生物科技公司; M-MLV 逆转录酶、Turbo 转染试剂、Trizol 裂解液, Invitrogen 公司.

1.2 细胞株和细胞培养

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为本实验室保

藏. 用 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司),添加 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养. 细胞用 0.25% 的胰酶消化传代.

1.3 质粒转染实验

以转染空载体(pCDNA3.1)的 MDA-MB-231 细胞为对照组,转染 p300 表达质粒的 MDA-MB-231 细胞为实验组,每组设 3 个复孔. 将 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板,接种密度为 2×10^5 个/孔,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h,待贴壁细胞达 60% ~ 70% 融合时开始细胞转染实验. 细胞转染过程参照 TurbofectTM 细胞转染试剂说明书进行.

1.4 小分子干扰 RNA (siRNA) 的合成

根据 p300 基因在 GenBank 中的序列设计 3 组靶向 p300 的 siRNA 和 2 组非靶向 p300 的阴性对照,由广州锐博生物科技有限公司合成. 经前期筛选,本实验使用 p300-siRNA 设计序列中最高效的一组干扰序列. p300-siRNA 序列如下: Sense: 5'-CGACUUACCAGAUGAAUUAdTdT-3', Antisense: 5'-UAAUUCAUCUGGUAAGUCGdTdT-3', 阴性对照 siRNA 序列由公司设计并合成.

1.5 siRNA 的转染过程

转染前 1 天接种细胞于 6 孔板,使转染时细胞密度达到 50% ~ 80%. siRNA 冻干粉 5 nmol 瞬时离心后加 250 μL 冰上预冷的 DEPC-H₂O 配成 20 μmol/L 储存液,分装保存于 -80 °C 冰箱. 用 DEPC 水配制的 PBS 稀释 riboFECTTM CP buffer(10×) 制备 riboFECTTM CP buffer(1×),并取出 riboFECTTM CP Reagent,在漩涡振荡器充分振荡后,室温放置 15 min. 取 250 μL riboFECTTM CP buffer(1×),加入 5 μL siRNA 20 μmol/L 储存液,轻轻混匀,室温放置 5 min. 加入 25 μL riboFECTTM CP Reagent,轻轻吹打混匀,室温放置 15 min. 最后将混合液加入 1 720 μL 细胞培养基中,使 6 孔板中 siRNA 的终浓度为 50 nmol/L,轻轻混匀. 细胞培养 48 h 后,收样检测.

1.6 细胞划痕实验

将 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板,接种密度为 2×10^5 个/孔,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h. 向各孔细胞中转染不同质粒,转染 6 h 后换液,此时在每孔中央用 10 μL 吸头划一宽度为 300 ~ 500 μm 的无细胞划痕区. 用 PBS 充分洗去漂浮细胞,加入含 1% FBS 的 RPMI-1640 培养基继续培养. 每隔 12 h 在倒置显微镜下观察每孔中划痕宽度变化情况,划痕愈合快慢代表细胞在培养板上迁移速率

大小.

1.7 RT-PCR 检测

收集处理组和阴性对照组的细胞,提取总 RNA 后逆转录成 cDNA,以此为模板进行 PCR 反应. 在 Invitrogen 公司合成以下引物: GAPDH 上下游引物 5'-ATTCAACGGCACAGTCAAGG-3', 5'-GCAGAA GGGGCGGAGATGA-3', 产物大小 213 bp. p300 上下游引物 5'-GCAAACAATCGAGCGGAATAC-3', 5'-CGGATCATACTTGGGTCAGGT-3', 扩增产物大小 218 bp. MYL9 上下游引物 5'-GAGCCCAAGC GCCTTCT-3', 5'-GTCAATGAAGCCATCACGGT-3', 扩增产物大小 202 bp. CYR61 上下游引物 5'-GTC GTCACCCCTTCTCCACTT-3', 5'-CTTGGCGCAGAC CTTACAG-3', 扩增产物大小 141 bp. MYH9 上下游引物 5'-AGCGTTACTACTCAGGGCTCATC-3', 5'-TCATACTCTGTAGGCGGTGTCT-3', 扩增产物大小 177 bp. 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色 10 min 后用 BioRad 图像分析仪成像进行半定量分析, 检测目的基因的表达水平.

