

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.21.003

转录因子 E2F1 蛋白纯化及甲基化鉴定

王 颖 邹世清[△] 陈 波

(武汉大学中南医院呼吸内科 湖北 武汉 430071)

摘要 目的:构建人 E2F1 基因原核表达质粒 pGEX-KG-E2F1,并在大肠杆菌中诱导表达。随后验证纯化得到的 E2F1 蛋白可作为底物被甲基化转移酶修饰。**方法:**构建原核表达质粒 pGEX-KG-E2F1,在大肠杆菌 BL-21 中经异丙基硫代半乳糖(IPTG)诱导表达,利用 GST 亲和层析法纯化表达的 E2F1 蛋白。随后将纯化的 E2F1 蛋白作为底物,组蛋白甲基化转移酶 SET7/9 作为酶进行体外同位素标记放射自显影实验,检测纯化的 E2F1 蛋白能否被甲基化。**结果:**酶切鉴定和测序结果证明成功构建了原核表达载体 pGEX-KG-E2F1,SDS-PAGE 检测结果证明实现了人 E2F1 基因在大肠杆菌中的可溶性表达,放射自显影证明纯化得到的 E2F1 蛋白可作为底物被甲基化转移酶 SET7/9 甲基化。**结论:**成功构建了转录因子 E2F1 体外甲基化体系,为筛选新的能甲基化 E2F1 的酶奠定基础。

关键词:原核表达;组蛋白甲基化转移酶;E2F1;SET7/9

中图分类号:R-33;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)21-4012-04

Purification and Methylation Identification of Transcription Factor E2F1 Protein*

WANG Ying, ZOU Shi-qing[△], CHEN Bo

(Dept. of Respiratory Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430071, China)

ABSTRACT Objective: To construct prokaryotic expression vector pGEX-KG-E2F1 of the human gene E2F1, and to express fusion protein and purify the E2F1 protein, and to validate that our purified E2F1 can be used as the substrate for histone methyltransferase-mediated methylation. **Methods:** The prokaryotic expression plasmid pGEX-KG-E2F1 was constructed and the expression of E2F1 was induced by IPTG in *E.coli* BL-21. And then we use GST affinity chromatography to purify E2F1 protein. Then we use the purified E2F1 protein as a substrate, and the histone methyltransferase enzyme SET7/9 as the enzyme for autoradiography experiments in vitro. **Results:** Enzyme digestion and sequencing results demonstrated the prokaryotic expression vector pGEX-KG-E2F1 was constructed successfully. SDS-PAGE results proved the E2F1 protein can be solubly expressed and autoradiography demonstrated that purified E2F1 protein can be methylated by histone methylation transferase SET7/9. **Conclusion:** We successfully constructed E2F1 methylation system in vitro, and this work certainly laid a solid foundation for the further study of screening histone methyltransferases which can methylate E2F1.

Key words: Prokaryotic expression; Histone methylation transferase; E2F1; SET7/9

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)21-4012-04

前言

E2F1 蛋白是一类重要的转录因子,它可以与 DP-1 蛋白形成复合物,调控下游基因转录,进而使细胞周期从 G1 期转换到 S 期。除调控细胞周期外,E2F1 在细胞增殖与分化,以及凋亡过程中也起着重要作用,例如在细胞凋亡方面,E2F1 一方面可以促进肿瘤抑制因子 p53 的转录从而促进如 puma, noxa 等凋亡相关基因的表达;另一方面 E2F1 还可以抑制如 NF- κ B 等信号通路,进而促进细胞凋亡^[1]。因此,转录因子 E2F1 与肿瘤发生有着密切的联系^[2]。近年来随着对 E2F1 翻译后修饰研究

