

# rAd-p53 的抑癌作用及体外转染后抑癌蛋白的表达

王建华<sup>1,2</sup>, 纪宗正<sup>1</sup>, 闫立昆<sup>2</sup>

The Expression of p53 in Posttransfectioncells with rAd-p53 Gene and Inhibition Activity in Vitro

WANG Jian-hua<sup>1,2</sup>, JI Zong-zheng<sup>1</sup>, YAN Li-kun<sup>2</sup>

1. Department of General Surgery, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Department of General Surgery, Shanxi Provincial People's Hospital

**Abstract :Objective** To understand the inhibition and IC<sub>50</sub> (50 % inhibiting concentration) of the recombinant adenoviral p53 gene (rAd-p53) for the colorectal cancer cells in vitro and to guide clinical practice.

**Methods** We evaluate the efficiency (IC<sub>50</sub>) of the rAd-p53 and six kind of anti-cancer drugs (5-fluorouracil, tegafur, mitomycin c, cisplatin, oxaliplatin, paclitaxel) for human colorectal cancer cell line-174 through the cell culture and MTT chemosensitivity assay to make sure the anti-cancer capability of rAd-p53. Expression of p53 protein in transfection cells of colorectal cancer line-174 with rAd-p53 was evaluated by immunohistochemical stain. **Results** The rAd-p53 has good anti-cancer efficacy for the colorectal cancer cell line-174 in vitro, its IC<sub>50</sub> is  $5.73 \times 10^{11}$  VP (viral particles) and it is dose-dependent and time-dependent. But its anti-cancer efficacy can't be compared with the classical chemical medicine mitomycin c, 5-fluorouracil and cisplatin et al when it used alone. The immunohistochemistry stain in blank control group is negative. However five different density of rAd-p53 are all appeared positive result in infected colorectal cancer cells with rAd-p53 and earliest positive result presented at 24 hours after infection. **Conclusion** The rAd-p53 has good anti-cancer efficacy for the colorectal cancer cell line-174 in vitro, it is dose and time-dependent manner. But its anti-cancer efficacy worse than those of the classical chemical medicine mitomycin c, 5-fluorouracil and cisplatin etc. when it was used alone.

**Key words** :rAd-p53; Cell culture; MTT assay; Gene transfection; Immunohistochemistry stain

**摘要**:目的 为了了解重组人 p53 腺病毒注射液(商品名“今又生”)对大肠癌-174 细胞株的体外抑制作用及其半数致死量(IC<sub>50</sub>),更好地指导临床应用。方法 通过体外细胞培养、利用 MTT 法对比检测重组人 p53 腺病毒注射液与 5-氟脲嘧啶、替加氟、顺铂、奥沙利铂、丝裂霉素以及紫杉醇等大肠癌常用化疗药物的 IC<sub>50</sub>,明确重组人 p53 腺病毒注射液体外抑瘤活性的强弱;利用免疫组化检测技术检测重组人 p53 腺病毒体外转染大肠癌-174 细胞株后,细胞凋亡、生长抑制与细胞内 p53 蛋白表达情况之间的关系。结果 重组人 p53 腺病毒注射液具有良好的体外抑瘤效应,IC<sub>50</sub>为  $5.73 \times 10^{11}$  VP,且有剂量和时间依赖性;但其单用时的体外抑瘤远远逊于经典的化疗药物如丝裂霉素、5-氟脲嘧啶和顺铂等;五种不同滴度的重组人 p53 腺病毒注射液在体外大肠癌-174 细胞株转染过程中皆出现了阳性染色结果,最早的阳性染色结果出现在 p53 基因转染 24 小时后,而空白对照组的免疫组化染色皆为阴性。结论 重组人 p53 腺病毒注射液具有明确的体外抑瘤效应,且有剂量和时间依赖性;但其单用时的体外-174 细胞株的作用低于丝裂霉素、5-氧脲嘧啶和顺铂。

**关键词**:重组人 p53 腺病毒;细胞培养; MTT 检测;基因转染;免疫组织化学

中图分类号:R735.3<sup>+</sup>4 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)03-0185-04

## 0 引言

目前肿瘤基因治疗领域中研究最多的就是“人

类基因组保护神”——抑癌基因 p53。p53 基因的改变,包括突变和(或)功能异常是肿瘤发生过程中最为常见的遗传变异<sup>[1,2]</sup>,尤其在结肠癌中更高达 75%<sup>[3]</sup>。2004 年我国率先将世界上第一种基因治疗药物——重组人 p53 腺病毒注射液(rAdp53 injection)应用于头颈部肿瘤患者的临床治疗。为了对比了解该注射液对大肠癌细胞株的体外生长抑制

