

番茄红素对体外肿瘤细胞抑制作用的研究

梅晓岩¹, 刘荣厚^{1,*}, 刘军²

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101; 2. 中国医科大学免疫教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 以纯度 $\geq 99\%$ 的番茄红素晶体为研究对象, 通过体外培养入宫颈癌细胞(Hela)、人黑色素瘤细胞(LiBr)进行抑制肿瘤能力试验。MTT法、细胞生长曲线测定、平板克隆形成试验结果显示, 番茄红素对体外培养Hela、LiBr细胞有显著的抑制作用($p < 0.01$), 培养96h后半数抑制浓度(IC_{50})分别为 $10.2\mu\text{mol/L}$ 和 $10.8\mu\text{mol/L}$, 存在显著的剂量-效应、时间-效应关系。培养10d后Hela各处理孔未见细胞集落形成, LiBr各处理孔仅有少量细胞集落形成。培养48h后, 两种细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)水平显著升高, 番茄红素使Hela、LiBr细胞膜损伤, 提示番茄红素对Hela、LiBr细胞的抑制与直接杀伤有关。

关键词: 番茄红素; 细胞培养; MTT; 抗肿瘤; 活性

Study on Inhibition Effects of Lycopene Crystals on Ectogenetic Tumor Cells

MEI Xiao-yan¹, LIU Rong-hou^{1,*}, LIU Jun²

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201101, China
2. Teaching and Research Section of Immunity, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Cultivating Hela and LiBr assays *in vitro* were used to inhibit tumor with about 99% purity lycopene crystals test samples. The results of MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide), cell growing curve and plate cloning showed that the lycopene crystals inhibition on Hela and LiBr was prominent $p < 0.01$. IC_{50} were $10.2\mu\text{mol/L}$ and $10.8\mu\text{mol/L}$, respectively. The dose-effects relationship and time-effects relationship were prominent. Cell colony of Hela was not found after 10 d cultivation. And a few cell's colonies were found in both LiBr and LDH cell fluids was increased prominently after 48h. The cell membranes of Hela and LiBr were damaged by lycopene crystals. It indicated that the inhibition on Hela and LiBr cells of lycopene has direct killing relationship.

Key words: lycopene; cell cultivating; MTT; antitumor; activity

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0305-05

番茄红素(lycopene, Lyp)是果蔬中重要的类胡萝卜素, 广泛分布于人类血浆和组织中, 在正常饮食情况下, Lyp在人体血浆中的浓度为 $0.5\mu\text{mol/L}$ 左右^[1]。流行病学研究表明, 血液中Lyp浓度与前列腺癌、食道癌、胰腺癌、胃肠癌、乳腺癌、皮肤癌、膀胱癌等

的发生率呈负相关^[2-4]。多食Lyp含量丰富的食品, 如番茄、胡萝卜、西瓜、红色葡萄柚及其制品等具有预防许多类型的癌症, 保护心血管, 抗氧化、保护皮肤等功用^[5-8]。因此Lyp成为保健食品领域研究开发的热点, 其中对Lyp抑制肿瘤作用的研究也有较多报道。番

收稿日期: 2006-04-29

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金项目(20273033)

作者简介: 梅晓岩(1967-), 男, 教授, 博士后, 主要从事食品科学和生物能源研究。

- [4] 曹健, 殷蔚申. 黑曲霉几丁质和壳聚糖的研究[J]. 微生物学通报, 1995, 22(4): 200-203.
[5] 汪志君. 碱量法测定壳聚糖中的胺基[J]. 化学世界, 1986(1): 20-22.
[6] 贺岚. 粘度法测定壳聚糖分子量的一些体会[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(5): 631-632.
[7] 刘祖洞, 江绍慧. 遗传学实验[J]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1987:

63-66.

- [8] 王俊林, 宋高臣. 黄芪对果蝇寿命影响的实验研究[J]. 中医药学报, 2005, 33(4): 34-35.
[9] 刘吉生. 自由基与衰老[J]. 国外医学: 老年医学分册, 1984, 4(4): 147.
[10] INAL M E, KANBAK G, SUNAL E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging[J]. Clin Chim Acta, 2001, 305(1/2): 75.

