

针刺对5-HT₇R跨膜信号通路的影响与其改善PCPA失眠中枢5-HT障碍机制的关联性探讨

罗本华*, 黄羽, 吴小玲, 李玉秋

广西中医药大学, 广西 南宁
Email: *luobenhua1968@163.com

收稿日期: 2020年11月30日; 录用日期: 2021年3月22日; 发布日期: 2021年3月29日

摘要

目的: 观察针刺5-HT₇R跨膜信号通路的影响, 探讨其与改善PCPA失眠大鼠中枢5-HT障碍机制的关系。方法: 64只大鼠经随机、PCPA失眠造模及筛选后, 共分4组各16只; 正常组、模型组无特殊处理, 针刺组给予针刺失眠方合脐内环穴干预, 非穴组予针刺非穴处理, 治疗6天后分离大鼠海马匀浆, ELISA法检测5-HT₇R和cAMP含量, 免疫印迹检测Gas表达; 统计学分析5-HT₇R与cAMP相关性。结果: PCPA模型大鼠海马5-HT₇R和cAMP明显降低, 针刺治疗组5-HT₇R和cAMP含量均显著升高; 各组二指标间呈显著正相关性; 四组间Gas相对表达无统计学差异。结论: 针刺调控5-HT₇R/Gas/cAMP信号通路起到改善PCPA失眠作用, 这种改善与中枢5-HT递质障碍机制有一定的相关性。

关键词

PCPA失眠, 脐内环穴失眠穴方针刺; 5-HT₇R, 环磷酸腺苷, Gas

Study the Acupuncture Effect on 5-HT₇R Transmembrane Signaling Pathway and the Exploration of the Relationship between This Effect and the Acupuncture Improving the Pathogenesis of Central 5-HT Transmitter Disorder in PCPA Insomnia

Benhua Luo^{1*}, Yu Huang¹, Xiaolin Wu², Yuqiu Li²

Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning Guangxi
Email: *luobenhua1968@163.com

*通讯作者。

文章引用: 罗本华, 黄羽, 吴小玲, 李玉秋. 针刺对 5-HT₇R 跨膜信号通路的影响与其改善 PCPA 失眠中枢 5-HT 障碍机制的关联性探讨[J]. 中医学, 2021, 10(2): 261-267. DOI: 10.12677/tcm.2021.102036

Abstract

Objective: To observe the effects of the acupuncture of combined method of the acupoint-prescription of umbilical inner acupoints and the insomnia acupoint-prescription on 5-HT₇R transmembrane signal pathway and explore its relationship with improving the mechanism of central 5-HT disorder in PCPA insomnia model rats. **Methods:** After being randomly divided, modeled and screened for PCPA insomnia model, 64 rats were divided into four groups, and each group was 16. The normal group and the model group were given no special treatment, the acupuncture observation group was acupunctured the combined acupoints of the acupoint-prescription of umbilical inner acupoints and the insomnia acupoint-prescription. The non-acupoint group was dealt with acupuncture non-acupoint. After six days of treatment, in the hippocampus homogenates of the rats, the content levels of 5-HT₇R and cAMP were detected by enzyme-linked immunoassay, and their correlation was statistically analyzed. The expression of *Gαs* was detected by western blot. **Results:** The contents of 5-HT₇R and cAMP in hippocampal of PCPA insomnia model rats in control group were significantly reduced, while that of the acupuncture treatment group was significantly increased, and there was a significantly positive correlation between them in each group. The relative expression of *Gαs* in hippocampus was no statistical difference among the four groups. **Conclusion:** The acupuncture method could improve PCPA insomnia by regulating the 5-HT₇R/*Gαs*/cAMP signaling pathway. This regulating mechanism is related to the acupuncture method improving the pathogenesis of central 5-HT transmitter disorder of insomnia.