1.8 免疫印迹 (Western blot) 检测

收集处理组及阴性对照组 MDA-MB-231 细胞, 弃上清液后, 加入 200 μ L SDS 细胞裂解液, 4 $^{\circ}$ C 裂解 20 min, 用细胞刮刀收集蛋白于 1.5 mL EP 中, 煮沸 5 min. 取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳. 电泳完毕, 利用半干转膜仪将蛋白转移至 NC 膜上, 用质量分数为 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜. 然后用 PBS 缓冲液 (PBST) 漂洗 NC 膜 3 次, 每次 5 min. 洗完后于室温下二抗避光孵育 1 h, PBST 漂洗 3 次, 每次 5 min. 洗完后, 用 Odyssey 红外激光成像系统成像, 以 GAPDH 作对照.

2 结果与分析

2.1 过表达 p300 对乳腺癌细胞迁移的影响

为了探究 p300 对乳腺癌细胞迁移的影响, 首先使用 MDA-MB-231 细胞做了体外划痕实验. 细胞转染空载体 pCDNA3.1 作为对照组, 转染 p300 表达质粒为处理组, 每隔 12 h 观察细胞的愈合情况, 结果如图 1 所示. 与对照组相比, 转染 24 h 和 48 h 后, 明显看到过表达 p300 的细胞划痕愈合的更快, 表明 p300 能够促进乳腺癌细胞的迁移.

2.2 过表达 p300 对 MDA-MB-231 细胞迁移相关基因 mRNA 水平的影响

为了检测过表达 p300 对乳腺癌细胞迁移相关基

因转录水平的影响, 运用 RT-PCR 方法检测了 MDA-MB-231 细胞中 MYL9、CYR61 和 MYH9 的 mRNA 的变化情况. 细胞转染空载体 pCDNA3.1 作为对照组, 转染 p300 表达质粒为处理组. 结果如图 2 所示, 第 1 行检测了 p300 的 mRNA 水平, 表明细胞转染效果理想且 p300 在细胞中成功表达, 之后检测了 MDA-MB-231 细胞中 MYL9、CYR61 和 MYH9 的 mRNA 水平, 与对照组相比, 过表达 p300 后这些迁移标志基因在 mRNA 上均上调.

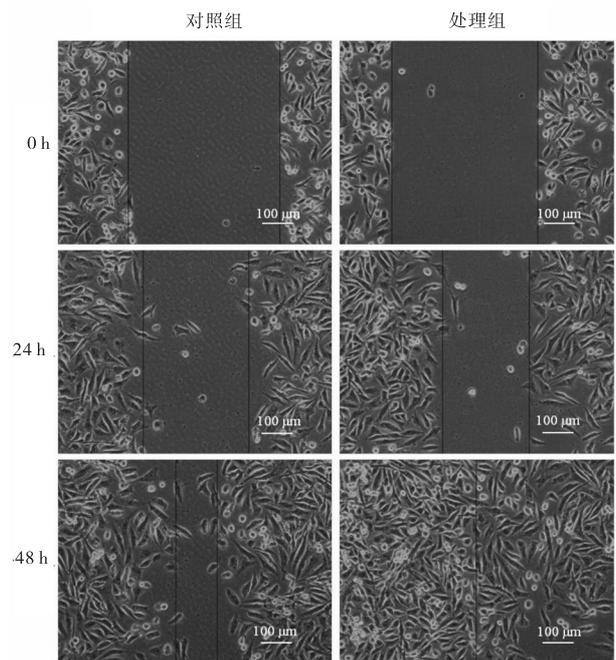


图 1 细胞划痕实验检测过表达 p300 后乳腺癌细胞迁移情况

Fig. 1 Effect of p300 overexpression on cell migration detected with wound-healing assay

