

木香烃内酯和去氢木香内酯对小鼠 B16 黑色素瘤细胞增殖和凋亡的影响

刘蕊^{1,2}, 张景照^{1,2}, 王丹丹^{1,2}, 刘海霞^{1,2}, 唐旭东^{1,2*}

¹深圳清华大学研究院创新中药及天然药物研究重点实验室;

²广东省创新中药及天然药物研究工程中心, 深圳 518057

摘要:木香烃内酯(costunolide, CL)和去氢木香内酯(dehydrocostus Lactone, DL)抗恶性黑色素瘤的活性。CL和DL处理B16细胞,采用MTT法检测不同浓度药物对B16细胞增殖的影响;采用DAPI染色荧光显微镜下观察细胞形态变化;Annexin V-FITC/PI双染,流式细胞仪检测细胞凋亡率;Western blot检测凋亡蛋白和PI3K/AKT蛋白表达。结果显示,与对照组比较,CL和DL能显著抑制B16细胞的增殖,随着浓度的增加,抑制率增大。荧光显微镜下观察发现药物处理后细胞形态学发生了改变,出现细胞收缩、高染色质凝聚、凋亡体的可见形成和核降解等细胞凋亡现象。流式细胞术检测确定了能诱导B16细胞凋亡,细胞凋亡率随着药物浓度的增加而增大。Western blot结果显示CL能明显升高Cyt-C、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9和Bax蛋白的表达,抑制PI3K、AKT和Bcl-2蛋白的表达。CL通过抑制恶性黑色素瘤细胞中PI3K/AKT通路激活,抑制Bcl-2蛋白的表达,促进线粒体膜通透性蛋白Bax的表达,使线粒体膜通透性增加,释放了细胞色素C,从而促进caspase-9和caspase-3的表达,最终促进B16细胞发生凋亡,起到抗黑色素瘤的作用。

关键词:木香烃内酯;去氢木香内酯;黑色素瘤;增殖;凋亡;抗肿瘤作用机制

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)12-2109-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.12.016

Study on the effect of costunolide and dehydrocostus lactone on the proliferation and apoptosis of mouse B16 melanoma cells

LIU Rui^{1,2}, ZHANG Jing-zhao^{1,2}, WANG Dan-dan^{1,2}, LIU Hai-xia^{1,2}, TANG Xu-dong^{1,2*}

¹Key Lab for New Drugs Research of TCM in Shenzhen, Research Institute of Tsinghua University in Shenzhen;

²Guangdong Innovative Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine,

Research Institute of Tsinghua University in Shenzhen, Shenzhen 518057, China

Abstract: To investigate anti-malignant melanoma activity induced by costunolide (CL) and dehydrocostus lactone (DL), MTT method was used to detect the inhibitory effect of CL and DL on the proliferation of B16 cells. DAPI staining was used to observe the morphological changes of B16 cells under fluorescence inverted microscope. Annexin V-FITC/PI double staining was used to stain cells and then the apoptosis rates were detected by flow cytometry (FCM). Western blot was used to detect the key protein expression. The results showed that both CL and DL significantly inhibited the proliferation of B16 cells, and the inhibited rates were related with the concentration of CL and DL in dose dependent. Under the fluorescence microscope, the morphology of the cells was changed after the treatment with CL or DL, such as cell contraction, high chromatin aggregation, visible formation of apoptotic bodies, et al. FCM results are consistent with the above. The FCM analysis showed that the apoptosis rate was increased after B16 cells treated with CL or DL. The apoptotic rate of B16 cells was increased as CL or DL concentration increased. The results of Western blot showed that the expression of Cyt-C, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9 and Bax were increased in CL group compared with control group, while the expression of PI3K, AKT and Bcl-2 proteins

收稿日期:2020-04-03 接受日期:2020-10-28

基金项目:深圳市出站博士后科研资助(2019年第一批);深圳市科技计划(JCYJ20160510141910129)

*通信作者 Tel:86-755-26551399; E-mail: tangxd@tsinghua-sz.org

were decreased. In conclusion, CL exhibited anti-melanoma activity, and it may be realized by inhibiting the activation of PI3K/Akt pathway, inhibiting the expression of Bcl-2 protein, increasing the mitochondrial membrane permeability protein Bax, releasing Cyt-C, and increasing the expression of caspase-9 and caspase-3.

