

竹节参总皂苷通过调节 miR-181a/PPAR α 通路改善非酒精性脂肪性肝病的作用

罗悦¹, 刘小慧¹, 魏承亮¹, 段丽¹, 刘朝奇¹, 贺海波², 蔡三金^{1*}

(1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002)

摘要: **目的** 应用高脂饮食诱导小鼠非酒精性脂肪性肝病, 研究竹节参总皂苷的干预作用。**方法** 模型小鼠灌胃给予不同剂量 (15、45 mg/kg) 竹节参总皂苷, 共 19 周, 称定体质量、肝脏质量, 计算肝质量指数, 收集血清及肝脏组织检测相关生化指标, HE 染色观察肝脏组织形态及病理变化, RT-PCR 与 RT-qPCR 测定小鼠肝脏中脂质代谢相关基因、炎症因子及 *miR-181a*、*PPAR α* mRNA 表达, Western blot 检测肝脏中 TLR4、p-STAT1 蛋白表达。**结果** 模型组小鼠体质量、肝质量指数及血清 ALT、肝组织 TG 水平均增加; HE 染色表现典型脂肪样变及炎性浸润; *miR-181a*、脂质代谢相关基因、炎症相关基因及蛋白表达增加, 而 *PPAR α* mRNA 表达下降。竹节参总皂苷干预后, 血清 ALT 及肝组织 TG 水平减少; 肝组织病理学变化明显改善。*miR-181a*、*SREBP-1c*、*ChREBP*, TLR4、p-STAT1, *IL-1 β* 、*TNF α* mRNA 表达下降, 而 *PPAR α* mRNA 表达上升。**结论** 竹节参总皂苷可改善高脂饮食诱导的非酒精脂肪性肝病, 其作用机制可能与 *miR-181a*/*PPAR α* 及其介导的脂毒性及炎症信号通路有关。

关键词: 竹节参总皂苷; 非酒精性脂肪性肝病; *miR-181a*/*PPAR α* ; 脂质代谢; 炎症反应

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)01-0219-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.042

随着生活方式的改变, 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 全球发病率高达 25%, 为肝细胞癌的主要病因之一^[1-2]。“多重打击”假说指出, 肝细胞脂质过度积累和肝细胞炎症环境是导致肝细胞损伤、激活肝细胞死亡、促进星状细胞活化、纤维基质沉积的重要因素^[3-4]。

miRNA 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 可以通过靶向 mRNA 并抑制其翻译或促进其降解在转录后水平调节基因表达。有研究指出, *miR-181a* 在 NAFLD 患者、高脂饮食小鼠及 ob/ob 小鼠的血液和肝脏中高度表达, 并在 NAFLD 中作用显著^[5]。

过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , *PPAR α*) 是一种配体诱导的转录因子, 在能量代谢、肝功能、炎症、细胞周期改变和啮齿动物肝癌发生中起关键作用^[6]。有研究报道, 敲除肝细胞特异性 *PPAR α* 基因导致小鼠肝脏和全身脂肪酸动态平衡受损, 可见 *PPAR α* 与 NAFLD 发展密切相关^[7]。

目前, 临床上仍缺乏针对治疗 NAFLD 的公认药物^[8]。竹节参 *Panax japonicus* C. A. Meyer 是五加科人参属多年生草本植物, 具有散瘀止血、消肿止痛、止咳祛痰、补虚强壮的功效, 竹节参总皂苷是其主要活性成分^[9], 具有减轻肠道炎症反应、改善小鼠脂肪性肝病作用^[10-11]。本研究利用高脂饮食建立 NAFLD 小鼠, 并使用不同剂量竹节参总皂苷干预, 为相关防治提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 40 只, 饲养于三峡大学实验动物中心 [动物生产许可证号 SCXK (鄂) 2017-0012]。所有操作都遵循伦理委员会相关动物使用和保护规定, 伦理审查表编号 2013090B。

