

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.35.011

肉桂酸对小鼠运动疲劳的实验研究

穆旭¹, 李金²

(1. 首钢工学院基础部, 北京 100041; 2. 北京建筑大学体育部, 北京 100044)

[摘要] **目的** 探讨肉桂酸对提升小鼠运动耐力的影响。**方法** 通过建立力竭性游泳来建立小鼠力竭性运动模型, 比较安静对照组、运动训练组和运动给药组小鼠力竭游泳持续时间, 血浆中乳酸(LAC)含量来探讨肉桂酸对小鼠的耐力提升; 检测肝脏组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和过氧化酶(CAT)的含量来探讨肉桂酸的抗氧化能力, 通过 Western blot 方法检测肉桂酸对小鼠股四头肌中 Na^+/K^+ -ATP 酶、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶表达水平来进一步研究其对小鼠运动能力提升的影响。**结果** 肉桂酸显著延长小鼠的游泳时间; 运动给药组与安静对照组比较: 血浆 LAC 含量虽然有所升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 肝脏组织匀浆中 SOD 和 CAT 显著下降 ($P<0.05$), MDA 显著上升 ($P<0.01$), CAT 虽下降但差异无统计学意义 ($P>0.05$), Na^+/K^+ -ATP 酶和 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的表达水平显著下降 ($P<0.01$); 运动训练组与安静对照组比较, 血浆 LAC 含量显著升高 ($P<0.01$), 肝脏组织匀浆中 SOD 和 CAT 显著下降 ($P<0.01$), MDA 显著上升 ($P<0.01$), Na^+/K^+ -ATP 酶和 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的表达水平显著降低 ($P<0.01$); 运动给药组与运动训练组比较, 血浆 LAC 含量显著降低 ($P<0.01$), 肝脏组织匀浆中 SOD 和 CAT 显著上升 ($P<0.01$), MDA 显著下降 ($P<0.01$), CAT 显著下降 ($P<0.01$), Na^+/K^+ -ATP 酶和 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的表达水平显著降低 ($P<0.05$)。**结论** 肉桂酸具有良好的抗氧化能力和抗疲劳能力。

[关键词] 肉桂酸; 运动耐力; 抗氧化**[中图分类号]** R872.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)35-4932-04

Experiment research of cinnamic acid on endurance exercise in mice

Mu Xu¹, Li Jin²

(1. Department Foundation, Shougang Institute of Technology, Beijing 100041, China;

2. Sports Section, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of cinnamic acid to enhance the exercise endurance in mice. **Methods** Through the exhaustive swimming to establish mice exhaustive exercise model, the mice were divided into control group, exercise control group and exercise cinnamic group ($n=10$), the mice exhaustive swimming time were compared, blood lactic acid(LAC) levels were used to explore the endurance of cinnamic acid in mice; the super oxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and peroxidase (CAT) content in liver homogenates were used to detect mice endurance enhancement and antioxidant capacity of cinnamic acid, and expression of Na^+/K^+ -ATP enzyme, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP enzyme on mice quadriceps by Western blot to further study its effect on improving exercise capacity in mice. **Results** Cinnamic acid significantly prolonged the swimming time of mice; Exercise cinnamic group compared with control group: although the LAC content in plasma elevated, the difference was not statistically significant ($P>0.05$), SOD and CAT in liver homogenate was significantly decreased ($P<0.05$), MDA increased significantly ($P<0.01$), CAT was decreased but with no statistically significant ($P>0.05$), the expression level of Na^+/K^+ -ATP enzyme and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP enzyme decreased significantly ($P<0.01$). Exercise control group compared with control group: the LAC content in plasma increased significantly ($P<0.01$), SOD and CAT in liver homogenate was significantly decreased ($P<0.01$), MDA increased significantly ($P<0.01$), expression level of Na^+/K^+ -ATP enzyme and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP enzyme decreased significantly ($P<0.01$); Exercise cinnamic group exercise control group: the LAC content in plasma was significantly reduced ($P<0.01$), SOD and CAT in liver tissue significantly increased ($P<0.01$), MDA decreased significantly ($P<0.01$), CAT decreased significantly ($P<0.01$), the expression level of Na^+/K^+ -ATP enzyme and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP enzyme decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Cinnamic acid has good oxidation resistances and anti-fatigue ability.