Key words: costunolide; dehydrocostus lactone; melanoma; proliferation; apoptosis; antitumor mechanisms

黑色素瘤, 又称恶性黑色素瘤 (malignant melanoma, MM), 被称为“皮肤癌王”, 是皮肤癌当中最危险的一种, 增殖能力极强, 是导致死亡人数最多的皮肤癌^[1,2]。中国黑色素瘤检出率增加, 每年新发病持续增长^[3]。目前, 常规治疗黑色素瘤的主要方法是手术、放疗和化疗, 但存在创伤大、不良反应明显。木香炔内酯和去氢木香炔内酯是木香的主要活性物质。木香是我国知名传统中药。《中国药典》(2015版) 收录木香为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根^[4]。《中国植物志》将木香置于菊科风毛菊属 *Saussurea*, 所以木香的拉丁名又为 *Saussurea costus* (Falc.) Lipech.。药典记载具有行气止痛, 健脾消食。用于胸胁、脘腹胀痛, 泻痢后重, 食积不消, 不思饮食。煨木香实肠止泻。用于泄泻腹痛^[4]。《本草通玄》记载木香外用研末调敷或密汁涂, 可“理疝气”。木香外用还具有抑菌, 治疗乳腺增生等功效。现代研究表明木香提取物、木香炔内酯和去氢木香炔内酯等具有多种药理活性, 如抗炎^[5]、促胃动力作用^[6,7]、利胆^[5,8]、抗支气管痉挛^[9]和抗肿瘤^[10]等。但是, 目前对木香提取物、木香炔内酯(图1)和去氢木香炔内酯抗黑色素瘤的研究甚少。仅有报道称木香炔内酯能抑制 IBMX-诱导的 B16 细胞黑色素的生成^[11], 文中侧重点是木香中单体化合物的分离和鉴定, 并从美白化妆品的角度分析化合物对黑色素产生的影响。本文将研究木香炔内酯和去氢木香炔内酯单体化合物抗黑色素瘤增殖和凋亡的影响, 并进一步深入研究其作用机制, 旨在为抗黑色素瘤创新药物的研发提供理论依据。

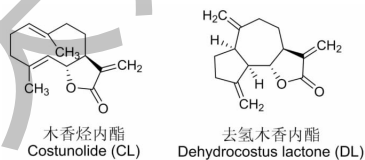


图1 化合物结构式

Fig. 1 The structure of compounds

1 材料与仪器

1.1 材料

小鼠 B16 黑色素瘤细胞(中国科学院典型培养

物保藏委员会细胞库); 木香炔内酯和去氢木香炔内酯(纯度 > 98%) (成都曼思特生物科技有限公司); RPMI 1640 培养基、胰酶、双抗、PBS、胎牛血清 (Gibco 公司); 噻唑蓝 (MTT) 和二甲基亚砜 (DMSO) (美国 Sigma 公司); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒和 DAPI 染色液 (碧云天生物技术研究所); 抗体 Ki-67、PI3K、Bax、Bcl-2、 β -Actin (美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.2 仪器

二氧化碳培养箱 (日本 SANYA 公司); 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 高压湿热灭菌器 (日本 SANYA 公司); 酶标仪 (美国 Thermo 公司); Airstream II 级 A2 型生物安全柜 (新加坡艺思高公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Tanon 化学发光图像分析系统 (上海天能公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠 B16 黑色素瘤细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (100 U/mL 链霉素及 100 U/mL 青霉素) 的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 1~2 天更换培养基, 细胞长至 70%~80% 融合度时, 细胞传代培养。