Keywords

PCPA Insomnia, The Combined Acupuncture of the Acupoint-Prescription of Umbilical Inner Acupoints and the Insomnia Acupoint-Prescription, Serotonin Receptor 7 Subtypes (5-HT₇R), Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP), *Gαs*

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

5-羟色胺受体 7 亚型(5-HT₇R)是与睡眠和觉醒密切相关的经典 5-HT 神经递质一个亚型,它对睡眠的昼夜节律有一定调节作用,但与中枢 5-HT 促睡眠机制有着一定关系,但具体怎样不甚清楚。针刺失眠方合脐内环穴针刺是临床失眠症的有效[1]疗法,具有改善 PCPA 失眠大鼠神经行为学[2]以及改善中枢 5-HT 递质障碍机制、5-HT_{1A}、5-HT_{2A} 受体作用的实验基础[3] [4] [5],本实验研究旨在从 5-HT₇R 后跨膜、胞内信号通路探讨与改善中枢 5-HT 障碍机制的可能关系。

2. 材料与方

2.1. 材料与试剂

2.1.1. 动物

健康 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 80 只,体重(250 ± 15) g,由广西医科大学动物实验中心提供;室温 20°C ~25°C 饲养,室内采光按照白昼循环模式,定时喂食,自由饮水,适应性喂养 15 d。

2.1.2. 试剂

对氯苯丙氨酸(PCPA)试剂盒:美国 Alfa Aesar,批号:H30Y014;I抗 *Gαs* (Santa cruz, 货号:Sc-135914), II抗: Goat anti-Mouse IgG (Bioswamp, 货号: SAB43706); 大鼠 5-HT、5-HT_{7R}、cAMP ELISA 试剂盒(均 Bioswamp): 武汉基因美生物科技有限公司, 批号: GR-201912、201907。

2.1.3. 仪器

低温高速离心机(SIGMA3-18K, 德国 Sigma 公司); Bio-Tek 800 酶标仪、mini protean 3 cel 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司); 洗板机(芬兰 Thermo LabSystems 公司); 培养箱(IHH.CP-01W); 匀浆仪(FLUKO-PRO200)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 实验分组

采用随机数字表法将 80 只 Wistar 大鼠随机分为正常组 16 只、预用模型复制大鼠 64 只。预用模型复制大鼠采用腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)法进行模型复制, 筛选后将造模成功的 48 只大鼠按随机数字表法分为失眠方加脐内环针组、西药组、非穴组 3 组, 每组各 16 只。四组各 16 只动物按分组随机号顺序再顺编为 1~16 号; 在各自干预完成后, 每组取 1~6 号动物进行免疫印迹检测, 每组其余 7~16 号动物再进行酶联免疫等相关检测。

2.2.2. PCPA 失眠模型制作

对氯苯丙氨酸(PCPA), 临用前按大鼠 45 mg/(1 ml·100 g)用量, 用弱碱性生理盐水(pH 7~8)配置成混悬液备用。

于上午 8:00 左右将大鼠按 1 ml/100 g 剂量腹腔注射 PCPA 混悬液, 每日 1 次, 连续注射 2 日, 在第 2 次腹腔注射 PCPA 28 h~30 h 后, 动物出现入睡率显著降低, 或昼夜节律消失, 呈现兴奋、烦躁、易激惹, 白天活动不停, 整体观察与正常组有明显不同者, 表明模型复制成功。

正常组腹腔注射相同体积的弱碱性生理盐水。

2.2.3. 针刺干预方法及疗程

4 组于造模成功后次日开始实验干预治疗。

1) 正常组与模型组: 不予任何治疗, 均只给予同失眠方加脐内环针组相同时间及相同强度的抓摸刺激(7 min)。

2) 失眠方加脐内环针组:

① 先给予针刺脐内环穴治疗。

取穴: 脐内环穴, 取心肝脾肺肾六穴点。脐内环穴在大鼠神阙穴[1]旁开 2.5 mm 处作一圆环, 环线上均是穴位(据上书神阙至中脘约 20 mm 拆算); 以正上方为心, 正下方为肾, 右为肝, 左为脾胃, 左上、右上均为肺, 共 6 个穴点。

针刺方法: 以 25 × 13 mm 粗细毫针, 由内向外以 10°~15°刺入 2~4 mm, 针后不行捻转提插手, 每穴点留针 30 s, 共计 3 min。

