

# SPIO标记对成骨样分化细胞 IRP1 基因及蛋白表达的影响

王广谊<sup>1,2</sup>, 颜丽芬<sup>1,2</sup>, 刘再毅<sup>2</sup>, 贾乾君<sup>2</sup>, 梁长虹<sup>2\*</sup>

(1. 南方医科大学, 广东 广州 510515; 2. 广东省人民医院//广东省医学科学院放射科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨超顺磁性氧化铁(SPIO)标记大鼠脂肪间充质干细胞(RADSC)后,其成骨样分化细胞中铁调节蛋白1(IRP1)基因及蛋白表达的变化。【方法】本实验采用转染剂多聚赖氨酸(PLL)介导 SPIO 标记 RADSC,然后将其诱导为成骨样分化细胞,分别在诱导后 0、7、14、21 d 进行 RT-PCR 及 Western blot 检测其 IRP1 基因及蛋白的表达。【结果】成骨样分化细胞 IRP1 mRNA 表达水平在 SPIO 标记与未标记组之间差异均无统计学显著性意义( $F = 1.571, P = 0.239$ ); IRP1 蛋白表达水平在标记与未标记组之间差异均无统计学显著性意义( $F = 0.547, P = 0.500$ )。【结论】SPIO 标记并未对成骨样分化细胞的 IRP1 基因及 IRP1 蛋白表达产生明显影响。

**关键词:**大鼠脂肪干细胞;成骨样分化细胞;超顺磁性氧化铁;铁调节蛋白1

中图分类号:R 811.1; Q74 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2013)02-0176-06

## Effects of SPIO Labeling on IRP1 Gene and Protein Expression in Osteoblast-like Cells

WANG Guang-yi<sup>1,2</sup>, YAN Li-fen<sup>1,2</sup>, LIU Zai-yi<sup>2</sup>, JIA Qian-jun<sup>2</sup>, LIANG Chang-hong<sup>2\*</sup>

(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Radiology, Guangdong General Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To evaluate the effects of SPIO labeling on the IRP1 gene and protein expression in osteoblast-like differentiated cells.【Methods】To label the RADSC with SPIO and transfection agent PLL, then induce SPIO labeled and unlabeled RADSC into osteoblastic differentiation cells. Real-time quantitative PCR and Western blot was used to exam the expression level of IRP1 gene and protein on the 0 day, 7 day, 14 day, and 21day after induction.【Result】The expression of IRP1 gene of osteoblast-like cells had not changed significant after labeling ( $F = 1.571, P = 0.239$ ). The expression of IRP1 protein of osteoblast-like cells had not changed significant after labeling ( $F = 0.547, P = 0.500$ ).【Conclusion】Osteoblast-Like cells were not effected by SPIO not only in the aspect of IRP1 gene, but also in IRP1 protein.

**Key words:** RADSC; osteoblast-like cells; SPIO; IRP1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2): 176-181]

干细胞移植在修复损伤组织如骨骼组织方面具有非常光明及诱人的前景<sup>[1]</sup>。但干细胞移植入活体动物后的示踪技术一直是制约干细胞研究发展的瓶颈环节。使用(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记干细胞,然后利用核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)无创地追踪干细胞在活体内的生长、分化、归巢、代谢等情况,是目

前最具前途的干细胞示踪技术之一<sup>[2]</sup>。然而,使用 SPIO 标记干细胞存在安全性问题。因为 SPIO 含有大量的铁元素,过量的铁元素具有强烈的细胞毒性<sup>[3]</sup>。Arbab<sup>[4]</sup>等研究已经证实,SPIO 标记干细胞时,细胞内的铁浓度会较未标记细胞增加数十至百倍。在这种情况下,干细胞及其分化细胞,如成骨样分化细胞在分化过程中能否维持细胞内的

收稿日期:2012-10-08

基金项目:国家自然科学基金(30970798),广东省医学科研基金(A2011036, B2011017)

作者简介:王广谊,南方医科大学在读博士,主治医师,研究方向:神经影像学。E-mail: superwgy@gmail.com; \*通信作者:梁长虹, E-mail: dr\_liang62@hotmail.com

