

低强度脉冲超声经 PI3K/Akt 通路调控兔膝骨性关节炎软骨细胞凋亡的作用机制研究

任莎莎, 李雪萍, 林强, 程凯, 夏鹏, 杨怀春, 高明霞

【摘要】 目的:探讨低强度脉冲超声(LIPUS)对兔膝骨性关节炎(OA)软骨细胞凋亡的影响及有关作用机制。方法:共选取30只新西兰大白兔,随机分为正常对照组(A组)、OA模型组(B组)、OA+LIPUS组(C组)、OA+LY294002(PI3K/Akt抑制剂)组(D组)、OA+LY294002+LIPUS组(E组),每组各6只。采用右后膝前交叉韧带切断术(ACLT)造模。于造模后第6周时采用空气栓塞法处死实验兔,切取软骨组织进行组织学观察,并进行Mankin评分;提取软骨细胞进行体外培养并采用免疫组化染色法鉴定;应用western blot检测各组软骨细胞中Ⅱ型胶原(COL2)、MMP-13、Akt、pAkt、P53、Bcl-2蛋白表达情况。结果:B组COL2、pAkt、Bcl-2蛋白含量较A组降低,MMP-13、P53蛋白含量较A组增高($P<0.05$)。与B组相比,C组COL2、pAkt、Bcl-2蛋白含量增高,MMP-13、P53蛋白含量下降($P<0.05$);D组COL2、Bcl-2、pAkt蛋白含量下降,MMP-13、P53蛋白含量升高($P<0.05$),E组COL2、MMP-13、P53、Bcl-2、pAkt蛋白含量无明显变化,但与C组、D组相比差异显著($P<0.05$)。各组Akt蛋白表达无明显差异。结论:LIPUS能通过PI3K/Akt通路降低兔膝骨性关节炎软骨细胞凋亡率,促进抗凋亡基因Bcl-2表达,下调促凋亡基因P53水平,促进关节软骨损伤修复。

【关键词】 低强度脉冲超声;软骨细胞;PI3K/Akt通路;凋亡

【中图分类号】 R49;R684.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2015.02.001

The action mechanism of low intensity pulsed ultrasound regulating chondrocytes apoptosis in rabbits with osteoarthritis via activating PI3K/Akt pathway Ren Shasha, Li Xueping, Lin Qiang, et al. Department of Rehabilitation Medicine, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on the apoptosis of chondrocytes in rabbits with osteoarthritis (OA) and explore the underlying mechanism. **Methods:** Thirty healthy New Zealand white rabbits were selected for this study. All the cultured cells were randomly divided into five groups: a normal control group (A group), an OA model group (B group), an OA model plus LIPUS group (C group), an OA model plus PI3K/Akt inhibitor group (D group), and an OA model plus PI3K/Akt inhibitor and LIPUS group (E group). The OA model was made by knee anterior cruciate ligament transection. At the 6th week after modeling, the rabbits were sacrificed by air embolism method and pathologic changes were assessed on articular surface of femoral condyles. Meanwhile chondrocytes were isolated and cultured *in vitro*, and cultured cells were identified by immunohistochemistry. The expression of collagen protein type II, MMP-13, Akt, pAkt, P53, and Bcl-2 was detected by Western blotting. **Results:** As compared with the A group, the expression of collagen type II, pAkt and Bcl-2 was significantly reduced in the B group, but that of MMP-13 and P53 was significantly increased in the B group ($P<0.05$). As compared with the B group, the expression of collagen type II, pAkt and Bcl-2 was significantly increased, and that of MMP-13 and P53 was significantly reduced in the C group ($P<0.05$); the expression of collagen type II, pAkt and Bcl-2 was significantly reduced ($P<0.05$), and that of MMP-13 and P53 was significantly increased in the D group ($P<0.05$). Although the expression of collagen type II, MMP-13, pAkt,

