

· 基础研究 ·

# 雌激素改善大鼠记忆及促进海马 BDNF 蛋白表达上调

唐明山

(重庆市巴南区人民医院神经内科 401320)

**摘要:**目的 探讨雌激素改善大鼠记忆与 BDNF 表达的关系。方法 停止繁殖的 15 月龄雌性大鼠,体质量 350~400 g,随机分为治疗组和对照组,在颈部皮下分别注射相同剂量的苯甲酸雌二醇和生理盐水。采用 Morris 水迷宫检测大鼠记忆,大鼠海马 BDNF、TrkB 及 mRNA 表达采用 RT-PCR 检测,BDNF、TrkB 及 proBDNF 蛋白表达采用 Western-blot 检测。结果 治疗组大鼠潜伏期缩短,海马 BDNF、TrkB、proBDNF 表达上调( $P < 0.01$ )。结论 雌激素改善大鼠记忆,可能与 BDNF 及相关蛋白表达上调有关。

**关键词:**雌激素;记忆;脑源性神经营养因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.23.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)23-2386-03

## Estrogen to improve rat memory and hippocampal BDNF protein expression upregulation

Tang Mingshan

(Department of Neurology, the First People's Hospital in Ba'nan District, Chongqing 401320, China)

**Abstract: Objective** To explore the relation of estrogen on memory and expression of BDNF in hippocampus of postmenopausal rats. **Methods** Rats retired from breeding for two reproductive cycles, 15-month-old, and 350-400 g weight, were divided into two groups by random assigned method. Before testing, estradiol benzoate and the same capacity of normal saline was injected subcutaneously on the cervical part of rats. memory of rats was detected by Morris water maze. RT-PCR and Western-blot were respectively used to detect expression of BDNF mRNA, TrkB mRNA and protein of BDNF, TrkB and proBDNF hippocampus of postmenopausal rats. **Results** Compared with the control group, the rats of estrogen replacement therapy group showed a shorter escape latency ( $P < 0.05$ ). Contrasted to the control group, expression of BDNF, TrkB and proBDNF protein in hippocampus increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Memory is enhanced in the rats received estrogen replacement therapy group in postmenopausal rats, it maybe related with high expression of BDNF and relational protein.

**Key words:** estrogen; memory; brain-derived nerve growth factor

研究表明,脑源性神经生长因子(brain-derived nerve growth factor, BDNF)与学习记忆有关<sup>[1-2]</sup>,BDNF是在脑内合成的一种蛋白质,它广泛分布于中枢神经系统内。有关运用雌激素改善记忆的研究颇多,尽管结论不一,多数研究认为,绝经后妇女血浆雌激素水平降低可能使认知功能恶化<sup>[3]</sup>,至少在绝经后特定的时间窗内,雌激素替代治疗能改善认知功能<sup>[3-4]</sup>。有关雌激素改善认知功能的机理尚不清楚,结合 BDNF 与记忆的关系,本研究观察雌激素治疗后大鼠海马 BDNF、高亲和受体酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)和 BDNF 前体蛋白(precursor protein of brain-derived neurotrophic factor, proBDNF)表达的变化,了解其与大鼠记忆改变的关系,探讨雌激素替代治疗影响绝经后大鼠认知功能的可能机制。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及分组** 93 只清洁级 Sprague-Dawley 雌性大鼠,15 月龄左右,已自然停止繁殖 2 个周期,体质量 350~400 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。随机分为治疗组和对照组,每组各 35 只,备用 8 只(每组 4 只),7 只在手术中或术后死亡。每组在 7 d 和 30 d 两个时间点进行观测。

**1.2 模型制备** 先将所有大鼠在实验前放入不放置水下平台的水迷宫中游泳 4 次(上下午各 2 次),剔除原地打转的大鼠 8 只后,随机分为雌激素替代治疗组及对照组。模型制备按有关文献<sup>[5]</sup>,雌激素替代治疗组切除双侧卵巢,对照组按相同方法

