

# 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体对类风湿关节炎滑膜细胞的影响

陈金 赵福涛

**【摘要】** 目的 探讨重组人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(hTRAIL)对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞(RASF)的作用。方法 原代培养 RASF,不同浓度 hTRAIL(0、100、200、400、800、1000 ng/ml)干预 4 h,检测 hTRAIL 对 RASF 的增殖和凋亡及其相应受体 DR5 mRNA 和蛋白表达的影响。结果 100、200、400、800、1000 ng/ml hTRAIL 干预可抑制 RASF 增殖;可上调 DR5 mRNA(0.801 ± 0.036、0.947 ± 0.032、0.969 ± 0.048、1.052 ± 0.031、0.992 ± 0.072)和蛋白(0.650 ± 0.118、0.803 ± 0.142、0.968 ± 0.130、0.945 ± 0.136、0.864 ± 0.160)表达( $F = 78.478$ ,  $F = 18.627$ , 均  $P < 0.01$ );高浓度 hTRAIL(400、800、1000 ng/ml)可诱导 RASF 发生凋亡[(5.82 ± 0.43)%、(7.32 ± 0.49)%、(8.78 ± 0.81)%]( $F = 304.573$ ,  $P < 0.01$ )。结论 hTRAIL 可诱导类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡。

**【关键词】** 关节炎,类风湿; 成纤维细胞; 人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 死亡受体 5

**The effect of TRAIL in the apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts** CHEN Jin, ZHAO Fu-tao.  
Department of Rheumatology and Immunology, The Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China  
Corresponding author: ZHAO Fu-tao, Email: futaozhao@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of hTRAIL in the apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASFs). **Methods** Primary culture the RASFs and then incubated with different concentrations of hTRAIL(0, 100, 200, 400, 800, 1000 ng/ml) for 4 h, the proliferation and apoptosis of RASFs was detected by MTT assay and flow cytometry, and then the expression of DR5 was examined by RT-PCR and Western blot. One-Way ANOVA and LSD were used for statistical analysis. **Results** hTRAIL (0, 100, 200, 400, 800, 1000 ng/ml) had significantly inhibited the proliferation of RASF; While the expression of DR5 mRNA (0.801 ± 0.036, 0.947 ± 0.032, 0.969 ± 0.048, 1.052 ± 0.031, 0.992 ± 0.072) and protein (0.650 ± 0.118, 0.803 ± 0.142, 0.968 ± 0.130, 0.945 ± 0.136, 0.864 ± 0.160) increased significantly ( $F = 78.478$ ,  $F = 18.627$ , all  $P < 0.01$ ); High concentration hTRAIL(400, 800, 1000 ng/ml) can induce the apoptosis of RASF [(5.82 ± 0.43)%, (7.32 ± 0.49)%, (8.78 ± 0.81)%] ( $F = 304.573$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusions** hTRAIL can induce the apoptosis of RASF.

**【Key words】** Arthritis, rheumatoid; Fibroblasts; Human TNF-related apoptosis-inducing ligand; Death receptor 5

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的病理特征主要表现为滑膜细胞的增殖与炎性细胞的浸润,导致滑膜增厚、骨与软骨组织的侵蚀破坏。越来越多的研究表明,RA滑膜成纤维细胞(rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, RASF)的凋亡缺陷是其重要发病机制之一<sup>[1-2]</sup>。因此诱导 RASF 凋亡、抑制滑膜组织增殖成为治疗 RA 的关键。肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配

体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是近年来新发现的凋亡诱导配体。它和 TNF- $\alpha$ 、FasL 虽然都是 TNF 超家族成员,都可以诱导细胞凋亡,但与后者相比却有很大不同:它具有强大的诱导肿瘤细胞凋亡的能力,但对正常细胞基本没有影响<sup>[3]</sup>。有研究发现,在 IL-1 $\beta$  诱导的兔膝关节炎模型中,通过对兔关节腔内注入带有 TRAIL 基因的腺病毒可使 TRAIL 介导的炎性滑膜组织凋亡率升高<sup>[4]</sup>。目前有学者<sup>[5]</sup>研究表明丹参可体外诱导 RASF 凋亡,抑制其增殖。本试验拟通过重组人 TRAIL(hTRAIL)蛋白体外诱导 RASF 的凋亡,以期寻找 RA 新的生物治疗方法。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.17.016