铁稳态是非常值得研究的问题。目前已知,铁调节蛋白 1(iron regulatory proteins 1,IRP1)是维持细胞内铁稳态的重要蛋白,IRP1 通过与转铁蛋白受体(TfR)和铁蛋白(Fn)mRNA 上的高度保守的非翻译区(UTR)作用得以实现铁的调控功能<sup>[5]</sup>。因此,检测 SPIO 标记后的干细胞在向成骨细胞分化过程中细胞内的 IRP1 水平,能间接评价细胞内的铁稳态的维持情况。本实验通过测量 SPIO 标记大鼠脂肪间充质干细胞 (rat adipose-derived stem cell, RADSC)后,其成骨样分化细胞内的 IRP1 基因及蛋白表达的情况,初步探讨 SPIO 标记对成骨样分化细胞铁稳态调节系统的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 动物及试剂 使用健康清洁级 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠,3 周龄,体质量 100 ~ 120 g,购自中山大学动物实验中心;成骨诱导液,购自 Cyagen 公司;SPIO(Resovist,德国先灵公司);PR-PCR 试剂盒,购自 TAKARA;IRP1 兔抗多克隆抗体,购自 Millipore 公司。碱性磷酸酶(ALP)试剂盒,购自 Bio Assay Systems 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 RADSC 提取 无菌条件下,提取大鼠腹股沟脂肪组织,充分剪碎后加入 0.25%II 型胶原酶溶液,37 °C 水浴消化 30 min;加入适量胎牛血清中止消化;1 500 r/min(离心机半径  $r = 20$  cm)离心 10 min,弃上清液;重悬细胞后接种于培养瓶内,置于 37 °C,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;传至第 3 代,使用流式细胞仪检测 CD29,CD44,CD31,CD34 表达水平,以鉴定 RADSC。

1.2.2 PLL 介导 SPIO 标记 RADSC 无血清培养基内加入 SPIO(35 μg/mL)和 PLL(0.75 μg/mL),室温下混匀;将其加入 RADSC 培养瓶内,37 °C,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养 16 h;PBS 洗涤标记细胞 3 次,除去多余 SPIO。

1.2.3 SPIO 标记检测 普鲁士兰染色:取部分标记细胞直接涂片;风干后甲醇固定 10 min,将固定后的细胞玻片完全置于普鲁士蓝溶液中,37 °C 孵育 30 min;蒸馏水冲洗 1 min;核固红复染 10 min;蒸馏水冲洗 1 min;光学显微镜观察 SPIO 标记率,每个样本进行多视野计数。

1.2.4 RADSC 向成骨样细胞诱导分化 SPIO 标记 RADSC 后 24 h,将 SPIO 已标记及未标记 RADSC 分别接种于 6 孔板中,加入成骨诱导分化液(主要成分为:DMEM 低糖培养液、胎牛血清、双抗、谷氨酰胺、VitC、β<sub>2</sub>-磷酸甘油钠、地塞米松)2 mL/孔,置 37 °C,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内培养。

1.2.5 成骨样分化细胞鉴定 茜素红染色法:成骨样细胞诱导后第 14 天,取出载有拟染色细胞的六孔板,PBS 液洗涤 3 次;每孔加入 40 g/L 多聚甲醛 2 mL,固定细胞 30 min;PBS 液洗涤后每孔加入茜素红染色剂(0.5%)1 mL,室温下静置 3 ~ 5 min。PBS 液洗涤后自然晾干。于倒置显微镜下观察(图 3)。碱性磷酸酶(ALP)活性定量检测:成骨样细胞诱导后第 7、14、21 d 分别于载有待分析细胞的 6 孔板,每孔加入 0.2% Triton X-100 液 0.5 mL,室温下轻摇动 20 min,将细胞溶液 25 μL 加入 96 孔板内待用;配制 ALP 活性分析液:使用一洁净 96 孔板,每孔加入 200 μL 缓冲液,5 μL(5 mmol)醋酸镁,2 μL(10 mmol)硝基磷酸苯酯(pNPP),使用移液枪轻轻混匀,待用;将各样本的细胞溶液 25 μL 分别加入 96 孔板内,然后在各孔内加入 ALP 分析液 175 μL,使用排枪轻轻混匀;将 96 孔板放入分光光度仪中,选取 OD<sub>405nm</sub> 进行测量,记下测量时间  $t = 0$ 。4 min 后( $t = 4$ ),重复测量一次。根据分光光度仪读数,计算各样本 ALP 活性。