茄红素的肿瘤抑制作用研究主要存在着两方面问题:使用的Lyp样品纯度或检测方法不同,常导致实验结果的较大差异;肿瘤细胞的种类尚有待于进一步拓展。为此,本文以纯度 $\geq 99\%$ 的Lyp为样品,针对文献报道相对较少的人宫颈癌细胞(Hela)、人黑色素瘤细胞(LiBr),采用MTT法,进行了Lyp抑制肿瘤细胞作用研究。现将初步结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人宫颈癌细胞(Hela)、人黑色素瘤细胞(LiBr) 中国医科大学免疫学教研室;6% Lyp 油树脂 华北制药集团;Lyp 晶体(纯度 $\geq 99\%$) 本实验室提纯制备,避光、密闭, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存;四甲基偶氮唑盐(MTT)、胎牛血清、二甲基亚砷、硝基蓝四氮唑(NBT)、氧化型辅酶(NAD⁺) Simolma公司;吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS) Fluka公司;RPMI1640培养基 Molibico公司;脂多糖(LPS) Biotinge公司;磺胺(SA) Wako公司;N-奈基乙二胺双氯化物(NED) Wako公司;亚硝酸钠、四氢呋喃、乙醇、正己烷、氢氧化钠等试剂及药品均为国产分析纯。

1.2 仪 器

Q10 差示扫描量热分析仪 美国TA公司;Bruker FT-IR 红外光谱仪 美国;WJ-3型CO₂培养箱 日本Harasawa公司;倒置显微镜 日本Olympus IM公司;Model450自动酶标检测仪 Bio-Rod公司;CR411水平转头离心机 法国Jouan公司;超净工作台 苏州净化设备厂;WZ-2A微量振荡器 北京海淀电子设备厂;L-160DTP分析天平 日本Shimadzu公司;微量进样器 法国GILSON公司;96孔、24孔细胞培养板 丹麦NUNCLON公司;XMT-420自动控温仪 北京朝阳自动化仪表厂。

1.3 方 法

1.3.1 番茄红素的重结晶纯化和纯度测定

参考文献[9]的方法,称取一定量6% Lyp油树脂加适量BHT以防氧化,分散于适量正己烷中,加等体积的经KOH饱和的无水乙醇,在N₂气保护下皂化后,加适量蒸馏水除去水溶性物质,静置分层并用正己烷回收水层中的Lyp,用适量蒸馏水洗上层溶液至中性,再经无水Na₂SO₄脱水,真空挥去部分溶剂,冷却析出晶体。滤出晶体溶于65 $^{\circ}\text{C}$ 乙酸乙酯达到饱和,匀速缓慢降温析出晶体,经多次重结晶、过滤、除溶剂,得纯度 $\geq 99\%$ Lyp晶体。

用KBr压片测定Lyp样品红外光谱;用差示扫描量热法(DSC)测定Lyp晶体的纯度,检测条件为:起始平

衡温度120 $^{\circ}\text{C}$,终止温度200 $^{\circ}\text{C}$,升温速率5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,记录样品熔化曲线,用DSC纯度分析软件进行分析。

1.3.2 番茄红素母液配制与细胞株制备

准确称取一定量Lyp晶体溶于四氢呋喃,得到4.0mmol/L的Lyp母液,加入RPMI1640培养基配制成所需浓度,过滤除菌。实验组(T)Lyp剂量:10、20、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$;对照组(C1)四氢呋喃剂量:0.25、0.5、1.0 $\mu\text{l}/\text{L}$;正常对照组(C2):1640培养液。

取对数生长期的Hela细胞、LiBr细胞,0.125%胰蛋白酶消化。用培养液调整细胞浓度至 5×10^4 个/ml。96孔培养板,每孔加入100 μl 细胞悬液,24孔培养板,每孔加入500 μl 细胞悬液,按常规条件置37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂孵育24h。

1.3.3 体外培养肿瘤细胞的检测

MTT法测癌细胞存活率^[10-12]:吸去培养24h后的96孔板中细胞培养上清液,每孔分别加入100 μl 各种浓度待测样品及对照液,正常对照组加等体积的1640培养液,各设3个复孔,置37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂培养箱分别孵育24、48、72、96h,每24h更换一次培养液。培养结束前4h每孔加入5mg/ml MTT 10 μl ,继续培养4h。1000r/min离心10min,弃上清,每孔加入二甲基亚砷100 μl ,在微量振荡器上缓慢振荡10min,用酶标仪测定570nm处OD值。癌细胞存活率=(实验组OD值/对照组OD值) $\times 100\%$ 。用(OD_{空白}-OD_{样品})/OD_{空白} $\times 100\%$ 计算每个浓度下的细胞增殖抑制率(IR%),用Bliss法求得半数抑制浓度(IC₅₀)。