②再给予针刺失眠方穴治疗。

取穴[1]: 双侧神门、支沟、足三里、三阴交。大鼠的神门在前肢内侧腕部横纹尺骨边缘, 直刺 1 mm; 三阴交在后肢内踝尖直上 10 mm, 直刺 5 mm; 足三里即后三里, 在膝关节后外侧, 腓骨小头下约 5 mm 处, 直刺 7 mm; 支沟穴在前肢外侧, 距腕关节 4.5 mm 左右的尺桡骨间, 直刺 1 mm。针刺方法: 以 25 × 13 mm 粗细的毫针, 刺入穴位相应的深度, 针后行捻转角度 90°以内 90~180 次/分的高频小幅度捻转手法, 每穴行 30 s 后出针, 每次共治疗 4 min。

以上失眠方针刺加脐内环针刺每次干预治疗, 共 7 min。

3) 非穴组: 针刺双侧肋下各两个固定非穴点[2], 约相当于乳正中线外开 2.5 mm 肋弓下 1 mm 平行肋弓方向向外下斜刺 3 mm; 每穴行 210 s 后出针, 每次总计 7 min。

以上 4 组按相应干预方法, 每日治疗 1 次, 共 6 次。

2.2.4. 大鼠海马取材方法

针灸干预方案完成后第 2 天, 即处死各组动物, 开颅迅速取出整脑, 冰上分离各组大鼠海马, 冷生理盐水中洗去血液, 电子天平上称重后置于 -80°C 冰冻保存备用待测。

2.2.5. 大鼠海马 5-HT、5-HT_{7R}、cAMP 含量检测

取海马组织, 按 1:9 比例加入 0.9% 氯化钠溶液, 组织匀浆器低温下匀浆, 4°C , 3000 r/min 离心 20 min, 取上清, 置于 -20°C 保存待测。采用双抗体夹心法检测 5-HT_{7R}、cAMP 含量。按试剂盒说明书设立标准品孔、样品孔和空白对照孔, 标准品孔加入不同浓度的标准品 50 μl 。样品孔先加待测样本 10 μl , 再加样本稀释液 40 μl 。标准品孔和样本孔每孔加入辣根酶标记抗体 10 μl , 37°C 水浴锅温育 60 min, 后洗板 5 次, 吸水纸拍干。每孔加入底物 A、B 各 50 μl , 37°C 避光孵育 15 min。加入终止液 50 μl 。450 nm 波长测定各孔的吸光度(OD)值。计算机根据各标准品吸光度以及标准品浓度, 计算检测样品 5-HT_{7R}、cAMP 的含量。

2.2.6. 大鼠海马 Gas 表达检测

主要步骤: ① 总蛋白提取: 大鼠迅速断头后, 分离新鲜海马组织, 加适量蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂, 冰上研磨、匀浆, 12,000 转, 4°C 离心, 收集上清液, 分装, -80°C 保存; ② BCA 法蛋白定量; ③ 蛋白电泳; ④ 转膜; ⑤ 封闭; ⑥ 一抗孵育; ⑦ 二抗孵育; ⑧ 显定影。应用 Quantity One 软件计算各组目标蛋白条带的灰度值, 并与同一膜上相应同组 β -actin 条带的灰度值进行比较, 将该蛋白相对表达量的比值用于各组统计分析。

2.3. 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

1) 对 PCPA 大鼠海马 5-HT、5-HT_{7R}、cAMP 含量($\bar{x} \pm s$)的影响, 如表 1。

Table 1. The contents of 5-HT, 5-HT_{7R} and cAMP in hippocampus of four group rats

表 1. 各组大鼠海马 5-HT、5-HT_{7R}、cAMP 含量的影响

分组	指标	5-HT (ng/ml)	5-HT _{7R} (pg/ml)	cAMP (nmol/L)
正常组		510.06 \pm 50.01	2352.08 \pm 126.58	102.78 \pm 11.00
模型组		198.96 \pm 28.54 ^{##}	1485.42 \pm 103.43 ^{##}	40.32 \pm 6.73 ^{###}
针刺组		406.82 \pm 33.26 ^{####}	1949.45 \pm 159.93 ^{###$\Delta$$\Delta$}	80.93 \pm 6.40 ^{####}
非穴组		219.71 \pm 39.93 ^{###}	1420.17 \pm 99.36 ^{##}	39.34 \pm 7.37 ^{##}
	F 值	149.83	122.316	150.11
	P 值	0.000	0.000	0.000