1.2.6 IRP1 RT-PCR 检测 选取 SPIO 标记组及非标记组细胞,分别于成骨诱导后 0、7、14、21 d 进行 RT-PCR 反应以观察 IRP1 基因表达情况。检测操作重复 3 次。正义链为:5'-TTACCAAGCA CCTCGACAA-3';反义链为:5'-AATCCTGCGCC TAACATCA-3'。以 GAPDH 为内参照。逆转录反应条件为:37 °C 15 min;85 °C 5 s。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 2 min;依次 94 °C 30 s、58 °C 30 s 及 72 °C 30 s 运行 33 个循环;72 °C 5 min;4 °C 终止。

1.2.7 Weston-Blot 检测 选取 SPIO 标记组及非标记组细胞,分别于成骨诱导后 0、7、14、21 d 进行 Weston-Blot,检测其 IRP1 蛋白的含量,以 GAPDH 为内参照。实验重复操作 3 次。

1.2.8 统计学方法 使用 SPSS 17 统计软件对所得数据使用重复测量方差分析比较组间的总体差异及组内的差异。

## 2 结 果

### 2.1 RADSC 细胞鉴定

对第三代 RADSC (图 1)行流式细胞仪检测,其中表达 CD29 的细胞为 98%,表达 CD44 的细胞为 97%;而表达 CD31 的细胞只有 9%,5%的细胞表达 CD34。

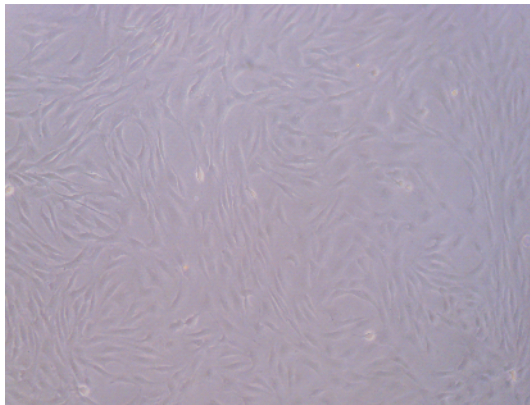


图 1 P3 代 RADSC

Fig.1 The third passage of RADSC

The cells exhibited a population of spindle-shaped( $\times 100$ ).

### 2.2 SPIO 标记 RADSC 效率

使用终浓度为 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SPIO 标记 RADSC 16 h 后,行普鲁士蓝染色,可见胞浆内有大量蓝染铁颗粒(图 2)。光学显微镜下观察标记组细胞标记率达 95%。

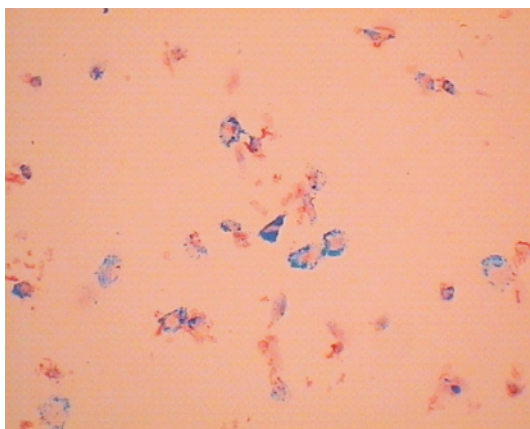


图 2 SPIO 标记 RADSC 后普鲁士蓝染色

Fig.2 Prussian blue-stained RADSC labeled with SPIO, blue particles can be observed in cytoplasm( $\times 200$ )

### 2.3 成骨样分化细胞鉴定

茜素红染色法:SPIO 标记组及未标记组成骨样分化细胞在诱导后第 14 天,使用茜素红染色,两组细胞均可发现大量钙盐沉积(图 3)。ALP 活性定量检测:分别于成骨诱导后 7、14、21 d 行 ALP 活性定量检测,所得数据使用重复测量方差分析比较组间的总体差异及组内的差异。诱导组细胞 ALP 活性水平与非诱导对照组比较差异有统

