

# 含 bFGF 的壳聚糖- 胶原复合支架对牙周膜细胞生长和增殖的影响

李容林<sup>1</sup>, 李春阳<sup>1</sup>, 张伟<sup>2</sup>

(中山大学 1. 光华口腔医学院·附属口腔医院; 2. 中山医学院组织学胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨含碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的壳聚糖- 型胶原复合支架对人牙周膜细胞 (HPDLC) 生长和增殖的影响。【方法】MTT 法观察含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架浸出液、不含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架浸出液以及正常细胞培养液对 HPDLC 生长和增殖的影响, 利用流式细胞仪 (FCM) 检测上述 3 种液体对 HPDLC 细胞周期的影响, 并将 HPDLC 接种于含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架和不含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架内, 通过免疫细胞组织化学和激光共聚焦显微镜来检测 HPDLC 在复合支架内的存活和增殖情况。【结果】含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架浸出液对 HPDLC 生长和增殖的促进作用明显强于不含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架浸出液和正常细胞培养液, 而后两组间无统计学意义; 含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架浸出液促进 HPDLC 从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期, HPDLC 在含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架内的生长和增殖也明显优于不含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架。【结论】含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架可以促进体外培养的 HPDLC 生长和增殖。

**关键词:** 碱性成纤维细胞生长因子; 壳聚糖; 型胶原; 复合支架; 牙周膜细胞

中图分类号: R739.82

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554 (2007) 04- 0434- 05

## Effects of Chitosan- collagen Composite Scaffold Carrying bFGF on HPDLC Growth and Proliferation

LI Rong-lin<sup>1</sup>, LI Chun-yang<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>

(1. Guanghua College of Stomatology, 2. Department of Histology and Embryology of Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effects of chitosan- type collagen composite scaffold combining with bFGF on HPDLCs growth and proliferation. 【Methods】The effects of leachate of chitosan- type collagen composite scaffold carrying bFGF, leachate of chitosan- type collagen composite scaffold without bFGF, and normal cell culture fluid on HPDLCs growth and proliferation were studied by MTT. The effects of three kinds of fluids on HPDLCs cell cycle were studied by flow cytometer (FCM). HPDLCs were inoculated into chitosan- type collagen composite scaffold combining with bFGF and chitosan- type collagen composite scaffold without bFGF, then the information about HPDLCs growth and proliferation were studied by immunocytochemistry and laser confocal microscopy. 【Results】The promotion of chitosan- type collagen composite scaffold combining with bFGF leachate on HPDLCs growth and proliferation was better than those of chitosan- type collagen composite scaffold without bFGF leachate and normal cell culture fluid, there had no difference between the last two groups. The leachate of chitosan- type collagen composite scaffold combining with bFGF promoted more HPDLCs from G<sub>1</sub> phase into S phase, and the growth and proliferation of HPDLCs inoculated in chitosan- type collagen composite scaffold combining with bFGF were better than those in chitosan- type collagen composite scaffold without bFGF. 【Conclusion】The chitosan- type I collagen composite scaffold carrying bFGF can promote the growth and proliferation of HPDLCs in vitro.

**Key words:** basic fibroblast growth factor; chitosan; type collagen; composite scaffold; periodontal ligament cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):434- 438]

收稿日期 2006-12-24

基金项目 广东省科技计划项目 (2004B31201003)

作者简介 李容林 (1954- ) 男, 副主任医师, 课题负责人, E-mail: zgdironglin@163.com

牙周组织缺损的修复主要针对牙周韧带、牙骨质和牙槽骨,目前利用组织工程材料修复牙周组织缺损的研究很多<sup>[1-3]</sup>。组织工程的三大基本要素是种子细胞、可降解的支架材料与细胞生长调节因子。当前组织工程化组织的构建方式有3种:支架材料+种子细胞; 支架材料+生长因子; 支架材料+种子细胞+生长因子。本课题组在先期研究壳聚糖- 型胶原复合支架材料的基础上<sup>[4]</sup>,将人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, HPDLC) 接种于含碱性成纤维细胞生长因子 (recombinant human basic fibroblast growth factor, bFGF) 的壳聚糖- 型胶原复合支架内,观察细胞的生长和增殖情况,从而探讨这种新型复合支架用于牙周引导性组织再生的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料、试剂和设备

