

但是慢性栓塞性肺动脉高压的发病机制与野百合碱诱导的 PAH 和 HPH 仍有些差别,为模拟临床上慢性血栓性肺动脉高压,本实验采用家兔慢性空气栓塞建立肺动脉高压模型,实验结果显示,与 AE 组相比,N 组肺动脉压力及右心室肥厚指数明显降低,肺血管重构等病理改变及 TI 和 AI 均明显减轻,主肺动脉扩张程度改善。此实验表明尼可地尔对家兔的慢性栓塞性肺高压具有良好的治疗作用。

综上所述,mitoKATPCOs 尼可地尔能有效改善慢性空气栓塞诱导的家兔动脉肺高压,抑制肺血管的增殖重构及右心室肥厚,将来可能会成为临床上治疗慢性栓塞性肺高压的良好药物。然而目前研究不能诠释尼可地尔药物对慢性栓塞性肺高压的肺血管结构重构的具体分子干预机制,以及最佳的应用于临床治疗的方法,尚有待进一步深入研究探讨。

参考文献

- 1 Park MH. Advances in diagnosis and treatment in patients with pulmonary arterial hypertension[J]. Catheterization and Cardiovascular Interventions,2008,71(3):205-213
- 2 Sahara M,Sata M,Morita T, *et al.* Nicorandil attenuates monocrotaline induced vascular endothelial damage and pulmonary arterial hypertension[J]. PLoS ONE,2012,7(3):e1932-e1944
- 3 Zhou X,Wang D,Claudia Y, *et al.* A pulmonary hypertension model induced by continuous pulmonary air embolization[J]. Journal of Surgical Research, 2011,170(1):e11-e16
- 4 王伟,张宜乾,吴树明.兔高动力性肺动脉高压模型的建立[J].中国病理生理杂志,2006,22(3):612-613
- 5 Liu R,Wu S,Cao G, *et al.* Transfection of human hepatocyte growth factor gene inhibits advancing pulmonary arterial hypertension induced by shunt flow in a rabbit model[J]. Transplant Proceedings,2013,45

- (2):705-712
- 6 Pengo V,Lensing AW,Prins MH, *et al.* Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism[J]. N Engl J Med,2004,350(22):2257-2264
- 7 Auger WR,Fedullo PF. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. Semin Respir Crit Care Med,2009,30(4):471-483
- 8 Lang I,Kerr K. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. Proc Am Thorac Soc,2006,3(7):568-570
- 9 Lang IM,Klepetko W. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension;an updated review[J]. Curr Opin Cardiol,2008,23(6):555-559
- 10 Stenmark KR,McMurtry IF. Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension;a time for reappraisal?[J]. Circ Res,2005,97(2):95-98
- 11 Ko EA,Han J,Jung ID, *et al.* Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells[J]. J Smooth Muscle Res,2008,44(2):65-81
- 12 Horinaka S,Kobayashi N,Higashi T, *et al.* Nicorandil enhances cardiac endothelial nitric oxide synthase expression via activation of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel in rat[J]. J Cardiovasc Pharmacol,2001,38(2):200-210
- 13 王慧,解卫平,左祥荣,等.埃他卡林对长期低氧大鼠肺组织 eNOSmRNA 和蛋白表达的影响[J].中国药理学通报,2009,25(12):1594-1598
- 14 The IONA Study Group. Trial to show the impact of nicorandil in angina (IONA): design, methodology and management[J]. Heart,2001,85(6):e9(1-7)
- 15 Node K,Asanuma H,Ogita H, *et al.* Opening of the adenosine triphosphate sensitive potassium channel attenuates cardiac remodeling induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis[J]. J Am Coll Cardiol,2002,40(5):991-997

(收稿日期:2013-06-15)

(修回日期:2013-06-24)

SHCBP1 在肝细胞癌中的表达及其临床意义

陶汉川 顾澄宇 蔡兵

摘要 **目的** 研究 SHCBP1 基因在人肝癌组织中的表达情况,探讨 SHCBP1 基因在肝细胞癌发生发展中的作用。**方法** 采用半定量 RT-PCR、荧光定量 PCR(实时 PCR)、免疫组织化学法等方法检测 SHCBP1 基因在 52 例临床肝细胞癌样本的癌及癌旁组织和人正常组织的表达情况,应用统计学方法分析结果。**结果** ①SHCBP1 基因 mRNA 表达水平在人正常组织中表达具有明显差异;在肝细胞癌样本中明显高于癌旁组织($P < 0.05$);②免疫组化结果检测显示 SHCBP1 蛋白在癌旁组织组织中低表达或不表达,而在肝细胞癌组织中表达明显增高,且棕色染色区域主要集中在肿瘤细胞边缘细胞膜位置;③Western blot 检测结果显示 SHCBP1 蛋白在肝细胞癌样本中高表达,癌旁组织中不表达或低表达($P < 0.05$);④临床统计资料分析显示 SHCBP1 基因的表达