打开腹腔,找到卵巢后不切除卵巢,关腹。所有手术操作均由同一实验人员完成,避免不同人员操作引起的误差。两组大鼠于相应时相点取材或行有关实验。

**1.3 动物饲养** 手术完毕后的实验动物在第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心按组分笼喂养,每组每笼对编号、组别、数量、手术时间进行标识,5 只大鼠为一笼进行喂养,饲料由动物实验中心提供普通大颗粒饲料,按每 200 g 标准体质量大鼠每天进食 15 g 干饲料匡算,限量分笼投食,自由饮水,每天 07:00~19:00 保证光照 12 h,定时通风,每日早、晚冲洗大鼠排泄物,空调调节室温,使室温保持在 17℃~23℃。

**1.4 给药方法** 实验动物术后恢复 1 个月,从第 17 月龄开始,每日治疗组大鼠颈部皮下注射苯甲酸雌二醇(estradiol benzoate, EB) 25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup><sup>[6]</sup>,对照组大鼠颈部皮下注射相同剂量生理盐水。为保持大鼠血浆雌二醇浓度,避免雌二醇波动引起的认知功能检查的误差,水迷宫实验阶段每日仍按上述方法进行苯甲酸雌二醇或生理盐水注射。

**1.5 记忆功能检测** 采用中科院研制生产的 Morris 水迷宫(morris water maze, MWM)3.0 对大鼠记忆功能检测。实验前 1 d 为观察其游泳姿势及熟悉环境,让大鼠自由游泳 2 min。训练开始时,将平台置于 NW 象限,将大鼠面向池壁从池壁 4 个起始点的任一点放入水池,入水后系统自动录像记录游泳路径(swimming pathlength)和大鼠找到平台的游泳时间即逃避潜伏期(escape latency),每天分上、下午两个时间段(blocks),每个时间段训练 2 次(trials),实验历时 5 d,每次大鼠爬上或

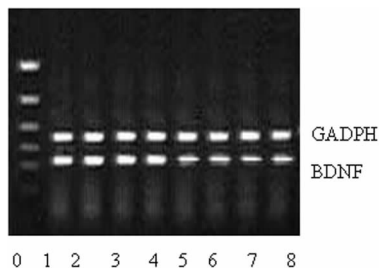
被引到平台后,在平台上休息 30 s。同一次训练的全部大鼠采用相同的人水点,每次训练选取不同入水点。大鼠训练过程由系统自动记录,在规定时间内找不到平台的大鼠,即将其引导到平台,系统自动中止记录,并将潜伏期计为 150 s。训练结束立即撤出平台,进行空间搜索实验,150 s 内大鼠在穿越原平台次数、游泳时间百分比、在平台象限游泳距离、大鼠的搜索策略。

**1.6 分子生物学指标** BDNF、TrkB、mRNA:采用半定量(RT-PCR)检测。全部引物由上海生工合成,BDNF 引物序列:上游 5'-AGC CTC CTC TGC TCT TTC TGC TGG A-3',下游 5'-CTT TTG TCT ATG CCC CTG CAG CCT T-3';TrkB 引物序列:上游 5'-ATT GAC CCA GAG AAC ATC AC-3',下游 5'-CAG GAA ATG GTC ACA GAC TT-3';GADPH 为内参照。proBDNF、BDNF 及 TrkB 蛋白:采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测。一抗分别采用 Chemicom International 公司的兔抗鼠 proBDNF(AB5613)及 Santa Cruz Biotechnology 公司的兔抗鼠 BDNF(N-20):sc-546、兔抗鼠 TrkB,二抗采用 Sigma 公司的山羊抗兔 IgG,采用美国 DUPONT 的化学增强发光试剂盒(western blot chemiluminescence reagent plus)。操作按分子生物学实验操作第 2 版进行。

**1.7 统计学处理** 实验数据采用 SPSS12.0 统计软件进行分析。所有计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组内均数的显著性检验采用单因素方差分析(one way ANOVA),组间均数的显著性检验采用独立样本的 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