[Key words] cinnamic acid; endurance exercise; antioxidant

运动员在运动和训练中经常产生缺氧、缺血及疲劳, 使机体耐力下降。如何消除剧烈运动后体内过量的自由基, 延缓和抵抗运动性疲劳的产生, 同时提高运动成绩, 成为运动医学者们研究的重要课题。有针对地使用运动保健品对提高运动训练效果和运动成绩具有重要的意义, 比如辣椒素、辣椒素脂

等^[1-3]。肉桂酸(cinnamic acid)即 3-苯丙烯酸(3-phenyl-2-propenoic acid), 又称桂皮酸、桂酸。是从植物中提取的一种天然芳香族有机酸, 无毒性^[4], 目前广泛应用于药品、香料、农药等, 具有抗菌^[5]、利胆^[6]、抗肿瘤^[7]的作用。目前, 在运动科学领域, You 等^[8]将肉桂酸衍生物——阿魏酸用于增强人和竞技用

马的竞技能力,发现加入肉桂酸衍生物可以增强举重运动员的肌肉强度^[8];Lee 等^[9]通过研究指出肉桂酸本身具有抗氧化的作用,虽然肉桂酸对健康的好处受到了大量的关注,但其对力竭性运动能力的影响的研究还相对较少。因此,本研究拟通过建立小鼠力竭游泳运动损伤模型,观察肉桂酸注射剂对力竭训练小鼠抗氧化能力及腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)酶代谢的影响,为肉桂酸应用于运动保健领域提供实验依据,为其今后在竞技体育运动中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 肉桂酸购自 Sigma 公司(美国)。

1.1.2 实验动物 健康 8 周龄 ICR 雄性小鼠 30 只,体质量(18.72±0.738)g,由天津中医药大学医学动物实验中心提供。

1.1.3 实验药品 乳酸(BLAC)试剂盒、丙二醛(MDA)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒、超微量 Na⁺/K⁺-ATP 试剂盒、超微量 Ca²⁺/Mg²⁺-ATP 酶均购自上海源叶生物技术有限公司;ATP 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司,β-actin 单克隆抗体购自武汉博士德公司,二抗购自 Invitrogen 公司。

1.1.4 主要仪器 小鼠恒温游泳池[90 cm×60 cm×45 cm,水温(2.8±1.0)℃,水深 38 cm,底部安装有水泵形成流动水流,流速 7.5 L/min],MP200A 型电子天平购自上海第二分析仪器厂,Nanodrop 微量紫外分光光度计(Thermoscientific 公司)、FSH-2 高速电动匀浆机、DL-46RC 低速冷冻离心机购自中科生物医学高科技开发公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将购入的小鼠适应性饲养 1 周后,按随机数字法随机分为安静对照组、运动训练组、运动给药组,每组 10 只。

1.2.2 动物饲养 动物饲养室温(25±2)℃,湿度 45%~55%,自然昼夜规律照明,各组每日给予基础饲料,自由饮水。

1.2.3 动物给药 根据前期预实验中结果,发现当肉桂酸为 250 μmol/kg 时效果最佳,精密称取肉桂酸粉末 0.037 g 溶于 3.5% NaCl 溶液,经 20 U 微孔滤膜高压蒸汽灭菌 15 min 制成注射剂,按照体质量从尾静脉给药,1 mL/10 g 小鼠体质量。正式实验开始,运动给药组小鼠在每天下午 3:00~4:30 从尾静脉注射肉桂酸针剂,其他两组小鼠从尾静脉注射等体积的生理盐水,持续 14 d。

1.2.4 力竭游泳训练模型的建立 实验前,对 3 组小鼠的体质量和无负重力竭游泳时间进行测定。力竭判定标准^[10]:小鼠头部全部入水持续 10 s 不能浮出水面,捞出后平放在水平面上,不能完成翻正反射。运动给药组小鼠在每天下午 3:00~4:30 从尾静脉注射肉桂酸针剂,其他两组小鼠从尾静脉注射等体积的生理盐水,1 h 后进行力竭游泳训练。安静对照组正常活动,持续训练 14 d,隔天进行 1 次无负重力竭游泳训练^[10]。最后一次力竭游泳时,专人记录小鼠力竭游泳时间。

