

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201703010

· 论著 ·

MTDH 促进头颈鳞癌细胞放疗抵抗的实验研究

周小娟¹, 张叠阔², 李果², 敬前程², 刘超², 余笠², 邱元正², 张欣², 黄东海², 张俊杰¹, 刘勇²

(1. 长沙市第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410005; 2. 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科耳鼻咽喉重大疾病研究湖南省重点实验室, 湖南长沙 410008)

摘要: **目的** 探讨星形胶质细胞上调基因1 (astrocyte elevated gene-1, AEG-1, 又称 MTDH) 对头颈部鳞状细胞癌(简称头颈鳞癌)放疗抵抗的影响。**方法** Western blotting 检测放射线照射后头颈鳞癌细胞 MTDH 蛋白表达的改变。通过脂质体转染的 MTDH cDNA 和慢病毒介导的 MTDH shRNA, 分别在不同头颈鳞癌细胞中过表达和抑制 MTDH, 平板集落形成实验检测头颈鳞癌细胞放疗抵抗能力的改变, 细胞免疫荧光染色检测 DNA 双链损伤指标 γ H2AX 的表达。**结果** MTDH 在头颈鳞癌细胞中的表达随着放射性照射剂量的增加和时间的延长逐渐升高。在 CNE-2 细胞中过表达 MTDH, 其体外集落形成能力增强; 相反, 在 Tu686 细胞中抑制 MTDH 的表达, 其体外集落形成能力减弱。同时, 细胞免疫荧光显示 Tu686 细胞在 MTDH 抑制后, 其 DNA 双链损伤指标 γ H2AX 的表达增加, 表明 DNA 双链损伤修复过程受阻。**结论** MTDH 能促进头颈鳞癌细胞放疗抵抗的形成, 与其对 DNA 双链损伤修复的调控作用相关。

关键词: 头颈部鳞状细胞癌; MTDH; 放疗抵抗; DNA 双链损伤

中图分类号: R739.91 文献标识码: A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(3): 233-237, 242]

MTDH promotes radioresistance in squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro

ZHOU Xiao-juan¹, ZHANG Die-kuo², LI Guo², JING Qian-cheng², LIU Chao², SHE Li²,

QIU Yuan-zheng², ZHANG Xin², HUANG Dong-hai², ZHANG Jun-jie¹, LIU Yong²

(1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Hospital of Changsha City, Changsha 410005, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Key Laboratory of Otolaryngology Major Disease Research of Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To study the function of mitochondria dehydrogenase (MTDH) on the radioresistance in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). **Methods** Western blotting was used to check the dynamic change of MTDH protein in SCCHN cells exposed to irradiation. The expression of MTDH was upregulated with Lipofectamine-mediated MTDH cDNA, and inhibited with lentivirus-mediated MTDH shRNA. Then plate colony formation assay was applied to examine the alteration of radioresistant capacity. Immunofluorescence was done to detect the expression of γ H2AX, which was a surrogate marker of DNA double-strand breaks. **Results** The expression of MTDH protein was increased after irradiation, which displayed an irradiation dose-dependent and time-dependent manner. MTDH overexpression in CNE-2 cells resulted in enhanced ability to form colony on plate. On the contrary, inhibition the expression of MTDH in SCCHN Tu686 cells led to declined ability of plate colony formation, which was accompanied by increased γ H2AX foci formation. **Conclusion** MTDH promotes radioresistance of SCCHN via modulating the repair process of DNA double-strand breaks.

Key words: Squamous cell carcinoma, head and neck; MTDH; Radioresistance; DNA double-strand break

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(3): 233-237, 242]

基金项目: 国家自然科学基金(81202128); 湖南省自然科学基金(2015JJ3137)。

作者简介: 周小娟, 女, 硕士, 主治医师。

通信作者: 刘勇, Email: liuyongent@csu.edu.cn

头颈部鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN, 简称头颈鳞癌)占头颈部恶性肿瘤的90%以上。放疗作为鼻咽癌的首选治