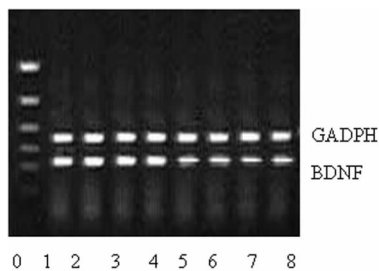
**2 结 果**

**2.1 雌激素能促进绝经后大鼠海马表达 BDNF mRNA 和 TrkB mRNA 扩增结果** GADPH 片断长度为 598 bp, BDNF 扩增片断长度为 297 bp(图 1), TrkB 扩增片断长度为 467 bp(图 2)。



1,2:雌二醇治疗 30 d;3,4:雌二醇治疗组 7 d;5,6:对照组 30 d;7,8:对照组 7 d;0:DL2000(DNA marker)。

**图 1 大鼠海马 BDNF mRNA 扩增产物**



1,2:长期雌二醇治疗组;3,4:短期雌二醇治疗组;5,6:长期对照组;7,8:短期对照组;0:DL2000(DNA marker)。

**图 2 大鼠海马 TrkB mRNA 扩增产物**

以 GADPH 内参照单位密度值为 10 D/mm<sup>2</sup>,结果经图像扫描分析,校正后显示:治疗组大鼠海马 BDNF 和 TrkB mRNA

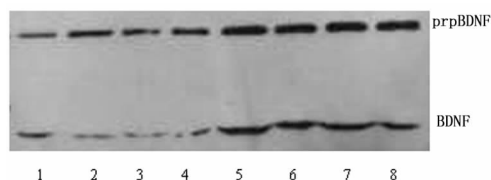
明显高于对照组,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),组内不同时相点比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

**表 1 大鼠海马 BDNF、TrkB mRNA 相对积分光密度( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	时间(d)	BDNF	TrkB
对照组	7	0.722±0.047	0.801±0.030
	30	0.651±0.096	0.732±0.050
雌激素治疗组	7	1.006±0.011*	1.175±0.015*
	30	0.999±0.015*	1.166±0.018*

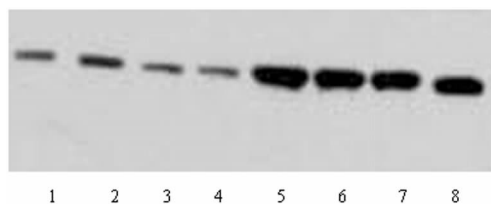
\*:  $P < 0.05$ ,与对照组同时时间段比较。

**2.2 雌激素能调节绝经后大鼠海马 proBDNF、BDNF 及 TrkB 蛋白表达** 免疫印迹结果显示,TrkB、proBDNF 和 BDNF 蛋白免疫印迹蛋白相对分子质量各为 30、14 和 145 kD,结果见图 3~5。



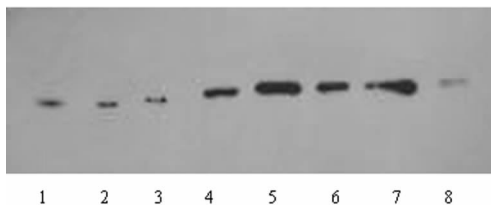
1,2:对照组 7 d;3,4:对照组 30 d;5,6:雌二醇治疗 7 d;7,8:雌二醇治疗 30 d。

**图 3 大鼠海马 BDNF 前体及成熟蛋白表达结果(Western blot)**



1,2:对照组 7 d;3,4:对照组 30 d;5,6:雌二醇治疗 7 d;7,8:雌二醇治疗 30 d。

**图 4 大鼠海马 BDNF 前体蛋白表达结果(Western blot)**



1,2:对照组 7 d;3,4:对照组 30 d;5,6:雌二醇治疗 7 d;7,8:雌二醇治疗 30 d。

**图 5 大鼠海马 TrkB 蛋白表达结果(Western blot)**

以对照组 7 d 这一时相点单位密度值为 10 D/mm<sup>2</sup>,结果经图像扫描分析,校正后显示:雌激素治疗组海马组织 proBDNF、BDNF 及 TrkB 表达水平均明显高于对照组大鼠( $P < 0.05$ ),组内不同时相点差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