P53, and Bcl-2 showed no significant difference between the E group and the B group, the expression of collagen type II, MMP-13, pAkt, P53 and Bcl-2 showed significant difference between C group and D group ($P<0.05$). There was no significant difference

基金项目:国家自然科学基金(81272151)

收稿日期:2014-12-17

作者单位:南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)康复医学科,南京 210006

作者简介:任莎莎(1988-),女,硕士研究生,主要从事骨科康复与神经康复方面的研究。

通信作者:李雪萍,lixueping6504@163.com

in the expression of Akt among all groups. **Conclusions:** The LIPUS can obviously decrease the apoptosis rate of chondrocytes in the knee joints of OA rabbits via activating PI3K/Akt pathway, and the underlying mechanisms are closely related to upregulation of Bcl-2 expression and downregulation of P53 expression. The LIPUS can accelerate the recovery of cartilage for the purpose of treatment of OA.

【Key words】 ultrasound; chondrocytes; PI3K/Akt pathway; apoptosis

研究发现软骨细胞生物学改变与骨性关节炎(osteoarthritis, OA)的发生具有一定相关性^[1-2], 软骨细胞凋亡与 OA 发病密切相关^[3]。低强度脉冲超声(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)在促进骨折愈合方面有确切疗效^[4], 近几年将其用于软骨组织及其他软组织方面的研究也越来越多^[5-6]。研究发现 LIPUS 能激活软骨细胞及诱导 II 型胶原(Type II Collagen, COL2)mRNA 表达来促进 COL2 合成^[7]; 还可影响软骨细胞膜表面应力受体整合素表达, 影响其下游局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、磷脂酰肌醇 3(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)力化学信号转导通路, 调节软骨细胞外基质合成^[8]。本研究主要应用 LIPUS 作用于体外培养的兔膝软骨细胞, 分析 LIPUS 通过 PI3K/Akt 信号通路调控兔膝 OA 软骨细胞凋亡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 ①动物:健康的 1 月龄普通级新西兰大白兔 30 只, 由南京医科大学附属南京医院动物实验中心(青龙山动物饲养中心)提供, 体质量 2.0~2.5Kg, 雌雄不限, 于 24h 昼/夜循环、无限量供应水和食物的动物设备中单笼饲养。实验经南京医科大学附属南京医院伦理委员会批准。②主要器材及试剂:低强度脉冲超声仪(osteoarthritis III, 日本株式会社), 胎牛血清(Gibco 公司), 高糖 DMEM 培养基(南京凯基生物有限公司), 胰蛋白酶(南京凯基生物有限公司), II 型胶原酶(Life Sciences 公司), PI3K/Akt 抑制剂(美国 Selleck 公司), COL2 抗体(德国 Acris 公司), 基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)抗体、Akt 抗体、磷酸化 Akt 抗体、Bcl-2 抗体(武汉博士德公司), P53 抗体(美国 LSBio 公司), 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(德国 Millipore 公司), 电泳仪与湿式电转移槽(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法 ①造模:30 只新西兰大白兔随机抽取 24 只进行造模, 采用前交叉韧带切断(anterior cruciate ligament transection, ACLT)法制作 OA 动物模型^[9], 统一选择兔右后膝为手术关节。对照组仅切开关节囊。术后肌肉注射青霉素 20 万 U, 每天 2 次, 连续 3d。制模 3d 后每日笼外放养 1h, 使其手术侧膝关节