的深入,研究发现由组蛋白甲基转移酶家族介导的 E2F1 的甲基化修饰也在 E2F1 的活性调控中起着重要的作用。例如,组蛋白赖氨酸甲基化转移酶 SET7/9 对 E2F1 的 185 赖氨酸单甲基化,阻碍了这个位点的乙酰化及磷酸化,促进了 E2F1 的泛素化。除了 SET7/9 报道对 E2F1 有甲基化作用外,组蛋白精氨酸甲基化转移酶 PRMT1, PRMT5 对 E2F1 都有甲基化修饰作用^[3]。E2F1 的翻译后修饰如甲基化修饰对细胞的增殖和凋亡以及癌症的发生具有紧密联系,由于目前报道的组蛋白甲基化酶已有六十多种,那么除了之前报道的 SET7/9 和 PRMT1, PRMT5 可以对 E2F1 进行甲基化修饰外,是否还有其它类型的组蛋白甲基化酶可以甲基化 E2F1 呢?同时是否还有甲基化酶是通过甲基化 E2F1 来参与癌症的发生与发展呢?因此为筛选更多新的 E2F1 甲基化转移酶,我们在体外纯化除了 E2F1 蛋白,同时组蛋白甲基化转移酶 SET7/9 作为酶检测纯化的 E2F1 是否可以作为底物被甲基化。最终我们成功构建了转录因子 E2F1 体外甲基化体系,为筛选新的能甲基化 E2F1 的酶奠定基础。

作者简介:王颖(1989-),硕士研究生,主要研究方向:呼吸系统疾病,电话:13545894076, E-mail: 1169173097@qq.com

[△] 通讯作者:邹世清(1966-),副主任医师,副教授,医学硕士,主要研究方向:呼吸系统疾病,电话:15207191456, E-mail: zsq623@163.com

(收稿日期:2016-12-27 接受日期:2017-01-22)

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

大肠杆菌 BL21(DE3)由本实验室保存,HEK 293 FRT (Invitrogen, 美国), 质粒 pGEX-KG, pCDNA5-FTF 和 pCDNA5-SET7/9 由实验室提供, 一抗鼠源 Anti-Flag (美国 Sigma 公司), Anti-mouse IgG-HRP (美国 Jackson Immuno Research 公司), Protein G 琼脂糖珠 (美国 GE 公司), 限制性内切酶 *Bam*HI、*Xba*I (美国 NEB), T4 DNA 连接酶 (TOYOBO 公司), 核酸标准分子质量 Marker (Takara 公司), KOD DNA 延伸酶 (美国 NEB)。超净工作台 (苏州安泰), PCR 仪 (BIORAD), 凝胶成像扫描仪 (SYNGENE 公司), 电泳仪 (北京六一仪器厂), 水平电泳槽 (北京君意), 高速离心机 (Sigma), CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司), 转膜仪 (Thermo 公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 原核表达载体 pGEX-KG-E2F1 的构建 通过软件 DNAMAN 分析 E2F1 在 GenBank 的序列, 正向与反向的内切酶分别选定为 *Bam*HI 和 *Xba*I, 引物设计为: 正向 5'-AAAAG-GATCCGGGGCCCCGGCCAAGGCCAT-3'; 反向 5'-AAAATC-TAGATCACCCCCCTGGATT-3'。合成由武汉擎科生物公司合成, 随后以 HEK293 FRT 细胞的 cDNA 为模版进行 PCR; 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 90 s, 30 个循环, 68 °C 终止延伸 10 min。琼脂糖胶回收, 酶切 37 °C 过夜, 再与载体酶连 4 °C 过夜, 转化到 DH5 α 中, 提质粒, 酶切鉴定并送样测序。测序正确, 随后 42 °C 热激 90 s, 冰浴, 将正确的 pGEX-KG-E2F1 的质粒转入到 BL21 中。