收稿日期:2005-09-09;修回日期:2006-02-20

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(2003C250)

作者单位:1. 710004 西安交通大学第二医院普外科;2. 陕西省人民医院普外科

作者简介:王建华(1971-),男,在读博士,主治医师,研究方向为大肠癌化疗耐药及耐药逆转

作用我们进行了如下试验。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 实验肿瘤细胞株 大肠癌 174 细胞株由西安交通大学医学院病理教研室王一理教授惠赠,最佳细胞接种浓度为  $(1.5 \sim 5.0) \times 10^4$  / ml,对数生长期为接种后的 3 ~ 5 天<sup>[4]</sup>。

1.1.2 重组人 p53 腺病毒注射液 (rAd-p53) 深圳赛百诺基因技术有限公司产品,为同源重组人 p53 腺病毒。

#### 1.2 方法

1.2.1 重组人 p53 腺病毒及临床常用化疗药物对大肠癌细胞体外生长抑制的对比测定 (噻唑蓝比色法,即 MTT 法)。利用细胞存活率 (细胞存活率 = 试验组光吸收值 / 对照组光吸收值  $\times 100\%$ ) 对药物剂量对数作图并按作图法  $y = ax + b$  求出实验药物的  $IC_{50}$ <sup>[5]</sup>。

1.2.2 消化、稀释、接种 0.25% 的胰蛋白酶 (GIBCO 公司) 消化大肠癌 174 细胞株,并用含 10% 新生牛血清 (北京鼎国) 的 RPMI 1640 (GIBCO 公司) 培养液稀释成浓度为  $5 \times 10^4$  个 / ml 均匀的单细胞悬液,将其以每孔 200 $\mu$ l 接种于 96 孔培养板 (美国 COSTAR),置于细胞孵育箱 (美国 NUAIRE),在 37 $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  及饱和湿度条件下进行培养。

1.2.3 基因转染 72h 后实验组 (共设 3 个浓度,每浓度设平行孔 3 个) 每孔加入重组人 p53 腺病毒液 100 $\mu$ l,浓度分别为  $1 \times 10^{10}$  VP、 $1 \times 10^9$  VP、 $1 \times 10^8$  VP;对照组每孔加入生理盐水 100 $\mu$ l,连续测定 96h。

1.2.4 显色 分别于转染后 12、24、48、72、96h 终止实验。在终止实验前 4h,于每孔加入 MTT 20 $\mu$ l (GIBCO 公司),继续培养 4h 后终止培养,吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 $\mu$ l (西安化学制剂厂),水平振荡仪振荡 10min,倒置显微镜下观察细胞内蓝紫色结晶完全溶解,形成均匀的蓝紫色溶液。

1.2.5 比色测定 选择 450nm、630nm 双波长,在酶联免疫检测仪 (香港 DENLEY DRAGON-352) 上测定各孔光吸收值,记录结果,并计算药物的  $Imax\%$  (Survival rate maximal inhibition) 和  $IC_{50}$  (50% Inhibition concentration),用以比较不同化疗药物的体外抑瘤效应。同时测定其他 6 种常用化疗药物的  $Imax\%$ 、 $IC_{50}$  以便与 rAd-p53 对比,了解其抑癌活性的强弱。