2.2 细胞增殖测定

取对数生长期的小鼠 B16 黑色素瘤细胞, 显微镜下细胞计数后, 细胞浓度调整为 1×10^5 个/mL, 接种到 96 孔板, 每孔 100 μ L 细胞液, 即 1×10^4 个/孔, 细胞贴壁生长过夜后, 分别加入 100 μ L 含药的新鲜培养基, 药物浓度设置为 3.125、6.25、12.5、25、50 μ M, 同时设有未加药的空白对照组, 每组设置 6 个复孔, 分别培养 24、48 和 72 h, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 细胞培养箱中继续培养 4 h, 弃去旧培养基, 每孔加入 200 μ L DMSO, 酶标仪 A₅₇₀ nm 测定吸光度值。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{给药组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.3 DAPI 染色

取 3 mL 1×10^5 个/mL B16 细胞液, 接种到置有玻片的 60 mm 培养皿中, 贴壁生长过夜后, 弃去旧

培养基,加入含不同浓度药物的新鲜培养基,设置空白对照组,置于细胞培养箱中继续培养 48 h 后,用 PBS 洗两次,加入预冷的 75% 的乙醇,4 °C 冰箱内固定过夜,弃去固定液,加入 PBS 洗 3 次,加入 DAPI 染色液,37 °C 避光 30 min, PBS 洗后,荧光倒置显微镜下观察细胞形态,并拍照分析。

2.4 流式细胞仪 FCM 检测分析细胞凋亡

取 3 mL 1×10^5 个/mL B16 细胞液,接种到的 60 mm 培养皿中,贴壁生长过夜后,弃去旧培养基,加入含不同浓度药物的新鲜培养基,设不加药物组为对照组。置于细胞培养箱中继续培养 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,1 000 rpm 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗两遍,用 PBS 重悬细胞,取 1×10^4 个重悬细胞,离心后,加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液,轻轻重悬细胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC 染色液,轻轻混匀,加入 10 μ L PI,轻轻混匀。室温避光孵育 20 min,随后置于冰上,流式细胞仪检测,进行凋亡率分析。

2.5 Western blot 检测凋亡蛋白

分别收集对照组细胞,及不同浓度药物处理 48 h 的 B16 细胞,加入配置好的含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液冰上充分裂解,提取蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。按照蛋白样品与 5 \times loading buffer 体积比 4:1 制备,95 度 8 min 变性。取 40 μ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入稀释好的一抗(表 2)4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入显影液, Tanon 化学发光图像分析系统,采集图像,进行条带分析。

2.6 统计学分析

数据以平均值 \pm 标准差来表示。用 SPSS 软件进行统计分析,用 One-way ANOVA 进行分析,方差齐性采用 *F* 检验,组间两两比较采用 Fisher's Protected LSD test 分析, $P < 0.05$ 判定为统计学上差异显著, $P < 0.01$ 判定为统计学上差异极显著。

3 结果与讨论

3.1 对 B16 细胞增殖的影响

木香烃内酯(CL)和去氢木香内酯(DL)处理小鼠 B16 黑色素瘤细胞 24、48 h 后,和未给药空白对照组相比,能明显抑制小鼠 B16 黑色素瘤细胞增殖(图 2 和图 3)。CL 和 DL 在 0 ~ 100 μ mol/L 处理 B16 细胞时,抑制率随着浓度的增加而增大;且随着

时间的增加,抑制率也在增大。如浓度为 25 μ mol/L 的 CL 对 B16 细胞 24 h 时的抑制率为 42.01%, 48 h 时抑制率为 62.23% (图 2)。CL 处理 B16 细胞 24 h, 48 h 的 IC_{50} 值分别为 28.34 μ mol/L 和 19.21 μ mol/L。如浓度为 25 μ mol/L 的 DL 对 B16 细胞 24 h 时的抑制率为 40.21%, 48 h 时抑制率为 60.06% (图 3)。DL 处理 B16 细胞 24 h, 48 h 的 IC_{50} 值分别为 29.54 μ mol/L 和 21.22 μ mol/L。可见, CL 和 DL 均具有抗 B16 黑色素瘤细胞的潜在能力,值得进一步深入研究。