基金项目:上海交通大学医学院附属第三人民医院自然科学基金(syz09-13)

作者单位:201900 上海交通大学医学院附属第三人民医院风湿免疫科

通讯作者:赵福涛,Email:futaozhao@yahoo.com.cn

## 对象与方法

### 一、滑膜标本来源

RA滑膜细胞来自我院骨科接受膝关节滑膜切除术的确诊活动期RA患者。诊断符合美国风湿病协会(ACR)修订的诊断标准,28关节疾病活动度评分(DAS28) > 2.6。患者签署知情同意书,该研究经我院伦理委员会批准。

### 二、主要试剂

DMEM(高糖)培养基,胰蛋白酶,青链霉素(均购自Gibco公司);胎牛血清(HyClone公司);I型胶原酶(Sigma公司);连接素(Annexin)V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);Trizol Reagent(Invitrogen公司),NA-Red(碧云天生物技术研究社),TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (Takara公司);重组hTRAIL(近岸蛋白质科技有限公司);DR5 Antibody(CST公司,Cat#:21-3696s),Anti-GAPDH monoclonal antibody(联科生物,Cat#:Mab5465),PageRuler™ Prestained Protein Marker(10~170 kDa)(联科生物,Cat#:PM0671)。

### 三、方法

1. RASF的原代培养及鉴定:采用消化培养法:将临床无菌取材的滑膜组织块带入准备好的超净工作台;剔除表面血污及附着脂肪组织,用含双抗PBS清洗3次;将组织剪成1 mm<sup>3</sup>小块,加入含I型胶原酶(4 mg/ml)的无血清DMEM培养液(2~3倍体积),37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育2 h,期间20 min摇晃一次;将未黏附细胞(贴壁细胞为滑膜组织的巨噬细胞)移入离心管离心,1000 r/min,10 min,弃上清,再加入含二乙四乙酸二钠(0.02% EDTA)的0.25%胰蛋白酶4 ml,在37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中消化30 min;镜检见分散成细胞团块或单个细胞时,加入完全培养基终止消化,经200目不锈钢筛网过滤,滤液以离心,1500 r/min,6 min,弃上清;用PBS清洗2次后,将细胞重悬液入瓶,用“十”字法轻轻摇晃培养瓶使细胞均匀分布,置37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养;24 h后换液,去除仍未贴壁细胞,继续培养。以后每2~3 d换液1次。实验采用4~9代的滑膜细胞。通过倒置相差显微镜,人滑膜细胞II型胶原进行鉴定。

2. MTT法检测hTRAIL对RASf增殖的影响:将RASf以5000个/孔接种于96孔板,设6个复孔,0、100、200、400、800、1000 ng/ml hTRAIL(0 ng/ml为对照组,100、200、400、800、1000 ng/ml为试验组);分别干预4、12、24、48 h后加入MTT(5 mg/ml),继续培养4 h后终止培养,吸净孔内培养液,每孔加入150 μl二甲

亚砷后于酶标仪(490 nm)下测定各孔吸光度(A)值。根据每组各孔测得的A值计算出平均值。实验重复3次。

3. Annexin V-PI双标法流式细胞术定量分析细胞早期凋亡:细胞的收集:不同浓度hTRAIL作用于滑膜细胞4 h后,弃去旧培养液,加入0.125%不含EDTA的胰酶消化;收集细胞后计数,每管取(1~5) × 10<sup>5</sup>个细胞,各个药物作用浓度均设三管,用冷的PBS洗涤2次(2000 r/min离心5 min);加入500 μl的Binding Buffer悬浮细胞,加入5 μl Annexin V-EGFP混匀后,加入5 μl Propidium Iodide,混匀;室温、避光、反应5~15 min;在1 h内,进行流式细胞仪的观察和检测。实验重复3次。

磷脂酰丝氨酸(PS)正常位于细胞膜脂质双层的内侧,而在细胞凋亡早期,细胞膜中的PS由脂膜内侧翻向外侧。暴露在细胞外环境中。暴露的PS与Annexin V有较强的亲和力。因此,将Annexin V标以荧光素(EGFP),以标记了的Annexin V作为荧光探针,利用流式细胞仪可检测凋亡和坏死的细胞。虽然坏死细胞的细胞膜亦丧失其完整性,可能出现PS外翻,但如果同时使用一种核酸染料——碘化丙啶(propidine iodide, PI),它不能透过完整的细胞膜,可将凋亡细胞以及坏死细胞区分开来。

