

人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38 年轻和衰老细胞中线粒体量和 mtDNA 相对含量以及功能变化的比较

孙青菊, 龙建纲, 汪振诚, 缪明永, 王学敏*

(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**培养人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38, 比较年轻和衰老细胞中线粒体量和线粒体 DNA(mtDNA) 相对含量的变化, 以及线粒体功能的改变, 探讨线粒体与衰老的关系。**方法:**培养人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38; 四氮唑盐(MTT) 比色法测细胞活力; 差速离心分离线粒体, BCA-100Pr 定量试剂盒测定线粒体蛋白的含量; 竞争 PCR 法分析 mtDNA 的相对含量; 流式细胞仪测定线粒体膜电位的变化; 分光光度法测定线粒体呼吸链氧化酶-NADH 氧化酶活性。**结果:**衰老细胞较年轻细胞形成单层时间明显延长, 细胞圆缩蜕变, 细胞活力明显低于年轻细胞; 线粒体膜电位约下降为原来的 50%; NADH 氧化酶活性也降低, 最大反应速度由 66.73 nmol/(mg protein · min) 降为 36.01 nmol/(mg protein · min); 衰老细胞线粒体蛋白含量 (0.78±0.02 mg/ml) 高于年轻细胞 (0.56±0.03 mg/ml); 以核 18S rDNA 为内参, 衰老细胞 mtDNA 相对含量 (1.557±0.072) 明显高于年轻细胞 (1.292±0.068)。**结论:**衰老细胞中, 线粒体量和 mtDNA 相对含量的增高可能是功能下降的一种代偿性反应, 为探讨线粒体与衰老的关系提供一定参考。

[关键词] WI-38 细胞; 线粒体; DNA, 线粒体; 衰老

[中图分类号] R 329.26 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1290-05

Young and aging human embryonic lung diploid cell line WI-38: a comparison of mitochondrial content, relative amount of mtDNA, and mitochondrial functions

SUN Qing-ju, LONG Jian-gang, WANG Zhen-cheng, MIAO Ming-yong, WANG Xue-min* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To compare the mitochondrial content, the relative amount of mtDNA, and mitochondrial functions between the young and aging WI-38 cells, so as to investigate the correlation between mitochondrial and aging. **Methods:** Human embryonic lung diploid cell line WI-38 was cultured and its viability was assayed by MTT assay; the content of mitochondrial protein was determined using BCA-100 Protein Quantitative Analysis Kit after mitochondria were fractionated by differential centrifugation; mtDNA relative content was measured by a competitive polymerase chain reaction (PCR) method; mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometry; and NADH oxidase activity was measured by spectrophotometry. **Results:** Compared with the young cells, the aging cells had a longer time to form a monolayer, an obviously decreased cell viability and mitochondrial membrane potential (by 50%), and a decreased NADH oxidase activity, with the maximal reaction speed declining from 66.73 nmol/(mg protein · min) to 36.01 nmol/(mg protein · min). Mitochondrial content in the aging cells (0.78±0.02 mg/ml) was higher than that in the young cells (0.56±0.03 mg/ml). Using 18S rDNA of nuclear as an internal reference, the relative amount of mtDNA in the aging cells (1.557±0.072) was found to be obviously higher than that in the young cells (1.292±0.068). **Conclusion:** The increase of mitochondrial contents and mtDNA relative amounts in aging cells may be one of the compensatory mechanisms for decreased mitochondrial function, which may provide an evidence for studying the correlation between mitochondrial and aging.

[KEY WORDS] WI-38 cells; mitochondria; DNA, mitochondrial; aging

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12): 1290-1294]

线粒体作为真核细胞中一种重要而独特的细胞器, 其性状改变与人的衰老和疾病密切相关。自 1989 年 Linnane 等^[1] 提出线粒体衰老假说以来, 人们越来越关注线粒体与衰老的关系。研究线粒体与衰老的关系, 既有理论意义, 在医学上也有潜在的应用前景。

被称为细胞动力工厂的线粒体, 因其生命周期

有限, 具有高的更新率, 形态、大小、数量和分布常因

[基金项目] 国家自然科学基金 (30171030, 30472175); 中国博士后科学基金 (2004036014)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30171030, 30472175) and China Postdoctoral Science Foundation (2004036014)。