1.2.2 E2F1 原核表达 (1) 菌种活化: 将保的菌用枪头沾一下, 然后加入 5 mL LB Amp 培养基中, 摇床过夜。(2) 5 mL 菌液加入 100 mL LB Amp 培养基, 37 °C 摇 1-2 h。(3) 100 mL 菌液加入 1 L 的 LB Amp 培养基, 37 °C 摇 1-2 h。(4) 菌浓度 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右时, 加入 IPTG, 终浓度至 0.2 mM, 18 °C 200 rpm 摇菌 4 h。(5) 离心, 6000 $\times$ g, 15 min。(6) PBS 溶液收集沉淀, 8000 rpm, 10 min。(7) 加溶菌酶溶解 30 min, 超声破碎, 功率 60 %, 10 min。(8) 超声后 12000 rpm, 4 °C 离心 1 h, 取上清, 弃沉淀。

1.2.3 GST 亲和层析纯化 E2F1 蛋白 首先安装连接好加入 Glutathione Sepharose beads 混合液的 GST 层析柱子 PBS 预清洗, 将上一步收集上清全部倒入柱子, 随后用 PBS 在洗涤一遍, 最后加入洗脱 buffer, 收集洗脱液, 加入 10% 甘油和 1 mM DTT 分装冻至 -80 °C。

1.2.4 BSA 定量检测 E2F1 浓度 将 10 mg/mL 的 BSA 用 PBS 稀释至 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL。制备 10% 聚丙烯酰胺凝胶, SDS-PAGE 电泳 (140 V 恒压, 1 h) 稀释后的 BSA 样品和待测的 GST-E2F1 蛋白样品。考马斯亮蓝染色 15 min, 考马斯亮蓝脱色液脱色过夜。

1.2.5 检测组蛋白甲基化转移酶 SET7/9 的表达 转染前一天下午将细胞传至 6 孔板 (大约 2×10^5 个/well), 第二天上午磷酸钙转染质粒 pCDNA5-FTF 和 pCDNA5-SET7/9。转染 24 h 后, 加入 100 μ L 2 $\times$ SDS loading buffer, 95 °C 煮样 15 min。SDS-PAGE 电泳 (140 V 恒压, 1 h)。

1.2.6 免疫共沉淀 收集 SET7/9 质粒转染如上步, 转染 24 h 后加入 lysis buffer 4 °C 裂解 0.5 h, 然后 12000 rpm, 15 min。加入 Flag-Argrose, 4 °C 敷浴 1 h, 再用 PBS 清洗 3-5 遍。

1.2.7 放射自显影 首先在上步清洗后的 Flag-Argrose 中加入: 2 $\times$ MAB 12.5 μ L 10 $\times$ BSA (1 mg/mL) 2.5 μ L, H₂O 4 μ L, GST-E2F1 蛋白 5 μ L, H3-SAM 1 μ L。37 °C 反应过夜, 然后加入 25 μ L 2 $\times$ SDS Loading, 95 °C 煮样 15 min。SDS-PAGE 电泳 (140 V 恒压, 1 h) 加入固定液, 在摇床上固定 30 min, 换液加入 Enlighting 增强显影, 在摇床上摇 30 min, 在高温真空干燥仪中干胶 75 °C 1 h。压片, -80 °C 衰变一周, 显影。

2 结果

2.1 原核表达载体 pGEX-KG-E2F1 的构建

载体 pGEX-KG 大小约为 5 kb, 人源 E2F1 的 CDS 序列大小约为 1.3 kb, 重组质粒 pGEX-KG-E2F1 电泳图与预期相符, 重组质粒经 *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切后, 可获得约 1.3 kb 的 DNA 片段, 与预期的片段大小相符 (如图 1)。

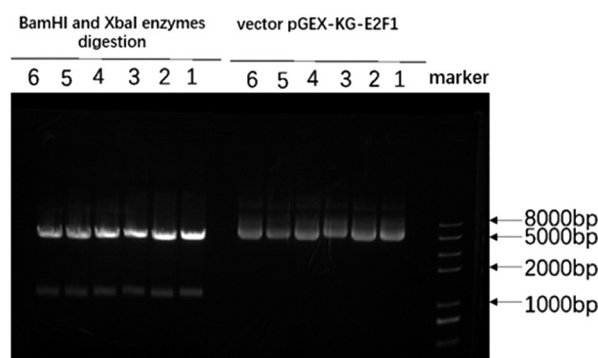


图 1 载体 pGEX-KG-E2F1 及酶切鉴定电泳图 (1-6 道为不同克隆及酶切结果)