结果判断:即左上象限Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>为细胞碎片,右上象限Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>为晚期凋亡细胞或死亡细胞,左下象限Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>为正常细胞,右下象限Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>为早期凋亡细胞。

4. RT-PCR检测hTRAIL对其相应受体DR5 mRNA的影响:0、100、200、400、800、1000 ng/ml hTRAIL干扰RASf 4 h后,加入Trizol 1 ml裂解细胞提取总RNA,紫外分光光度计测量RNA总量。取2 μg RNA合成cDNA。DR5的引物序列为上游:5'-GGGAGC-CGCTCATGAGGAAGTTGG-3',下游5'-GGCAAGTCTCT-CTCCCAGCGTCTC-3',产物长182 bp。GAPDH的引物序列为上游5'-ACGGATTGTCGTATTGGGCG-3',下游5'-CTCCTGGAAGATGCTGATGG-3',产物长212 bp。取上述cDNA 2 μl,终体积20 μl,按TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0操作说明书加样。Bio-Rad PCR仪RT-PCR反应条件:预变性95℃ 3 min;95℃ 45 s、55℃ 1 min、72℃ 45 s,DR4 35个循环、GAPDH 25个循环,随后72℃延伸5 min。各药物作用浓度扩增3管,使用1.5%的琼脂糖进行凝胶电泳检测PCR产物,实验重复3次。以GAPDH作为内参,使用Quantity One软件对基因的mRNA表达量进行半定量分析。

5. Western blot检测hTRAIL对DR5蛋白表达的

影响:0、100、200、400、800、1000 ng/ml hTRAIL 干扰 RASF 4 h 后,提取总蛋白,25 μg/孔,10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后电转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,兔抗人 DR5(1:1000 稀释)一抗及 GAPDH(1:5000 稀释)4 ℃ 孵育 15 h,孵育二抗 1 h 后采用底物发光法进行检测。实验重复 3 次。采用 Quantity One 软件进行扫描定量,取目的蛋白条带吸光度值(A/mm<sup>2</sup>)与内参蛋白吸光度值(A/mm<sup>2</sup>)的比值来表达蛋白的相对定量。

6. 统计学分析:数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多样本间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两均数比较采用 LSD 法检验。所有数据经 SPSS 13.0 统计软件进行处理,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. MTT 法检测 hTRAIL 对 RASF 增殖的影响:0、100、200、400、800、1000 ng/ml hTRAIL 分别干预 4、12、24、48 h,结果显示不同浓度 hTRAIL 对 RASF 增殖有明显抑制作用( $P < 0.001$ ),见表 1。

表 1 不同浓度 hTRAIL 对 RASF 增殖的影响( $\bar{x} \pm s$ )

hTRAIL (ng/ml)	A 值			
	4 h	12 h	24 h	48 h
0	0.445 ± 0.058	0.453 ± 0.038	0.444 ± 0.033	0.448 ± 0.026
100	0.296 ± 0.039	0.312 ± 0.057	0.387 ± 0.042	0.366 ± 0.035
200	0.263 ± 0.042	0.236 ± 0.011	0.352 ± 0.036	0.354 ± 0.081
400	0.253 ± 0.043	0.268 ± 0.022	0.299 ± 0.032	0.279 ± 0.016
800	0.181 ± 0.021	0.178 ± 0.013	0.151 ± 0.009	0.165 ± 0.010
1000	0.114 ± 0.032	0.129 ± 0.041	0.134 ± 0.263	0.121 ± 0.032
F 值	216.33	180.33	198.61	163.73
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2. 流式细胞术检测 hTRAIL 对 RASF 凋亡的影响:0、100、200、400、800、1000 ng/ml hTRAIL 分别干预 4 h,结果显示 400、800、1000 ng/ml hTRAIL 能诱导 RASF 发生凋亡( $P < 0.001$ )。见表 2;图 1,2。

3. hTRAIL 对 RASF 的 mRNA 表达的影响:100、200、400、800、1000 ng/ml hTRAIL 干预 RASF 4 h 后,DR5 的 mRNA 表达升高,与对照组比较差异有统计学意义,且随 hTRAIL 浓度增高,DR5 mRNA 表达升高越明显。见表 3,图 3。