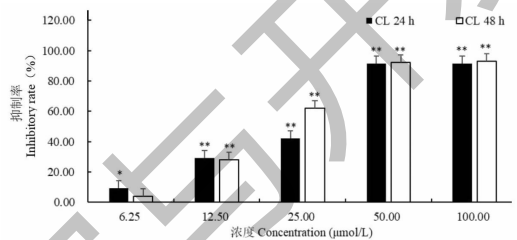


图 2 木香烃内酯 (CL) 对 B16 细胞增殖的影响

Fig. 2 The effect of costunolide on proliferation of B16 cells

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, 具有显著性差异;

** $P < 0.01$, 具有极显著性差异, 下同。Note: Compared with blank control, * $P < 0.05$, significant difference; ** $P < 0.01$, extremely significant difference, the same below.

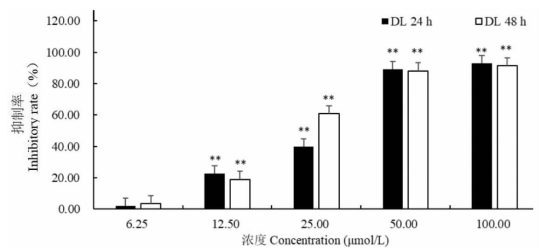


图 3 去氢木香内酯 (DL) 对 B16 细胞增殖的影响

Fig. 3 The effect of dehydrocostus lactone on proliferation of B16 cells

3.2 细胞形态变化

CL 和 DL 处理 B16 细胞后,显微镜下观察细胞的数目明显减少,出现收缩,消解现象。DAPI 染色后在倒置显微镜下观察 CL 对 B16 细胞形态的影响(图 4), CL 处理 B16 细胞 48 h 后,细胞形态发生明显变化,主要是凋亡相关形态学的改变,包括细胞收缩、高染色质凝聚、凋亡体的可见形成和核降解。说明 CL 引起了 B16 细胞凋亡。

3.3 流式细胞仪分析 B16 细胞凋亡率

流式细胞仪检测 CL 诱导 B16 细胞凋亡,不同浓度的 CL 处理 B16 细胞 48 h 后,流式检测结果发

现 CL 能显著诱导 B16 细胞凋亡,增加细胞凋亡数目,而且随着浓度的增加,细胞凋亡率也在增加。CL 处理细胞 48 h 后,浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 CL 诱导 35.1% 的 B16 细胞凋亡;浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CL 诱

导 50.2% 的 B16 细胞凋亡;浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CL 诱导 57.6% 的 B16 细胞凋亡(图 5)。流式结果,结合显微镜观察结果,明确了 CL 能够诱导 B16 黑色素瘤细胞凋亡。

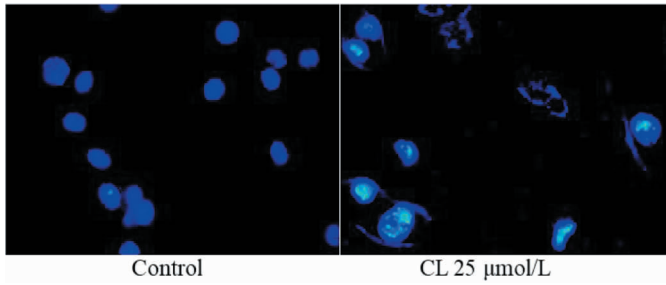


图 4 CL 对 B16 细胞形态变化的影响(DAPI 染色)

Fig. 4 Effect of CL on morphology of B16 cells (DAPI staining)