作者单位:214023 南京医科大学附属无锡市人民医院肝胆外科

通讯作者:蔡兵,电子信箱:caibing@wuxiph.com

达情况与肝细胞癌患者的性别、年龄、临床分期无关,而与肿瘤的直径大小、个数、分化程度、脉管浸润紧密相关。**结论** SHCBP1 基因在肝细胞癌组织中呈高表达,可能通过影响多种癌症信号通路分子促进肝癌的发生发展,同时该基因可能成为肝癌治疗的潜在新靶点。

关键词 SHCBP1 基因 原发性肝癌 Src 同源区 2 结构域蛋白 C(Shc)

Expression of SHCBP1 in Hepatocellular Carcinoma and Its Clinical Significance. Tao Hanchuan, Gu Chengyu, Cai Bing. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu 214023, China

Abstract Objective To investigate the expression of SHCBP1 in hepatocellular carcinoma, and evaluate the role of SHCBP1 in the development and progression of HCC. **Methods** RT-PCR, real-time PCR, immunohistochemistry and were used to detect the expression of SHCBP1 in 52 pairs of human HCC specimens and human normal tissue. The results were statistically evaluated. **Results** ①The expression of SHCBP1 mRNA level had evident individual differences among human normal tissue. Compared with the adjacent tissues, the expression level of SHCBP1 in hepatocarcinoma tissue was significantly higher than that in non-HCC tissue and the mean time was 3.33 ($P < 0.05$). ②The immunohistochemical staining showed that the expression of SHCBP1 was obviously up-regulated in HCC, and down-regulated or absence in non-HCC tissue. The dyed mainly accumulated in the membrane of HCC cells. ③Western blot results showed that SHCBP1 protein was highly expressed in HCC tissues. In contrast, the no or low expression was detected in paracancerous tissues; ④The clinical data showed that the expression of SHCBP1 had no correlation with gender, age, stage; but it was positively associated with tumor size, number, vascular invasion and metastasis, the differentiation degree ($P < 0.05$). **Conclusion** SHCBP1 gene is up-regulated in HCC tissue. It may play important roles in activation of intracellular signal transduction pathway. Study of SHCBP1 gene will provide new therapeutic target for targeted therapy of Hepatocarcinoma.

Key words SHC SH2 domain-binding protein 1 (SHCBP1); Hepatocellular carcinoma (HCC); Src homology 2 domain-containing (SHC)

肝细胞癌是中国最常见的恶性肿瘤之一,位于肺癌之后,每年发病和死亡人数分别约在 36 万和 35 万^[1]。目前肝癌发生、发展是一个相当复杂的问题,除了外界致癌因素外,机体的内在因素也起着重要作用,后者更加复杂的,许多问题尚未清楚。所以在肝细胞癌基因蛋白水平上进一步研究,有利于肝细胞癌的诊断、治疗和预防。本实验在微阵列(microarray 或基因芯片)比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)技术的基础上分析了多例肝细胞癌组织标本,发现 SHCBP1 基因在肝细胞癌组织表达量较癌旁组织有明显上调^[2]。SHCBP1 (SHC SH2 结构域连接蛋白 1),位于 16q11.2,全长 3249bp,所编码蛋白 672 个氨基酸,大小 76kDa。

材料和方法

1. 材料:(1)人正常组织和肝癌、癌旁组织:12 种人体正常组织 mRNA:脑、心、肺、脾、肾、胃、食管、小肠、卵巢、睾丸、胎肝、肝等购自 Clontech 公司。肝细胞癌及癌旁组织标本来自于江苏省无锡市人民医院肝胆外科 2010 年 9 月~2012 年 6 月临床病理确诊的原发性肝癌手术患者。其中男性 38 例,女性 14 例,患者年龄 37~65 岁(平均年龄 54 ± 8.56 岁),术前巴塞罗那肝癌分期 A 级 7 例、B 级 17 例、C 级 23 例、D 级 5 例(表 1)。取手术切除肝细胞癌组织及癌旁 3cm 组织,立即放入液氮中保存。本实验所用标本,均术前告知患者及其家属并签署知情同意书。(2)主要仪器和试剂:TaKaRa 公司半定