主动屈伸。②软骨细胞分离及培养:造模后第 6 周时处死实验兔, 取膝股骨髁关节表面软骨, 分离软骨细胞并培养, 每天采用光学显微镜观察软骨细胞贴壁情况, 细胞铺满瓶底 30%~40%时, 换液去除培养基中死亡细胞, 细胞铺满瓶底 80%~90%时传代, 传至第 2 代于倒置相差显微镜下观察细胞形态, 并进行 COL2 免疫组化染色鉴定。③分组干预:假手术处理实验兔第 2 代软骨细胞作为正常对照组(A 组), OA 模型兔第 2 代软骨细胞分为 OA 模型组(B 组)、OA+LIPUS 组(C 组)、OA+LY294002(PI3K/Akt 抑制剂)组(D 组)、OA+LY294002+LIPUS 组(E 组), 每组各 6 只。超声组细胞均给予 LIPUS 辐射, 应用 HT2009-1 型低强度脉冲超声仪(日本, 伊藤公司), 探头置于培养瓶下方, 探头与培养瓶之间涂以耦合剂, 耦合剂厚度不超过 1mm, FREE 模式, 频率为 3MHz, 辐射强度为 40mW/cm², 通断比为 20%, 每天辐射 20min, 每天 1 次, 每周 6d, 持续 1 周。抑制剂组细胞给予 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 干预:将 5mgLY294002 干粉充分溶于 325ul 二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液中, 配制成 50umol/L 的 LY294002 溶液, 于 -20℃ 冰箱储存, 使用时将其按相应的比例加入上述已配好的培养基中。

1.3 评定标准 ①软骨组织 HE 染色及组织学评分:收集 ACLT 术侧及假手术处理实验兔胫骨平台关节软骨, 置入中性福尔马林溶液中, 准备行病理学分析。并采用改良 Mankin 评分法进行评分^[10], 包括纤维化、基质分布、软骨细胞缺失及软骨细胞集落等方面, 该评分分别在股骨内髁、外髁, 内侧和外侧胫骨平台进行; 最低 4 分, 最高 16 分。由 2 位独立的观察者双盲评价并出具相关报告。②软骨细胞免疫组化染色鉴定:加片加盖玻片后在光学显微镜下观察并拍照。③western blot 检测:检测各组软骨细胞中 COL2、MMP-13、Akt、pAkt、P53、Bcl-2 蛋白表达情况。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验或方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔膝关节软骨组织学观察及 Mankin 评分 正

常关节软骨表面规则,染色均匀,见图 1a;而 OA 关节软骨明显不规则,HE 染色缺失,软骨细胞明显减少,见图 1b。与 A 组比较,B 组 Mankin 总分增高($P<0.05$),同时 B 组纤维化、基质分布及软骨细胞集落评分较 A 组明显增高($P<0.05$),但软骨细胞缺失评分与 A 组比较差异无统计学意义,见表 1。

2.2 正常软骨细胞与 OA 软骨细胞免疫组化结果

第二代正常软骨细胞贴壁较快,主要呈星形、多边形,圆形核仁居于细胞中央,可见 1~3 个较清晰的核仁,需 7d 左右长满培养瓶 90%;第二代 OA 软骨细胞较正常软骨细胞贴壁慢,进入指数生长期慢,主要呈多边形,其间夹杂不少树突样细胞,核仁肥大,增多,需 12d 左右长满培养瓶 90%;见图 2a~b。免疫组化可见正常软骨细胞 COL2 免疫组化染色呈阳性,细胞胞浆内有棕黄色颗粒物质,胞核基本无着色,见图 2c;OA 软骨细胞 COL2 免疫组化染色与正常软骨细胞相比,其胞浆颗粒颜色较浅,见图 2d。

2.3 各组软骨细胞 COL2、MMP-13、Akt、pAkt、P53、Bcl-2 的 Western 表达 与 A 组比较,B 组 COL2、pAkt、Bcl-2 蛋白表达均降低($P<0.05$),MMP-13、P53 蛋白表达均增高($P<0.05$),Akt 蛋白表达无明显差异,见图 3、4。与 B 组比较,C 组 COL2、pAkt、Bcl-2 蛋白含量均增高,MMP-13、P53 蛋白含量均下降($P<0.05$);D 组 COL2、Bcl-2 蛋白、pAkt 含量均下降,MMP-13、P53 蛋白含量均升高($P<0.05$);E 组 COL2、MMP-13、P53、Bcl-2、pAkt 蛋白含量无明显变化,但与 C、D 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);各组 Akt 蛋白含量比较无明显差异,见图 5、6。