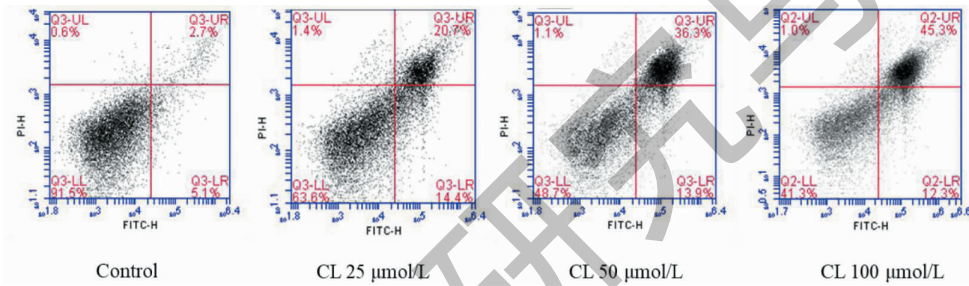


图 5 流式细胞仪分析木香烯内酯对 B16 细胞的凋亡率

Fig. 5 The apoptosis rate analysis of FCM in B16 cells

3.4 凋亡蛋白

Western blot 实验结果表明,CL 处理组 B16 细胞 48 h 后,不同浓度(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) CL 组细胞内 Cyt-C、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9

表达明显升高,并成浓度依赖性促进 B16 细胞凋亡,与空白对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 6)。

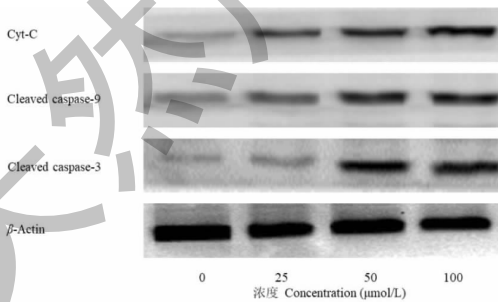
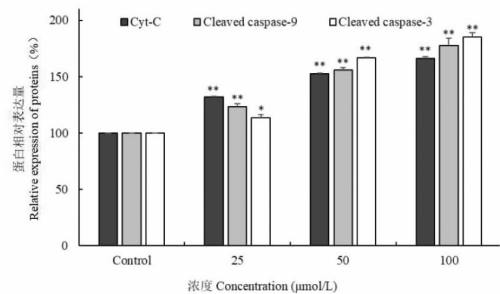


图 6 Western blot 分析木香烯内酯对 B16 凋亡相关蛋白表达

Fig. 6 The apoptosis protein changes of CL in B16 cells analyzed by Western blot



3.5 PI3K/AKT 通路

Western blot 实验结果表明,不同浓度木香烯内酯(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理 B16 细胞 48 h 后,能够抑制 B16 恶性黑色素瘤细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白的

表达(图 7)。这种抑制作用呈现出浓度趋势,浓度越高抑制作用越明显。PI3K/AKT 信号通路调控细胞增殖和凋亡,对该通路的调控,能够影响 Bcl-2 家族蛋白的活性。

实验证实,木香炔内酯确实能抑制 B16 黑色素瘤细胞中 Bcl-2 的表达,并促进 Bax 蛋白表达(图 7)。细胞内与线粒体膜通透性蛋白 Bax 发生作用的 Bcl-2 蛋白受到了木香炔内酯的抑制,从而线粒

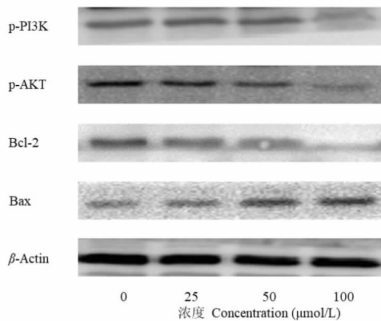
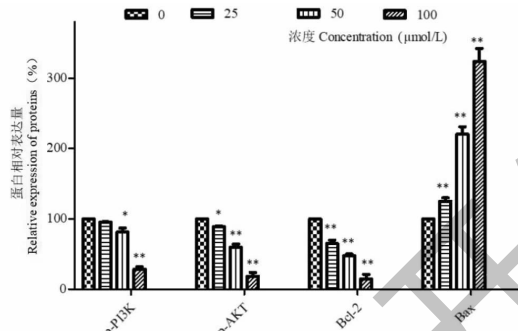