4. hTRAIL 对 RASF 的蛋白表达的影响:100、200、400、800、1000 ng/ml hTRAIL 干预 RASF 4 h 后,DR5 的蛋白表达升高,与对照组比较差异有统计学意义,且随 hTRAIL 浓度增高,DR5 mRNA 表达升高越明显。见表

4,图 4。

表 2 不同浓度 hTRAIL 作用于滑膜细胞后的凋亡检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

hTRAIL(ng/ml)	孔数	早期凋亡细胞(%)
0	9	2.39 ± 0.22
100	9	2.49 ± 0.30
200	9	2.83 ± 0.33
400	9	5.82 ± 0.43 <sup>abc</sup>
800	9	7.32 ± 0.49 <sup>abcd</sup>
1000	9	8.78 ± 0.81 <sup>abcde</sup>
F 值		304.573
P 值		<0.001

注:与 0 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 100 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 200 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与 400 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>d</sup> $P < 0.01$ ;与 800 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>e</sup> $P < 0.01$

表 3 不同浓度 hTRAIL 对 DR5 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

hTRAIL(ng/ml)	孔数	DR5 mRNA
0	9	0.742 ± 0.049
100	9	0.801 ± 0.036 <sup>a</sup>
200	9	0.947 ± 0.032 <sup>ab</sup>
400	9	0.969 ± 0.048 <sup>ab</sup>
800	9	1.052 ± 0.031 <sup>abcd</sup>
1000	9	0.992 ± 0.072 <sup>abc</sup>
F 值		78.478
P 值		<0.01

注:与 0 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 100 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 200 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 400 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与 800 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>e</sup> $P < 0.05$

表 4 不同浓度 hTRAIL 对 DR5 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

hTRAIL(ng/ml)	孔数	DR5 蛋白
0	9	0.491 ± 0.121
100	9	0.650 ± 0.118 <sup>a</sup>
200	9	0.803 ± 0.142 <sup>ab</sup>
400	9	0.968 ± 0.130 <sup>abc</sup>
800	9	0.945 ± 0.136 <sup>abc</sup>
1000	9	0.864 ± 0.160 <sup>ab</sup>
F 值		18.627
P 值		<0.01

注:与 0 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 100 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 200 ng/ml hTRAIL 比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