量 RT-PCR 仪、Bio-Tech 公司酶标仪、Odyssey Infrared Imaging System 红外成像扫描仪。Invitrogen 公司的 TRIzol, TaKaRa 公司的 Taq DNA 聚合酶、SYBR Premix EX Taq、dNTP、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒。引物均有上海博尚生物有限公司合成;兔抗人 SHCBP1 购自美国 Sigma 公司、山羊抗兔二抗、Alexa Fluor 488/594 标记山羊抗兔 IgG(H+L)均购自中国碧云天公司,抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒购自中国基因科技(上海)有限公司。

2. 方法:(1)提取总 RNA 及 cDNA 合成:Trizol 法提取组织细胞总 RNA,取 OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 的标本总 RNA 2 μ g,使用反转录试剂盒反转录成 cDNA。(2)半定量 RT-PCR:取 2 μ l cDNA 为模板,PCR 反应扩增 SHCBP1 基因, β -actin 作为内参。PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,57 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 35s,共 32 循环(actin 为 25 循环),72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物并拍照。SHCBP1 基因上游引物:5'-ACATCCAAGCAAAGGGTGTC-3',下游引物:5'-GCACACAGTTTTC-CAGCGTA-3',产物大小为 432bp。 β -actin 上游引物:5'-CAT CCT GCGTCTGGACCT-3',下游引物:5'-GT ACTT GCGCTCAGGAGGAG-3',产物大小为 490bp。(3)荧光定量 PCR(实时 PCR):实验中所使用的是 TaKaRa 生物公司的实时荧光定量 PCR 仪。反应体系:总体积 20 μ l, SYBR Premix EX Taq 10 μ l,引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ l, DNA 2 μ l, ddH₂O 7.2 μ l,颠倒混匀试剂,离心后放入 PCR 仪中进行反应。对照组和实验组基因的表达水平按以下方法进行计算:SHCBP1_

$\Delta Ct = \text{平均 SHCBP1_Ct} - \text{平均 } \beta\text{-actin Ct}$, $\text{SHCBP1_}\Delta\Delta\text{Ct} = \text{SHCBP1_}\Delta\text{Ct 实验组} - \text{SHCBP1_}\Delta\text{Ct 对照组}$, 对照组和实验组中的待测基因的倍数关系用 $2^{-\text{SHCBP1_}\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。(4) 组织、细胞免疫荧光: 石蜡切片二甲苯 I 脱蜡 30min, 二甲苯 II 脱蜡 10min。100% 乙醇 3min, 100% 乙醇 3min, 95% 乙醇 3min, 85% 乙醇 3min, 75% 乙醇 3min, 50% 乙醇 3min, 蒸馏水 3min, 蒸馏水 3min, PBS 5min。再将切片置于 0.1mol/L 枸橼酸液修复液中, 煮沸沸腾, 温度保持在 97℃, 10min, 自然冷却 20min。PBS 洗 3min × 3 次, 滴加封闭 5% BSA 室温封闭 30min, 用滤纸擦去封闭液。滴加适宜浓度的一抗置湿盒中 4℃ 孵育过夜, PBS 3min × 3 次, 用滤纸擦去标本外的 PBS, 滴加 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L) 荧光二抗室温置湿盒中避光孵育 2h, 用 PBS 3min × 3 次, 用滤纸擦去标本外的 PBS。滴加 DAPI 避光孵育 2min。甘油封片, 荧光显微镜下观察拍照。细胞免疫荧光: 细胞爬片后, 吸尽培液 PBS 洗 3 次后冰上 4% 多聚甲醛固定 30min, PBS 洗涤 5min × 3 次吸净。加入含 0.2% Triton X-100 的 PBS 约 1ml, 冰上静置 10min; PBS 洗涤 5min × 3 次吸净, 6 孔板中加入 2ml 5% BSA (PBST 稀释), 室温封闭 2h, PBS 洗涤 5min × 3 次, 一抗稀释在含 5% BSA 中, 滴在盖玻片上, 4℃ 过夜。次日 PBS 洗涤, 5min × 3 次; 在含 5% BSA 稀释荧光二抗滴在盖玻片上, 室温, 避光, 静置 2h 后荧光显微镜拍照。(5) 免疫组化: 石蜡切片常规二甲苯脱蜡、入水、0.01% 的枸橼酸盐缓冲液 (pH6.0, 抗原修复液) 抗原修复后, 3% 过氧化氢溶液浸泡 10min, 消除过氧化氢酶影响, PBS 洗 3min × 3 次。提前配制 DAB 工作液, 按每毫升 B 液中加 20μl C 液。适量效价一抗湿盒孵育 1h, PBS 洗 3min × 3 次。试剂 A 封闭孵育 30min 后 PBS 洗 3min × 3 次。滴加 DAB 工作液, 镜下控制显色, 适时 ddH₂O 浸泡终止显色。后常规逐级脱水、二甲苯浸泡晾干后中性树脂封片。