图 7 Western blot 分析 CL 对 B16 细胞 PI3K/AKT 通路的作用

Fig. 7 Effect of CL on PI3K/AKT pathway in B16 cells

体膜通透性得到了提高,线粒体释放 Cyt-C,促进 caspase-9 和 caspase-3 的表达,最终促进 B16 细胞发生凋亡。



恶性黑色素瘤被称为“皮肤癌王”,是皮肤癌致死的主要元凶。目前手术、放疗和化疗对于恶性黑色素瘤的治疗不明朗,存在一系列的问题,如手术造成的创伤和术后后遗症;化疗药物的副作用脱发、恶心、肝肾损伤;放疗不敏感等。中药是天然药物的宝库,在中医理论的指导下,借鉴现代医学手段,越来越受到科学家和医学工作者的重视。木香炔内酯和去氢木香内酯能够抑制 B16 细胞增殖,并成浓度和时间依赖。据报道,木香炔内酯能够抑制黑色素瘤细胞 SK-MEL-2 的增殖,并成浓度依赖趋势,木香炔内酯处理细胞 48 h 后,IC₅₀ 为 0.5 μg/mL,文中未对抑制增殖机理、细胞凋亡和作用机制进行研究^[12]。

诱导肿瘤细胞凋亡是抗癌的主要思路之一。木香炔内酯和去氢木香内酯是木香的主要成分,木香是一些中成药的常见成分,可内服,可外用。CL 诱导 B16 细胞凋亡可能是通过线粒体释放 Cyt-C 从而激活 caspase 凋亡通路,最终引起 B16 细胞凋亡,起到抗黑色素瘤的作用。Ding 等^[13]研究表明细胞色素 C 参与新狼毒素 A 诱导人黑色素瘤 A375 细胞凋亡过程,下调 Bcl-2 蛋白的表达。这与文献报道木香炔内酯诱导肺癌 A549 细胞凋亡的途径一致^[14],木香炔内酯还能促进激活促凋亡因子 Bax 的表达和抑制抗凋亡因子 Bcl-2 的表达来抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖,并促进其凋亡^[15]。去氢木香内酯引起线粒体跨膜电位降低而破坏了线粒体的结构,进一步阻碍了线粒体的功能,导致了细胞内代谢物的紊乱,最终诱导了人类乳腺癌细胞 MCF-7 细胞的

凋亡^[11]。木香中部分有效成分的抗肿瘤机制通过引起线粒体通透性转换(MPT)、细胞色素 C 释放或破坏线粒体膜电位而诱导人白血病细胞 HL-60 凋亡^[16]。

本文发现 CL 和 DL 能抑制小鼠黑色素瘤细胞 B16 的增殖,并能诱导 B16 细胞凋亡。研究表明,木香炔内酯通过抑制恶性黑色素瘤细胞中 PI3K/AKT 通路激活,抑制 Bcl-2 蛋白的表达,促进线粒体膜通透性蛋白 Bax 的表达,使线粒体膜通透性增加,释放了细胞色素 C,从而促进 caspase-9 和 caspase-3 的表达,最终促进 B16 细胞发生凋亡。本文为开发出以木香炔内酯和去氢木香内酯为原料的抗黑色素瘤创新中药提供理论依据,为抗黑色素瘤提供新的解决思路。

参考文献

- 1 Kibbi N, Kluger H, Choi JN. Melanoma: clinical presentations [J]. *Cancer Treat Res*, 2016, 167: 107-129.
- 2 Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification [J]. *In Vivo*, 2014, 28: 1005-1011.
- 3 Yang N, Lu J, Lu Y, et al. Primary malignant melanotic melanoma and hypomelanotic melanoma of the female urethra: case series and a review of the literature in China [J]. *Melanoma Res*, 2019, 29(1): 59-64.
- 4 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 62.