壳聚糖 (Sigma, 脱乙酰度 85%), 型胶原(广州创尔生物技术有限公司), DMEM(Sigma) 胎牛血清(FBS, Gibco), 胰蛋白酶 (Trypsin, Ameresco), 波形丝蛋白 (Vimentin, Sigma), 角蛋白 (Keratin, 博士德), SABC-FITC 免疫组化试剂盒 (博士德), SAN YOMDF2192A T 型超低温保存箱 (日本), Unicryo MC2L-60 冷冻干燥机(德国), HITACHI S-3000N 扫描电镜 (日本), 激光共聚焦显微镜 (德国蔡司)。

### 1.2 壳聚糖- 型胶原复合支架的制备

室温下将壳聚糖溶于 0.2 mol/L 乙酸并搅拌均匀,配成 20 g/L 的壳聚糖溶液, 型胶原以同等浓度乙酸配成 4.6 g/L 的胶原溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤除菌,壳聚糖、 型胶原按体积比 1:1 混合, 一组加入 bFGF (10 ng/mL) 为 A 组, 另一组为 B 组, 加入同等量的 DMEM, 搅拌均匀后离心除渣脱泡。将溶液倾入预冷的 24 孔板中在 -20  $^{\circ}\text{C}$  下冻存 24 h, 后移入冻干机冻干 24 h, 密封 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 壳聚糖- 型胶原复合支架扫描电镜和孔径大小、孔隙率的测定

取以上支架材料, 浸入液氮后折断, 分别对其表面和内部结构喷铂金处理, 扫描电子显微镜下加速电压 20 kV, 放大不同倍数观察, 并在材料内部选取 5 个高倍视野 (100 倍), 每视野测量 10 个孔径值, 计算材料的平均孔径。采用液体位移法测定支架的孔隙率<sup>[5]</sup>。将支架样本切成 5 mm  $\times$  5 mm

大小, 置入体积为  $V_1$  的无水乙醇中, 5 min 后负压吸引脱气, 使乙醇充分进入多孔支架的孔隙中, 直至再无气泡逸出, 此时乙醇体积 (浸没支架) 计为  $V_2$ 。轻轻将浸满乙醇的支架样品取出, 剩余乙醇体积计为  $V_3$ 。支架的孔隙率如下计算:  $\rho = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3)$ , 每个样本测 5 次, 取其均值。

### 1.4 HPDLC 的体外培养和鉴定

参照 Inoue 培养方法<sup>[6]</sup>, 取因正畸需要拔除的新鲜第一前磨牙, 刮取根中 1/3 牙周膜组织, 剪成 1 mm<sup>3</sup> 碎块, 以含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}\text{C}$  条件下细胞培养箱中孵育, 细胞快长满培养瓶底时用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代, 取第 4 或 5 代细胞用于实验。消化第 5 代 HPDLCs, 接种于六孔板中的盖玻片上, 培养 3 d 后用 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 正常山羊血清室温封闭 20 min, 滴加一抗 (小鼠抗人波形丝蛋白 (1:500), 小鼠抗人角蛋白 (1:200)) 于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 加抗小鼠 IgG-FITC 荧光二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 加 Hoechst 33342 室温孵育 20 min 标记细胞核, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次后荧光封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