3. 统计学方法: 本实验中应用 SPSS 19.0 统计软件对进行处理, 采用 *t* 检验和 χ^2 检验统计学方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. SHCBP1 基因 mRNA 在肝细胞癌组织和人正常组织中的表达: 采用半定量 RT-PCR 方法验证 SHCBP1 基因 mRNA 在肝细胞癌组织中的表达量, 结果发现相对于癌旁组织, 肝癌组织样本中 SHCBP1 基因 mRNA 的表达量明显上调 (图 1)。52 例肝细胞癌样本中 36 例表现为上调, 上调比为 69.2% (36/52, $P < 0.05$)。采用荧光定量 PCR (实时 PCR) 检测 SHCBP1 在人正常组织脑、心、肝、脾、肺、肾、胎肝等中表达, 结果发现 SHCBP1 基因在脑、睾丸、卵巢、胎肝中呈高表达, 而在心、脾、肺、肾、食管、小肠、胃中呈低表达 (图 2)。

2. SHCBP1 蛋白在肝细胞癌组织中的表达: 免疫组化、细胞和组织免疫荧光均提示肝癌细胞胞膜上

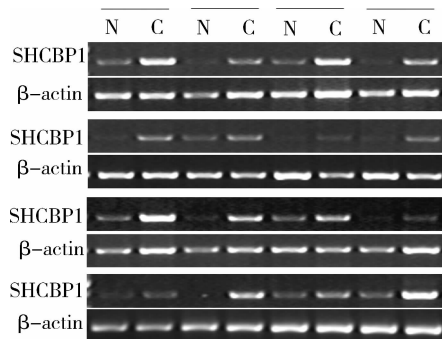


图 1 SHCBP1 基因 mRNA 在肝癌样本中表达情况

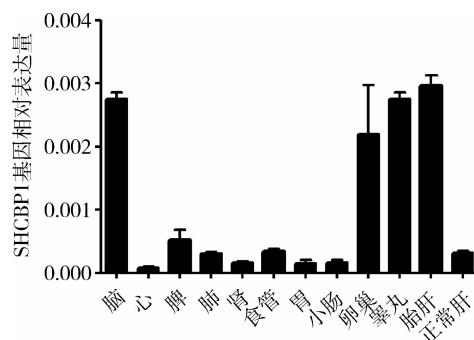


图 2 SHCBP1 基因 mRNA 在人正常组织中的表达水平

可以检测到 SHCBP1 的表达, 其中免疫组化检测结果发现在癌旁组织中 SHCBP1 蛋白不表达或者低表达, 而在肝细胞癌组织中表达上调明显 (图 3、图 4)。

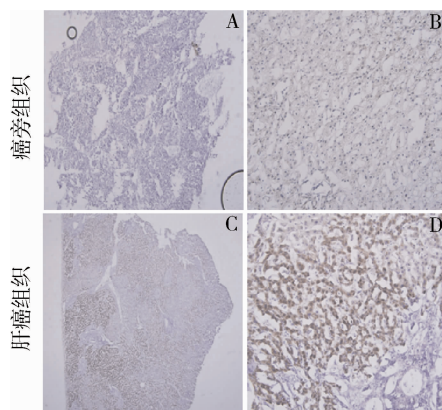


图 3 SHCBP1 蛋白在癌旁组织、肝癌组织样本中的表达
免疫组化染色, A、C 为 ×40, B、D 为 ×200

3. 肝癌中 SHCBP1 基因的表达水平与临床病理特征的相关性: 经临床资料数据统计分析, SHCBP1 的表达水平与肝癌大小、数目、肿瘤分化程度和脉管侵犯紧密相关 ($P < 0.05$), 具有统计学意义; 而在性别、年龄、肝癌临床分期上无统计学差异。另外样本血清检测 AFP 阳性 75% (39/52), 与 SHCBP1 相比, $P < 0.001$, 两者具有统计学差异 (表 1)。