疗方案,同时也是晚期和/或复发性喉癌和口咽癌的重要治疗手段。放疗抵抗则是影响头颈鳞癌临床放疗效果的重要因素之一^[1]。因此,阐明放疗抵抗产生的分子机制,寻找放疗抵抗密切相关的分子标志物和干预靶点,有望改善头颈鳞癌患者的临床放疗效果。星形胶质细胞上调基因1(astrocyte elevated gene-1, AEG-1, 又称 MTDH)作为癌基因在乳腺癌、肝癌和肺癌等多数实体瘤中的表达升高,且出现功能异常,促进了肿瘤的侵袭转移和化疗耐药^[2]。我们前期研究发现 MTDH 在头颈鳞癌组织高表达,能通过诱导上皮-间质转化和肿瘤血管新生促进头颈鳞癌侵袭转移,与患者预后呈显著负相关^[3-5]。然而,有关 MTDH 在肿瘤放疗抵抗中的作用研究目前报道较少。因此,本研究旨在探讨 MTDH 在头颈鳞癌放疗抵抗中的作用。

1 材料方法

1.1 实验材料

RPMI-1640 细胞培养基, DMEM/F12 (1:1) 培养基, 南美胎牛血清 (Hyclone, 美国), 0.25% 胰蛋白酶消化液, 青链霉素双抗 (Gibco, 美国), MTDH cDNA 质粒及对照质粒 (GeneCopoeia, 美国), MTDH shRNA 慢病毒沉默载体及其对照载体, Polybrene, 嘌呤霉素 (Santa Cruz, 美国), Lipofectamine 2000 转染试剂盒 (Invitrogen, 美国), 兔抗人 MTDH 多克隆抗体 (Proteintech Group. INC, 美国), 鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (上海碧云天公司), 鼠抗人 γ H2AX 单克隆抗体 (Novus, 美国), 羊抗鼠 DyLight594 IgG 抗体 (联科生物公司, 中国), 4',6-二脒基-2-苯基吲哚/DAPI (碧云天公司, 中国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 本研究采用的头颈鳞癌细胞均由湘雅医学院细胞中心提供。其中, Tu686 为口咽部鳞癌细胞, CNE-2 为鼻咽部低分化鳞癌细胞。Tu686 和 CNE-2 均在 37°C 恒温, 5% CO₂ 浓度下, 分别用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1) 和 RPMI 1640 培养基进行培养, 0.25% 胰酶消化传代。所有试验均选用处于对数生长期的细胞。

1.2.2 MTDH cDNA 脂质体转染 CNE-2 细胞 头颈鳞癌细胞 CNE-2 细胞 MTDH 过表达采用 Lipofectamine 2000 进行转染, 按说明书和我们前期研究方法进行。只加 Lipofectamine 2000 组为空白组, 转染对照 cDNA 组为对照组, 转染 MTDH cDNA 组

为实验组。

1.2.3 MTDH shRNA 慢病毒感染 Tu686 细胞 头颈鳞癌 Tu686 细胞 6 孔板种板 16~24 h 后, 细胞密度约 40%~60% 时, 分别加入 MTDH shRNA 慢病毒颗粒及对照 shRNA 慢病毒颗粒, 感染增强剂 Polybrene (终浓度 6 μ g/ml)。感染后 24 h 更换新鲜培养基继续培养 48 h, 加入 5 μ g/ml 嘌呤霉素进行筛选 2 周后, Western blotting 检测 MTDH 抑制效果, 再进行后续实验。其中, 感染 MTDH shRNA 慢病毒颗粒为实验组, 感染对照 shRNA 慢病毒颗粒为对照组。

1.3 细胞放射线照射

按照课题组前期细胞放射线照射方法^[6], 采用 X-RAD 255X 射线辐照仪 (Precision X-ray Inc., 美国), 160KV X 射线进行照射, 源皮距为 40 cm, 吸收剂量率为 200.0 cGy/min。

1.3.1 蛋白印迹法 (Western blotting) 提取各组细胞总蛋白并进行蛋白定量。取 50 μ g 总蛋白变性处理后, 进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳。蛋白电泳分离后转膜至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。兔抗人 MTDH 多克隆抗体 (1:600) 于 4°C 下孵育过夜。洗膜后辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:3 000) 室温下孵育 1 h。洗膜后经化学发光剂显影曝光摄片。以小鼠抗人 β -actin 抗体 (1:2 000) 检测 β -actin 含量作为内参照。

1.3.2 平板集落形成实验 各组细胞消化后以每孔 500 个细胞接种于 6 孔板, 待细胞贴壁 12 h 后, 分别用 0、2、4、6 和 8 Gy 放射线进行满野照射。照射后, 细胞继续培养 14 d 后, 弃培养液清洗后, 4°C 甲醇固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色观察集落形成数目及大小。实验重复 3 次, 取平均数作为实验结果。