### 1.5 MTT 法和流式细胞仪检测

将复合支架 A (含 bFGF) 和复合支架 B (不含 bFGF) 按 3 cm<sup>2</sup>/mL (材料/培养液) 的比例置含 FBS 的 DMEM 培养液中, 37  $^{\circ}\text{C}$  浸泡 72 h, 收集浸出液用于培养 HPDLC。取生长良好的第 5 代 HPDLC, 调整细胞密度为  $1 \times 10^5$ /mL 接种细胞于 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。在饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}\text{C}$  标准环境下培养细胞 48 h, 弃去培养液及未贴壁的 HPDLC。细胞分为 A、B 和 C3 组 (每组 32 孔), 分别加入浸出液 A、浸出液 B 和含 FBS 的 DMEM 培养液, 每孔 200  $\mu\text{L}$ 。每组分为 1、3、5 和 7 d 4 个时间点 (每个时间点各 8 孔), 分别于接种后 1、3、5、7 d 弃去培养液, 每孔加入 0.01 mol/L PBS 100  $\mu\text{L}$ 、MTT (1 mg/mL) 液 20  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 后弃去液体, 加入 200  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (DMSO), 震荡 10 min 后, 用分光光度计以 490 nm 波长光测每孔吸光度 ( $A_{490}$ ) 值, SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析。取浸出液 A 和浸出液 B 加入生长良好的第 5 代 HPDLCs 培养瓶中, 培养 5 d 后消化收集细胞, 流式细胞仪检测细胞周期, 以正常培养的 HPDLCs 作为对照,

重复三次,结果行单因素方差分析。

### 1.6 HPDLCs在复合支架的种植和存活检测

取生长良好的第 5 代 HPDLC,以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化、收集和离心, Hoechst 33342 标记细胞 1 h,洗涤、离心后以正常培养液将细胞稀释成  $1 \times 10^5$  /mL 备用。先将复合支架 A (含 bFGF) 和复合支架 B (不含 bFGF) 修成 5 mm  $\times$  5 mm  $\times$  5 mm 大小置于培养皿中,然后滴加细胞悬浮液 100  $\mu$ L,培养箱中静置 1 h 后再缓慢加入培养液,液面刚刚浸没复合支架,在饱和湿度、5%CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 标准环境下培养细胞。分别于培养 1、3、7 和 14 d 后取出复合支架,恒温冰冻切片机制片,片厚 50  $\mu$ m,按上述方法作波形丝蛋白免疫荧光化学染色。激光共聚焦显微镜下扫描支架,高倍镜下随机取 10 个视野,计数每 mm<sup>2</sup> 细胞数,每组样本每个时间点各 5 个复合支架。结果行 One way ANOVA 检验。

## 2 结 果

### 2.1 壳聚糖屏障膜的微观结构、孔隙率

冻干后制备的壳聚糖-型胶原复合支架呈白色海绵状,表面粗糙,内部呈海绵状多孔结构(图 1)。复合支架 A 和复合支架 B 微观结构一致,内部孔径测量分别为  $(158 \pm 17) \mu\text{m}$  和  $(150 \pm 18) \mu\text{m}$ ,孔隙率分别为  $90.8\% \pm 0.5\%$  和  $91.1\% \pm 0.5\%$ ,两种支架的孔隙率无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

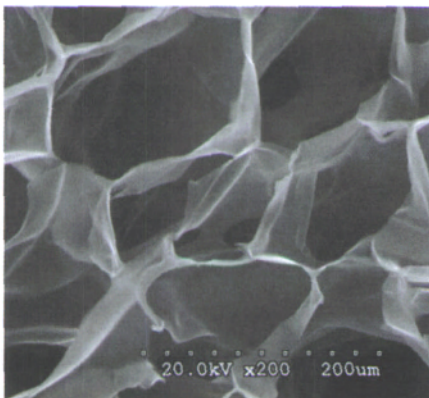


图 1 壳聚糖-型胶原复合支架内部结构扫描电镜

Fig.1 The inside structure of chitosan-type collagen composite scaffold under scanning electron microscope ( $\times 200$ )

### 2.2 HPDLC 的体外培养和鉴定

原代培养 3 d 后可见人 PDLCs 从组织块中向四周爬出(图 2A),传代几次后可以得到纯度较高

的人 PDLC 细胞呈梭形或星形,胞突细长,放射状排列,胞体丰满,胞浆均匀,核圆形或卵圆形,为成纤维样细胞(图 2B)。细胞波形丝蛋白染色阳性(图 2C),角蛋白染色阴性(图 2D),由此可证明其中胚层组织来源。