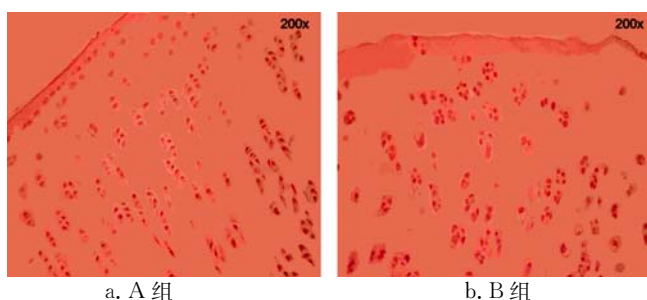


图 1a~b A、B 组软骨组织 HE 染色

表 1 A、B 组关节软骨组织 Mankin 评分比较

项目	A 组	B 组
Mankin 总分	5.00±0.82	10.00±1.26 ^a
纤维化	1.33±0.47	2.83±1.17 ^a
基质分布	1.00±0	2.33±0.52 ^a
软骨细胞缺失	1.67±0.52	2.17±0.75
软骨细胞集落	1.00±0	2.67±0.82 ^a

与 A 组比较,^a $P<0.05$

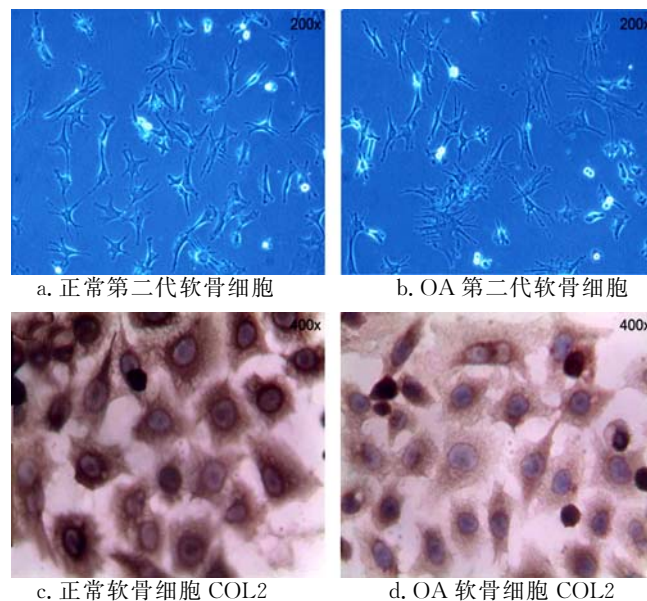


图 2a~d 正常与 OA 软骨细胞鉴定

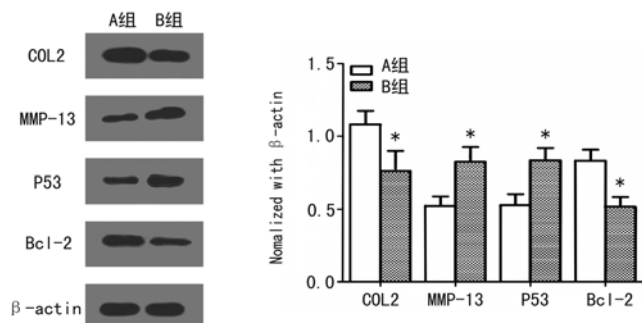


图 3 A 组与 B 组 COL2、MMP-13、P53 及 Bcl-2 的 Western blot 结果比较(与 A 组比较,* $P<0.05$)