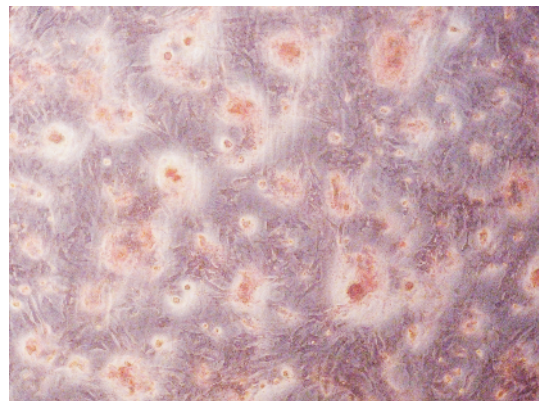


图 3 RADSC 成骨诱导液培养 14 d 后使用茜素红染色

Fig.3 Alizarin red staining of RADSC cultured by osteoblastic differentiated medium for 14 days

The red stained particles were deposits of calcium salt( $\times 40$ ).

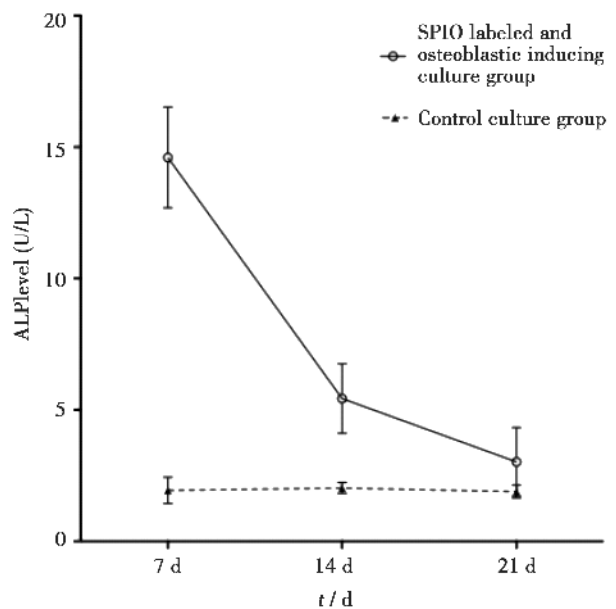


图 4 成骨样诱导分化对 SPIO 标记 RADSC 细胞 ALP 活性水平影响

Fig.4 The effect of osteoblastic differentiated culture on ALP expression of SPIO labeled RADSC

计学显著意义 ( $P = 0.000$ , 图 4); 诱导组内各时间点碱性磷酸酶活性差异有统计学显著意义 ( $P = 0.000$ )。

### 2.4 RT-PCR 检测

PCR 产物电泳结果(图 5)目的条带清晰明亮, 未见非特异性二聚体。GAPDH 产物大小约 300 bp 左右, IRP1 链产物大小约 98 bp; 各产物所得到的大小与引物设计时的预期大小基本一致。RADSC 成骨样分化细胞 SPIO 标记组与未标记组 IRP1 mRNA 在不同时间点的表达水平见(图 6)。经重复测量方差分析标记组 IRP1 mRNA 的表达水平与未标记组

比较差异无统计学显著意义 ( $P = 0.239$ ); RADSC 成骨样分化细胞标记组各时间点 IRP1 mRNA 表达水平, 差异有统计学显著意义 ( $P = 0.007$ )。

### 2.5 Western-Blot 检测

RADSC 成骨样分化细胞 SPIO 标记组与未标记组 IRP1 蛋白在不同时间点的表达水平见 (图 7)。所得蛋白电泳条带清晰(图 8)。经重复测量方差分析, 标记组 IRP1 蛋白表达水平与未标记组 IRP1 蛋白表达水平差异无统计学显著意义 ( $P = 0.239$ ); 标标记组各时间点间差异有统计学显著意义 ( $P = 0.007$ ); 未标记组各时间点 IRP1 蛋白表达水平差异有统计学显著意义 ( $P = 0.014$ )