1.2 试剂及药物 竹节参购于恩施竹节参种植基地, 经湖北省天然产物研究与开发重点实验室汪鋆植教授鉴定为正品。竹节参总皂苷采用醇提法提取, 大孔树脂吸附法纯化^[12]。丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒、甘油三酯 (TG) 试剂盒均购于中生北控生物科技股份有限公司; PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (日本 TaKaRa 公司, 货号 RR047A); Green Taq Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司, P131-03); 抗体 TLR4 (美国 Santa Cruz 公司, 货号 SC-293072)、p-STAT1 (美国 Cell Signaling 公司, 货号 8826)、 β -actin (美国 Cell Signaling 公司, 货号 4970L)。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 PowerPas Basic 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 核酸蛋白分析仪 (美国 Beckman 公司); Gene Genius 凝胶分析系统 (英国 Syngene 公司); Step One Plus 实时定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystem 公司); 梯度 PCR 仪 (美国 Applied Biosystem 公司); Gel Logic-200 凝胶成像分析系统 (美国 Kodak 公司); 全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

收稿日期: 2020-06-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673675); 湖北省卫健委科研基金项目 (WJ2019M067)

作者简介: 罗悦 (1991—), 女, 硕士, 研究方向为代谢性疾病中药药理。Tel: 15587900966, E-mail: 470209763@qq.com

* 通信作者: 蔡三金 (1962—), 男, 副教授, 研究方向为代谢性疾病中药药理。Tel: 13972609507, E-mail: XYYPB@ctgu.edu.cn

网络出版日期: 2021-02-24

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210224.1648.006.html>

2 方法

2.1 分组及给药 将小鼠随机分为正常饮食组、模型组、竹节参总皂苷低剂量组、竹节参总皂苷高剂量组，除正常饮食组外（标准饲料喂养）其他 3 组给予华阜康公司高脂饲料（H10060）喂养，同时竹节参总皂苷组灌胃不同剂量药物（15、45 mg/kg，溶于生理盐水），正常饮食组予等量的生理盐水灌胃，饲养 19 周，每 2 d 记录 1 次体质量。

2.2 标本采集 将喂养 19 周后的小鼠称定质量，腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉，取血，血液静置于 37 ℃ 下 1 h，3 000 r/min 离心 10 min，收集血清。小鼠脱颈椎处死，切取肝脏，生理盐水冲洗并称质量，切取肝大叶中部长度、厚度适中部分置于包埋夹中，多聚甲醛固定，剩余新鲜肝脏组织置于 1.5 mL 离心管中，在-80 ℃ 下保存。

2.3 小鼠血清 ALT 活性检测 新鲜小鼠血清使用多功能酶标仪检测 ALT 活性，具体方法参照试剂盒说明书。

2.4 小鼠肝脏组织 TG 水平检测 称取小鼠新鲜肝脏 50 mg，浸于 1 mL 无水乙醇，置于 1.5 mL 离心管中，充分研磨后室温抽提 24 h，5 000 r/min 离心 5 min，收集上层澄清抽提液，使用多功能酶标仪检测 TG 水平。

2.5 小鼠肝脏组织 HE 染色 小鼠肝组织固定完成后修整大小，乙醇梯度脱水，石蜡包埋，切片（厚度 4 μm），常规 HE 染色，在显微镜下观察。

2.6 RT-PCR 与 RT-qPCR 检测 *SREBP-1c*、*ChREBP*、*IL-1β*、*TNFα*、*miR-181a*、*PPARα* mRNA 表达 称取小鼠新鲜肝脏 50 mg 至 1.5 mL EP 管中，使用 Trizol 充分裂解并提取总 RNA，电泳检测 RNA 完整性，逆转录试剂盒逆转获得 cDNA，RT-PCR 技术验证引物，2% 琼脂糖凝胶电泳（内参 β-actin），成像系统中拍摄分析。*miR-181a* 以 *U6* 作为内参，在实时定量 PCR 仪中扩增并测量绘制扩增曲线，反应体系为 5 μL SYBR Green，2.4 μL RNase-free water，0.4 μL 引物（浓度为 10 μmol/L），2 μL cDNA（逆转后稀释 10 倍），0.2 μL ROX。反应结束后读取 CT 值，计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ，引物序列见表 1。