[作者简介] 孙青菊, 博士生。

* Corresponding author. E-mail: Wang-xuemin@hotmail.com

细胞种类不同而异。线粒体 DNA (mtDNA) 与核 DNA 不同, 是多拷贝的且具有异质性, 到目前为止, 虽对衰老中线粒体量和 mtDNA 相对含量以及功能的改变有一些研究报道, 但结果并不一致^[2~7], 关于人衰老中线粒体的一些变化并无定论。机体的衰老来源于细胞的衰老, 本研究建立二倍体细胞衰老模型, 比较了年轻和衰老细胞中线粒体量和功能的变化, 结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38, 来自妊娠 3 个月的正常胚胎肺组织, 购于上海中国科学院细胞库; BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒(申能博彩生物科技有限公司); 基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司); 线粒体膜电位检测试剂盒(Calbiochem 公司)。

1.2 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液接种 WI-38 细胞, 在 37℃ 条件下, 95% 空气+5% CO₂ 培养箱(美国 Forma Scientific 公司)中培养, 待细胞长满瓶后, 0.25% 的胰蛋白酶消化, 制成单个细胞悬液, 充分混匀, 血球计数板计数, 以需要的密度传代细胞。按时换液和传代, 定期冻存于液氮中; 倒置相差显微镜观察, 拍照记录生长状态。细胞从 20 代传至约 50 代。

1.3 四氮唑盐(MTT)比色法测定细胞活力 经胰蛋白酶充分消化分散的 WI-38 细胞, 计数后以 1×10^4 细胞/孔接种至 96 孔培养平板中, 每孔体积 200 μ l。每次设 16 孔空白对照(只加培养基)。将培养板移入 CO₂ 孵箱中, 培养 48 h 后, 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μ l, 37℃, 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μ l DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪(490 nm 波长)测定各孔光密度值, 检测紫色 formazon 晶体的产生量, 判断细胞活力变化。

1.4 BCA-100Pr 定量试剂盒测定线粒体蛋白的含量 0.25% 的胰蛋白酶消化, 分别收集年轻(30 代前)和衰老细胞(45 代后), 取相同数目(8×10^5), 按 $1 \text{ ml}/10^6 \text{ cell}$ 加入分离介质(50 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 玻璃匀浆器匀浆, 差速离心分离线粒体, 制成合适的线粒体悬液。BCA-100Pr 定量试剂盒测定线粒体悬液的蛋白量, 间接反映线粒体的量。

1.5 竞争 PCR 法^[9]测定 mtDNA 相对含量变化 0.25% 的胰蛋白酶消化, 离心收集年轻和衰老细胞, 细胞计数, 取相同数目, 采用基因组 DNA 抽提试剂

盒提取细胞总 DNA。上海生工生物工程服务有限公司合成 PCR 引物。内参照 18S rDNA 引物序列为 n1: 5'-GCT TTC TAC CTA CAT GGT TGA TC- 3'; n2: 5'-GGC CTC GAA AGA GTC CTG TA- 3', 大小 559 bp。线粒体 DNA D-loop 区引物序列为 m1: 5'-CCC TTA AAT AAG ACA TCA CGA TG- 3'; m2: 5'-GTT AGT TGG GGG GTG ACT GT- 3', 大小 468 bp。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 30 个循环, 之后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 各组上样量为 6 μ l。

1.6 线粒体膜电位测定

1.6.1 R123 标记 0.25% 的胰蛋白酶消化, 离心收集年轻和衰老细胞, PBS 漂洗 2 次, 重悬于 PBS 中, 细胞调整为 $2 \times 10^5 \text{ cell/ml}$, 取 0.5 ml 加入 Eppendorf 管, 加入荧光染料 R123(1 $\mu\text{g/ml}$)3 μ l, 37℃ 孵育 20 min, 弃染料, PBS 漂洗, 重悬于 1 ml PBS 中, 流式细胞仪 FL1 通道检测荧光强度^[10]。