1.3.3 γ H2AX 细胞免疫荧光染色及定量 各组细胞消化后接种至放有盖玻片的 6 孔板进行爬片, 待细胞贴壁 12 h 后进行 4 Gy 放射线照射, 继续孵育 6 h 后 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% Triton-X100 破膜后胎牛血清室温封闭 10 min, 鼠抗人 γ H2AX 单克隆抗体 (1:800) 于 4°C 孵育过夜, 羊抗鼠 DyLight594 IgG 抗体室温孵育 1 h, DAPI 染色 1 min 封片。光学显微镜观察细胞核内出现的红色灶点即为 γ H2AX 焦点, 蓝色荧光为细胞核。计数至少 200 个细胞内的焦点总数, 取均数定义为 γ H2AX 焦点数^[7]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用多样本均数的方差分析进行组间样本均数的比较。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 放射线照射诱导 MTDH 在头颈鳞癌细胞中的表达

为探讨 MTDH 在放疗抵抗中潜在作用,我们采用两种方式检测其在放射性照射后的改变情况。首先,采用不同放射性照射剂量照射 CNE-2 细胞 12 h 后,western blotting 检测发现随着放射性剂量增加(0, 4 Gy 和 8 Gy),MTDH 蛋白的表达升高(图 1A)。另外,4Gy 放射性照射后,在不同时间点检测 MTDH 的表达,发现随着时间改变,MTDH 的表达逐渐升高,在 48 h 时最为明显(图 1B)。上述结果表明,放射性照射可诱导 MTDH 的表达升高,提示 MTDH 可能在头颈鳞癌放疗抵抗过程中发挥作用。

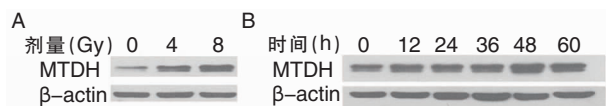


图 1 Western blotting 检测 MTDH 在不同放射剂量照射后 12 h 的表达量(A)和 4 Gy 照射后不同时间点的表达情况(B)

2.2 上调 MTDH 增强头颈鳞癌细胞的放疗抵抗能力

为直接证实 MTDH 在放疗抵抗中的作用,我们首先采用脂质体在 CNE-2 细胞中过表达 MTDH(图 2A)。结果显示 MTDH 上调后,种板 14 d 后实验组 CNE-2 细胞形成的集落较空白组和对照组中明显增多,且单个集落增大(图 2B)。根据集落形成结果所得生存分数曲线表明,在 2, 4 Gy 和 6 Gy 作用后实验组的生存分数明显提高(图 2C)。上述结果表明 MTDH 上调后可促进头颈鳞癌细胞的放疗抵抗性。

2.3 沉默 MTDH 抑制头颈鳞癌细胞的放疗抵抗能力

进而在另一株头颈鳞癌 Tu686 细胞中,通过慢病毒介导 shRNA 沉默 MTDH 的表达(图 3A)。平板集落形成实验表明,MTDH 表达抑制后实验组形成的克隆集落较对照组明显减少,单个集落变小(图 3B)。生存分数显示在 4, 6 Gy 和 8 Gy 作用后,实验组 Tu686 的生存分数减低(图 3C)。该结果进一步表明 MTDH 沉默可提高头颈鳞癌细胞对放疗

的敏感性。

2.4 沉默 MTDH 抑制头颈鳞癌细胞的 DNA 双链损伤修复

放射性照射可导致肿瘤细胞 DNA 双链损伤,若无法及时修复可导致肿瘤细胞死亡^[8]。由于发现 MTDH 表达改变后,可引起头颈鳞癌细胞放疗抵抗性的相应改变。我们进而在 MTDH 抑制后,检测了 Tu686 细胞中 DNA 双链损伤标志物 γ H2AX 的表达。细胞免疫荧光结果表明,实验组中 γ H2AX 焦点数(15.3 ± 2.0)较对照组(7.0 ± 0.9)显著增多($P < 0.01$)(图 4A 和 4B)。该结果表明 MTDH 表达抑制后,可显著抑制 DNA 损伤修复过程,从而增加 Tu686 细胞的放疗敏感性。