表 1 引物序列		
基因	引物	扩增长度/bp
<i>β-actin</i>	正向 5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3'	224
	反向 5'-TTTGATGTCACGCAGCAATT-3'	
<i>PPARα</i>	正向 5'-ACGGCAATGGCTTTATCACA-3'	361
	反向 5'-GCCGCGGACTCGGCTCTTCTT-3'	
<i>SREBP-1c</i>	正向 5'-CGCGCTGCAGGCTGTAGGATG-3'	430
	反向 5'-CTGCACGGCTGTGCCAGGAG-3'	
<i>ChREBP</i>	正向 5'-CCTTCAATGGGATGCTGTCTACC-3'	193
	反向 5'-TCTGTGACTGCCCGTGTGG-3'	
<i>IL-1β</i>	正向 5'-TGTCTCTGTGAATGAAAGACGGC-3'	186
	反向 5'-GCTTGTGCTCTGCTTGTGAGG-3'	
<i>TNFα</i>	正向 5'-TCAACCTCTCTCTGCCGTC-3'	198
	反向 5'-GAGCAATGACTCCAAAGTAGACCT-3'	
<i>U6</i>	正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	94
	反向 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	
<i>miR-181a</i>	正向 5'-CGCACGGAACATTCAACG-3'	76
	反向 5'-CACTGCAGGGTCCGAGGT-3'	

2.7 Western blot 法检测 p-STAT、TLR4 蛋白表达 称取小鼠肝脏组织适量，加入 RIPA 蛋白裂解液充分匀浆后，在 4 ℃ 下提取 30 min 后，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清为

组织总蛋白，应用 BCA 蛋白定量法检测蛋白浓度，加入蛋白上样缓冲液，制备灭活样品。经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后，按照蛋白分子大小切取相应凝胶片段，采用湿法转膜将蛋白条带转移至 PVDF 膜上，经牛奶封闭、孵育一抗、洗膜、孵育二抗、洗膜等步骤后，X 光片显影，扫描图像，Image J 软件分析蛋白表达。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，2 组之间比较采用 Dunnett-*t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

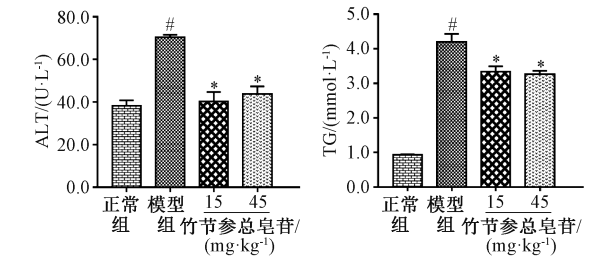
3.1 竹节参总皂苷对高脂饮食小鼠体质量及肝质量指数的影响 小鼠给予高脂饲料喂养 19 周后，体质量及肝质量指数较正常组升高 (*P*<0.05, *P*<0.01)；经竹节参总皂苷药物干预后，小鼠体质量及肝质量指数下降 (*P*<0.05, *P*<0.01)，见表 2。

表 2 竹节参总皂苷对高脂饮食小鼠体质量及肝质量指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组别	体质量/g	肝指数/%
正常组	32.21±2.68	4.49±0.23
模型组	37.99±3.86 [#]	4.98±0.07 ^{##}
竹节参总皂苷低剂量组	33.26±1.76 ^{**}	4.62±0.37 [*]
竹节参总皂苷高剂量组	33.01±1.42 ^{**}	4.35±0.17 ^{**}

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。

3.2 竹节参总皂苷对高脂饮食小鼠血液中 ALT 活性及肝组织 TG 水平的影响 小鼠给予 19 周高脂饲料喂养后，血液中 ALT 活性及肝组织 TG 水平升高，与正常组比较具有显著差异 (*P*<0.05)；与模型组比较，竹节参总皂苷低、高剂量干预后，血清中 ALT 活性及肝组织 TG 水平降低 (*P*<0.05)，见图 1。



注：与正常组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

图 1 竹节参总皂苷对高脂饮食小鼠血液中 ALT 及肝组织 TG 的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

3.3 竹节参总皂苷改善高脂饮食小鼠肝组织病理变化 小鼠给予高脂饲料喂养 19 周后，肝小叶结构不完整，肝脏细胞肿胀、变圆，排列不规则，可见弥漫性的脂质空泡，并有融合现象，伴随炎性细胞浸润，结合“3.1”“3.2”项下结果证明模型构建成功^[13]；经竹节参总皂苷干预后，肝组织病理变化改善明显，肝索排列较整齐，脂肪空泡明显减少，肝组织炎症浸润现象轻微，见图 2。

3.4 竹节参总皂苷调节高脂饮食小鼠肝脏脂质代谢相关基因的表达 与正常组比较，模型组小鼠肝脏组织中脂质代谢相关基因 *SREBP-1c*、*ChREBP* mRNA 表达升高 (*P*<0.05)，高脂饮食引起小鼠肝脏脂质代谢紊乱；竹节参总皂苷干预后 *SREBP-1c*、*ChREBP* mRNA 表达降低 (*P*<