1.2.5 指标检测 最后一次力竭游泳后记录各组小鼠力竭游泳时间。3.5% 水合氯醛麻醉后,腹主动脉取血,约 2 mL,肝素抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液按照 BLAC 试剂盒说明书要求做 ELISA 检测小鼠血浆中 LAC 的含量;取肝脏,生理盐水冲洗后称质量,按照 1:9 的比例加入生理盐水,冰浴

下用匀浆机匀浆,7 500 r/min 低速冷冻离心机离心 15 min,吸取上清液,按照试剂盒说明书要求采用 ELISA 法对小鼠肝脏中 SOD、MDA 和 CAT 的含量进行检测;取小鼠股四头肌,生理盐水冲洗后称质量,按照 1:9 的比例加入生理盐水冰浴下用匀浆机匀浆,7 500 r/min 低速冷冻离心机离心 15 min,吸取上清液,Nanodrop 微量紫外分光光度计测定蛋白含量,各孔的蛋白上样总量一致,均为 100 μg。电泳浓缩胶 80 V,50 min,分离胶 110 V,150 min。经过 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,110 V,5 mA 转膜 120 min,将蛋白转移至 PVDF 膜上。室温含 25% 脱脂奶粉的 PBST(400 mL PBS+100 μL Tween 20)封闭 60 min,按抗体要求的比例加入兔抗小鼠一抗(1:3 000)、β-actin 兔抗小鼠一抗(1:3 000)。4℃ 过夜,室温复性 1 h,PBST 洗膜 4 次,每次 10 min,按一定比例(1:10 000)加入相应的山羊抗小鼠二抗,室温避光孵育 120 min。PBS 洗去未结合的二抗 5 次,每次 5 min。用 Western blot 红外荧光显像仪显影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,各检测指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析法(one-way ANOVA),两两比较采用 S-N-K 法,检验水准设定为 0.05,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肉桂酸对小鼠游泳能力的影响 运动给药组最后一次给药后 1 h,对运动训练组和运动给药组进行力竭游泳测试,结果表明进行运动训练的两组小鼠力竭游泳时间较安静对照组显著增加($P < 0.01$),运动给药组小鼠游泳时间明显长于运动对照组($P < 0.01$),见图 1。

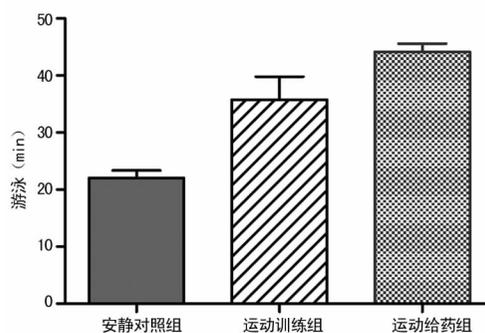


图 1 3 组小鼠力竭游泳时间

2.2 血浆中 LAC 的含量检测 结果显示,运动训练组小鼠血浆 LAC 较安静对照组显著升高($P < 0.01$);而服用肉桂酸的运动给药组小鼠血浆 LAC 相对于安静对照组虽有所上升,但差异无统计学意义($P > 0.05$),相对于运动训练组则呈现显著性降低($P < 0.01$),见图 2。

2.3 肝脏中 SOD、MDA 和 CAT 含量的检测 实验结果表明,力竭性游泳训练会导致肝脏中 SOD 的活性显著降低,运动训练组和安静对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);肉桂酸给药 14 d,运动给药组与安静对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);运动给药组与运动训练组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。力竭性游泳训练后,肝脏中 MDA 的含量显著增加,运动训练组与安静对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);运动给药组与安静对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);注射肉桂酸的运动给药组与运动训练组比较,MDA 含