绘制细胞生长曲线^[13-14]:用胰酶消化指数生长期的细胞,用1640培养液稀释至浓度为 5×10^5 /ml。等量接种于培养板,置37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂培养箱孵育24h,细胞贴壁后吸去清液,加入不同浓度的Lyp培养液,对照组加等体积1640培养液,置37 $^{\circ}\text{C}$,5%二氧化碳培养箱孵育。连续6d,每d每个浓度取三个平行孔用常规方法消化,苔盼蓝染色计数,绘制生长曲线。

平板克隆形成试验^[14]:用胰酶消化Hela细胞、LiBr细胞,将细胞浓度调整为 1×10^3 个/ml,接种于24孔细胞培养板,置37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂孵育。24h后加入不同浓度Lyp培养液及1640培养液,各设6个复孔,再培养48h(每24h更换一次培养液),再将培养液换成10% FCS 1640培养液,继续培养10d后,小心吸弃培养液,用PBS清洗细胞。吹干,甲醇固定,Gimesa染色,计算每孔细胞集落数(50个细胞以上者算一个集落)。集落形成率=(平均集落数/种入的单个细胞数) $\times 100\%$ 。

细胞液中LDH的测定^[13]:取对数生长期的Hela细胞、LiBr细胞,0.125%胰蛋白酶消化,调整细胞浓度至 5×10^4 个/ml,接入96孔培养板,100 $\mu\text{l}/\text{孔}$,置37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂培养箱孵育24h。小心吸弃培养液,加

入不同浓度的Lyp培养液和四氢呋喃对照液,各设3个复孔,置37℃,5% CO₂培养箱孵育48h。吸取各孔上清液0.1ml加于另一培养板中,置37℃,5% CO₂培养箱中孵育10min,每孔加入新配制的底物液0.1ml,室温避光反应10~15min,每孔加入1mol/L枸橼酸终止液30μl,终止酶促反应,在570nm处测OD值。

实验数据用SPSS 12.0统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 番茄红素样品纯度测定结果

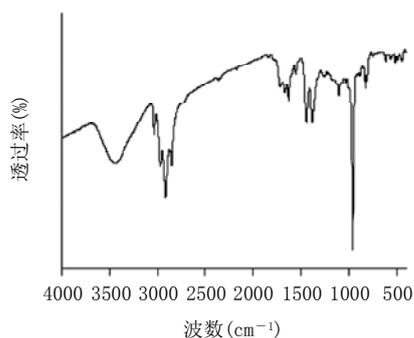


图1 番茄红素样品红外光谱图
Fig.1 Infrared spectrum of lycopene crystals

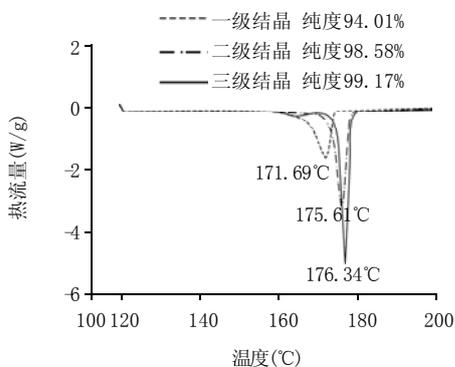


图2 番茄红素3次结晶的DSC曲线
Fig.2 DSC curve of lycopene crystals for three times

Lyp样品红外光谱如图1所示,红外谱图显示该样品为典型的共轭多烯结构,其特征吸收与全反式Lyp的标准红外吸收图谱一致。其中,3038cm⁻¹处的吸收峰为饱和C-H键的伸缩振动,1560cm⁻¹处的峰是C=C伸缩振动吸收峰,959cm⁻¹为反式单烯双取代的CH=CH剪切振动吸收峰,在730~665cm⁻¹内没有出现吸收峰,这一范围是出现顺式单烯双取代的CH=CH剪切振动的吸收峰区域^[15],说明晶体样品中没有顺式结构存在。图2是番茄红素三级结晶的DSC曲线。DSC纯度分析结果,显示3次重结晶样品纯度分别达到94.01%、98.58%、99.17%。

2.2 四氢呋喃对肿瘤细胞存活率的影响

由于Lyp不溶于水,实验选用四氢呋喃作助溶剂。通过四氢呋喃对照组和正常对照组中培养的细胞存活率比较,培养基中四氢呋喃的浓度≤1.0μl/L不会对Hela、LiBr细胞的正常生长产生影响。