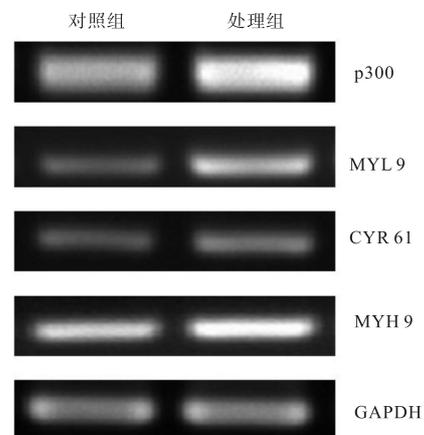


图 2 RT-PCR 法检测 MDA-MB-231 细胞中迁移相关基因在 mRNA 水平的变化

Fig. 2 RT-PCR assay of the mRNA of metastasis-related genes in MDA-MB-231 cells

2.3 过表达 p300 对乳腺癌细胞迁移相关基因蛋白表达水平的影响

为了检测过表达 p300 对乳腺癌细胞迁移相关基因蛋白表达水平的影响,运用 Western blot 方法检测了 MDA-MB-231 细胞中 MYL9、CYR61 和 MYH9 的蛋白质的变化情况. 细胞转染空载体 pCDNA3.1 作为对照组,转染 p300 表达质粒为处理组. Western blot 分析表明(图 3),与对照组相比,在 MDA-MB-231 细胞中转染 p300 后,其蛋白水平呈高表达;继续检测了细胞中 MYL9、CYR61 和 MYH9 的蛋白表达水平,结果表明过表达 p300 后这些蛋白的表达明显增强.

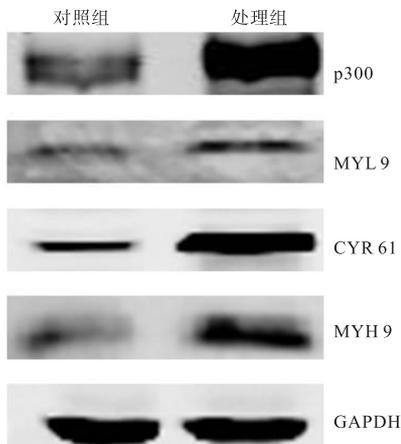


图3 Western blot 法检测 MDA-MB-231 细胞中迁移相关基因在蛋白水平的变化

Fig.3 Western blot analysis of the protein expression of metastasis-related genes in MDA-MB-231 cells

2.4 siRNA 干扰 p300 表达对乳腺癌细胞迁移的影响

为了进一步验证 p300 对乳腺癌细胞迁移的影响,运用 siRNA 干扰技术下调 p300 的表达,继续做了体外划痕实验. 细胞转染阴性非靶向 siRNA 作为对照组,转染 p300-siRNA 作为处理组,同样每隔 12 h 观察细胞的愈合情况,结果如图 4 所示. 细胞转染 24 h 和 48 h 后,干扰 p300 表达的细胞划痕愈合明显比对照组慢,再次表明 p300 对乳腺癌细胞的迁移有促进作用.

2.5 下调 p300 对 MDA-MB-231 细胞迁移相关基因 mRNA 和蛋白表达水平的影响

为了检测下调 p300 对乳腺癌细胞迁移相关基因的影响,运用 RT-PCR 和 Western blot 方法从 mRNA 和蛋白表达水平上检测了 MDA-MB-231 细胞中 MYL9、CYR61 和 MYH9 的变化情况. 转染阴性对照 siRNA 作为对照组,转染 p300-siRNA 作为处理

组,实验结果如图 5 所示. 由图 5(a)可知,RT-PCR 分析表明 MDA-MB-231 细胞中 p300 基因在 mRNA 水平呈高表达, RNA 干扰 48 h 后 p300 在 mRNA 水平的表达明显下调,说明 p300-siRNA 能有效抑制 p300 mRNA 的表达. 转染 p300-siRNA 下调 p300 的表达后,细胞迁移相关基因 MYL9、CYR61 和 MYH9 的 mRNA 与对照组相比有明显的降低. 与 RT-PCR 的结果一致,图 5(b)的 Western blot 分析表明 p300 基因在蛋白水平呈高表达, RNA 干扰 48 h 后 p300 表达下调,导致细胞迁移相关基因的表达也显著下调.