1.6.2 TMRM 标记^[11] 采用线粒体膜电位检测试剂盒: 0.25% 的胰蛋白酶消化, 离心收集年轻和衰老细胞, 细胞调整为 $2 \times 10^5 \text{ cell/ml}$, 取 0.5 ml 加入 Eppendorf 管, 离心 $1000 \times g$ 5 min, 弃上清, 沉淀加入稀释的 MitoCapture 溶液(含荧光探针 TMRM)1 ml, 5% CO₂, 37℃ 条件下培养 15~20 min, 离心 $500 \times g$ 5 min, 弃上清, 沉淀加入 1 ml 预温的孵育缓冲液, 悬浮, 流式细胞仪 FL1 通道检测聚集在细胞质中的绿色荧光单体。

1.7 线粒体呼吸链氧化酶活性测定 0.25% 的胰蛋白酶消化, 分别收集年轻和衰老细胞, 按 $1 \text{ ml}/10^6 \text{ cell}$ 加入分离介质(50 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 玻璃匀浆器匀浆, 差速离心分离线粒体, 即 $1000 \times g$ 4℃ 离心 10 min, 取上清, $10000 \times g$ 4℃ 离心 10 min, 所得黄色沉淀即为线粒体, 溶于分离介质中制成合适的线粒体悬液。BCA-100Pr 定量试剂盒测定线粒体悬液的蛋白量。酶标分光仪(Molecular device, USA, Spectra Max 190)测定 NADH 氧化酶活性^[12]。反应体系: DCPIP(0.64 mmol/L)25 μ l, $10 \times \text{buffer}$ 25 μ l(pH 7.4), ddH₂O 150 μ l, 线粒体悬液(蛋白含量约 25 μg), 30℃ 孵育 5 min, 加入 2 mmol/L NADH 启动反应, 600 nm 波长处检测 2 min 内光密度值变化。

1.8 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 SPSS 统计软件进行方差分析或 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞生长状态 观察发现年轻细胞平均 2 d 呈致密单层,细胞长梭形,排列成束状,界限清晰,细胞饱满,折光度好,立体感强;衰老细胞形成单层时间延长,细胞变短,边缘不整齐,排列紊乱,折光度下降,表面有微小泡状突起,胞质内有颗粒样物聚集,直到不再形成致密单层(图 1)。

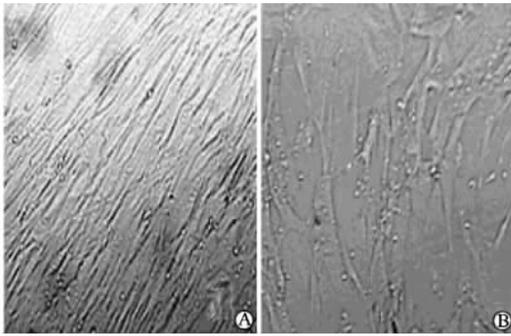


图 1 年轻细胞(A)和衰老细胞(B)生长状态比较
Fig 1 Cell growth of young cells(A) and aging cells(B, ×200)

2.2 细胞活力测定 结果表明衰老细胞活力 (D_{490}) 明显低于年轻细胞 (0.22 ± 0.02 vs 0.63 ± 0.03 , $P < 0.05$)。

2.3 线粒体量的测定 按照试剂盒的测定方法,绘制标准曲线: $y = 0.12 + 0.208x$, $r = 0.9998$; 测定结果早期细胞 (8×10^5) 线粒体蛋白含量为 (0.56 ± 0.03) mg/ml, 晚期细胞 (8×10^5) 线粒体蛋白含量为 (0.78 ± 0.02) mg/ml ($n = 5$, $P < 0.05$)。结果显示衰老细胞线粒体含量明显高于年轻细胞。

2.4 竞争 PCR 法测定 mtDNA 相对含量 本实验重复 5 次,以核 18S rDNA 为内参,分析电泳条带净密度比值,结果表明衰老细胞 mtDNA D-loop 区片段与 18SrDNA 片段相比相对量明显高于年轻细胞相对量 (1.557 ± 0.072 vs 1.292 ± 0.068 , $P < 0.05$),衰老与年轻细胞的 mtDNA 相对量比值为 1.205 ± 0.020 。