量显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。力竭游泳训练后, 肝脏中 CAT 的含量表现为运动训练组与安静对照组比较显著降低 ($P < 0.01$); 服用肉桂酸的运动给药组与安静对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 运动给药组与运动训练组比较 CAT 的含量则显著性上升 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

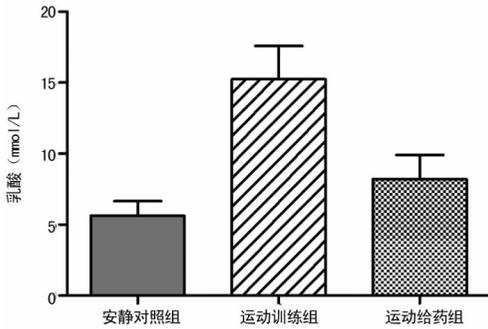


图 2 力竭性游泳后 3 组小鼠血浆 LAC 含量

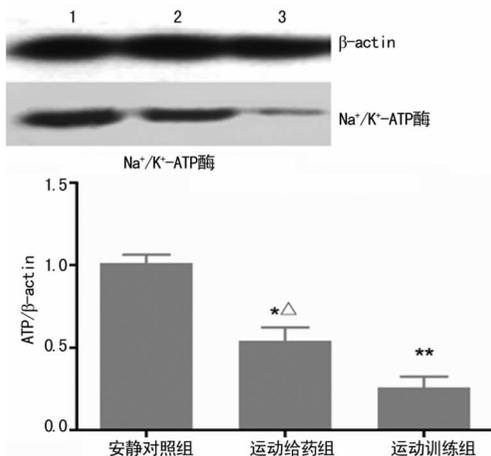
表 1 3 组小鼠肝脏组织中 SOD、MDA 和 CAT 的含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	CAT(U/mg)
安静对照组	18.36 ± 0.46	3.01 ± 0.38	18.02 ± 0.78
运动训练组	12.46 ± 0.74 [*]	5.33 ± 0.51 [*]	14.65 ± 0.23 [*]
运动给药组	16.13 ± 1.03 ^{*△}	3.96 ± 0.28 ^{*△}	17.75 ± 0.56 [△]

: $P < 0.05$, ^{}: $P < 0.01$, 与安静对照组比较; [△]: $P < 0.05$, 与运动训练组比较。

2.4 Western blot 检测小鼠股四头肌中 Na^+/K^+ -ATP 酶、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶表达水平结果。

2.4.1 Western blot 检测小鼠股四头肌 力竭性游泳后运动训练组和运动给药组与安静对照组比较均显著降低 ($P < 0.05$), 运动给药组的 Na^+/K^+ -ATP 酶的表达水平显著高于运动训练组小鼠的表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

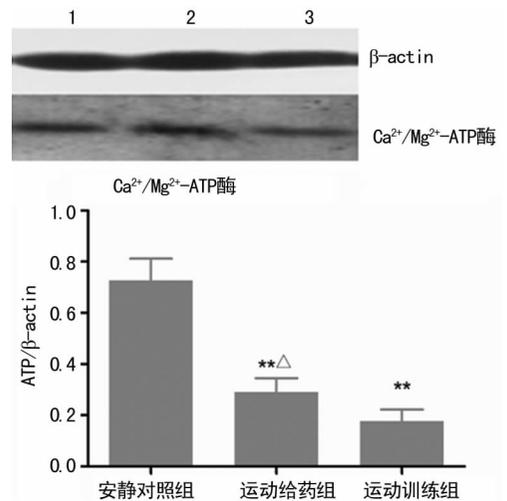


*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与安静对照组比较; [△]: $P < 0.05$, 与运动训练组比较。1: 安静对照组; 2: 运动给药组; 3: 运动训练组 ($n = 3$)。

图 3 免疫印迹法检测小鼠肌肉中 Na^+/K^+ -ATP 酶的表达

2.4.2 Western blot 法检测小鼠股四头肌中 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的表达 力竭性游泳后运动训练组和运动给药组与安静对照组比较均显著降低 ($P < 0.01$); 运动给药组小鼠的

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的表达水平显著高于运动训练组小鼠的表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。