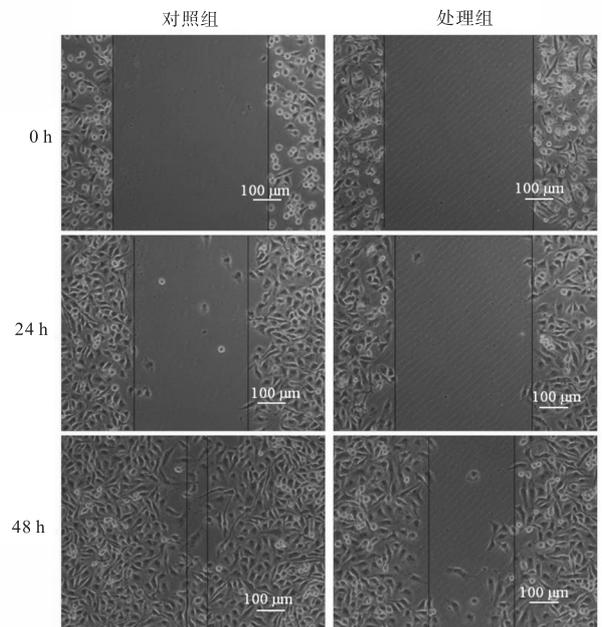
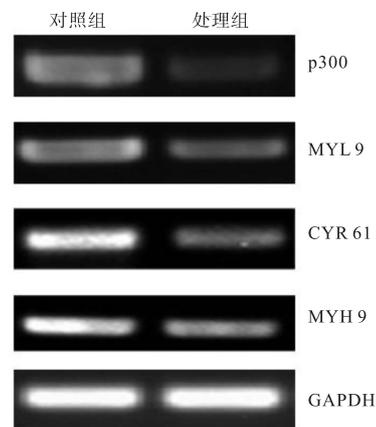
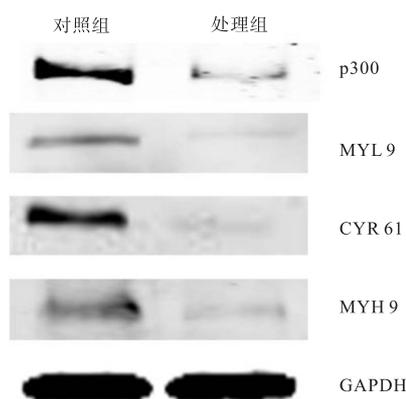


图4 细胞划痕实验检测下调 p300 表达后乳腺癌细胞迁移情况

Fig.4 Effect of p300 knock-down on cell migration detected with wound-healing assay



(a) 干扰 p300 对迁移标志基因 mRNA 的影响



(b) 干扰 p300 对迁移标志基因蛋白的影响

图 5 干扰 p300 表达对 MDA-MB-231 细胞迁移标志基因的影响

Fig. 5 Effect of p300 interference on the migration of MDA-MB-231 cell

3 讨论

乳腺癌的病因学机制至今尚未完全阐明,对乳腺癌细胞转移的研究是一个热点,也是难点.细胞迁移是一种复杂的生物学行为,是整个转移过程的关键步骤,涉及众多的调节因子、信号通路以及分子机制.

p300 是组蛋白乙酰转移酶(HAT)家族中研究最多的酶蛋白之一,它除了能乙酰化组蛋白,还能乙酰化非组蛋白. p300 在已知的各种转录活化因子与转录复合物的相互作用中起重要作用,对有关启动子抑制或激活抑或失活,通过不同机制影响细胞的生长、增殖、分化及癌症的发生和进展等. p300 的功能失调被认为可引发多种人原发性恶性肿瘤,但至今仍不十分清楚 p300 是如何参与癌症发生的.本研究在 MDA-MB-231 细胞中转染 p300 表达质粒,体外划痕实验观察到,外源表达 p300 后细胞的迁移能力增强(图 1).同时,细胞内迁移相关基因 MYL9、CYR61 和 MYH9 的 mRNA 和蛋白表达水平增加(图 2 和图 3).以上实验结果表明 p300 可能通过提高迁移相关基因的表达促进乳腺癌细胞的迁移,但其具体的促迁移机制还需后续的研究进一步阐明.