Fig. 1 Electrophoresis map of vector pGEX-KG-E2F1 and its enzyme digestion (1-6 channels are different clones and enzyme digestion results)

2.2 E2F1 原核表达

为了弄清 E2F1 蛋白存在于上清还是沉淀, 我们选择了三个样品, 分别是全细胞, 上清和沉淀。同时为了设置对照, 我们将每个样品又分为加 IPTG 和不加 IPTG 诱导两种 (如图 2)。结果显示 E2F1 蛋白几乎全部存在于上清, 而且通过分析全细胞和上清样品的条带我们可以发现, 在 75 KD 处多了一条带, 初步判定这条带即是 E2F1 蛋白的位置, E2F1 蛋白重量约为 47 kDa, 由于携带 GST (约 26 kDa) 标签, 故 GST-E2F1 的条带在 75 KD 处。因此融合蛋白 GST-E2F1 在上清中表达。

2.3 E2F1 蛋白的纯化与浓度测定

通过上步实验, 我们已鉴定 E2F1 蛋白主要存在于上清液中, 故我们用 1L 的培养基扩大培养重组菌落, 然后收集上清, 并用 GST 亲和层析柱纯化 E2F1 蛋白, 收集洗脱液时, 1 毫升收集一管。共收集了 5 管, 依次编号。我们通过考马斯亮蓝染色分别对第 1, 2, 3, 4, 5 号管中的 GST-E2F1 蛋白进行浓度鉴定 (如图 3.1)。结果显示, E2F1 蛋白主要分布在第一号和第二号管中。随后, 我们通过 BSA 定量检测了 1, 2 号管中 E2F1 蛋白的浓度 (如图 3.2), 结果表明, 1 号管中的蛋白浓度为 0.2 mg/mL 左右, 而 2 号管中的蛋白在 0.1 到 0.2 mg/mL 之间。

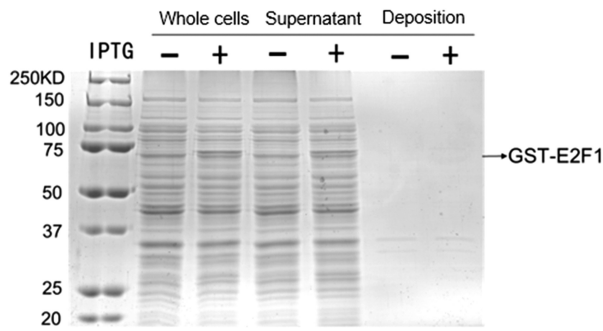


图 2 E2F1 原核表达 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis map of E2F1 prokaryotic expression