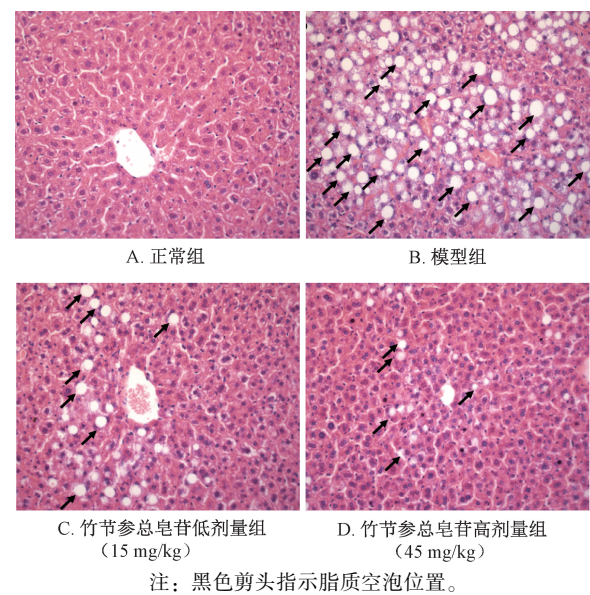


图 2 高脂饮食小鼠肝组织 HE 染色 (×200)

0.05), 见图 3。

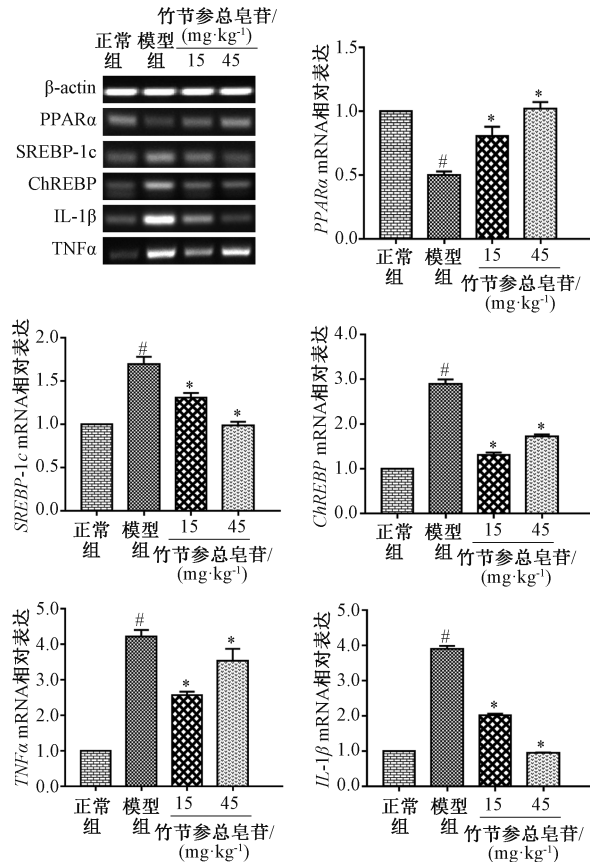


图 3 竹节参总皂苷对高脂饮食小鼠肝组织中脂质代谢及炎症相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.5 竹节参总皂苷调节高脂饮食小鼠肝脏组织炎症相关基因及蛋白表达 小鼠高脂饲料喂养 19 周后, 肝脏组织中 TLR4、p-STAT1 蛋白表达升高, 见图 4; *TNFα*、*IL-1β* mRNA 表达也较正常饮食组高 ($P < 0.05$), 见图 3; 低、高剂量竹节参总皂苷干预后, 上述指标均有所下降, 并趋于