注: 与正常组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与非穴组比较, ^{Δ} $P < 0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$ 。

从表 1 可以看出: PCPA 失眠模型组 5-HT、5-HT₇R、cAMP 含量均较正常组非常显著性降低, 通过针刺后 5-HT、5-HT₇R、cAMP 含量均得到升高, 均具有统计学意义(均 $P < 0.01$), 均显示有经穴作用的特异性。

2) 各组 5-HT、5-HT₇R、cAMP 检测指标相互间的相关性, 如表 2。

Table 2. The index correlation between 5-HT, 5-HT₇R and cAMP in hippocampus of rats in each group

表 2. 各组大鼠海马 5-HT、5-HT₇R、cAMP 指标间相关性分析表

相关性分析	分组	正常组	模型组	针刺组	非穴组
5-HT 与 5-HT ₇ R	相关系数	0.810	0.914	0.844	0.768
	P 值	0.005	0.000	0.002	0.010
	回归方程	$Y = 1306.61 + 2.05x$	$Y = 826.56 + 3.311x$	$Y = 299.17 + 4.057x$	$Y = 1000.43 + 1.91x$
5-HT ₇ R 与 cAMP	相关系数	0.861	0.813	0.803	0.891
	P 值	0.001	0.004	0.005	0.001
	回归方程	$Y = -73.239 + 0.075x$	$Y = -38.305 + 0.053x$	$Y = 18.321 + 0.032x$	$Y = -54.56 + 0.066x$
5-HT 与 cAMP	相关系数	0.845	0.832	0.814	0.736
	P 值	0.002	0.003	0.004	0.015
	回归方程	$Y = 7.897 + 0.186x$	$Y = 1.289 + 0.196x$	$Y = 17.26 + 0.157x$	$Y = 9.495 + 1.36x$

表 2 可见, 各组 5-HT 与 5-HT₇R 之间、5-HT₇R 与 cAMP、5-HT 与 cAMP 之间均呈正相关性关系, 各组均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3) 对 PCPA 大鼠海马 Gas// β -actin 含量与相对表达的影响, 如表 3、图 1。

Table 3. The relative contents of Gas// β -actin in hippocampus of four groups

表 3. 各组大鼠海马 Gas// β -actin 含量的影响

分组(n = 6)	正常组	模型组	非穴组	F 值	P 值
Gas/ β -actin 表达	0.738 \pm 0.106	0.531 \pm 0.149	0.537 \pm 0.132	2.587	0.111

注: 与正常组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与非穴组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

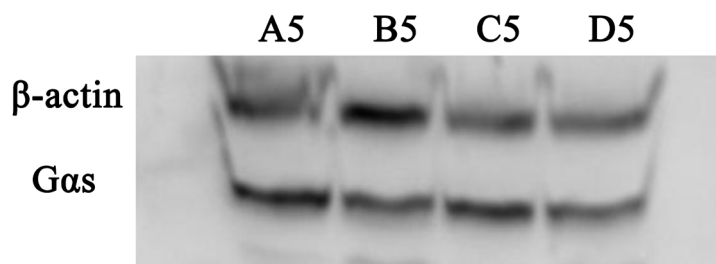


Figure 1. The expression of Gas/ β -actin in the hippocampus of the four group rats

图 1. 各组 PCPA 大鼠海马 Gas/ β -actin 蛋白相对表达

图 1 中, A5、B5、C5、D5 代表动物分组及动物编号, 图示各组 PCPA 大鼠海马 Gas/ β -actin 相对表达量, 模型组和非穴组较正常组表达要弱, 灰度浅, 但从与 β -actin 相对表达情况看(表 2), 各组间比较差异未达到统计学意义($P = 0.111$)。