1.2.6 免疫组化法检测 rAd-p53 体外转染大肠癌细胞后相关蛋白的表达情况 (1) 消化、稀释、接种:同

样将大肠癌 174 细胞株,以每孔  $3 \times 10^4$  个细胞的密度接种于预置有圆玻片 (经多聚赖氨酸浸泡、高压灭菌预处理) 的 12 孔细胞培养板中并置于细胞孵育箱中培养。(2) 转染:72h 后细胞生长良好,全部附于玻片上。分别以  $1 \times 10^{11}$  VP/孔、 $1 \times 10^{10}$  VP/孔、 $1 \times 10^9$  VP/孔、 $1 \times 10^8$  VP/孔、 $1 \times 10^7$  VP/孔加入 rAd-p53,在转染后 1、2、6、12、24、48、72、96h 捞出玻片,并以 4% 无水乙醇固定 10min,PBS 冲洗 3 遍,自然晾干。实验过程中设置空白对照组,仅加入生理盐水 100 $\mu$ l,不给予 rAd-p53。(3) 免疫组化检测:每张玻片滴加 50 $\mu$ l 3%  $H_2O_2$ ,室温下孵育 10min。PBS 冲洗 3  $\times$  3min。滴加一抗 50 $\mu$ l (鼠抗人 p53 单克隆抗体,北京中杉金桥),37 $^{\circ}$ C 孵育 60min。PBS 冲洗 3  $\times$  3min。滴加二抗 50 $\mu$ l (即用型羊抗鼠 IgG/HRP 多聚体,北京中杉金桥),37 $^{\circ}$ C 孵育 15min。PBS 冲洗 3  $\times$  3min。滴加 100 $\mu$ l DAB 溶液,显微镜下观察显色。流水冲洗,苏木素复染。二甲苯透明后封片。

### 2 结果

按体外 MTT 检测结果,以细胞存活率为纵轴结合浓度的对数值绘制大肠癌 174 细胞株在 rAd-p53 作用下的细胞生长抑制曲线见图 1。从曲线看不同浓度对大肠癌细胞生长抑制作用不同,随浓度变化抑制作用呈现正相关性剂量效应关系;同样,随药物作用时间的延长其对细胞的生长抑制也呈正相关时间效应关系。利用作图法  $y = ax + b$  计算 rAdp53 的  $IC_{50}$  为  $5.73 \times 10^{11}$  VP/ml。

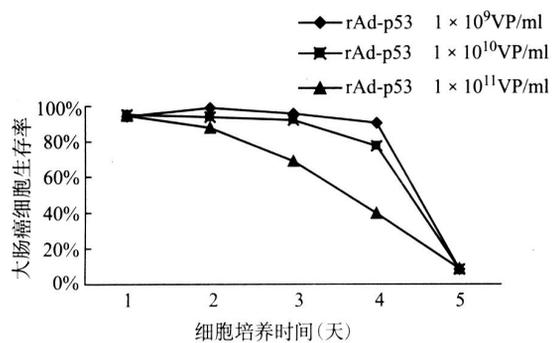


图 1 rAd-p53 体外作用下大肠癌 174 细胞株的生长抑制曲线

$Imax\%$  代表了化疗药物达到最大抑制时,残存肿瘤细胞的存活率。 $Imax\%$  越大,表示残存的肿瘤细胞越多,药物的肿瘤抑制效应越小。不同药物之间的  $Imax\%$  存在着明显的差异。表 1 列出了大肠癌 174 细胞株对重组 p53 腺病毒及大肠癌常用的 6 种化疗药物  $Imax\%$  的对比。

由此可以看出,10 倍临床血浆峰浓度时丝裂霉素的抑瘤效应最强;1 倍临床血浆峰浓度时 5-氟尿

表 1 重组 p53 腺病毒与 6 种常用化疗药物对大肠癌 174 细胞株的  $I_{max}$  %对比

浓度	rAd-p53	5-Fu	Tegafur	Cisplatin	Oxaliplatin	MMC	Paclitaxel
10 倍	38.29 %	28.19 %	49.82 %	21.93 %	22.93 %	14.20 %	33.64 %
1 倍	86.67 %	33.97 %	69.11 %	66.74 %	51.60 %	47.76 %	46.46 %
0.1 倍	86.81 %	62.99 %	89.29 %	76.47 %	82.82 %	84.26 %	50.25 %

表 2 大肠癌 174 细胞株对重组 p53 腺病毒及常用化疗药物  $IC_{50}$  的比较

kinds	rAd-p53	5-Fu	Tegafur	Cisplatin	Oxaliplatin	MMC	Paclitaxel
血浆峰浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	$10^{11}$ *	250	250	50	100	10	4
$IC_{50}$ (血浆峰浓度倍数)	5.73	0.28	9.77	2.36	1.14	0.86	0.53

嘧啶抑瘤效果最强;0.1倍临床血浆峰浓度时紫杉醇抑瘤效果最强。由此推论丝裂霉素、顺铂、奥沙利铂等随着浓度的增加体外抑瘤效果也在增强即表现出良好的剂量依赖效应;紫杉醇、5-氟尿嘧啶等则在0.1倍临床血浆峰浓度时表现良好的抑瘤效果即敏感性最好。