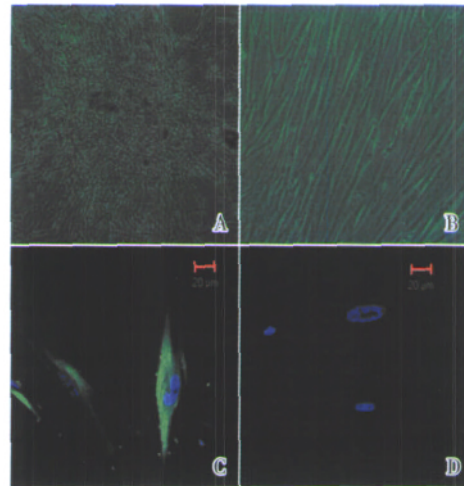


图 2 HPDLC 的培养和鉴定

Fig.2 The culture and identification of HPDLC

A: the primary culture of HPDLC; B: the fifth generation of HPDLC; C: the positive HPDLC of vimentin (green) and the cell nuclei labeled blue by hoechst33342 (bar: 20  $\mu\text{m}$ ); D: the negative HPDLCs of keratin, only the blue cell nuclei labeled by hoechst33342 can be detected (bar: 20  $\mu\text{m}$ ).

### 2.3 壳聚糖-型胶原复合支架浸出液对 HPDLC 增殖和细胞周期的影响

通过 MTT 法检测细胞吸光度得知,在细胞培养第 1 天,正常培养组、复合支架 A 浸出液组和复合支架 B 浸出液组间无显著性差别,第 3、5、7 天,正常培养组、复合支架 B 浸出液组间仍然无显著性差别,但是复合支架 A 浸出液组细胞吸光度在各时间点都明显高于其他两组(表 1)。经流式细胞仪测试三组细胞周期时相结果见表 2,与正常培养组和浸出液 B 组相比,浸出液 A 组的 G<sub>1</sub> 期(DNA 合成前期)细胞所占百分比明显降低,而 S 期(DNA 合成期)细胞所占百分比升高,反映细胞增殖活力的增殖指数 Pri 值 (S + G<sub>2</sub>M) 也明显升高。

### 2.4 含 bFGF 壳聚糖-型胶原复合支架促进人 PDLC 在其内的存活和增殖

通过激光共聚焦显微镜扫描计数发现,细胞种植入复合支架内后 1 d,两种支架内细胞数目基本一致(图 3,  $P > 0.05$ ),可见分布于支架内的绿色细胞胞体和蓝色的细胞核(图 4A, 4D)。细胞种植

表 1 HPDLCs 在三组培养液中不同时间点的  $A_{430}$  值

Groups	1 d	3 d	5 d	7 d
Normal	0.078 $\pm$ 0.004	0.099 $\pm$ 0.006	0.103 $\pm$ 0.014	0.091 $\pm$ 0.027
Leachate A	0.076 $\pm$ 0.003	0.149 $\pm$ 0.011 <sup>1) 2)</sup>	0.166 $\pm$ 0.026 <sup>1) 2)</sup>	0.185 $\pm$ 0.026 <sup>1) 2)</sup>
Leachate B	0.077 $\pm$ 0.004	0.109 $\pm$ 0.022	0.118 $\pm$ 0.031	0.114 $\pm$ 0.040

One way ANOVA, 1)  $P < 0.05$  vs normal group, 2)  $P < 0.05$  vs Leachate B group

表 2 HPDLCs 在三组培养液中培养 5 d 后的细胞周期检测

Groups	$G_1$	S	$G_2+M$	PrI
Normal	75.8 $\pm$ 0.4	13.5 $\pm$ 0.6	10.8 $\pm$ 0.6	24.2 $\pm$ 0.4
Leachate A	72.1 $\pm$ 0.4 <sup>1) 2)</sup>	16.8 $\pm$ 0.4 <sup>1) 2)</sup>	11.2 $\pm$ 0.4	27.9 $\pm$ 0.4 <sup>1) 2)</sup>
Leachate B	76.1 $\pm$ 0.4	13.3 $\pm$ 0.6	10.6 $\pm$ 0.4	23.9 $\pm$ 0.4

One way ANOVA, 1)  $P < 0.05$  vs normal group, 2)  $P < 0.05$  vs Leachate B group