2.3 番茄红素对体外培养Hela、LiBr细胞的影响

Lyp对体外培养Hela、LiBr细胞存活率的影响见图3,统计学分析表明,给定剂量的Lyp对Hela、LiBr细胞存活率均存在显著影响(p<0.01)。用 $y=A1*\exp(-x/t_1)+y_0$ 模型对培养96h的数据拟合,不同剂量Lyp培养96h的线性拟合参数见表1。两种癌细胞的存活率与Lyp存在显著的剂量效应关系,对Hela的半数抑制浓度(IC₅₀)为10.2μmol/L;对LiBr的IC₅₀为10.8μmol/L。张庆英等也曾报道^[16],Lyp对体外培养的人胚食管上皮癌细胞汕头株36代有明显抑制作用,随着Lyp浓度增加,抑制作用越明显。

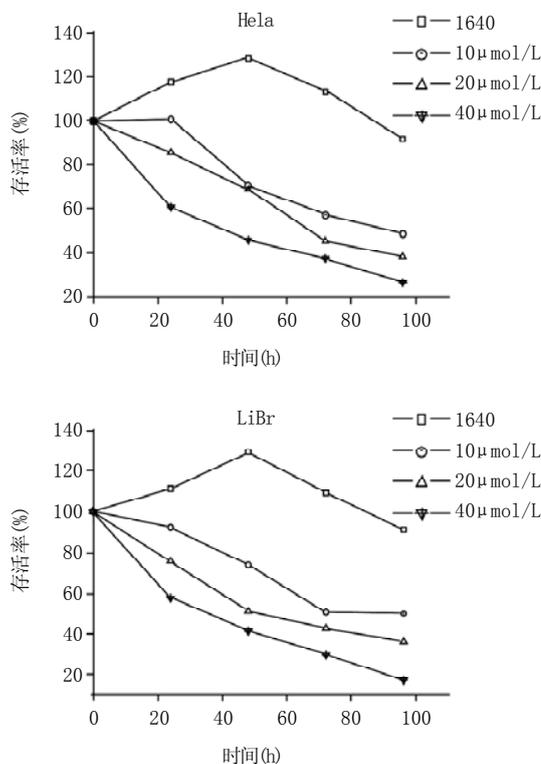


图3 番茄红素对Hela、LiBr细胞存活率的影响
Fig.3 Effects of lycopene on Hela and LiBr cell's survival rate

表1 不同剂量Lyp培养96h的线性拟合参数
Table 1 Linear fit curve of lycopene crystal after culturing 96h with different doses

参数	Hela	LiBr
y ₀	26.61±0.267	13.30±0.073
A ₁	65.12±0.421	77.266±0.580
t ₁	9.973±0.132	14.750±0.533
R ²	0.99441	0.99405

肿瘤细胞在最适条件下呈指数生长,以细胞数的指

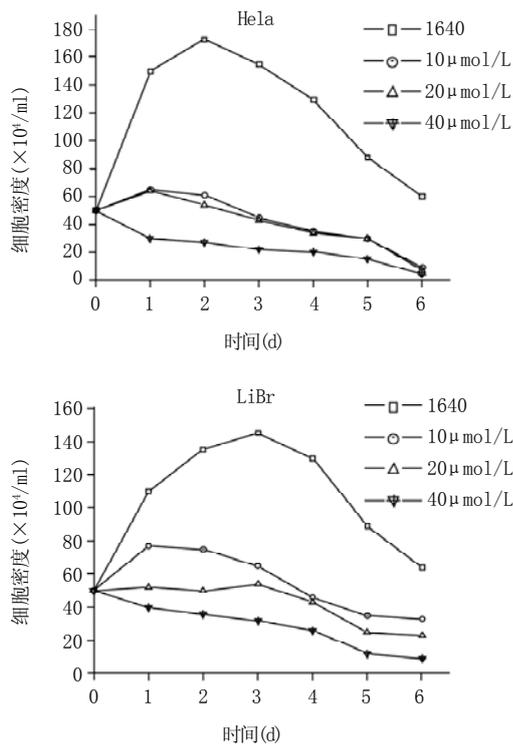


图4 番茄红素对HeLa、LiBr细胞生长曲线的影响

Fig.4 Effects of lycopene on growth curve of HeLa and LiBr cell

数(密度)与培养时间作图可得到细胞生长曲线,考察化学物质对生长曲线影响,已经成为研究开发具有抗癌效能化学物质的重要手段^[17]。图4是Lyp对HeLa、LiBr细胞生长曲线的影响。由图4可知,两种细胞在对照组1640培养基中的生长曲线均呈抛物线形,Lyp对HeLa、LiBr细胞增殖有显著的抑制作用($p < 0.01$),同时发现 $10\mu\text{mol/L}$ 与 $20\mu\text{mol/L}$ 剂量组对HeLa的抑制作用区别不