2.5 线粒体膜电位的测定

2.5.1 R123 标记 流式细胞仪 FL1 通道检测结果显示年轻细胞的平均荧光强度为 63.75,衰老细胞下降为 33.41,由此可见衰老后线粒体膜电位明显下降(图 2)。

2.5.2 TMRM 标记 流式细胞仪 FL1 通道检测聚集在细胞质中的绿色荧光单体,结果显示,年轻细胞胞质中的绿色荧光单体的平均荧光强度为 455.99,衰老细胞上升为 941.50,由此可见衰老后

线粒体膜电位明显下降,与 R123 标记结果一致(图 3)。

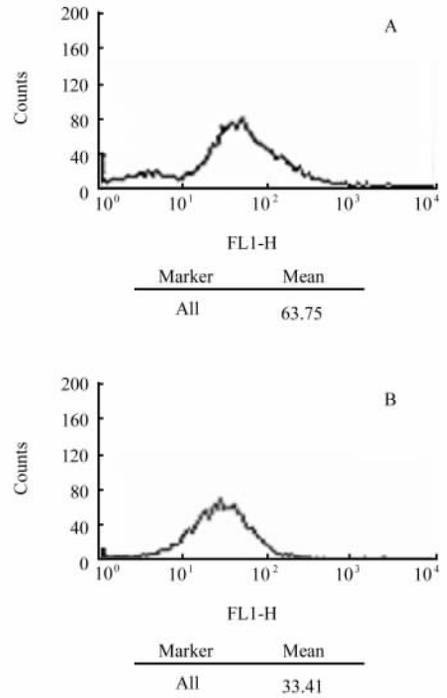


图 2 R123 标记测定线粒体膜电位
Fig 2 Measurement of mitochondrial membrane potential by binding with R123
A: Young cells; B: Aging cells

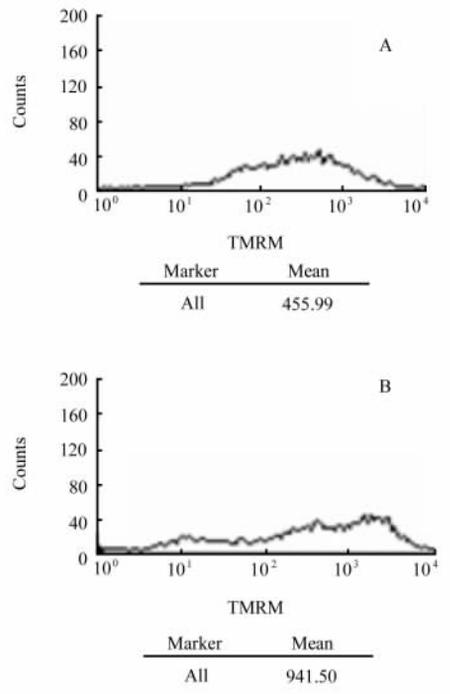


图 3 R123 标记测定线粒体膜电位
Fig 3 Measurement of mitochondrial membrane potential by binding with TMRM
A: Young cells; B: Aging cells

2.6 呼吸链氧化酶-NADH 氧化酶活性测定 结果显示衰老细胞 NADH 氧化酶活性明显低于年轻细胞, 最大反应速度年轻细胞为 66.73 nmol/(mg protein · min), 衰老细胞下降为 36.01 nmol/(mg protein · min)。

3 讨论

线粒体作为真核细胞中一种重要而独特的细胞器, 其性状改变与人的衰老和疾病密切相关。线粒体的数量在不同细胞中差异很大, 多则可达数千, 甚至几十万, 少则仅几百, 并且随细胞衰老而变化。蛋白质是线粒体的主要化学成分之一。通常, 它可占到线粒体干重的 65%~70%, 所以从一定意义上可代表细胞线粒体的量。我们用差速离心法分离线粒体, BCA-100Pr 定量试剂盒测定线粒体蛋白的含量, 间接反映了线粒体的量。与核 DNA 不同, 哺乳动物细胞内 mtDNA 是多拷贝的。每个人体细胞可包含几千个以上的 mtDNA, 同时其数量变化与细胞的功能状态密切相关。因此对衰老的研究中, mtDNA 含量的变化是极有意义的。由于 18S rDNA 在每个细胞内具有上百个拷贝, 含量较恒定, 因此可代表核 DNA 的含量。D-loop 区为 mtDNA 的复制和转录起始区, 一般不存在较大的缺失突变, 可以代表 mtDNA 的量。所以我们选择 18S rDNA 作为内参照, mtDNA 与核 DNA 的含量比值即为 mtDNA 的相对含量。采用竞争 PCR 法检测 mtDNA 相对含量。