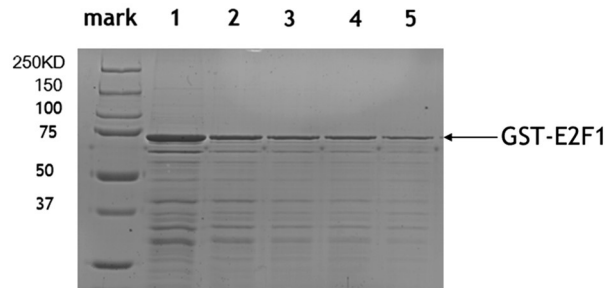


图 3.1 GST 亲和层析柱纯化 E2F1 蛋白跑胶检测

Fig. 3.1 Purification of E2F1 protein by GST affinity chromatography

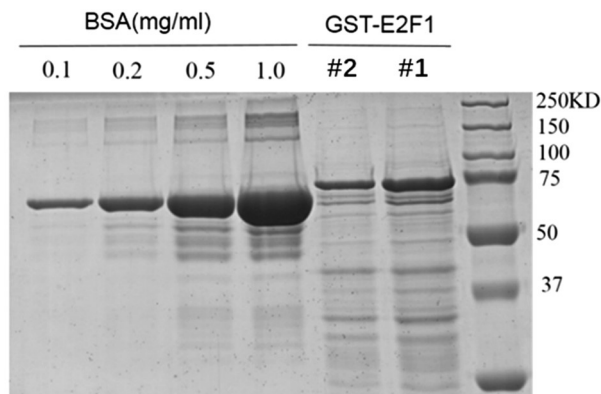


图 3.2 GST-E2F1 蛋白浓度的检测

Fig. 3.2 Detection of GST-E2F1 protein concentration

2.4 检测组蛋白甲基化转移酶 SET7/9 的表达

为了检测组蛋白甲基化转移酶的表达,我们用磷酸钙转染了质粒 pCDNA5-FTF 和 pCDNA5-SET7/9 各 1 微克到 HEK293 细胞中,然后 Western Blot 测(如图 4)。结果在 pCDNA5-SET7/9 转染细胞中各自看到了条带,而空载的没有,故可以判定 SMYD2 和 SET7/9 可以表达。

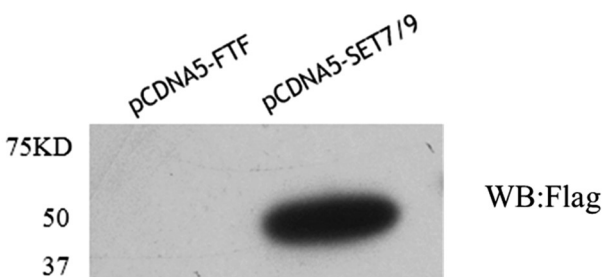


图 4 SET7/9 表达检测

Fig. 4 Detection of SET7/9 expression

2.5 GST-E2F1 体外甲基化反应检测

我们用带 Flag 标签的琼脂糖免疫共沉淀收集 SET7/9,再加入 GST-E2F1 蛋白和 H3-SAM 以及其他 buffer,37℃ 反应过夜后跑胶,衰变一周后压片显影(如图 3)。结果显示 E2F1 可以被组蛋白甲基化转移酶 SET7/9 甲基化。表明我们纯化的 E2F1 能作为底物来筛选甲基化酶。

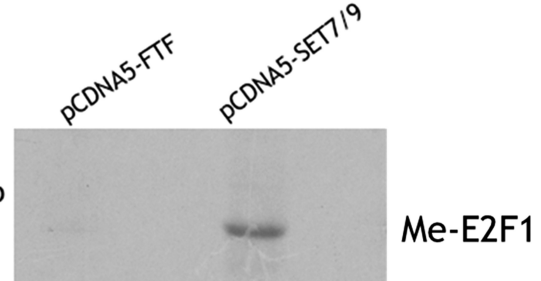


图 5 E2F1 蛋白甲基化检测

Fig. 5 Detection the methylation of E2F1 protein

3 讨论

E2F1 作为一类重要的转录因子,在细胞周期,DNA 复制酶,细胞生长和凋亡等方面起着重要的调控作用^[4]。E2F1 可与 DP 蛋白家族(DP1 和 DP2)形成异二聚体,其转录活性增强;E2F1 也可与 Rb 形成异二聚体,其转录活性被抑制^[5]。E2F1 在细胞周期 G1/S 期过程中起着重要的作用:当细胞处于 G1 前期,E2F1 与 Rb 形成异二聚体,其转录活性被抑制,阻抑细胞分裂^[6]。当细胞进入 S 期时,cyclinE/A 和 Cdk2 表达量增加,使 Rb 磷酸化,随后释放 E2F1 与 DP1 形成的异二聚体,进而调控细胞 S 期生长相关基因的转录,如 DNA 聚合酶 α 、CDK、cyclin D1 等^[7]。除调控细胞周期外,E2F1 在细胞增殖与分化,以及凋亡过程中也起着重要作用^[8],例如在细胞凋亡方面,E2F1 一方面可以促进肿瘤抑制因子 p53 的转录从而促进如 puma,nox 等凋亡相关基因的表达^[9-11];另一方面 E2F1 还可以抑制如 NF- κ B 等信号通路,进而促进细胞凋亡^[12-16]。因此,转录因子 E2F1 与肿瘤发生有着密切的联系^[17]。