入复合支架内后 3 d, 两种支架内细胞数目均明显减少, 但是复合支架 A 内细胞存活数目明显高于复合支架 B 内的 (图 3,  $P < 0.01$ ; 图 4B, 4E)。细胞种植入复合支架内后 7 d 和 14 d, 细胞数目明显增加, 但是, 在每一时间点, 复合支架 A 内的细胞数均明显高于复合支架 B 内的 (图 3,  $P < 0.01$ ; 图 4C, 4F)。

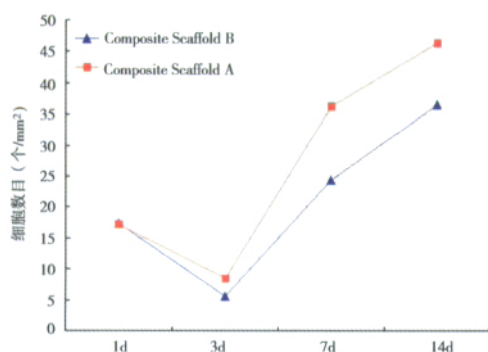


图 3 HPDLCs 在复合支架 A、B 内的存活和增殖曲线图

Fig.3 The curve diagram of HPDLCs surviving and proliferating in composite scaffold A and B

### 3 讨论

屏障膜的性能是决定牙周引导组织再生成败的一个关键因素。本研究之所以采用壳聚糖和

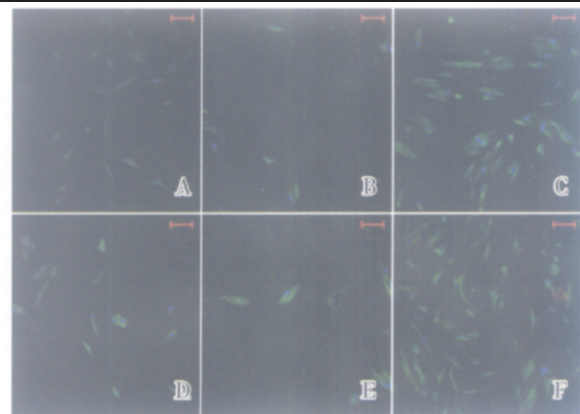


图 4 不同时间点复合支架 A、B 内存活 HPDLC 的激光共聚焦显微镜图像

Fig.4 The laser confocal microscopy pictures of surviving HPDLCs in composite scaffold A and B at different time

A, B, C: HPDLCs in composite scaffold B for 1, 3, and 14 d, respectively; D, E, F: HPDLC in composite scaffold A for 1, 3, and 14 d respectively (immunocytochemistry, bar: 100  $\mu$ m)

型胶原的复合支架, 是因为壳聚糖是甲壳素脱去部分乙酰基后的产物, 具有良好的生物相容性、生物降解性及机械强度<sup>[7]</sup>。在体内溶菌酶、甲壳酶的作用下, 壳聚糖可完全水解, 其降解中间产物低分子甲壳素或寡聚糖、降解终产物 N-乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖在体内无蓄积, 无毒性, 无刺激性, 无免疫原性, 无热原反应, 无致突变乃至致死性突变效应, 此外其还有诱导、刺激结缔组织重建的活性<sup>[8]</sup>。型胶原可以选择性地诱导牙周膜细胞生长, 参与组织代谢、止血并可作为多种生物因子的缓释载体<sup>[9,10]</sup>等等, 但是其降解速度过快, 机械强度较差。本实验将这两种材料通过冻干法制备成复合支架, 具有一定的机械强度和可降解性, 尤其重要的是它是具有一定孔径的多孔支架, 可以诱导细胞在支架内生长和增殖。

组织工程的另一要素是细胞生长调节因子, 应用较多的有 bFGF、骨形成蛋白(BMP)等。本研究选用 bFGF 是因为它能促进牙周膜细胞增殖, 刺激细胞外基质的合成, 还可刺激牙周膜新生血管网形成, 提供牙周膜细胞的血供, 为牙周组织再生创造良好条件<sup>[11]</sup>。本研究将 bFGF 溶入壳聚糖-型胶原溶液, 然后进一步制备成复合支架, 不但保留了 bFGF 的生物学活性, 而且可以延长其对牙周膜细胞的作用时间。本研究发现, 含 bFGF 因子壳聚糖-型胶原复合支架的浸出液可以明显的促进