3 讨论

MTDH 最初发现是缘于对 HIV-1 感染所致的神经退行性病变及对 HIV-1 相关性痴呆的研究。2004 年完成对人 MTDH 基因 cDNA 全部序列的克隆^[9-10]。对 MTDH 促进肿瘤侵袭转移的作用机制为现有报道的主要侧重点。目前进展表明,MTDH 作为癌基因,可活化 PI3K/Akt、Wnt/ β -Catenin 和 NF- κ B 等多条信号通路,调控肿瘤上皮-间质转化(EMT)、自噬和血管新生等过程,促进包括头颈鳞癌在内的多种实体瘤的侵袭转移^[2]。另一方面,MTDH 亦可以通过诱导自噬和促进多药耐药基因(MDR-1)表达等,增强肿瘤细胞对阿霉素、5-氟尿嘧啶和顺铂等化疗药物的耐药性^[11-13]。然而,MTDH 在肿瘤放疗抵抗中的作用目前研究报道甚少。

在本研究中,我们通过基因功能获得或缺失研究表明,MTDH 过表达可促进头颈鳞癌细胞的放疗抵抗性产生。而相反,MTDH 抑制可提高头颈鳞癌细胞对放疗的敏感性。Zhao 等^[14]在宫颈癌的研究中发现,沉默 MTDH 可通过促进凋亡、减少放疗所致的 G2 期细胞周期阻滞,减少宫颈癌细胞的体外放疗抵抗性。本研究结果与 Zhao 等^[14]在宫颈癌中的研究结果一致,表明 MTDH 在头颈鳞癌和宫颈癌放疗抵抗过程中具有促进作用。但 MTDH 如何引起肿瘤放疗抵抗性的产生有待于进一步研究。

DNA 双链断裂(DNA double-strand break, DSB)作为最严重的 DNA 损伤,若无法及时修复,可导致整段染色体丢失损伤出现细胞凋亡、衰老甚至死亡。同源重组(Homologous recombination, HR)和非同源末端连接(Nonhomologous end joining, NHEJ)是 DSB

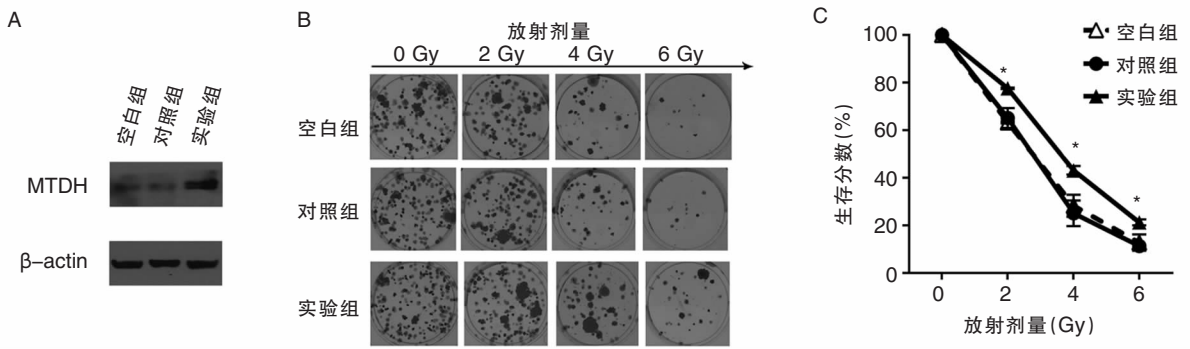


图 2 MTDH 过表达促进 CNE-2 细胞的放疗抵抗 Western blotting 检测 MTDH 的上调效果(A)、克隆集落形成实验检测放疗抵抗能力的改变(B)和生存分数(C); * 示 $P < 0.05$

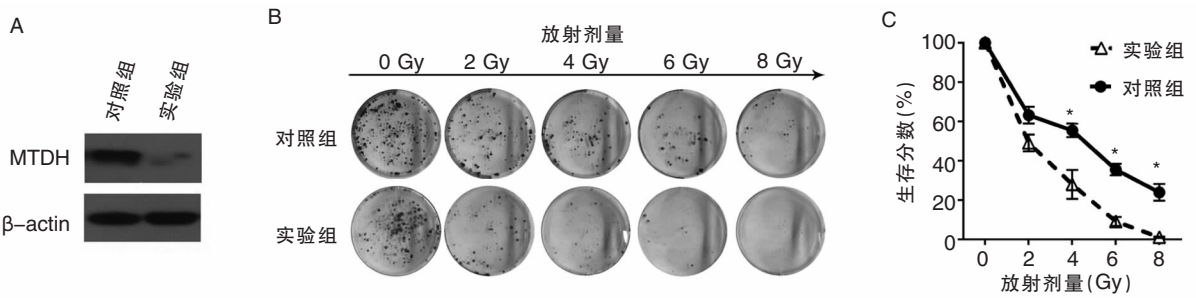


图 3 沉默 MTDH 抑制 Tu686 细胞的放疗抵抗 Western blotting 检测 MTDH 的抑制效果(A)、克隆集落形成实验检测放疗抵抗能力的改变(B)和生存分数(C); * 示 $P < 0.05$