RA 是一种系统性炎症性疾病,影响关节衬里组织,即滑膜。滑膜正常情况下由 1~2 层细胞组成,而

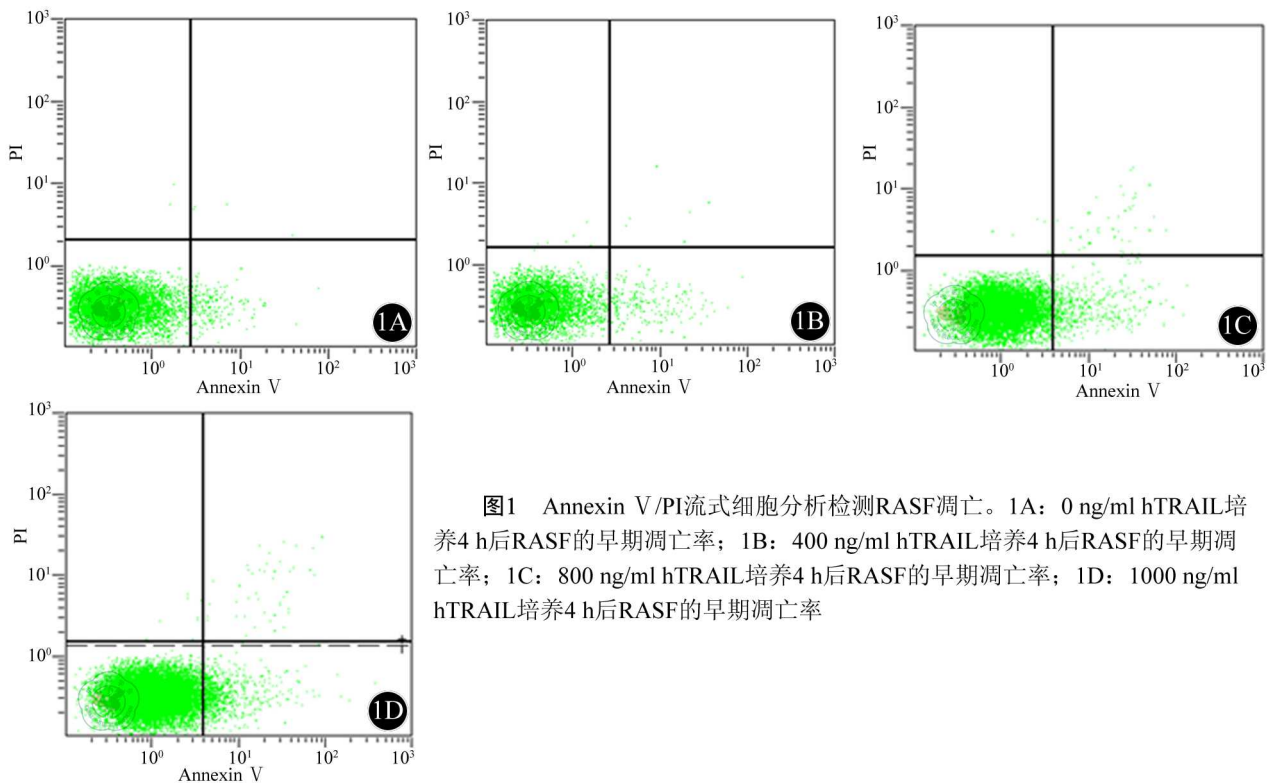


图1 Annexin V/PI流式细胞分析检测RASF凋亡。1A: 0 ng/ml hTRAIL培养4 h后RASF的早期凋亡率; 1B: 400 ng/ml hTRAIL培养4 h后RASF的早期凋亡率; 1C: 800 ng/ml hTRAIL培养4 h后RASF的早期凋亡率; 1D: 1000 ng/ml hTRAIL培养4 h后RASF的早期凋亡率

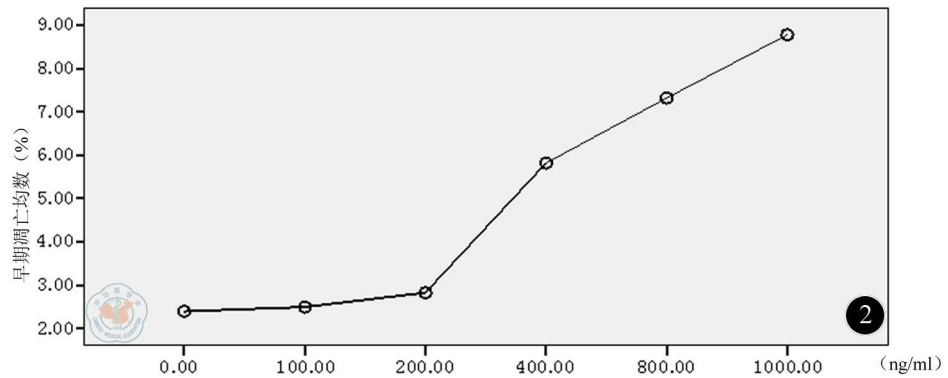


图2 RASF凋亡率

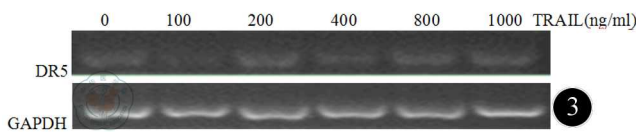


图3 不同浓度hTRAIL对DR5 mRNA表达的影响

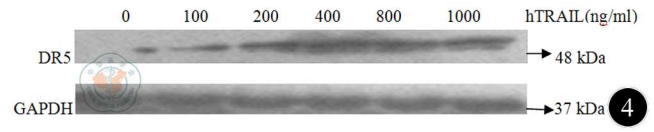


图4 不同浓度hTRAIL对RASF蛋白表达的影响

RA 的滑膜组织中成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 过度增生, 并有巨噬细胞、T 细胞、B 细胞的大量浸润。RAFL 的过度增生一方面通过提高基质降解酶的产生直接导致关节破坏, 另一方面, 通过致炎症细胞因子的过度释放间接起作用。RAFL 的增生表现出类似肿瘤细胞增生的特性, 如抛锚式独立生长, 接触抑制缺乏, 表达癌基因及象征转化的细胞周期蛋白<sup>[1]</sup>。