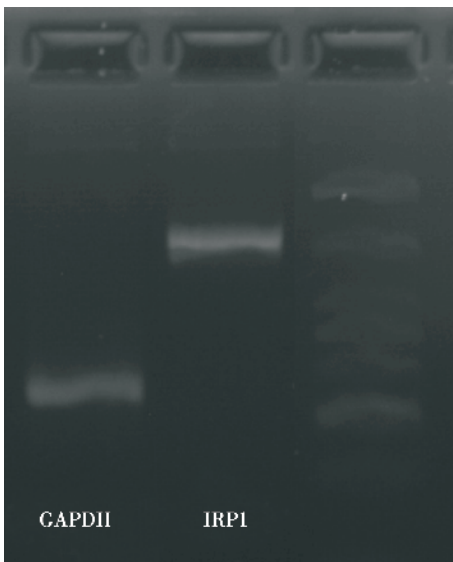


图 5 IRP1 PCR 电泳产物结果

Fig.5 Results of PCR electrophoresis products

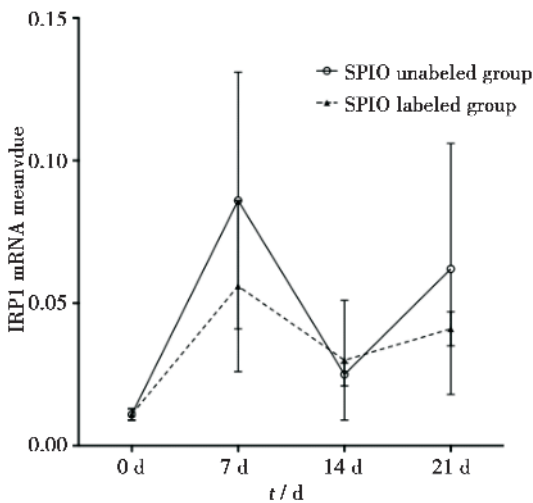


图 6 SPIO 标记对 RADSC 成骨样分化细胞 IRP1 mRNA 表达影响

Fig.6 Effect of SPIO labeled on IRP1 mRNA of osteoblastic-like RADSC

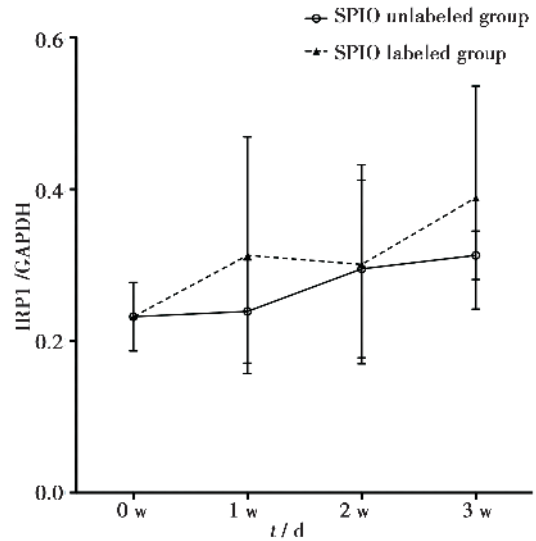


图 7 SPIO 标记对 RADSC 成骨样分化细胞 IRP1 蛋白表达影响的曲线图

Fig.7 Effect of SPIO labeling on IRP1 protein expression of RADSC osteoblastic-like differentiated cells