以药物达到最大抑瘤效应一半时所需的药物浓度  $IC_{50}$  来比较大肠癌-174 细胞株对不同药物的敏感性。 $IC_{50}$  越小,表示肿瘤细胞对化疗药物的敏感性越大;反之则表示敏感性越小。表 3 列出了大肠癌 174 细胞株对重组 p53 腺病毒及大肠癌常用的 6 种化疗药物的  $IC_{50}$  (50 % inhibiting concentration) 数值。

从表 2 可以看出同等条件下,重组 p53 腺病毒抑制大肠癌-174 细胞株的效应并不强,按  $IC_{50}$  而言 5-氟尿嘧啶、紫杉醇、丝裂霉素的作用最强,5-氟尿嘧啶仅需要临床血浆峰浓度的0.28倍即可以达到受试细胞的半数抑制;顺铂、奥沙利铂的抑制肿瘤细胞生长的作用较前者弱,但明显强于重组 p53 腺病毒、替加氟的作用。

基因转染后免疫组化染色结果如图 2~7。5 种不同滴度的重组人 p53 腺病毒注射液转染后皆出现了阳性染色结果且最早的阳性染色结果皆出现在基因转染 24 小时后,差别仅仅在于阳性染色的细胞数略有不同。阳性细胞表现为核棕染的细胞。空白对照组未进行基因转染,免疫组化染色为阴性。

### 3 讨论

大肠癌是一种常见的高发恶性肿瘤。在世界范围内其发病率位于各种恶性肿瘤的第 2 位;在我国大肠癌的发病率、死亡率逐年上升<sup>[6]</sup>。如何合理有效的治疗大肠癌,尤其对于放、化疗不敏感且无法手术切除者已经成为令人关注的问题。

研究证实,p53 基因的改变,在致癌过程中起着非常重要的作用<sup>[7-9]</sup>。野生型 p53 基因(wild type-p53 gene, wt-p53)是一个与细胞凋亡密切相关的抑

癌基因<sup>[10]</sup>。早在 1990 年 Baker、1993 年 Roth 等<sup>[11,12]</sup>就先后观察到肿瘤细胞体外转染 wt-p53 后凋亡会明显增加。因此,以正常野生型 p53 基因进行替代治疗就成为大肠癌基因治疗的研究热点。

将基因导入细胞内的载体一般分为病毒类和非病毒类两种。rAd-p53 注射液就是以目前应用最广泛的人 V 型腺病毒为载体同源重组人类 p53 基因构成的。腺病毒载体具有广泛的宿主感染性,提高了靶细胞的感染率;同时作为载体,其 DNA 不整合到宿主细胞染色体中,安全性较高<sup>[13]</sup>。目前多项实验已证实,无论靶细胞的 p53 基因缺失与否,都不会影响外源性野生型 p53 基因的细胞转导,并且癌细胞的生长抑制作用只取决于重组 p53 腺病毒的转染效率<sup>[14-17]</sup>。

通过体外 MTT 药敏检测,我们发现 rAd-p53 的  $IC_{50}$  为  $5.73 \times 10^{11}$  VP/ml,并且具有剂量和时间依赖性。通过免疫组化染色检测我们观察到,外源性野生型 p53 基因转染 24 小时后,p53 蛋白已经在 174 细胞中合成并表达,与 Ohtani 等进行的裸鼠体内外源性 p53 基因转染的表达结果、表达时间相同<sup>[18]</sup>,且与转染的病毒滴度无关。此外通过免疫组化染色检测发现阳性染色片中,不同滴度转染后阳性细胞的数量略有差异,但免疫组化染色仅仅只是一种定性检查法,并非定量检查法,阳性细胞的计数并不代表基因转染的效率和细胞生长抑制的强度,仅仅证明抑癌基因 p53 可以成功转导入细胞,同时可以合成相应的功能蛋白,发挥其应有的监视作用,促进肿瘤细胞及受损细胞程序性凋亡。

rAd-p53 的体外抑制肿瘤细胞生长的作用是确定的,但通过与大肠癌常用化疗药物的体外 MTT 药敏对比检测,却发现其单用时对大肠癌-174 细胞株的抑制效果远远差于经典的化疗药物如丝裂霉素、5-氟尿嘧啶和顺铂等。所以,临床治疗过程中单独使用它进行大肠癌的非手术治疗可能无法获得令人满意的治疗效果。