我们通过超声破碎鉴定了 E2F1 蛋白存在于细胞上清,然后扩大培养,收集 E2F1 蛋白,并鉴定了 E2F1 蛋白的浓度约为 0.2 mg/mL,然后作为底物做体外甲基化的实验,而且最终结果表明,我们纯化的 E2F1 能作为底物来筛选甲基化酶。有文献报道转录因子 E2F1 可调节多种基因表达,既能促进细胞进入 S 期,同时又能促进凋亡,E2F1 如何选择性的调控下游基因与 E2F1 的修饰类型有着密切的关系^[18]。例如组蛋白赖氨酸甲基化转移酶 SET7/9 对 E2F1 的 185 赖氨酸单甲基化,阻碍了这个位点的乙酰化及磷酸化,促进了 E2F1 的泛素化。当 DNA 损伤时,SET7/9 诱导的甲基化被抑制,抑制其泛素化,同时促进了该蛋白的乙酰化和磷酸化,使 E2F1 蛋白更加稳定并调控前凋亡相关基因的表达,促进细胞凋亡^[35]。除了 SET7/9 报道对 E2F1 有甲基化作用外,组蛋白精氨酸甲基化转移酶 PRMT1,PRMT5 对 E2F1 也有甲基化修饰作用:PRMT1 在 E2F1 的 109 精氨酸进行甲基化,稳定 E2F1 蛋白促进凋亡^[19];而 PRMT5 对称性的甲基化 111 和 113 位的精氨酸,降低 E2F1 的稳定性,抑制了细

胞凋亡^[20,9]。可见组蛋白甲基转移酶家族介导的 E2F1 的甲基化修饰也在 E2F1 的活性调控中起着重要的作用。那么是否还有其它类型的组蛋白甲基化酶可以甲基化 E2F1 呢? 同时是否还有甲基化酶是通过甲基化 E2F1 来参与癌症的发生与发展呢? 在本文研究中, 我们成功纯化了 E2F1 蛋白, 并通过已报道对 E2F1 有甲基化作用的 SET7/9, 成功构建 E2F1 体外甲基化体系, 为后面筛选更多新的 E2F1 甲基化转移酶打下基础。

参考文献(References)