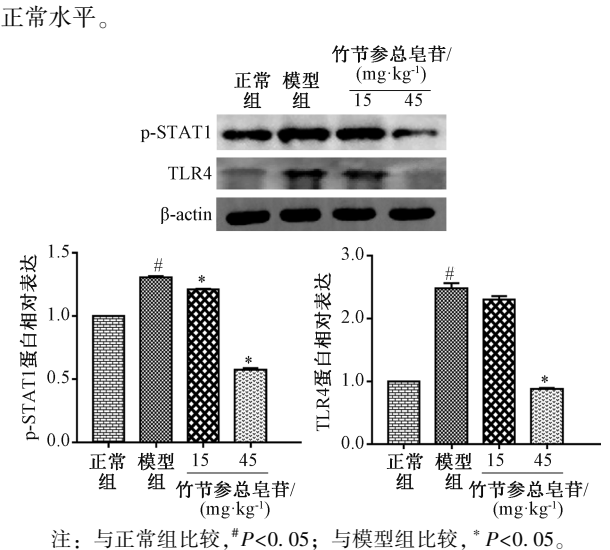


图 4 竹节参总皂苷对高脂饮食小鼠肝脏组织中炎症相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.6 竹节参总皂苷调节高脂饮食小鼠肝脏组织 *miR-181a* 及 *PPARα* 基因表达 *PPARα* 基因表达在小鼠肝组织中下降 ($P < 0.05$), 而经竹节参总皂苷干预后升高, 并趋于正常组水平, 见图 3。同时, *PPARα* 可作为 *miR-181a* 的靶蛋白, 见图 5。模型组 *miR-181a* 基因表达较正常组升高, 竹节参总皂苷干预后其表达呈下降趋势 ($P < 0.05$), 见图 6。

Position 5517-5524 of *PPARα* 3' UTR 5' ...CCUCCUGUAAGCUGAUGAAUGUA ...

mmu-*miR-181a*-5p 3' UGAGUGGUCUGCGCAACUUACAA

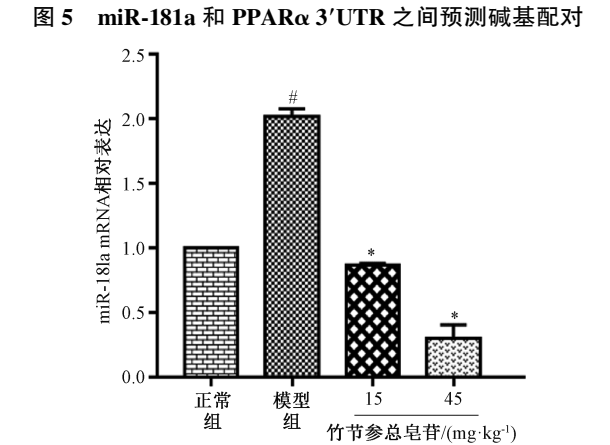


图 5 *miR-181a* 和 *PPARα* 3'UTR 之间预测碱基配对

图 6 竹节参总皂苷对高脂饮食小鼠肝脏组织中 *miR-181a* 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4 讨论

miRNAs 通过参与转录后调控干扰目标基因的表达, *miR-181a* 是其中的一员, 可调节基因表达所引起的肝脏代谢紊乱及应激激活途径, 从而影响 NAFLD 及其向疾病更严重阶段的发展^[14]。NAFLD 患者及动物中显著上调的 *miR-181a* 可损害肝脏葡萄糖、脂质平衡, 而 *miR-181a* 可直接靶向 *PPARα*, 激活 TLR4/NF-κB 途径, 调节炎症反应^[15-16]。本实验证实, NAFLD 发生发展与 *miR-181a*/*PPARα* 信号通路相关, 而竹节参总皂苷可通过调控该信号通路对 NAFLD 起到干预作用。

PPAR α 可同时参与 NAFLD 脂质代谢及炎症反应的调节过程^[17], 通过 LXR 途径调节 SREBP-1c、ChREBP 水平^[18-19], 调控乙酰辅酶 a 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 和脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 活性^[20-21], 干预肝脏脂肪酸催化合成。抑制 PPAR α 表达时, 肝脏储存过量的脂肪酸, 破坏其生理适应机制, 引起活性氧形成、内质网应激、肝细胞功能障碍和损伤, 导致脂毒性炎症发生^[22]。脂毒性应激时 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 被激活, 一方面通过 MyD88 依赖途径激活 NF- κ B 诱导炎症介质 IL-1 β 、TNF α 的释放^[23]; 另一方面通过 MyD88 和 TRIF 依赖性信号诱导 STAT1 在 Ser727 处的快速磷酸化, 并形成同源二聚体进一步迁移到细胞核中驱动下游炎症途径, 激化炎性反应^[24-25], 而 PPAR α 可抑制 TLR4 表达来减轻炎症水平^[26]。本实验结果显示, 竹节参总皂苷可能通过调节 PPAR α /SREBP-1c、ChREBP 的脂毒性及 PPAR α /TLR4/STAT1 的炎症反应信号通路, 达到改善 NAFLD 的作用。

综上所述, miR-181a/PPAR α 及其介导的 SREBP-1c、ChREBP 及 TLR4/STAT1 信号通路促进 NAFLD 的发生与发展, 而竹节参总皂苷可通过调控上述信号通路对 NAFLD 起到治疗作用, 为相关防治提供了新方向。

参考文献:

[1] Younossi Z M, Marchesini G, Pinto-Cortez H, *et al.* Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Transplantation*, 2019, 103(1): 22-27.