**2.3 血浆雌二醇水平比较** 大鼠血浆雌二醇浓度在雌激素治疗 7 d 组为(66.92±10.78)pg/mL,大鼠血浆雌二醇浓度在对照组相应时相点为(3.87±1.94)pg/mL;大鼠血浆雌二醇浓度在雌激素治疗 30 d 组为(64.89±10.09)pg/mL,大鼠血浆雌

二醇浓度在对照组相应时相点为(5.54±2.37)pg/mL,组内时相点比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),两组组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 2 海马 proBDNF、BDNF 及 TrkB 蛋白表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	时间(d)	proBDNF	BDNF	TrkB
对照组	7	1.000	1.000	1.000
	30	0.951±0.096	1.032±0.050	1.131±0.030
雌二醇治疗组	7	2.006±0.011*	1.579±0.015*	1.975±0.015*
	30	2.099±0.015*	1.661±0.018*	2.166±0.018*

\*: $P<0.05$ ,与对照组同时间段比较。

2.4 两组大鼠水迷宫试验成绩比较 两组大鼠定位航行实验经过水迷宫训练后游泳速度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );组内不同时相点间大鼠游泳速度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。说明绝经后大鼠的游泳速度并不能被雌激素替代治疗改善。对两组大鼠潜伏期比较,治疗组找到平台的潜伏期小于对照组( $P<0.05$ ),治疗 30 d 的大鼠潜伏期小于治疗 7 d 的大鼠( $P<0.05$ )。说明治疗组大鼠记忆力强于对照组,治疗 30 d 的记忆力更强(表 3)。

表 3 雌激素对大鼠定位航行实验的影响( $\bar{x}\pm s$ )

项目	n	对照组		雌二醇治疗组	
		7 d	30 d	7 d	30 d
潜伏期(s)	10	16.39±4.76	17.06±5.24	12.01±3.18*	8.34±3.03*★
游泳速度(cm/s)	10	35.18±10.21	33.52±9.21	34.96±9.54	36.07±10.75

\*: $P<0.05$ ,与对照组同时间段比较;★: $P<0.05$ ,与组内 7 d 时比较。

### 3 讨论

本研究中,雌激素治疗组手术后给予雌二醇治疗后,治疗组体内雌激素水平高于对照组,大鼠找到平台的潜伏期较对照组短,说明治疗组大鼠对平台的记忆比对照组好,雌激素治疗改善了大鼠记忆功能。与 Kiss 等<sup>[7]</sup>的研究相符。研究中选取已经绝经的大鼠,主要考虑其雌激素水平较低,即使对照组假手术未切除卵巢,其体内雌激素的水平与治疗组给予的雌二醇量比较可以忽略不计,实验结果能反应雌激素对大鼠记忆的影响。

对雌激素替代治疗改善认知功能的机制,研究认为雌激素可能通过抗凋亡、抗氧化、阻止淀粉样斑的产生及促进神经营养因子分泌<sup>[8]</sup>,来影响认知功能。有研究表明,大脑中 BDNF 表达受月经周期影响<sup>[9]</sup>,提示 BDNF 的表达受雌激素影响。有关记忆的研究表明,记忆与突触前和突触后的长时程增强效应(long-term potentiation, LTP)明确相关,BDNF 能调节突触传递和突触可塑性,改变 LTP<sup>[10]</sup>,增强学习记忆功能。因此,在某种程度上,BDNF 可作为记忆改善的分子标志物。