** : $P < 0.01$, 与安静对照组比较; [△]: $P < 0.05$, 与运动训练组比较。1: 安静对照组; 2: 运动给药组; 3: 运动训练组 ($n = 3$)。

图 4 免疫印迹法检测小鼠肌肉中 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的表达

3 讨论

本次实验得出, 肉桂酸显著提升了小鼠的运动耐力。运动员在长时间高强度运动训练中, 肌肉为了满足能量需求会产生糖酵解, 必然生成大量的乳酸, 乳酸在体内堆积时可影响肌肉的收缩功能和运动能力, 刺激神经末梢, 从而引起肌肉的痉挛、疼痛和局部水肿等一系列表现, 严重影响训练效果和运动成绩, 因此, 减少乳酸在肌肉中的堆积, 可以延缓疲劳的发生或加速疲劳的消除^[10], 提高运动效率。本研究结果表明, 运动训练组小鼠血浆乳酸含量显著增加 ($P < 0.01$), 这与运动员训练后的机体反应是相符的, 而给予肉桂酸的小鼠其血浆中的乳酸含量大大减少, 可能是在进入机体后通过降低机体的乳酸含量, 从而改善运动者的组织代谢, 减轻身体内乳酸的堆积, 进而降低乳酸对肌肉和神经末梢的影响, 使运动给药组的小鼠力竭游泳持续的时间更久, 运动耐力更强。

力竭游泳还导致了小鼠体内 ROS 的大量产生, 过量的氧自由基导致体内氧化与抗氧化功能失衡, 由于力竭运动导致的体内高度氧化损伤使运动耐力显著下降, 更易导致疲劳的产生, 肝脏中 MDA 水平反映了氧自由基对细胞膜不饱和脂肪酸的破坏程度, 而肝脏里存在的大量的抗氧化酶如 SOD 和 CAT, 其含量则直接反映了身体应对由运动引起的氧化应激的保护能力, SOD 可以清除细胞内的氧自由基和超氧阴离子自由基, 抑制氧自由基带来的细胞损伤^[11], CAT 可以直接水解由于富集的 ROS 所产生的 H_2O_2 , 进一步起到抗氧化的作用^[12]。本实验中, 在力竭运动后, 运动训练组的小鼠 MDA 显著升高, 细胞膜稳定性下降, 更易疲劳, 而给予肉桂酸的运动给药组小鼠 MDA 水平与运动训练组相比则明显下降; 其 SOD 和 CAT 水平与安静对照组相比 SOD 虽然显著下降但是远不比不给肉桂酸的运动训练组高, 而 CAT 的含量已经接近正常水平, 明显高于运动训练组小鼠, 这些可能与肉桂酸促进了小鼠 SOD 和 CAT 的合成, 促进了 CAT 的稳定性, 从而使体内自由基能及时得到清除有关, MDA 的降低也提示了 ROS 对细胞膜

的毒性得到抑制,从而对小鼠具有抗疲劳的效果,力竭游泳的时间也更持久,运动耐力得到增强。

ATP 酶是生物膜上的一种重要的活性蛋白酶,其在物质转运、能量转换和信息传递方面具有重要的作用^[13]。当剧烈运动引起氧化应激时,膜的完整性和流动性都受到了破坏,受损的生物膜使 ATP 酶的活性降低,从而使神经信号的传导以及骨骼肌的收缩受到影响,更易引起痉挛和运动疲劳的产生^[14]。本实验证实了剧烈运动引起的氧化应激会导致生物膜的损伤,从而使 ATP 酶的含量降低,给予肉桂酸的运动给药组小鼠生物膜完整性和流动性得到保护,神经信号传导更好,对肌肉的调控更灵敏,同时线粒体供能更强,骨骼肌的抗疲劳能力更显著,运动耐力得到提升。

肉桂酸在运动保健方面的功能有望为运动员和运动爱好者提高运动表现发挥作用,本实验结果对防止运动损伤、提高运动能力的临床治疗及运动保健补剂的开发均提供了重要的实验依据。

参考文献

[1] Haramizu S, Mizunoya W, Masuda Y, et al. Capsiate, a nonpungent capsaicin analog, increases endurance swimming capacity of mice by stimulation of vanilloid receptors[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(4): 774-781.