rAd-p53 不仅具有独立的抑制多种肿瘤生长的

作用,还可以通过激活 *bax* 基因、抑制 *bcl-x* 基因以及诱导前凋亡基因 *PUMA*、*Bak* 及 *Fas* 的表达,促进细胞凋亡,提高多种肿瘤细胞对放化疗的敏感性<sup>[1]</sup>。对此有争议的是, *p53* 还可能会通过诱导 *p21* 基因表达等机制,使肿瘤细胞只是生长停止而不发生凋亡,同时修复放化疗导致的 DNA 损伤,从而降低了肿瘤细胞对放化疗的敏感性<sup>[19]</sup>。究竟 *rAd-p53* 抑制肿瘤的作用以及与肿瘤放化疗之间的协同作用如何表现,尚待进一步深入研究证实。

(本文图见 232 页)

#### 参考文献:

- [1] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancers[J]. *Science*, 1991, 253(5015): 49-53.
- [2] Seemann S, Maurici D, Olivier M, et al. The tumor suppressor gene TP53: implications for cancer management and therapy[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004, 41(5-6): 551-583.
- [3] Kressner U, Lindmark G, Gerdin B, et al. Immunohistochemical p53 staining is of limited value in the staging and prognostic prediction of colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 1996, 16(2): 951-957.
- [4] 王建华, 张涛, 纪宗正, 等. 应用噻唑蓝比色法进行大肠癌与胆囊癌细胞生长曲线的对比测定[J]. *现代肿瘤杂志*, 2005, 13(3): 310-312.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 第 1 版. 西安: 世界图书出版社, 1996. 174-176.
- [6] 王吉甫. 胃肠外科学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 920-924.
- [7] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis[J]. *Cell*, 1990, 61(3): 759-767.
- [8] Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, et al. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(14): 3965-3971.
- [9] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development[J]. *N Engl J Med*, 1988, 319(4): 525-532.
- [10] Gu J, Zhang L, Swisher SG, et al. Induction of p53-regulated genes in lung cancer cells: implications of the mechanism for adenoviral p53-mediated apoptosis[J]. *Oncogene*, 2004, 23(6): 1300-1307.
- [11] Baker SJ, Markowitz S, Fearon E, et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild type p53[J]. *Science*, 1990, 249(2): 912-919.
- [12] Roth JA. Gene replacement strategies for cancer[J]. *Isr J Med Sci*, 1996, 32(2): 89.
- [13] Swisher SG, Roth JA. Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2002, 11(3): 521-535.
- [14] 郭英, 王坤, 陈积圣. 野生型 p53 基因对不同内源性 p53 状态的肝癌细胞生长的影响[J]. *中外普通外科杂志*, 2001, 16(12): 722-724.
- [15] Inoue A, Narumi K, Matsubara S, et al. Administration of wild-type p53 adenoviral vector synergistically enhances the cytotoxicity of anti-cancer drugs in human cancer cells irrespective of the status of p53 gene[J]. *Cancer Lett*, 2000, 157(1): 105-112.
- [16] Quist SR, Wang-Grohke S, Kohler T, et al. Cooperative effect of adenoviral p53 gene therapy and standard chemotherapy in ovarian cancer cells independent of the endogenous p53 status[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(8): 547-554.
- [17] Wolf J K, Mills GB, Bazzet L, et al. Adenovirus-mediated p53 growth inhibition of ovarian cancer cells is independent of endogenous p53 status[J]. *Gynecol*, 1999, 75(2): 261-266.
- [18] Ohtani S, Kagawa S, Tango Y, et al. Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 in vivo[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(1): 93-100.
- [19] Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53[J]. *Cell Tissue Res*, 1998, 292(3): 435-445.

[编辑:周永红]

#### (上接第 184 页)

- ting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2004, 60(4): 303-309.
- [7] Ma XT, Wang S, Ye YJ, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(11): 1569-1573.
  - [8] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8590-8607.
  - [9] Vanasse G, Winn RK, Rodov S, et al. Bcl-2 overexpression leads to increases in suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells and de novo follicular lymphoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(11): 620-631.
  - [10] Yuste VJ, Sanchez-Lopez I, Sole C, et al. The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells[J]. *J Neurochem*, 2002, 80(1): 126-139.
  - [11] Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells[J]. *Blood*, 2002, 100(1): 194-199.
  - [12] Burke WM, Jin X, Lin HJ, et al. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2001, 20(55): 7925-7934.
  - [13] Lai SY, Childs EE, Xi S, et al. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2005, 24(27): 4442-4449.
  - [14] Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(11): 897-907.
  - [15] Song H, Sondak VK, Barber DL. Modulation of Janus kinase 2 by cisplatin in cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(4): 1017-1026.