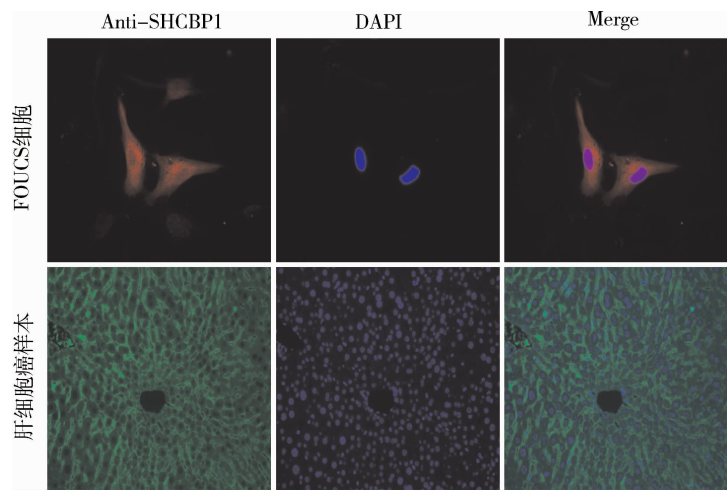


图 4 免疫荧光染色检测 SHCBP1 在 FOCUS 肝癌细胞株、肝癌组织样本中的表达 (×200)

表 1 SHCBP1 表达与原发性肝癌临床病理学特征的关系

肝癌临床病理资料	n	SHCBP1			χ^2	P
		(+)	(-)	阳性率(%)		
性别						
男性	38	27	11	71	0.220	>0.05
女性	14	9	5	64		
年龄						
≥45 岁	33	24	9	73	0.518	>0.05
<45 岁	19	12	7	63		
BCLC 肝癌分期						
Stage A(早期)	7	5	2	71	0.739	P>0.05
Stage B(中期)	17	10	7	59		
Stage C(晚期)	23	17	6	74		
Stage D(末期)	5	4	1	80		
分化程度						
高中分化	20	11	10	55	4.695	<0.05
低分化	30	25	6	83		
肿瘤大小						
≥3cm	41	31	9	78	5.564	<0.05
<3cm	11	5	7	42		
有无脉管侵犯						
有	31	27	4	87	11.502	<0.001
无	21	9	12	43		
有无卫星灶						
有	30	24	6	80	3.862	<0.05
无	22	12	10	55		
AFP						
阳性	39	32	7	82	12.037	<0.001
阴性	13	4	9	31		

讨 论

SHC 编码 3 种亚体, 分别是 p46Shc、p52Shc、p66Shc, 它们都具有羧基末端 Src 同源结构域 (SH2), 携带游离 α-氨基的磷酸丝氨酸结合结构域 (PTB) 和中央富含脯氨酸的胶原-同源区 (CH1),

p66shc 含有氨基末端区 (CH2)^[3, 4]。p46Shc、p52Shc 普遍存在在各种细胞中, 包括癌细胞, 如乳腺癌、子宫内膜癌等, p66shc 表达量因细胞而异。酪氨酸磷酸化激酶受体如生长因子受体 EGFR、FGFR、erbB-2 等激活后胞内结构域的酪氨酸磷酸化, 能被胞质内相

应的 SH2 区的蛋白识别结合并相互作用,将细胞外信号逐级下传^[5-12]。而 SHCBP1 是 SHC 蛋白 SH2 结构域上的一重要连接蛋白,其功能作用尚未有明确定论。SHCBP1 基因的 mRNA 和蛋白在具有增殖能力的细胞内表达,如干细胞、淋巴细胞、癌细胞等,而在稳定细胞、永久性细胞中不表达或者低表达,如骨骼肌、心肌细胞等^[13]。SHC (Src 同源区 2 结构域蛋白 C) 是一重要的胞内信号通路蛋白,现已有研究资料证明该蛋白介导 RAS、PI₃K - AKT 等多种信号通路,具有监管细胞周期、促进细胞迁移侵袭等作用^[14]。

在 SHCBP1 基因在肝细胞癌中的研究,本研究属于首例报道。本实验在微阵列 (microarray 或基因芯片) CGH 技术的基础上分析了数百例肝细胞癌旁和癌组织样本,发现众多基因在肝癌组织表达量较癌旁组织明显上调,如 E2F8、NICE - 3、STC2、C9orf100 等^[15]。国外学者研究证实 SHCBP1 基因 mRNA 的表达水平在细胞分裂象、G₂/M 期明显升高。这一结果提示该基因可能参与细胞周期进程,从而影响细胞的增殖、分化和侵袭转移能力^[13]。而在本实验中笔者结合临床病理资料发现 SHCBP1 基因的 mRNA 的表达与肝癌的大小、数目、脉管浸润密切相关 ($P < 0.05$),作者推测 SHCBP1 基因可能通过影响肝癌细胞内某些信号转导通路来影响细胞周期的改变,从而在肝癌发生发展中起到一定作用。