[2] Sledz P, Silvestre HL, Hung AW, et al. Optimization of the interligand overhauser effect for fragment linking: application to inhibitor discovery against Mycobacterium tuberculosis pantothenate syntheses[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(13): 4544-4545.

[3] Schoene NW, Kelly MA, Polansky MM, et al. A polyphenol mixture from cinnamon targets p38 MAP kinase-regulated signaling pathways to produce G2/M arrest[J]. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(8): 614-620.

[4] 国家药典委员会. 中国药典(2010 年版 1 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 127-128.

[5] 卢兆莲, 黄才国. 肉桂多酚改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(24): 276-279.

[6] 姜琼, 邹盛勤, 周伟华, 等. 肉桂总多酚的提取工艺优选及降糖作用考察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(20): 21-23.

[7] 石松林, 王国红, 李祺福, 等. 人参皂甙 Rg1、肉桂酸和丹参酮 II A 组合对成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖与相关基因表达的影响[J]. *细胞生物学杂志*, 2008, 30(6): 761-765.

[8] You Y, Park J, Yoon HG, et al. Stimulatory effects of ferulic acid on endurance exercise capacity in mice[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(6): 1392-1397.

[9] Lee ES, Park SH, Kim MS, et al. Caffeic acid disturbs monocyte adhesion onto cultured endothelial cells stimulated by adipokine resistin[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(10): 2730-2739.

[10] 蒋晓明, 郝明, 叶素英. 牡蛎提取液对力竭运动小鼠股四头肌抗氧化与 ATP 酶代谢的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(20): 5058-5060.

[11] 张岚. 马齿苋多糖运动功能饮料抗运动性疲劳及提高运动耐力的作用[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(7): 3948-3949, 3954.

[12] 邓一兵, 杨体强. 应用红外光谱研究电场对超氧化物歧化酶二级结构的影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(7): 1312-1315.

[13] 苏振阳. 垂盆草对训练大鼠不同组织 ATPase 活性的影响[J]. *北京体育大学学报*, 2006, 29(11): 1505-1507.

[14] Tuna M, Polat S, Idan F, et al. The relationships among ultrastructural angiogenic features, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ATP-ase activities and SOD concentration in the microvasculature of intracranial meningiomas and glial tumors[J]. *Neurol Res*, 2002, 24(3): 286-290.

(收稿日期: 2015-05-15 修回日期: 2015-07-21)

(上接第 4931 页)

Fracture toughness and hardness evaluation of three pressable all-ceramic dental materials[J]. *J Dent*, 2003, 31(3): 181-188.

[9] Asmussen E, Peutzfeldt A, Sahafi A. Finite element analysis of stresses in endodontically treated, dowel-restored teeth[J]. *J Prosthet Dent*, 2005, 94(4): 321-329.

[10] Akkayan B. An in vitro study evaluating the effect of ferule length on fracture resistance of endodontically treated teeth restored with fiber-reinforced and zirconia dowel systems[J]. *J Prosthet Dent*, 2004, 92(2): 155-162.

[11] Yang HS, Lang LA, Molina A, et al. The effects of dowel design and load direction on dowel-and-core restorations[J]. *J Prosthet Dent*, 2001, 85(6): 558-567.

[12] Lanza A, Aversa R, Rengo S, et al. 3D FEA of cemented

steel, glass and Carbon posts in a maxillary incisor[J]. *Dent Mater*, 2005, 21(8): 709-715.

[13] Hu YH, Pang LC, Hsu CC, et al. Fracture resistance of endodontically treated anterior teeth restored with four post-and-core systems[J]. *Quintessence Int*, 2003, 34(5): 349-353.

[14] Tait CM, Ricketts DN, Higgins AJ. Weakened anterior roots--intraradicular rehabilitation[J]. *Br Dent J*, 2005, 198(10): 609-617.

[15] Schmitter M, Rammelsberg P, Lenz J, et al. Teeth restored using fiber-reinforced posts: in vitro fracture tests and finite element analysis[J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(9): 3747-3754.

(收稿日期: 2015-05-24 修回日期: 2015-07-27)