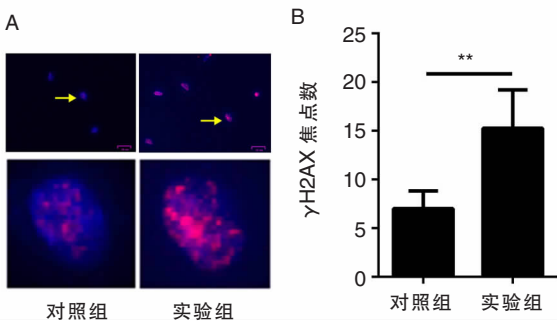


图 4 细胞免疫荧光检测 Tu686 细胞中 γ H2AX 的表达(A、B);黄色箭头示 γ H2AX 染色阳性 Tu686 细胞; ** 示 $P < 0.01$

应答机制中两条重要的修复通路。放射性照射可导致细胞 DNA 双链断裂,如接下来的细胞 DNA 双链修复过程受阻,表现为 DNA 双链断裂标志物 γ H2AX 表达量剧增,肿瘤细胞则易发生死亡,放疗抵抗性减轻^[15]。为探寻 MTDH 调控肿瘤放疗抵抗的作用机制,我们发现 MTDH 表达抑制后,头颈鳞癌 Tu686 细胞中 γ H2AX 表达量显著升高,表明 MTDH 沉默可抑制头颈鳞癌细胞的体外 DNA 双链修复过程,促进不能产生 DNA 修复的肿瘤细胞死亡,减轻

放疗抵抗性的产生。该研究结果从 DNA 损伤修复的角度,初步阐述了 MTDH 调控头颈鳞癌细胞放疗抵抗性的作用机制。

在本研究中,我们虽然发现 MTDH 可促进 DNA 双链损伤修复和放疗抵抗,但是 MTDH 是通过何种信号通路调控 DNA 双链损伤修复过程进而促进放疗抵抗仍不清楚。现有研究表明表皮生长因子受体信号(EGFR)通路、PI3K/Akt/mTOR 通路和 p53 通路的功能异常,与头颈鳞癌的放疗抵抗密切相关^[16]。我们前期研究发现 MTDH 可激活 PI3K/Akt 通路促进头颈鳞癌细胞的恶性增殖和侵袭转移^[17-18]。据此推断 MTDH 是否同样经该通路影响放疗抵抗,为我们后续通路研究的方向之一。除 PI3K/Akt 通路外,MTDH 调控的下游信号通路还包括 NF- κ B^[19]、Wnt/ β -catenin^[20]、MAPK^[21] 通路等,上述通路是否也可参与 MTDH 调控的头颈鳞癌放疗抵抗,有待进一步明确。

放射线照射除可引起 DNA 双链损伤,还可促使肿瘤细胞发生典型的上皮-间质转化(EMT)改变^[22-23],且 EMT 改变可增强肿瘤细胞的放疗抵抗

性^[24-25]。现有较多研究和我们前期研究均已证实 MTDH 能促进肿瘤细胞的 EMT 改变^[17, 26-27],但之前的研究并未回答 EMT 改变能否在 MTDH 介导的放疗抵抗中是否发挥作用,值得深入探讨。另外,自噬作用是机体细胞的一种重要防御和保护机制。通过自噬作用,细胞内受损或多余的蛋白质和细胞器被包裹、消化并降解成新的核苷酸、氨基酸和脂肪酸以备重新循环利用,为细胞在饥饿、能量缺乏等代谢压力下合成新的大分子和能量,从而维持自我稳态和生存^[28]。研究表明自噬可通过减低活性氧类物质促进肺癌细胞的放疗抵抗^[29],通过自噬抑制剂氯喹可提高脑胶质瘤肿瘤起始细胞对放疗的敏感性^[30]。MTDH 同样可在肿瘤细胞中引起保护性自噬促进肿瘤细胞的恶性进展^[31-32],其是否可通过诱导自噬调控肿瘤细胞的放疗抵抗并不清楚。我们课题组目前亦积极在探索 EMT、自噬及二者之间的相互作用在肿瘤放疗抵抗中的作用机制。

总而言之,上述研究表明 MTDH 沉默可抑制 DNA 损伤修复过程,进而促头颈鳞癌细胞产生放疗抵抗性。然而,MTDH 是通过何种信号通路,如何引起 DNA 损伤修复过程和放疗抵抗的具体分子机制仍需深入探讨,且需从体内实验对现有细胞实验结果进行佐证。上述研究将有助于明确 MTDH 能否作为肿瘤放疗增敏的分子干预靶点。

参考文献:

[1] 邱元正,刘超,李果.鼻咽癌放射治疗的现状与对策[J].中国耳鼻喉咽喉底外科杂志,2015,21(6):435-438.