- [1] Ertosun MG, Hapil FZ, Osman Nidai O. E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling [J]. Cytokine & growth factor reviews, 2016, 13(1): 38-49
- [2] Putzer BM. E2F1 death pathways as targets for cancer therapy [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2007, 11(2): 239-251
- [3] Liu J, Qian C, Cao X. Post-Translational Modification Control of Innate Immunity[J]. Immunity. 2016, 45(1): 15-30
- [4] Wang LY, Hung CL, Chen YR, et al. Campbell M, et al. KDM4A Coactivates E2F1 to Regulate the PDK-Dependent Metabolic Switch between Mitochondrial Oxidation and Glycolysis [J]. Cell reports, 2016, 16(11): 3016-3027
- [5] Biswas AK, Johnson DG. Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage[J]. Cancer research, 2012, 72(1): 13-17
- [6] Frame FM, Rogoff HA, Pickering MT, et al. E2F1 induces MRN foci formation and a cell cycle checkpoint response in human fibroblasts [J]. Oncogene, 2006, 25(23): 3258-3266
- [7] Zhan L, Zhang Y, Wang W, et al. E2F1: a promising regulator in ovarian carcinoma [J]. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2016, 37(3): 2823-2831
- [8] Kumari A, Iwasaki T, Pyndiah S, et al. Regulation of E2F1-induced apoptosis by poly (ADP-ribosylation) [J]. Cell death and differentiation, 2015, 22(2): 311-322
- [9] Carnevale J, Palander O, Seifried LA, et al. DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis [J]. Molecular and cellular biology, 2012, 32(5): 900-912
- [10] Herskho T, Chaussepied M, Oren M, et al. Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F[J]. Cell death and differentiation, 2005, 12(4): 377-383
- [11] Elias J, Dimitrio L, Clairambault J, et al. The p53 protein and its molecular network: modelling a missing link between DNA damage and cell fate [J]. Biochimica et biophysica acta, 2014, 1844 (1 Pt B): 232-247
- [12] Udayakumar T, Shareef MM, Diaz DA, et al. The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy [J]. Seminars in radiation oncology, 2010, 20(4): 258-266
- [13] Farra R, Grassi G, Tonon F, et al. The Role of the Transcription Factor E2F1 in Hepatocellular Carcinoma [J]. Current drug delivery, 2016, 38(4): 23-31
- [14] Engelmann D, Putzer BM. Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance [J]. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anti-cancer chemotherapy, 2010, 13(4-5): 119-131
- [15] Palomer X, Alvarez-Guardia D, Davidson MM, et al. The interplay between NF-kappaB and E2F1 coordinately regulates inflammation and metabolism in human cardiac cells [J]. PloS one, 2011, 6(5): e19724
- [16] Blaser H, Dostert C, Mak TW, et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation[J]. Trends in cell biology, 2016, 10(4): 19-31
- [17] Poppy Roworth A, Ghari F, La Thangue NB. To live or let die - complexity within the E2F1 pathway [J]. Molecular & cellular oncology, 2015, 2(1): e970480
- [18] Pyndiah S, Sakamuro D. Restoration of tumor suppressor functions by small-molecule inhibitors[J]. Molecular & cellular oncology, 2015, 2(3): e991225
- [19] Sakamuro D, Folk WP, Kumari A. To die, or not to die: E2F1 never decides by itself during serum starvation[J]. Molecular & cellular oncology, 2015, 2(2): e981447
- [20] He Y, Korboukh I, Jin J, et al. Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers [J]. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2012, 44(1): 70-79
- [21] Meng YX, Wilson GW, Avery MC, et al. (1997) Suppression of the expression of a pancreatic beta-cell form of the kinesin heavy chain by antisense oligonucleotides inhibits insulin secretion from primary cultures of mouse beta-cells[J]. Endocrinology, 1997, 138(5): 1979-1987
- [22] Cui J, Wang Z, Cheng Q, et al. Targeted inactivation of kinesin-1 in pancreatic β -cells in vivo leads to insulin secretory deficiency [J]. Diabetes, 2011, 60(1): 320-330
- [23] Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (29): 25863-25866
- [24] Argyropoulos G, Stütz AM, Ilnytska O, et al. KIF5B gene sequence variation and response of cardiac stroke volume to regular exercise[J]. Physiol Genomics, 2009, 36(2):79-88
- [18] Takazawa K, Noguchi T, Hosooka T, et al. Insulin-induced GLUT4 movements in C2C12 myoblasts: evidence against a role of conventional kinesin motor proteins [J]. Kobe J Med Sci, 2008, 54: E14-22
- [19] Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y, et al. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization[J]. J Clin Invest, 2004, 114(11): 1666-1675
- [20] Huh MS, Parker MH, Scimè A, et al. Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation[J]. J Cell Biol, 2004, 166(6): 865-876
- [21] Varadi A, Ainscow EK, Allan VJ, et al. Involvement of conventional kinesin in glucose-stimulated secretory granule movements and exocytosis in clonal pancreatic beta-cells [J]. J Cell Sci, 2002, 115 (Pt21): 4177-4189

(上接第 4046 页)