[编辑:周永红]

## Skp2、p27 在骨肉瘤中的表达及其临床意义

(正文见 189 页)

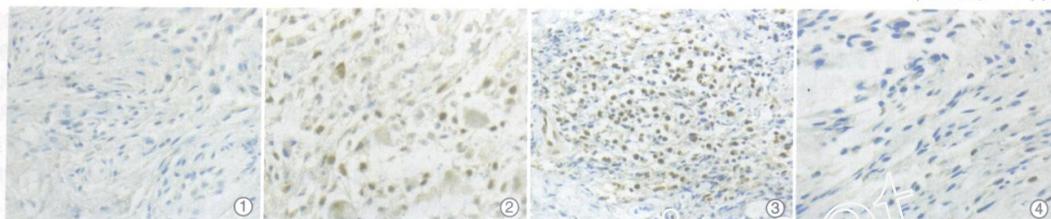


图 1 Skp2 在骨软骨瘤中呈阴性表达 (SP × 400)

图 2 Skp2 在骨肉瘤中的阳性表达 (SP × 400)

图 3 p27 在骨软骨瘤中的强阳性表达 (SP × 400)

图 4 p27 在骨肉瘤中的阴性表达 (SP × 400)

## rAd-p53 的抑癌作用及体外转染后抑癌蛋白的表达

(正文见 185 页)

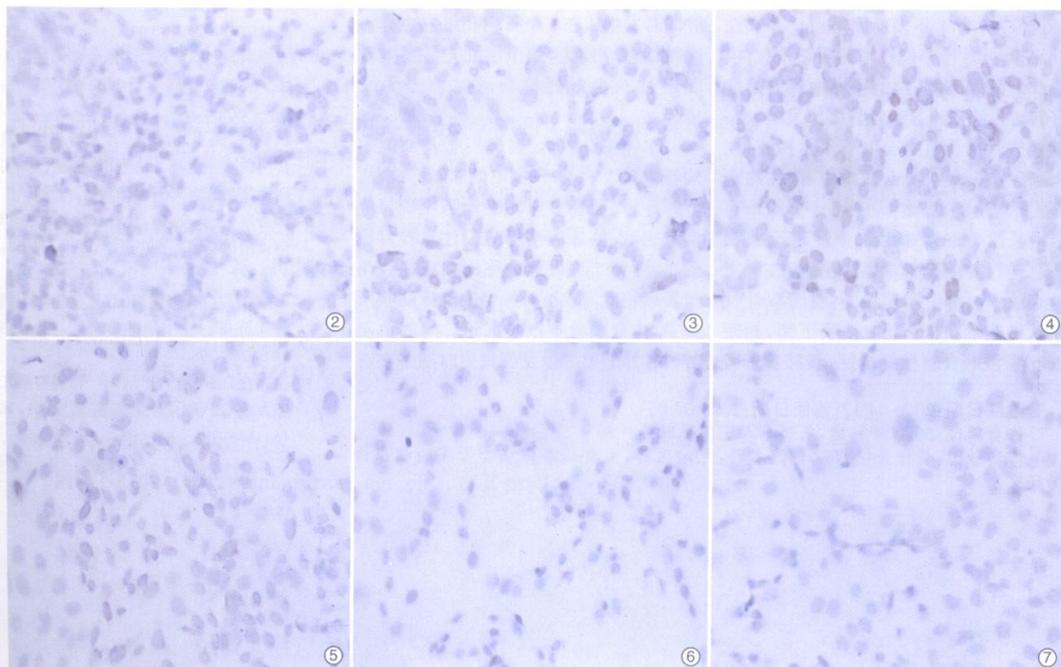


图 2 rAd-p53 阳性染色切片  $1 \times 10^{11}$ VP ( $\times 40$ )

图 3 rAd-p53 阳性染色切片  $1 \times 10^{10}$ VP ( $\times 40$ )

图 4 rAd-p53 阳性染色切片  $1 \times 10^9$ VP ( $\times 40$ )

图 5 rAd-p53 阳性染色切片  $1 \times 10^8$ VP ( $\times 40$ )

图 6 rAd-p53 阳性染色切片  $1 \times 10^7$ VP ( $\times 40$ )

图 7 p53 阴性染色切片 ( $\times 40$ )