本研究中,雌激素治疗组大鼠 BDNF 基因及蛋白表达均明显上调,雌激素可能通过促进 BDNF 表达来影响大鼠的记忆。本研究中,治疗组 30 d 时相点大鼠与 7 d 时相点大鼠比较,BDNF 的基因和蛋白水平表达并未上调,其体内雌激素浓度也无显著差异,说明雌激素与 BDNF 表达一致。治疗组定位航行的结果中,30 d 组大鼠潜伏期比 7 d 组大鼠短,说明 30 d 组大鼠记忆好于 7 d 组。分析原因:(1)可能是手术创伤对大

鼠游泳速度有影响,30 d 大鼠手术恢复较好,受手术本身的影响较小。(2)一定时间内雌激素持续替代治疗时间的长短可能对记忆有一定影响。另外,大鼠的记忆可能还存在其他机制。

BDNF 需与其受体结合才能发挥作用,因此,研究 BDNF 的表达离不开其高亲和力受体 TrkB,BDNF 需要与其结合才能发挥作用,二者在海马中表达均较高,它们结合后,使 TrkB 络氨酸残基自磷酸化,促发细胞内信号传导通路,调节 LTP<sup>[11]</sup>,影响学习记忆。TrkB 的基因及蛋白表达上调均与 BDNF 一致,结果从另一方面表明,BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达上调,是雌激素记忆的可能机制。在神经元突触中,BDNF 由其前体蛋白 proBDNF 而来<sup>[12]</sup>,因此,本研究也检测了两组大鼠海马 proBDNF 蛋白表达,结果发现,雌激素治疗组大鼠 proBDNF 蛋白增强,与 BDNF 成熟蛋白表达一致。proBDNF 蛋白表达增强也从另一方面表明雌激素能促进 BDNF 表达,改善学习记忆功能。

本实验中,雌激素替代治疗能改善绝经后大鼠记忆功能,促进 BDNF、高亲和力受体 TrkB 及 proBDNF 蛋白表达,这些蛋白表达的增强,可能是雌激素改善记忆的分子机制之一。

### 参考文献:

- [1] Tuomisto H, Salo P, Saarinen R, et al. The association of serum oestradiol level, age, and education with cognitive performance in peri- and late postmenopausal women[J]. *Maturitas*, 2012, 71(2): 173-179.
- [2] Sherwin BB. Estrogen and cognitive functioning in women: lessons we have learned[J]. *Behav Neurosci*, 2011, 11(17) [Epub ahead of print].
- [3] Meis S, Endres T, Lessmann V. Postsynaptic BDNF signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents[J]. *J Physiol*, 2012, 590(1): 193-208.
- [4] Oostrom I, Franke B, Rijpkema M, et al. Interaction between BDNF val66 met and childhood stressful life events is associated to affective memory bias in men but not women[J]. *Biol Psychol*, 2012, 89(1): 214-219.
- [5] Palmer AM. Pharmacotherapy for Alzheimer's disease: progress and prospects[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(9): 426-433.
- [6] Miller MM, Monjan AA, Buckholtz NS. Estrogen replacement therapy for the potential treatment or prevention of Alzheimer's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 949: 223-234.
- [7] Kiss A, Delattre AM, Pereira SI, et al. 17 $\beta$ -estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 227(1): 100-108.
- [8] Russo M, Daino D, Russo N, et al. Brain-derived neurotrophic factor plasma variation during the different phases of the menstrual cycle in women with premenstrual syndrome[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2011, 36(4): 523-530.
- [9] Balschun D, Manahan VD, Wagner T, (下转第 2391 页)

NOS、NO 与 mALB、肾肥大指数、基质比、肾小球截面积呈正相关。结合尿 mALB、肾脏形态学改变判定糖尿病大鼠 12 周时,尚处于糖尿病肾病早中期,仍以肾脏高血流量、高滤过为主,与 NO、NOS 的表达相一致,证明 NOS、NO 参与了糖尿病肾病早期的发病,且 iNOS、cNOS 均参与了 NO 的生成。随着病程的发展,可能会出现 Radko 和 Anderson<sup>[12]</sup> 总结的 NO 双向调节机制。