表2 培养72h后Lyp对人HeLa、LiBr细胞集落形成的影响
Table 2 Effects of lycopene on human HeLa and LiBr cell colony after 72h

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	HeLa		LiBr	
	细胞集落数	抑制率(%)	细胞集落数	抑制率(%)
0	31.67 ± 0.12	—	29.33 ± 3.58	—
10	$19.67 \pm 2.41^*$	37.89	$17.53 \pm 3.87^*$	40.23
20	$7.33 \pm 1.21^*$	76.86	$7.67 \pm 2.64^*$	73.84
40	0**	100	0**	100

注: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ 。

大,两者的生长曲线几乎重合。而对LiBr细胞的剂量效应关系较为明显。

表2是培养72h后Lyp对人HeLa、LiBr细胞集落形成的影响。平板克隆形成实验表明,Lyp对人HeLa、LiBr细胞集落形成有显著的抑制作用($p < 0.01$)。继续培养10d,HeLa各处理孔细胞全部脱落未见集落形成;LiBr各处理孔仅有少量细胞集落形成,并存在明显的剂量一效应和时间一效应关系。

表3 培养48h Lyp对细胞LDH释放水平的影响
Table 3 Effects of Lyp on cell LDH release level after 48h

Lyp剂量($\mu\text{mol/L}$)	细胞液中LDH释放水平(OD值)	
	HeLa	LiBr
0	0.047 ± 0.0006	0.047 ± 0.0006
10	$0.092 \pm 0.0012^*$	$0.087 \pm 0.0012^*$
20	$0.134 \pm 0.0006^{**}$	$0.129 \pm 0.0021^{**}$
40	$0.229 \pm 0.0023^{**}$	$0.241 \pm 0.0093^{**}$

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

LDH是一种胞浆酶,在细胞膜受损时LDH释放量较多,是反映细胞损伤较灵敏的指标之一,广泛应用于细胞毒理学研究之中。表3是培养48h Lyp对细胞液中LDH释放水平的影响。由表3可知,Lyp作用于HeLa和LiBr细胞48h后,培养上清液中LDH水平显著升高。在Lyp作用下HeLa和LiBr的细胞膜受到损伤,提示Lyp这两种细胞的抑制作用可能与直接杀伤有关。而唐莉莉等^[18]在观察Lyp对人前列腺非激素依赖性细胞(DU145)抑制作用时未发现LDH水平显著升高,因为在细胞凋亡过程中,细胞膜仍然保持完整,细胞仍然处于存活状态,保持排斥苔盼蓝的能力,推测抑制作用与凋亡诱导作用有关。此外,Lyp具有防止脂质、蛋白质、DNA等大分子损伤的抗氧化活性^[19],其结果往往表现为对机体内正常细胞膜的保护。Lyp对HeLa和LiBr细胞膜的损伤作用机理以及能否对其产生诱导凋亡的作用需要进一步研究。

3 结论

3.1 用重结晶方法获得的样品为全反式Lyp,第三次结晶样品的纯度达到99.17%。

3.1 四氢呋喃对照组(C_1)与正常对照组(C_2)对人HeLa和LiBr细胞培养的存活率影响没有显著差异,可以使用给定浓度的四氢呋喃作助溶剂使Lyp与1640培养基形成均相的悬浊液用于实验研究。

3.2 MTT法、细胞生长曲线、平板克隆实验结果显示,Lyp对体外培养HeLa和LiBr细胞有显著的抑制作用($p < 0.01$),并且存在剂量一效应和时间一效应关系。培养96h后Lyp对人HeLa、LiBr细胞的 IC_{50} 分别是 10.2 、 $10.8\mu\text{mol/L}$ 。

3.3 Lyp显著提高了细胞培养上清液中LDH水平,Lyp对人HeLa、LiBr的抑制作用与直接杀伤细胞有关。

参考文献:

- [1] STAHL W, SIES H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans[J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 336(1): 1-9.
- [2] RAO A S, VENKATESHWAR A. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases[J]. Association medicale canadienne, 2000, 163(6): 739-744.