[2] Yang H H, Li D M, Song X C, *et al.* Joint associations of serum uric acid and ALT with NAFLD in elderly men and women: a Chinese cross-sectional study[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 285.

[3] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1038-1048.

[4] Arab J P, Arrese M, Trauner M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2018, 13(1): 321.

[5] Du X L, Yang Y C, Xu C, *et al.* Upregulation of miR-181a impairs hepatic glucose and lipid homeostasis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(53): 91362-91378.

[6] Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart J C, *et al.* Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(3): 571-580.

[7] Montagner A, Polizzi A, Fouché E, *et al.* Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD[J]. *Gut*, 2016, 65(7): 1202-1214.

[8] Ahmed A, Wang R J, Harrison S A. Nonalcoholic fatty liver disease review: diagnosis, treatment, and outcomes[J]. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*, 2015, 13(12): 2062-2070.

[9] 何毓敏, 艾 可, 何春喜, 等. 竹节参中的三萜皂苷类成分及其¹³C-NMR 谱特征[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 249-260.

[10] 程志豪, 顿耀艳, 刘 洁, 等. 从 Neu3/IAP 通路研究竹节参总皂苷对衰老大鼠结肠炎症的改善作用[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1597-1601.

[11] 熊海容, 李 聪, 何春喜, 等. 竹节参总皂苷通过调节 miR-

199-5p 改善小鼠脂肪性肝病的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17): 3525-3529.

[12] 张海滨, 张长城, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷不同提取工艺的比较研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(18): 3457-3460.

[13] Jahn D, Kircher S, Hermanns H M, *et al.* Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(5): 943-953.

[14] Gjorgjieva M, Sobolewski C, Dolicka D, *et al.* miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy[J]. *Gut*, 2019, 68(11): 2065-2079.

[15] Jiang K F, Guo S, Zhang T, *et al.* Downregulation of TLR4 by miR-181a provides negative feedback regulation to lipopolysaccharide-induced inflammation[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(2): 142.

[16] Huang R X, Duan X Y, Liu X L, *et al.* Upregulation of miR-181a impairs lipid metabolism by targeting PPAR α expression in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(4): 1252-1258.

[17] Bougarne N, Weyers B, Desmet S J, *et al.* Molecular actions of PPAR α in lipid metabolism and inflammation[J]. *Endocr Rev*, 2018, 39(5): 760-802.

[18] Iizuka K, Wu W, Horikawa Y, *et al.* Feedback looping between ChREBP and PPARalpha in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissues [J]. *Endocr J*, 2013, 60(10): 1145-1153.

[19] Hebbachi A M, Knight B L, Wiggins D, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor α deficiency abolishes the response of lipogenic gene expression to re-feeding[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(8): 4866-4876.

[20] Lambert J E, Ramos-Roman M A, Browning J D, *et al.* Increased *de novo* lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(3): 726-735.

[21] Linden A G, Li S, Choi H Y, *et al.* Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice[J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(3): 475-487.

[22] Hirsova P, Ibrahim S H, Gores G J, *et al.* Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis[J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(10): 1758-1770.

[23] Yao L, Kan E M, Lu J, *et al.* Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10(1): 23.

[24] Roy A, Srivastava M, Saqib U, *et al.* Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4) - mediated signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40(8): 79-89.

[25] Tomita K, Kabashima A, Freeman B L, *et al.* Mixed lineage kinase 3 mediates the induction of CXCL10 by a STAT1-dependent mechanism during hepatocyte lipotoxicity[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(10): 3249-3259.

[26] 王卫远, 李俊芳, 聂尚燕, 等. 非诺贝特通过上调 PPAR α 抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞 TLR4 表达的实验研究[J]. 西部医学, 2016, 28(1): 32-35.