[2] Hu G, Wei Y, Kang Y. The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression[J]. Clin Cancer Res, 2009,15(18):5615-5620.

[3] Wang Z, Wei YB, Gao YL, et al. Metadherin in prostate, bladder, and kidney cancer: A systematic review[J]. Mol Clin Oncol, 2014,2(6):1139-1144.

[4] 李果,刘勇,徐芳,等.星形胶质细胞上调基因-1蛋白在鼻咽癌中的表达及临床意义[J].中国耳鼻喉咽喉底外科杂志,2012,18(5):354-357.

[5] 余长云,刘勇,谭浩蕾,等.AEG-1介导上皮-间质转化调控头颈部鳞状细胞癌的侵袭转移[J].中国耳鼻喉咽喉底外科杂志,2013,19(3):183-187.

[6] Liu Y, Su Z, Li G, et al. Increased expression of metadherin protein predicts worse disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2013,133(3):671-679.

[7] 李果,刘勇,粟忠武,等.放射性照射诱导鼻咽癌细胞上皮-间质转化的作用研究[J].中华耳鼻喉咽喉头颈外科杂志,

2013,48(8):662-667.

[8] Peitzsch C, Cojoc M, Hein L, et al. An epigenetic reprogramming strategy to re-sensitize radioresistant prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2016,76(9):2637-2651.

[9] Liauw SL, Connell PP, Weichselbaum RR. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology[J]. Sci Transl Med, 2013,5(173):173sr172.

[10] Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, et al. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1[J]. Gene, 2005,353(1):8-15.

[11] Zhang J, Zhang Y, Liu S, et al. Metadherin confers chemoresistance of cervical cancer cells by inducing autophagy and activating ERK/NF-kappaB pathway[J]. Tumour Biol, 2013,34(4):2433-2440.

[12] Song Z, Wang Y, Li C, et al. Molecular Modification of Metadherin/MTDH Impacts the Sensitivity of Breast Cancer to Doxorubicin[J]. PLoS One, 2015,10(5):0127599.

[13] Wei YB, Guo Q, Gao YL, et al. Repression of metadherin inhibits biological behavior of prostate cancer cells and enhances their sensitivity to cisplatin[J]. Mol Med Rep, 2015,12(1):226-232.

[14] Zhao Y, Moran MS, Yang Q, et al. Metadherin regulates radioresistance in cervical cancer cells[J]. Oncol Rep, 2012,27(5):1520-1526.

[15] Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, et al. Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research[J]. Cancer Lett, 2012,327(1-2):123-133.

[16] Perri F, Pacelli R, Della Vittoria Scarpati G, et al. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications[J]. Head Neck, 2015,37(5):763-770.

[17] Yu C, Liu Y, Tan H, et al. Metadherin regulates metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck via AKT signalling pathway-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Lett, 2014,343(2):258-267.

[18] Zhu GC, Yu CY, She L, et al. Metadherin regulation of vascular endothelial growth factor expression is dependent upon the PI3K/Akt pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Medicine (Baltimore), 2015,94(6):1502.

[19] Emdad L, Sarkar D, Su ZZ, et al. Activation of the nuclear factor kappaB pathway by astrocyte elevated gene-1: implications for tumor progression and metastasis[J]. Cancer Res, 2006,66(3):1509-1516.

[20] Wang Z, Cao CJ, Huang LL, et al. EFEMP1 promotes the migration and invasion of osteosarcoma via MMP-2 with induction by AEG-1 via NF-kappaB signaling pathway[J]. Oncotarget, 2015,6(16):14191-14208.

[21] Chang Y, Li B, Xu X, et al. Lentivirus-Mediated Knockdown of Astrocyte Elevated Gene-1 Inhibits Growth and Induces Apoptosis through MAPK Pathways in Human Retinoblastoma Cells[J]. PLoS One, 2016,11(2):e0148763.

(下转第242页)