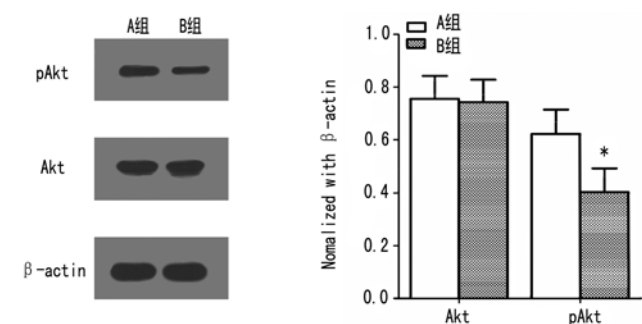


图 4 A 组与 B 组 Akt、pAkt 的 Western blot 结果比较(与 A 组比较,* $P<0.05$)

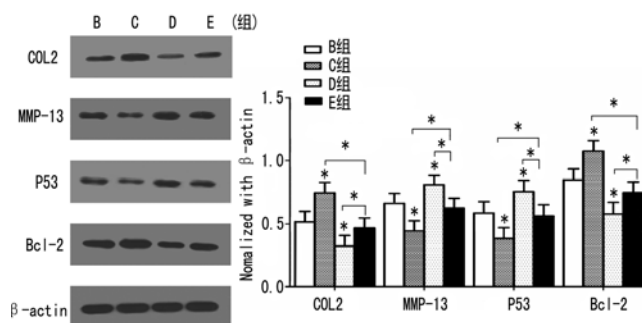


图 5 B 组、C 组、D 组及 E 组 COL2、MMP-13、P53 及 Bcl-2 的 Western blot 结果(* $P<0.05$)

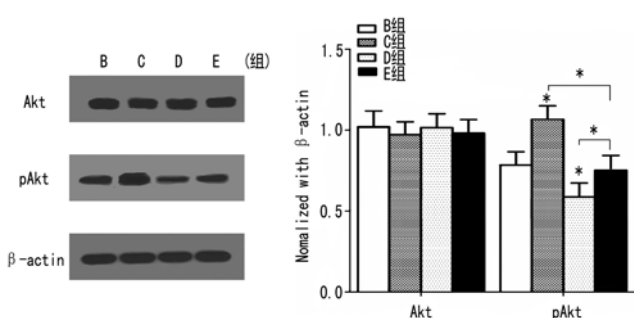


图6 B组、C组、D组及E组Akt、pAkt的Western blot结果 (* $P < 0.05$)

3 讨论

软骨细胞是成熟软骨组织内唯一的细胞类型,在软骨损伤及重塑过程中起着重要作用,其增殖能力、细胞形态及分泌COL2的量可反映软骨细胞的活性。体外培养软骨细胞有助于了解软骨细胞增殖、分化及合成细胞外基质过程中的影响因素,对研究OA病理等具有重要意义^[11-12]。本研究通过体外培养正常、OA软骨细胞发现,第2代正常软骨细胞主要呈星形、多边形,生长快,其COL2免疫组化染色呈阳性;第2代OA软骨细胞生长慢,主要呈多边形,其间夹杂不少树突样细胞,其COL2免疫组化染色相对正常软骨细胞,胞浆棕黄色颗粒变浅,提示OA软骨细胞培养成功。

软骨细胞外基质由COL2、蛋白多糖等构成,COL2约占基质总量的80%-90%,由软骨细胞分泌^[13]。MMPs是降解细胞外基质最重要的蛋白水解系统,其中MMP-13主要降解COL2^[14-15]。正常关节软骨中可发生细胞凋亡,是维持关节内微环境稳定等所必需的生理现象;研究发现软骨细胞凋亡与基质降解密切相关,OA软骨细胞过度凋亡,可致基质合成减少,逐渐形成恶性循环,是关节软骨退变发展成骨性关节炎的重要原因^[16]。