4. 讨论

失眠症的病机关键为水火失调、阴阳失衡。失眠穴方是治疗失眠症的针刺验方[6]，主穴为神门、支沟、足三里、三阴交，立意泻火补水，针对失眠症水火失调病机而设。脐内环穴位于脐旁开 0.5 寸，是机体三部人部所在，既能沟通任冲和调节先天后天；结合针向迎随，也是调理脏腑信息和气血的枢纽；“脐通五脏神、善调五脏气”，又起针刺最基本的调气调神作用；故针刺脐内环穴能整体调理脏腑阴阳气血和神气，是以壮医针刺做为基础的调气方法，广泛用于全身诸多疾病的整体调理，也是失眠症治疗的颇具疗效和研究基础的壮医效方[7] [8]。数年来，笔者验证了脐内环结合失眠穴方针刺治疗失眠症取效极好，明显优于二者单一针刺[1] [3] [4] [5]，这样既能有效地发挥脐内环针治神调气和近部脏腑调节的整体作用，又能发挥失眠穴方肢体经穴的远治作用，全面顾及失眠症的脏腑经络调节、水火阴阳平衡，是以确立其为失眠症的研究方法。

睡眠发生与睡眠-觉醒机制相关的中枢神经递质含量发生改变密切相关[9]。5-HT 是公认的参与睡眠-觉醒机制的神经递质，对慢波睡眠的发生和维持起着重要作用，是脑内的“致眠因子” [10]；海马是参与脑内 5-HT 睡眠-觉醒机制的重要结构组织之一[11]；PCPA 是 5-HT 合成抑制剂，腹腔注射 PCPA 能造成睡眠昼夜节律消失，达到完全失眠，故 PCPA 失眠大鼠模型是目前公认的、广泛用于失眠症中枢 5-HT 递质障碍机制研究的经典动物模型；研究发现，腹腔注射 PCPA 能导致大鼠大脑皮质 5-HT 浓度下降约 80% [12]。中枢 5-HT 促睡眠物质是受细胞功能调节分泌、分解和灭绝，而 5-HT 受体亚型的功能又受自身 5-HT 配体直接激活，研究证明 PCPA 失眠又受细胞第二信使 cAMP 影响细胞调节功能[13]，其本身是 5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R、5-HT₇R 等受体后细胞信号通路的下游，推测 5-HT 亚型受体介导的下游胞内 *Ga*/cAMP/cGMP 细胞睡眠机制与中枢 5-HT 递质障碍机制可能存在某些相关性，其中，5-HT₇R 在海马广泛分布，偶联 *Gas*，增加 AC 活性，升高 cAMP，参与昼夜节律调节[13]。从本研究结果看来，PCPA 失眠模型大鼠 5-HT、5-HT₇R、cAMP 含量受损均呈显著降低；且相关性分析显示，5-HT 与 5-HT₇R 之间、5-HT₇R 与 cAMP、5-HT 与 cAMP 之间均呈正相关性关系的受损，均有统计学意义，说明 PCPA 模型大鼠存在中枢 5-HT 递质信号传递障碍机制，也存在 5-HT₇R 后跨膜胞内信号通路的障碍，二者之间有正相关性，损伤存在某种内在关联性。通过针刺失眠方结合脐内环穴针刺后 5-HT、5-HT₇R、cAMP 含量都得到显著升高，且显示针刺经穴相对特异性；且针刺后，5-HT 与 5-HT₇R 之间、5-HT₇R 与 cAMP、5-HT 与 cAMP 之间均呈正相关性关系的改善，均有统计学意义，说明针刺后改善了 PCPA 模型大鼠中枢 5-HT 递质信号传递障碍机制，也改善 5-HT₇R 后跨膜胞内信号通路的障碍，二者之间有正相关性，改善二种机制间存在某种内在关联性，也具有经穴作用的特异性；说明针刺改善了 5-HT₇R/*Gas*/cAMP 通路信号的关键分子信号，针刺通过上调 5-HT₇R 含量使激活 *Gas* 信号增强，增强 AC 活性，促使 cAMP 生成增加，导致 5-HT 的合成和释放增加，从而改善了失眠中枢 5-HT 递质障碍机制，从而也有助于睡眠改善；因而针刺良性调控 5-HT₇R 跨膜及细胞信号通路机制与针刺改善中枢 5-HT 递质障碍机制[3]是相互关联的，起正向神经通路的回环调节作用，该针刺改善失眠具体途经也可能通过 5-HT₇R 信号刺激相关细胞功能，对其他睡眠物质和通路起到神经内分泌的调节作用。*Gas* 是这一途经的重要跨膜中介，实验显示数量上虽然有一定的上调，但相对含量没有达到统计学意义，可能因为 *Gas* 受很多受体结合、调节的相关，但保持与其上下游的 5-HT₇R、cAMP 一致趋势，可解释与这一跨膜通路的信号调节作用。从实验结果我们认为脐内环结合失眠穴方针刺调控 5-HT₇R/*Gas*/cAMP 信号通路、改善了中枢 5-HT 递质障碍机制，这两种机制协同交互影响，综合起到改善 PCPA 失眠作用；实验推测可能是该针刺对 5-HT₇R/*Gas*/cAMP 信号通路的良性调控可能更好地改善了中枢 5-HT 递质障碍机制，更有助于改善睡眠作用。但这种机制相关的具体胞内物、具体途经、作用机制等，须进一步探讨。