线粒体作为细胞活动的能量供应中心, 是动物细胞生成 ATP 的主要地点。线粒体基质的三羧酸循环酶系通过底物脱氢氧化生成 NADH。NADH 通过线粒体内膜呼吸链氧化酶氧化。NADH 还原酶 (complex I) 是呼吸链上最复杂的酶复合体, 是呼吸链的主要入口, 其功能与多种疾病和衰老有关^[13]。在氧化的同时, 跨膜质子移位形成跨膜质子梯度和跨膜电位。线粒体内膜上的 ATP 合成酶利用跨膜质子梯度能量合成 ATP。合成的 ATP 通过线粒体内膜 ADP/ATP 载体与细胞质中 ADP 交换进入细胞质, 参与细胞的各种需能过程。因此线粒体膜电位的稳定与细胞维持正常功能密切相关。R123 是一种亲脂性阳离子荧光染料, 对膜具有通透性。它的荧光信号主要集中于线粒体, 因此可通过流式细胞仪检测其荧光强度的变化来反映线粒体膜电位的变化。TMRM 是一类阳离子染料分子, 对线粒体膜电位非常敏感。线粒体膜电位下降或消失, 它以单体形式存在于细胞液中, 发出绿色荧光。因

此检测胞液中绿色荧光强度的增高, 可以反映出线粒体膜电位的下降。

机体的衰老来源于细胞的衰老, 对二倍体细胞的研究有助于衰老机制的探讨。通过对年轻和衰老二倍体细胞中线粒体变化的研究, 有助于探讨线粒体与衰老的关系, 进一步弄清线粒体在衰老中的作用。近年来应用人胚肺二倍体细胞作为衰老研究的体外模型, 已得到国内外研究工作者的肯定^[14,15]。成纤维细胞在体外的群体分裂次数小于 30 次时, 75%~85% 的细胞能够进行 DNA 合成, 发生有丝分裂, 因此视为年轻细胞; 而当其群体分裂次数大于 48 次时只有不到 10% 的细胞能进行 DNA 合成, 此时的细胞是衰老细胞^[16]。我们选用人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38, 传代培养, 定期冻存, 建立了衰老研究的体外模型, 对年轻和衰老细胞中线粒体的变化进行了比较研究。

我们的实验结果表明, 衰老细胞较年轻细胞线粒体膜电位、呼吸链氧化酶活力均下降; 而线粒体的量、mtDNA 的相对含量显著增多 ($P < 0.05$)。有关线粒体的量、mtDNA 含量增加的机制尚不完全清楚, 可能的机制有两种: (1) 代谢反馈机制^[17]: 衰老后线粒体功能出现缺陷, 这种与衰老相关的线粒体功能的缺陷, 一方面通过增加未受损的正常线粒体工作量来进行代偿, 另一方面反馈刺激细胞增加线粒体的含量来代偿。(2) 调节失控机制^[18]: 早期细胞中, 野生型线粒体 DNA 有一种顺势控制作用, 在衰老过程中, 这种控制作用因基因突变而被抑制或失活, 突变型线粒体 DNA 的量就超过野生型, 导致与细胞能量状态及代谢需要无关的突变型线粒体 DNA 的过度增殖。

总之, 本实验通过培养人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38, 对年轻和衰老细胞中线粒体量和 mtDNA 相对含量及线粒体功能变化进行了比较研究, 为线粒体与衰老关系的探讨提供一定参考。关于其变化的分子机制有待于进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, et al. Effect of age on *in vivo* rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93:15364-15369.
- [2] Rasmussen UF, Krstrup P, Kjaer M, et al. Human skeletal muscle mitochondrial metabolism in youth and senescence: no signs of functional changes in ATP formation and mitochondrial oxidative capacity[J]. Pflugers Arch, 2003, 446:270-278.
- [3] Rasmussen UF, Krstrup P, Kjaer M, et al. Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging. A study of isolated human skeletal muscle mitochondria[J]. Exp Gerontol,

2003,38:877-886.