菜籽多糖对 S₁₈₀ 小鼠肉瘤及其免疫能力的影响

严奉伟¹, 王 辰¹, 严赞开², 吴谋成³

(1. 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025 2. 韩山师范学院化学系, 广东 潮州 521041;

3. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 研究菜籽多糖的抑瘤作用及其机理。通过接种 S₁₈₀ 细胞复制荷 S₁₈₀ 瘤小鼠模型, 分别腹膜注射生理盐水、环磷酸胺、菜籽多糖, 测定各组小鼠肿瘤重量与脏器指数、免疫能力、抗氧化能力、乳酸脱氢酶活力等指标。结果表明: 50~200mg/kg·d 的 RSPS 抑瘤率在 20.66%~34.71% 之间; RSPS 能显著提高荷瘤小鼠脾脏指数、腹腔巨噬细胞吞噬率与吞噬指数、迟发性超敏反应、小鼠血清溶血素含量与脾细胞抗体形成等指标, 显著抑制荷 S₁₈₀ 小鼠血清 LDH 的活性, 提高红细胞 CAT 活性, 降低血清中 MDA 含量。以上结果表明 RSPS 在小鼠体内具有抑制 S₁₈₀ 肉瘤的作用, 能增进荷瘤小鼠免疫力、清除自由基与抑制 LDH 活性可能是其抑制肿瘤的机理。

关键词: 菜籽多糖; S₁₈₀ 肉瘤; 抑制肿瘤; 免疫能力; 抗氧化

Effects of Rapeseed Polysaccharides (RSPS) on S₁₈₀ Tumor Growth Inhibition and Immune Capability Enhancement *in vivo*

YAN Feng-wei¹, WANG Chen¹, YAN Zan-kai², WU Mou-cheng³

(1. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

2. Department of Chemistry, Hanshan Normal College, Chaozhou 521041, China

3. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Effects and mechanism of RSPS on S₁₈₀ tumor growth inhibition were studied in this paper. The tumor-bearing mice were gained by being implanted S₁₈₀ cells inoculated in right front axillas. The S₁₈₀-bearing mice were injected with physiological

收稿日期: 2006-04-19

基金项目: 国家“十五”重大科技资助项目(2001BA501A20)

作者简介: 严奉伟(1966-), 男, 教授, 博士, 主要从事功能食品与营养方面的研究。

- [3] FERI B. Natural antioxidants in human health and disease[M]. San Diego Academic Press, 1994: 95-132.
- [4] STEINMETZ K A, POTTER J D. Vegetables fruits and cancer prevention: a review[J]. Am Diet Assoc, 1996, 96(11): 1027-1039.
- [5] CLINTON S K. Lycopene: chemistry, biology and implications for human health and disease[J]. Nutr Rev, 1998, 56(2Pt 1): 35-51.
- [6] GIOVANNUCCI E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature [J]. Natl Cancer Inst, 1999, 91(10): 317-331.
- [7] KENNEDY T A, LIEBLER D C. Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers[J]. Biol Chem, 1992, 267(8): 4658-4663.
- [8] PALOZZA P, MONALLA S, KRINSKY N I. Effects of β -carotene and α -tocopherol on radical-initiated peroxidation of microsomes[J]. Free Rad Biol Med, 1992, 13(4): 127-136.
- [9] 李伟. 番茄红素的纯化性质研究及微胶囊化[D]. 无锡: 江南大学, 2003: 29-30.
- [10] HUSSAIN R F, NOURI A M E, OLIVER R T D. J Immunol[J]. Methods, 1993, 160(1): 89.
- [11] CARMIAEI J, DEGRAFF W C, GAZDAR A F, et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity[J]. Cancer Res, 1987, 47(10): 936.
- [12] EBISUNO S, INAGAKI T, KOHJIMOTO Y, et al. The cytotoxic effects of fleroxacin and ciprofloxacin on transitional cell carcinoma *in vitro*[J]. Cancer, 1997, 80(12): 2263-2267.
- [13] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2003: 505, 115.
- [14] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司, 2001, 124-131.
- [15] 李润卿. 有机结构波谱分析[M]. 天津: 天津大学出版社, 2002: 55-75.
- [16] 张庆英, 沈忠英, 蔡唯佳, 等. 番茄红素体外对人食管癌细胞 SHEEC36 的初探[J]. 肿瘤, 2001, 21(4): 246-248.
- [17] 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1991: 16-37.
- [18] 唐莉莉. 番茄红素对前列腺癌的作用及其机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2003: 11-12.
- [19] DI MASCIO P, KAISERT S, SIES H, et al. Lycopene as the most efficient biological carotenoid single oxygen quencher[J]. Arch Biochem Biophys, 1989, 274(1): 1-7.