基金项目

广西自然科学基金项目任务书, 2018GXNSFAA138076, 桂科计字[2018]138号。

参考文献

- [1] 罗本华, 乔赞, 高炜燕, 等. 三种针法对 121 例原发性失眠症临床疗效、焦虑抑郁量表和睡眠指数的对照研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(9): 2184-2186.
- [2] 梁薇. 针刺对 PCPA 失眠模型大鼠行为学及下丘脑 5-HT、Glu、GABA 递质含量影响研究[D]: [硕士学位论文]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [3] 罗本华, 王燕, 张亚飞, 罗梅桂. 三种针法对 PCPA 失眠大鼠海马 5-HT、5-HIAA 含量影响观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(11): 1517-1519.
- [4] 罗本华, 陈周婧, 王燕, 张亚飞, 等. 三种针法对对氯苯丙氨酸诱导失眠大鼠海马 5-HT_{1A}、5-HT_{2A} 蛋白表达影响研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2016, 45(6): 670-673.
- [5] 罗本华, 王燕, 张亚飞, 陈周婧, 郭雅雯, 赵岚. 三种针法对对氯苯丙氨酸诱导失眠大鼠海马 5-HT_{1A}、5-HT_{2A} 基因表达影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(10): 2630-2633.
- [6] 罗本华. 针刺失眠穴方治疗失眠症 56 例疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(2): 274-275.
- [7] 罗本华, 覃斌宁, 范小婷, 等. 脐内环针与安定片治疗原发性失眠症疗效观察[J]. 针灸临床杂志, 2014, 30(11): 8-11.
- [8] 罗本华, 覃斌宁, 范小婷, 等. 脐内环针与安定片对失眠症心理量表影响的比较研究[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(1): 27-30.
- [9] 朱国庆. 5-羟色胺和环磷酸腺苷对睡眠的影响[J]. 中国药理学通报, 1999, 49(2): 135.
- [10] 林殷利. 五羟色胺与睡眠[J]. 上海第二医科大学学报, 1988, 8(2): 185.
- [11] 张瑾, 张景行, 朱国庆, 等. 海马在慢波睡眠调节中的作用研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽医科大学, 2002: 2-3.
- [12] Nimgaonkar, V.L., Goodwin, G.M., Davies, C.L., *et al.* (1985) Down-Regulation of Beta-Adrenoceptors in Rat Cortex by Repeated Administration of Desipramine, Electroconvulsive Shock and Clenbuterol Requires 5-HT Neurones but Not 5-HT. *Neuropharmacology*, **24**, 279-283. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(85\)90132-7](https://doi.org/10.1016/0028-3908(85)90132-7)
- [13] David, R. (2008) 5-HT₇ Receptor Modulation of Sleep Patterns. *Thomas Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*. 439-456.