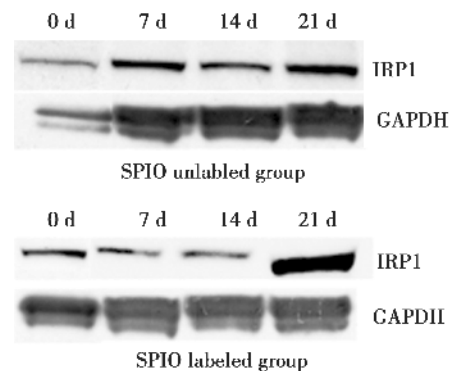


图 8 成骨样分化细胞 IRP1 电泳蛋白条带  
Fig.8 Weston blot protein analysis of IRP1

### 3 讨 论

目前对于 SPIO 标记干细胞后会否影响其分化、增值潜能,一直存有争议,虽然有较大多数的研究证实一定浓度范围内,SPIO 不会影响标记干细胞的活力、增殖能力及多向分化潜能<sup>[6]</sup>。但也有不同的研究结论,例如 Kostura 等<sup>[7]</sup>研究发现,使用 SPIO 标记干细胞,会影响干细胞向软骨细胞方向的有效分化。Schafer 等<sup>[8]</sup>研究发现,使用 SPIO 标记的干细胞移植治疗多发性硬化时,被试者症状加重,而采用未标记的干细胞移植则症状减轻。因此,SPIO 标记干细胞的安全性尚未有定论,还需要进一步的研究。本实验选用 RADSC 成骨样分化细胞为特定研究对象,以探讨 SPIO 标记对此类细胞的分化及铁调节的影响。

2001 年,Zuk 等<sup>[9]</sup>从人抽脂术中抽取的脂肪组织悬液中第一次成功分离取得了脂肪间充质干细胞(ADSCs),为干细胞的来源提供了新的选择,由于其具有取材快捷、方便、廉价等明显优点,脂肪干细胞迅速引起人们的关注。目前常用的 ADSCs 为大鼠脂肪间充质干细胞(RADSC),研究者已成功从大、小鼠等动物的不同部位(如腹股沟、颈后、附睾及内脏)的脂肪组织中分离得到 RADSC<sup>[10-11]</sup>。故本研究选取其为研究对象。检测细胞表面抗原分子和特异性蛋白是常用的鉴定间充质干细胞的方法<sup>[12]</sup>。目前,已知的用于鉴定干细胞的表面标记蛋白主要有:CD117、CD166、CD105、CD59、CD45、CD44、CD38、CD14、CD29 等,但几乎不表达 CD34<sup>[13-14]</sup>。我们从 SD 大鼠腹股沟处脂肪组织分离出的细胞,培养至第 3 代,使用流式细胞仪进行检测,发现表达 CD29 的细胞为 98%,表达 CD44 的细胞为 97%;而表达 CD31 的细胞只有 9%,5%的细胞表达 CD34。这一结果符合间充质干细胞的特征,与文献报道类似<sup>[13-14]</sup>。因此,可以证实,本实验中获取、提纯所得的细胞为脂肪来源的间充质干细胞。

本实验使用了较为公认的方法为“鸡尾酒”法<sup>[15]</sup>对 rADSC 进行成骨样分化诱导。加入多种化学物质对干细胞进行诱导培养,这些物质包括地塞米松、骨化三醇、维生素 C、 $\beta$ -甘油磷酸钠等。体外诱导成骨细胞鉴定目前尚存在一定争议<sup>[16]</sup>,最有价值的方法之一是对成骨诱导细胞在诱导后 14 d 进行茜素红染色。由于成骨细胞的特性是

在细胞外基质形成钙沉积,茜素红染色对钙结晶物非常敏感,因此它能在干细胞向成骨细胞分化的早期(7-16 天)就能特异地检测钙沉积。本实验中,在 RADSC 向成骨分化的第 14 天进行茜素红染色,发现 SPIO 标记组及未标记组钙沉积均明显增多(图 3),可推测 rADSC 已经成功向成骨样细胞分化,而且 SPIO 标记,并未对 rADSC 向成骨细胞分化产生明确影响。为了进一步证明我们所诱导的 RADSC 成功向成骨细胞分化,我们进一步对被诱导细胞进行 ALP 活性检测。ALP 是在碱性环境下催化磷酸酯水化的酶。在哺乳动物中,ALP 主要存在于肝脏及骨骼中。因此通过检测细胞中的 ALP 水平,可以鉴别细胞是否来源于肝或骨骼组织。细胞 ALP 活性水平检测是目前鉴定成骨细胞的最主要方法<sup>[15-16]</sup>。本实验中,分别在成骨诱导后 7、14、21 d 检测细胞 ALP 活性。我们发现在 rADSC 被诱导后 7 d 左右,其 ALP 活性水平显著增高。在诱导后第 14、21 d,ALP 逐渐回落到正常水平,这与文献描述相符<sup>[17]</sup>。这进一步证实我们使用的方法能成骨将 RADSC 诱导为成骨细胞。