HPDLC的增殖,调节细胞周期,促进 DNA 合成前期(S期)的 HPDLC 进入 DNA 合成期。尤为重要的是,本研究将 HPDLC 接种于复合支架后,在一定条件下细胞可以在支架内存活和增殖,而且含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架内的细胞存活和增殖数量明显高于不含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架,在两周内效果都非常明显,说明含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架对 HPDLC 生长和增殖具有促进作用。

参考文献:

- [1] 涂小丽,刘宏伟. 骨髓基质细胞- 牙根- 珊瑚羟基磷灰石复合体内再植的初步观察 [J]. 实用口腔学杂志, 2006, 22(1): 45- 47.
- [2] ZHANG Y, CHENG X, WANG J, et al. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta1 DNA for periodontal tissue engineering [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344(1): 362- 369.
- [3] 刘涛,耿发云,杨萍,等. 引导组织再生术治疗度根分叉病变的临床研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2004, 25(S1):216- 218.
- [4] 李容林,李春阳,张伟. 壳聚糖与 型胶原制备组织工程复合支架材料的扫描电镜研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006, 27(5):557- 561.
- [5] ZHANG R, MA P X. Poly (alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering I Preparation and morphology [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 44 (4): 446- 455.
- [6] INOUE M, LEGEROS R Z, HOFFMAN C, et al. Effect of enamel matrix proteins on the phenotype expression of periodontal ligament cells cultured on dental materials [J]. J Biomed Mater Res, 2004, 69(1): 172- 179.
- [7] 姚子昂,吴海歌,韩宝芹,等. 不同脱乙酰度对壳聚糖膜与角膜基质细胞相容性的影响 [J]. 生物工程学杂志, 2006, 23(4): 800- 804.
- [8] 刘良明,田昆仑,范小青,等. 异丁基壳聚糖多功能敷料的生物安全性 [J]. 中国海洋药物, 2005, 24(5): 39- 42.
- [9] LIAO S, WANG W, UO M, et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration [J]. Biomaterials, 2005, 26(36): 7564- 7571.
- [10] NAKAHARA T, NAKAMURA T, KOBAYASHI E, et al. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane [J]. Tissue Eng, 2003, 9(1): 153- 162.
- [11] SAE-LIM V, ONG WY, LI Z, et al. The effect of basic fibroblast growth factor on delayed-replanted monkey teeth [J]. J Periodontol, 2004, 75(12):1570- 1578.

(编辑 王晓鹰)

(上接第 433 页 from page 433)

- [8] GOTO H, MATSUYAMA T, MIYAMOTO M, et al. Platelet-plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation [J]. J Periodontal Res, 2006, 41(5):455- 462.
- [9] GERARD D, GARLSON E R, GOTCHER J E, et al. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2006, 64(3):443- 451.
- [10] WEIBRICH G, GNOTH S H, OTTO M, et al. Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrates in vitro [J]. Mund Kiefer Gesichtschir, 2002, 6(3):168- 174.
- [11] WILTFANG J, KLOSS F R, KESSLER P, et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment [J]. Clin Oral Implants Res, 2004, 15(2): 187- 193.
- [12] AGHALOO T L, MOY P K, FREYMILLER E G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2002, 60(10): 1176- 1181.
- [13] CARLSON E R. Bone grafting the jaws in the 21<sup>st</sup> century: the use on platelet-rich plasma and bone morphogenetic protein [J]. Alpha Omegan, 2000, 93(3): 26- 30.
- [14] JUNG R E, SCHMOEKEL H G, ZWAHLEN R, et al. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 [J]. Clin Oral Implants Res, 2005, 16(6): 676- 682.
- [15] PARK Y J, LEE Y M, PARK S N, et al. Platelet derived growth factor releasing chitosan spong for periodontal bone regeneration [J]. Biomaterials, 2000, 21(2): 153- 159.

(编辑 王晓鹰)