PI3K/Akt是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为整合素下游信号通路之一,该通路是调节软骨细胞生长、基质重塑及抗软骨细胞凋亡最重要的信号转导通路^[17]。PI3K是一种膜蛋白,可接收膜上的酪氨酸激酶受体、细胞因子受体、CD19、BCR等传入信号,从而直接或间接激活下游因子Akt,激活后的Akt主要通过含有丝氨酸残基或苏氨酸残基的底物(P53、NF- κ B及Caspase-9等)磷酸化而发挥生物学效应^[18]。研究表明PI3K/Akt通路与促凋亡因子P53及抗凋亡因子Bcl-2存在关联性;正常和OA软骨细胞内均有P53表达,OA软骨细胞表达更高,其下调可抑制OA软骨细胞凋亡^[19];P53基因还能诱导Bax基因表达,抑制Bcl-2基因表达,提示P53基因与Bcl-2基因家族在调

控细胞方面也具有相关性^[20];Bcl-2基因是Bcl-2家族成员之一,具有抑制细胞凋亡和延长细胞寿命等功能,可部分抑制NO诱导的软骨细胞凋亡^[21]。

本研究结果显示,A组与B组软骨细胞内均可表达COL2、MMP-13、Akt、pAkt、P53、Bcl-2蛋白;B组COL2、pAkt、Bcl-2蛋白表达量低于A组,而MMP-13、P53蛋白表达量高于A组,两者Akt蛋白表达量无明显差异。进一步证明OA病理过程与软骨细胞凋亡密切相关。

近年来研究发现LIPUS可诱导软骨细胞中COL2和蛋白多糖基因表达,对IL-1 β 诱导的MMP-13的表达有抑制作用,利于软骨细胞表型的稳定^[22]。LIPUS可增加增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达,促进软骨细胞增殖,该作用机制可能与PI3K/Akt信号转导通路相关^[23];还可激活退变人髓核细胞内的PI3K/Akt信号通路来促进细胞外基质合成^[24]。LIPUS影响OA软骨细胞凋亡的作用主要是通过机械效应来实现,其机械效应可对细胞膜产生一种微应力,使整合素蛋白在细胞膜发生聚集,当逐渐聚集达到一定量时,细胞内第一个信号分子局部粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)被磷酸化而激活,FAK的激活使PI3K的p85亚基发生磷酸化从而激活PI3K/Akt信号通路产生相应的生物学效应^[25]。

本研究结果表明OA软骨细胞予以LIPUS刺激后Akt磷酸化水平升高同时MMP-13、P53表达水平降低,Bcl-2、COL2表达水平增高;加入PI3K特异性抑制剂LY294002共培养后,Akt磷酸化水平降低的同时MMP-13、P53表达水平增高,pAkt、COL2、Bcl-2蛋白表达水平降低,提示LIPUS照射能促进Akt的磷酸化进而激活PI3K/Akt信号转导通路来抑制炎症因子MMP-13表达,从而减少细胞外基质COL2降解;抑制促凋亡基因P53蛋白表达,促进抗凋亡基因Bcl-2蛋白表达,对OA软骨细胞具有保护作用。

综上所述,本研究发现LIPUS可经PI3K/Akt通路上调抗凋亡基因Bcl-2表达,下调促凋亡基因P53表达,降低兔膝OA软骨细胞凋亡率,调节细胞外基质合成,从而促进OA关节软骨损伤的修复、延缓关节软骨退变,起到一定的保护软骨的作用。但LIPUS对于晚期OA软骨细胞及人软骨细胞是否具有相同作用目前还无法证实,因此还需日后进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] Setton LA, Mow VC, Muller FJ, et al. Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee carti-