目前已知,IRP1 为维持细胞内铁稳态的关键性调控蛋白之一。当细胞内铁超载时,IRP1 数量减少,与铁蛋白(Fn) mRNA 5'端不结合或者结合力下降,导致 Fn mRNA 保持稳定,不易被降解,因此其翻译增加,导致 Fn 含量增多,大量螯合细胞质中的游离铁,减低游离铁的浓度,因而,细胞内铁稳态得以维持;另外 IRP1 与转铁蛋白受体(TfR) mRNA 3'端不结合或者结合力下降,导致 TfR mRNA 易发生降解,导致细胞膜表面的 TfR 数量下降,细胞摄取铁量减少<sup>[6]</sup>。若细胞内铁浓度下降时,则执行相反的调控过程<sup>[8,18]</sup>。因此检测 IRP1 的表达水平,是判断细胞内铁稳态是否得以维持的重要因素。SPIO 标记 RADSC 后向成骨诱导分化,在 0、7、14、21 d 使用 RT-PCR 及 Western Blot 实验方法分别对其 IRP1 的基因及蛋白表达水平进行了定量检测,发现 IRP1 基因及蛋白表达水平在标记与未标记组之间差异均无统计学显著性意义。笔者推测,这很可能是由于当细胞内铁超载时,IRP1 数量上的变化只发生在铁超载(SPIO 标记)的早期,如 24h 内,之后 IRP1 数量迅速回复,本研究在 SPIO 标记 rADSC 24h 后对其进行成骨样分化诱导,很可能错过了 IRP1 数量变化的时间窗。另一可能的原因为当细胞内发生铁超载时,

IRP1 的数量并不发生明确改变,只是其与 Fn mRNA 5' 端及 TfR mRNA 3' 端的结合力发生改变,从而实现对 Fn 及 TfR 的调控作用。这需要进一步的实验加以证实。就目前所得的结果而言,我们可以初步得出以下结论:SPIO 标记后对成骨样分化细胞 IRP1 基因及蛋白表达并无明确影响。SPIO 并未明显破坏成骨样分化细胞内的铁调节系统。SPIO 作为成骨样分化细胞的示踪剂,应该是安全可行的。

#### 参考文献:

- [1] Gastaldi G, Asti A, Scaffino MF, et al. Human adipose-derived stem cells (hASCs) proliferate and differentiate in osteoblast-like cells on trabecular titanium scaffolds[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 94(3): 790-799.
- [2] Cromer Berman SM, Walczak P, Bulte JWM. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2011, 3(4): 343-355.
- [3] Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2001, 55(6): 333-339.
- [4] Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques[J]. *Transplantation*, 2003, 76(7): 1123-1130.
- [5] Hirling H, Henderson BR, Kuhn LC. Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase[J]. *EMBO J*, 1994, 13(2): 453-461.
- [6] Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease[J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(8): 406-414.
- [7] Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, et al. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis[J]. *NMR Biomed*, 2004, 17(7): 513-517.
- [8] Schafer R, Kehlbach R, Wiskirchen J, et al. Transferrin receptor upregulation: in vitro labeling of rat mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide[J]. *Radiology*, 2007, 244(2): 514-523.
- [9] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228.
- [10] Zhang C, Wängler Br, Morgenstern B, et al. Silica- and alkoxy-silane-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imaging [J]. *Langmuir*, 2007, 23(3): 1427-1434.
- [11] Kakite S, Fujii S, Nakamatsu S, et al. Usefulness of administration of SPIO prior to RF ablation for evaluation of the therapeutic effect: an experimental study using miniature pigs[J]. *Eur J Radiol*, 2011, 78(2): 282-286.
- [12] Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(10): 680-686.
- [13] Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Yang JQ, et al. Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering [J]. *Cells Tissues Organs*, 2008, 187(4): 263-274.
- [14] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 376-385.
- [15] Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, et al. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow[J]. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(3): 312-324.
- [16] Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2): 183-187.
- [17] Huang J-W, Chen W-J, Liao S-K, et al. Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in A carrier system of Pluronic F127 and Interpore [J]. *Chang Gung Med J*, 2006, 29(4): 363-372.
- [18] Wang W, Di X, D'Agostino RB, et al. Excess capacity of the iron regulatory protein system [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 24650-24659.

(编辑 孙慧兰)