[4] Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, et al. Aging- and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung[J]. FEBS Lett,1998, 441:292-296.

[5] Miller FJ, Rosenfeldt FL, Zhang C, et al. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31:61-62.

[6] Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 287:R1244-R1249.

[7] Masuyama M, Iida R, Takatsuka H, et al. Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1723(1-3):302-308.

[8] 司徒镇强, 吴军正 主编. 细胞培养[M]. 北京: 兴果图书出版公司,1996:186-187.

[9] Yen MY, Chen CS, Wang AG, et al. Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation[J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86:1027-1030.

[10] Lee HC, Yin PH, Lu CY, et al. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells[J]. Biochem J, 2000,348:425-432.

[11] Bell RM, Maddock HL, Yellon DM. The cardioprotective and mitochondrial depolarising properties of exogenous nitric oxide in mouse heart[J]. Cardiovasc Res, 2003,57:405-415.

[12] Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi M, et al. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis[J]. Life Sci, 2003,73:3277-3288.

[13] Bai Y, Park JS, Deng JH, et al. Restoration of mitochondrial function in cells with complex I deficiency[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005,1042:25-35.

[14] 陈勤. 抗衰老研究实验方法[M]. 北京: 中国医药科技出版社,1996:167-169.

[15] 张洪泉, 余文新. 中华抗衰老医药学[M]. 北京: 科学出版社, 2000:294-295.

[16] Peacocke M, Campisi J. Cellular senescence: a reflection of normal growth control, differentiation, or aging[J]? Cell Biochem,1991,45:147-155.

[17] Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Mitochondrial decay in aging[J]. Biochim Biophys Acta,1995, 1271:165-170.

[18] Katayama M, Tanaka M, Yamamoto H, et al. Deleted mitochondrial DNA in the skeletal muscle of aged individuals[J]. Biochem Int,1991,25:47-56.

[收稿日期] 2006-06-13 [修回日期] 2006-09-01
[本文编辑] 尹 茶

· 读者 作者 编者 ·

GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》规定的文献著录格式(I)

GB/T 7714-2005自2005年10月1日实施。以下括号中标注“任选”的是选择项目,其余为必备项目。

专著 以单行本或多卷册形式在限定期限内出版的非连续出版物,包括图书、古籍、学位论文、技术报告、会议文集、汇编、多卷书、丛书等。

著录格式:

[序号] 主要责任者.题名:其他题名信息 [文献类型标志(电子文献必备,其他文献任选)].其他责任者(任选).版本项(第1版不著录).出版地:出版者,出版年:引文页码 [引用日期(联机文献必备,其他电子文献任选)].获取和访问路径(联机文献必备).

示例:

- [1] 昂温 G, 昂温 PS. 外国出版史[M]. 陈生铮, 译. 北京: 中国书籍出版社, 1988.
- [2] 全国文献工作标准化技术委员会第七分委员会. GB/T 5795-1986 中国标准书号[S]. 北京: 中国标准出版社, 1986.
- [3] 孙玉文. 汉语变调构词研究[D]. 北京: 北京大学出版社, 2000.
- [4] 辛希孟. 信息技术与信息服务国际研讨会论文集: A 集[C]. 北京: 中国社会科学出版社, 1994.
- [5] 赵耀东. 新时代的工业工程师[M/OL]. 台北: 天下文化出版社, 1998[1998-09-26]. [http://www.ie.nthu.edu.tw/info/ie.newie.htm\(Big 5\)](http://www.ie.nthu.edu.tw/info/ie.newie.htm(Big 5)).

[6] PIGGOT TM. The catalogue's way through AACR2: from document receipt to document retrieval[M]. London: The Library Association, 1990.

[7] YUFIN SA. Geocology and computers: proceedings of the Third International Conference on Advances of Computer Methods in Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Moscow, Russia, February 1-4, 2000[C]. Rotterdam: A. A. Balkema, 2000.

(注:作者姓的外文或汉语拼音的写法也可首字母大写,余小写)