TRAIL 是 Wiley 等<sup>[6]</sup>于 1995 年首次发现并克隆成

功的。一直以来, 由于 TRAIL 表现出的特定的诱导肿瘤细胞凋亡的特性, 在肿瘤发生方面备受关注, 多项临床临床试验评估了 TRAIL 的潜在治疗作用<sup>[7]</sup>。TRAIL 共有 5 种受体: 2 个死亡受体 (death receptor, DR), 包括 DR4 和 DR5; 2 个诱骗受体 (decoy receptor, DcR), 包括 DcR1 和 DcR2; 1 个可溶性死亡受体护骨素 (osteoprotegerin, OPG)<sup>[8]</sup>。死亡受体的作用至今未明, DR4 和 DR5 能触发除凋亡以外的细胞反应, 如增生和分化<sup>[9]</sup>。

多项研究表明, TRAIL 能控制自身免疫性疾病的

病情,包括 RA<sup>[10]</sup>。动物实验研究表明,TRAIL 治疗能明显抑制 DBA/1J 小鼠胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)的病情进展。这主要是由于 TRAIL 的抗炎和免疫调节活化作用。这种对于 RA 发病机制的抑制作用,可能与淋巴细胞活化调节、通过凋亡途径清除活化淋巴细胞、减少致炎细胞因子及抗 C II 特异性抗体的释放有关<sup>[11]</sup>。结合于脂质膜的 TRAIL 能增强其生物活性并有效治疗抗原诱发关节炎(antigen-induced arthritis, AIA)<sup>[12]</sup>。来自 RA 患者滑液的 T 细胞对 TRAIL 诱导的凋亡敏感<sup>[13]</sup>。研究表明,来自不同患者和不同病情严重程度的 RA 患者的 FLS,对于 TRAIL 作用的敏感性存在差异<sup>[9]</sup>。

本实验研究 MTT 结果显示,人重组 TRAIL 蛋白能有效抑制 RA 患者滑膜成纤维细胞的生长,流式细胞术显示:与对照组比较,100 ng/ml hTRAIL 作用浓度, RASF 早期凋亡率( $2.49 \pm 0.30$ )%, 200 ng/ml TRAIL 作用浓度, RASF 早期凋亡率为( $2.83 \pm 0.33$ )%, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而当 hTRAIL 浓度为 400、800、1000 ng/ml, RASF 早期凋亡率明显上升,分别为( $5.82 \pm 0.43$ )%、( $7.32 \pm 0.49$ )%、( $8.78 \pm 0.81$ )%, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。随着 hTRAIL 浓度的逐渐升高,TRAIL 相应受体 DR5 mRNA 及蛋白表达水平逐渐升高,呈现剂量依赖性关系,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。说明 TRAIL 作用于 RASF,可能通过凋亡途径起作用,这为治疗 RA,延缓关节破坏提供了新的研究思路。

#### 参 考 文 献

[1] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 2003,

423:356-361.

- [2] Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2:527-535.
- [3] Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia*, 2001, 3:535-546.
- [4] Yao Q, Wang S, Gambotto A, et al. Intra-articular adenoviral-mediated gene transfer of trail induces apoptosis of arthritic rabbit synovium. *Gene Ther*, 2003, 10:1055-1060.
- [5] 蒋红,刘青松,罗雄燕,等.丹参体外抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2010, 4:48-51.
- [6] Wiley SR, Schooley K, Smolok PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, 3:673-682.
- [7] Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8:782-798.
- [8] Kim Y, Seol DW. TRAIL, a mighty apoptosis inducer. *Mol Cells*, 2003, 15:283-293.
- [9] Audo R, Calmon-Hamaty F, Baeten D, et al. Mechanisms and clinical relevance of TRAIL-triggered responses in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, 2011, 63:904-913.
- [10] Anel A, Bosque A, Naval J, et al. Apo2L/TRAIL and immune regulation. *Front Biosci*, 2007, 12:2074-2084.
- [11] Jin CH, Chae SY, Kim TH, et al. Effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on the reduction of joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332:858-865.
- [12] Martinez-Lostao L, García-Alvarez F, Basúñez G, et al. Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rabbit model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2010, 62:2272-2282.
- [13] Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Saez-Gutierrez B, et al. Rheumatoid synovial fluid T cells are sensitive to APO2L/TRAIL. *Clin Immunol*, 2007, 122:28-40.

(收稿日期:2012-01-20)

(本文编辑:张志巍)

陈金,赵福涛.肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体对类风湿关节炎滑膜细胞的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(17):5034-5038.