RNAi(RNA interfering, RNA 干扰)是指外源性或内源性的双链 RNA(double-silencing RNA, dsRNA)诱导与其同源的 mRNA 特异性降解,引起转录后阶段的基因沉默,使细胞表现出特定基因缺失的表型.自 1998 年 Fire 等^[19]发现 RNA 干扰现象之后, RNAi 技术迅速被成功用于线虫、果蝇、植物和哺

乳动物以及人的基因功能研究,并用于某些肿瘤、病毒感染性疾病治疗的研究中. siRNA 是通过与靶 mRNA 的特异性结合,激活 RNA 酶,促使 mRNA 的降解^[20].在 siRNA 转染细胞 48 h 后即可了解靶基因表达受抑制后的生物学现象.

本研究选用靶向干扰 p300 最强的 siRNA 序列,成功下调 MDA-MB-231 细胞中 p300 的表达,RT-PCR 和 Western blot 结果表明,肿瘤迁移相关基因 MYL9、CYR61 和 MYH9 的 mRNA 和蛋白表达水平均下调(图 5),反过来证明了乙酰转移酶 p300 对这些肿瘤迁移基因表达非常重要, p300 通过调节肿瘤迁移基因的表达促进人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移.同时,本研究结果还提示利用 siRNA 干扰 p300 的表达,从而抑制乳腺癌细胞的迁移,达到减少乳腺癌转移的抗癌效果,在乳腺癌治疗中将有广阔的应用前景.

参考文献:

- [1] Forouzanfar M H, Foreman K J, Delossantos A M, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis[J]. *Lancet*, 2011, 378(9801): 1461-1484.
- [2] Ziegler R G, Anderson W F, Gail M H. Increasing breast cancer incidence in China: The numbers add up[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2008, 100(19): 1339-1341.
- [3] Keramatnia A, Mousavi-Jarrahi S H, Hiteh M, et al. Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in Asia[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(3): 1387-1390.
- [4] Kachuri L, De P, Ellison L F, et al. Cancer incidence, mortality and survival trends in Canada, 1970-2007 [J]. *Chronic Diseases and Injuries in Canada*, 2013, 33(2): 69-80.
- [5] Sariego J. Breast cancer in the young patient[J]. *The American Surgeon*, 2010, 76(12): 1397-1400.
- [6] Kamby C. The Pattern of metastasis in human breast cancer: Methodological aspects and influence of prognostic factors[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 1990, 17(1): 37-61.
- [7] Eckner R, Ewen M E, Newsome D, et al. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein(p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor[J]. *Genes & De-*

- velopment, 1994, 8(8) : 869–884.
- [8] Gayther S A, Batley S J, Linger, et al. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers[J]. *Nature Genetics*, 2000, 24(3) : 300–303.
- [9] Ishihama K, Yamakawa M, Semba S, et al. Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2007, 60(11) : 1205–1210.
- [10] Heemers H V, Debes J D, Tindall D J. The role of the transcriptional coactivator p300 in prostate cancer progression[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 617: 535–540.
- [11] Peña C, García J M, García V, et al. The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas[J]. *International Journal of Cancer*, 2006, 119(9) : 2098–2104.
- [12] Yokomizo C, Yamaguchi K, Itoh Y, et al. High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells[J]. *Cancer Letters*, 2011, 310(2) : 140–147.
- [13] Santer F R, Höschele P P S, Oh S J, et al. Inhibition of the acetyltransferases p300 and CBP reveals a targetable function for p300 in the survival and invasion pathways of prostate cancer cell lines[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2011, 10(9) : 1644–1655.
- [14] Xiao Xiangsheng, Cai Muyan, Chen Jiwei, et al. High expression of p300 in human breast cancer correlates with tumor recurrence and predicts adverse prognosis[J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2011, 23(3) : 201–207.
- [15] Gururaj A E, Singh R R, Rayala S K, et al. MTA1, a transcriptional activator of breast cancer amplified sequence 3[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(17) : 6670–6675.
- [16] Betapudi V, Licate L S, Egelhoff T T. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(9) : 4725–4733.
- [17] Medjkane S, Perez-Sanchez C, Gaggioli C, et al. Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis[J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11(3) : 257–268.
- [18] Luo Xuegang, Zhang Chunling, Zhao Wenwen, et al. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2014, 344(1) : 129–137.
- [19] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669) : 806–811.
- [20] Hannon G J. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6894) : 244–251.

责任编辑: 郎婧