- lage following periods of joint disuse with remobilization [J]. *Osteoarthritis Cartilage* 1997, 5(1):1-16.
- [2] Schroeppel JP, Crist JD, Anderson HC, et al. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis[J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26(3):377-394.
- [3] Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage[J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(2):333-345.
- [4] Martinez de Albornoz P, Khanna A, Longo UG, et al. The evidence of low-intensity pulsed ultrasound for in vitro, animal and human fracture healing[J]. *Br Med Bull*, 2011, 100(1): 39-57.
- [5] Griffith JF, Wang YX, Antonio GE, et al. Modified Pfirrmann grading system for lumbar intervertebral disc degeneration[J]. *Spine*, 2007, 32(24) : E708-E712.
- [6] Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, et al. Ex vivo observation of human intervertebral disc tissue and cells isolated from degenerated intervertebral discs[J]. *Eur Spine J*, 2012, 21 (Suppl 1) : S10-S19.
- [7] Naito K, Watari T, Muta T, et al. Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Increases the Articular Cartilage Type II Collagen in a Rat Osteoarthritis Model[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(3):361-369.
- [8] Cheng K, Xia P, Lin Q, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on integrin-FAK-PI3K/Akt mechanochemical transduction in rabbit osteoarthritis chondrocytes[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(7):1609-1618.
- [9] Jean YH, Wen ZH, Chang YC, et al. Increase in excitatory amino acid concentration and transporters expression in osteoarthritic knees of anterior cruciate ligament transected rabbits [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(12):1442-1449.
- [10] Gurkan I, Ranganathan A, Yang X, et al. Modification of osteoarthritis in the guinea pig with pulsed low-intensity ultrasound treatment [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(5):724-733.
- [11] Damjanovich S, Nagy I, Somogyi B, et al. Application of a molecular enzyme kinetic model for aging cells and tissues[J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 1989, 8(1):37-45.
- [12] Smith RL, Lin J, Trindade MC, et al. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression[J]. *J Rehabil Res Dev*, 2000, 37(2):153-163.
- [13] Takaishi H, Kimura T, Dalal S et al. Joint disease and matrix metalloproteinases; a role for MMP-13[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9(1):47-54.
- [14] Prasadani I, Crawford R, Xiao Y. Aggravation of ADAMTS and matrix metalloproteinase production and role of ERK1/2 pathway in the interaction of osteoarthritic subchondral bone osteoblasts and articular cartilage chondrocytes—possible pathogenic role in osteoarthritis[J]. *J Rheumatol*, 2012, 39(3): 621-634.
- [15] Jiezhong C, Ross C, Yin X. Vertical inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of osteoarthritis[J]. *J Cell Biochem* 2013, 114(2):245-249.
- [16] Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, et al. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(2):307-313.
- [17] Tong KM, Shieh DC, Chen CP, et al. Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human synovial fibroblasts[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(8): 1478-1488.
- [18] Hofler A, Nichols T, Grant S, et al. Study of the PDK1/AKT signaling pathway using selective PDK1 inhibitors, HCS and enhanced biochemical assays[J]. *Anal Biochem*, 2011, 414(5):179-186.
- [19] Hashimoto S, Nishiyama T, Hayashi S, et al. Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(8):2340-2349.
- [20] Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor P53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene[J]. *Cell*, 1995, 80(2):293-299.
- [21] Oshima Y, Akiyama T, Hikita A, et al. Pivotal role of Bcl-2 family proteins in the regulation of chondrocyte apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(39):26499-26508.
- [22] Zhang ZJ, Huckle J, Francomano CA, et al. The effects of pulsed low intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(11):1645-1650.
- [23] Li X, Lin Q, Wang D, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes early proliferation of knee articular chondrocytes by activating phosphatidylinositol 3 kinase pathway in a rabbit osteoarthritis model[J]. *Adv Sci Lett*, 2012, 5(1):217-221.
- [24] 张晓军, 胡侦明, 郝杰, 等. 低强度脉冲超声通过 PI3K/Akt 通路促进人退变髓核细胞合成细胞外基质[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(1): 34-38.
- [25] Watabe H, Furuhashi T, Tani-Ishii N, et al. Mechano-transduction activates $\alpha 5 \beta 1$ integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts [J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(18) :2642-2649.