- 5 Shao Y, Huang F, Wang Q, et al. Anti-inflammatory and cholegogic effects of aucklandiae [J]. Pharm Clin Res (药学与临床研究), 2005, 13:5-6.
- 6 Zhou XM, Zhang LM, Cao YL, et al. Effect of muxiang dynamics capsules inclusion (MDCI) on gastric emptying in mice [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2003, 20:207-209.
- 7 Zhu JZ, Leng ER, Chen DF. The effect and mechanism of muxiang on gastrointestinal motility in rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig (中国中西医结合消化杂志), 2000, 8:236-236.
- 8 Guo Q, Wang HB, Li XY, et al. Simultaneous determination of 14 components in Lidanpaishi tablets by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2017, 37:631-638.
- 9 Gupta OP, Ghatak BJ. Pharmacological investigations on *Saussurea lappa* (Clarke) [J]. Indian J Med Res, 1967, 55:1078.
- 10 Wang GM, Yang C, Lu YF, et al. Study on mechanism of dehydrocostus lactone treatment on breast cancer MCF-7 cells [J]. Prog Mod Biomed (现代生物医学进展), 2015, 15:6601-6605.
- 11 Choi JY, Choi EH, Jung HW, et al. Melanogenesis inhibitory compounds from *Saussureae Radix* [J]. Arch Pharm Res, 2008, 31:294-299.
- 12 Park SH, Choi SU, Lee CO, et al. Costunolide, a sesquiterpene from the stem bark of *Magnolia sieboldii*, inhibits the RAS-farnesyl-proteintransferase [J]. Planta Medica, 2001, 67:358-359.
- 13 Ding YF, Li DF, Chen XY, et al. Study on the apoptosis mechanism of human melanoma A375 cells induced by Neochamaejasmin A [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发) 2019, 31:1240-1245.
- 14 Wang Z. Study on costunolide-induced apoptosis molecular mechanisms in human lung cancer A549 cells [D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2015.
- 15 Luo X, Peng JM, Jiang XL. Effect of costunolide on apoptosis of human lung cancer A549 cells and its mechanisms [J]. J Mod Med (现代医药卫生), 2018, 34:3473-3475.
- 16 Yun YG, Oh H, Oh GS, et al. *In vitro* cytotoxicity of mokko lactone in human leukemia HL cells: induction of apoptotic cell death by mitochondrial membrane potential collapse [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2004, 26:343-353.

(上接第 2108 页)

- 19 Zhu K, Wang W. Green tea polyphenol EGCG suppresses osteosarcoma cell growth through upregulating miR-1 [J]. Tumor Biol, 2016, 37:4373-4382.
- 20 Yokoyama T, Kohn E, Brill E, et al. Apoptosis is augmented in high-grade serous ovarian cancer by the combined inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and PARP [J]. Int J Oncol, 2017, 50:1064-1074.
- 21 Lin SW, Yin CC, Yin M, et al. Effect of total flavonoids from *Castanea mollissima* involucre on 3 tumor cells [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27:143-147.
- 22 Liu JJ, Yang CL, Chen YQ, et al. Mechanism of SGC-7901 apoptosis induced by *Houttuynia cordata* Thumb subterraneous stem extraction [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30:257-261.
- 23 Marcotegui PS, Montes MM, Barneche J, et al. Geometric morphometric on a new species of trichodinidae. a tool to discriminate trichodinid species combined with traditional morphology a molecular analysis [J]. Int J Parasitol-par, 2018, 7:228-236.