高血糖诱导 ROS 的产生,ROS 能够激活 NOS 产生 NO,同时解偶联的 NOS 在生成 NO 的时候,也产生超氧阴离子,因此解偶联的 NOS 是糖尿病血管 ROS 产生的重要来源,加重氧化应激状态<sup>[13]</sup>。当局部 NO 浓度升高又可与周围的氧自由基等反应而生成活性氮族(reactive nitrogen species, RNS),此反应速度极快,且反应不可逆,只要两者相遇即可生成 ONOO<sup>-</sup>,速度是超氧歧化酶的 6 倍,NO 是 ROS 强大的清除剂,与此同时 NO 的水平也是下降的,因此 RNS 和 ROS 的生成和清除是重叠的,且彼此是互相调节的<sup>[14-15]</sup>。本实验显示 SOD/MDA 与总 NOS、NO 之间存在负相关提示肾脏抗氧化能力减低与 NOS、NO 有关。这可能与不同生理病理状态下二者之间的代谢平衡有关。

很多动物实验证实抗氧化治疗对心脑血管疾病有效,但大多人体实验研究效果并不令人满意<sup>[16]</sup>。ROS 和 NO 虽然在糖尿病肾病可作为独立的发病因素存在,两者之间也有着密切的联系,但其作用效果仍不清楚,分析其原因可能是多因素效应不能均衡的结果。不仅仅是 ROS 和 NO 之间的平衡,更是肾脏细胞内氧化状态和抗氧化状态的平衡,有待于进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Josephine M, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes[J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1446-1454.
- [2] Lee SH, Nam BY, Kang EW, et al. Effects of an oral adsorbent on oxidative stress and fibronectin expression in experimental diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(7): 2134-2141.
- [3] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes[J]. *Endocr Rev*, 2002, 23: 599-622.
- [4] Hiroki F, Hiromi F, Shinsuke C, et al. Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy[J]. *JASN*, 2009, 20(6): 1303-1313.
- [5] Ulrich F, William C. Sessa nitric oxide synthases: regulation and function[J]. *Eur Heart*, 2011, 9(10): 1093-1098.
- [6] Ducasay CA, Myers DA. eNOS activation and NO function: differential control of steroidogenesis by nitric oxide and its adaptation with hypoxia[J]. *J Endocrinol*, 2011, 210: 259-269.
- [7] Bernd H, Christian PM, Birgit H, et al. Analysis of NO-synthase expression and clinical risk factors in human diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(4): 1346-1354.
- [8] Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis[J]. *Semin Nephrol*, 2003, 23(2): 194-199.
- [9] Ishii N, Patel KP, Lane PH, et al. Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with diabetes mellitus[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12: 1630-1639.
- [10] Tessari P, Cecchet D, Cosma A, et al. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy[J]. *Diabetes*, 2010, 59(9): 2152-2159.
- [11] Atul A, Harlokesh NY, Sharma PL. Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 354(1-2): 57-66.
- [12] Radko K, Anderson S. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284(6): 1121-1137.
- [13] Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288: 1144-1152.
- [14] Nava B, Julia K, Hilla O, et al. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(1): 27-71.
- [15] Bedrad K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(2): 245-313.
- [16] Schürks M, Glynn RJ, Rist PM, et al. Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *BMJ*, 2010, 341(11): c5702-5709.

(收稿日期: 2011-11-07 修回日期: 2012-02-16)

(上接第 2388 页)

- et al. A specific role for group mGluRs in LTP and hippocampus-dependent spatial learning[J]. *Lear Mem*, 1999, 6(2): 138-152.
- [10] M0hamd EM, Ahmed HH, Estefan SF, et al. Windows into estradiol effects in Alzheimer's disease therapy[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011, 15(10): 1131-1140.
- [11] Lu B, Gottschalk W. Modulation of hippocampal synaptic

transmission and plasticity by neurotrophins[J]. *Prog Brain Res*, 2000, 128: 231-241.

- [12] Derek TS, Robert JH. Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus[J]. *J Neuro Sci*, 2002, 22(7): 2650-2659.

(收稿日期: 2012-01-18 修回日期: 2012-02-28)