肝细胞癌的发病机制是一个极其复杂繁琐的内容,需要研究了解的问题众多。肝癌的发生涉及诸多原癌基因的激活以及抑癌基因的抑活,这需要我们来进行进一步研究探索。本研究的 SHCBP1 基因在肝癌发生发展中的具体分子机制尚未明朗,如该基因是影响哪条细胞信号通路来促进癌细胞的增殖、侵袭。综上所述,SHCBP1 基因可能在肝癌发生发展中起到特定的作用,这使得该基因可能成为肝癌治疗的一新靶点,然而肝癌的预防、诊断、治疗需要仍有待于进一步深层次的研究。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61 (2): 69 - 90 (收稿日期: 2013 - 06 - 22)
- 韩泽广. 肝癌基因组学研究进展 [J]. 中国科学 (C 辑: 生命科学), 2008, 10: 907 - 912
- Heinrich JN, Kwak SP, Howland DS, *et al.* Disruption of ShcA signaling halts cell proliferation - characterization of ShcC residues that influence signaling pathways using yeast [J]. Cell Signal, 2006, 18 (6): 795 - 806 (修回日期: 2013 - 07 - 09)
- Vanderlaan RD, Hardy WR, Kabir MG, *et al.* The ShcA phosphotyrosine docking protein uses distinct mechanisms to regulate myocyte and global heart function [J]. Circ Res, 2011, 108 (2): 184 - 193
- Ferro M, Savino MT, Ortensi B, *et al.* The Shc family protein adaptor, Rai, negatively regulates T cell antigen receptor signaling by inhibiting ZAP - 70 recruitment and activation [J]. PLoS One, 2011, 6 (12): e29899
- Tomilov AA, Ramsey JJ, Hagopian K, *et al.* The Shc locus regulates insulin signaling and adiposity in mammals [J]. Aging Cell, 2011, 10 (1): 55 - 65
- Segatto O, Pelicci G, Giulini S, *et al.* Shc products are substrates of erbB - 2 kinase [J]. Oncogene, 1993, 8 (8): 2105 - 2112
- Francia P, Cosentino F, Schiavoni M, *et al.* p66 (Shc) protein, oxidative stress, and cardiovascular complications of diabetes: the missing link [J]. J Mol Med (Berl), 2009, 87 (9): 885 - 891
- Giles AJ, Bender TP, Ravichandran KS. The adaptor protein Shc plays a key role during early B cell development [J]. J Immunol, 2009, 183 (9): 5468 - 5476
- Chen J, Lai F, Niswander L. The ubiquitin ligase mLin41 temporally promotes neural progenitor cell maintenance through FGF signaling [J]. Genes Dev, 2012, 26 (8): 803 - 815
- Sweet DT, Chen Z, Wiley DM, *et al.* The adaptor protein Shc integrates growth factor and ECM signaling during postnatal angiogenesis [J]. Blood, 2012, 119 (8): 1946 - 1955
- Savino MT, Olivieri C, Emmi G, *et al.* The Shc family protein adaptor, Rai, acts as a negative regulator of Th17 and Th1 cell development [J]. J Leukoc Biol, 2013, 93 (4): 549 - 559
- Schmandt R, Liu SK, McGlade CJ. Cloning and characterization of mPAL, a novel Shc SH2 domain - binding protein expressed in proliferating cells [J]. Oncogene, 1999, 18 (10): 1867 - 1879
- Shih HJ, Chen HH, Chen YA, *et al.* Targeting MCT - 1 oncogene inhibits Shc pathway and xenograft tumorigenicity [J]. Oncotarget, 2012, 3 (11): 1401 - 1415
- Deng Q, Wang Q, Zong WY, *et al.* E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation [J]. Cancer Res, 2010, 70 (2): 782 - 791

欢迎订阅 2014 年《医学研究杂志》

《医学研究杂志》每册定价 10 元,全年 120 元 (含邮费)。每月 25 日出版,国内外公开发行。邮发代号: 2 - 590。全国各地邮局均可订阅,也可通过编辑部订阅。