

· 临床论著 ·

胃肠道肿瘤中 EphrinB2 和淋巴管密度的表达及临床意义

岳文静 刘成霞 连海峰 高方美 朱玉红 李明

【摘要】 目的 探讨胃肠道肿瘤中 EphrinB2 的表达与淋巴管密度、淋巴结转移及临床病理参数的关系。方法 采用免疫组织化学、蛋白质印迹两种方法检测 EphrinB2 在 45 例胃腺癌、57 例大肠腺癌和正常胃大肠黏膜组织(各 15 例)中的表达。检测 D2-40 标记的淋巴管并计数淋巴管密度(LVD)。结果 (1) EphrinB2 阳性反应主要定位于肿瘤细胞胞质内;D2-40 标记的 LVD 为棕黄色管腔样结构,阳性反应主要位于淋巴内皮的胞膜上。(2)免疫组织化学:EphrinB2 在肿瘤组织中阳性表达率明显高于正常组织的阳性表达率(胃 82.2% vs. 26.7%, 大肠 75.4% vs. 33.3%, P 均 < 0.05);肿瘤组织 LVD 显著高于正常组织(P 均 < 0.05)。蛋白质印迹:胃和大肠肿瘤组织的表达分别为 2.30 ± 0.86 和 1.89 ± 0.89 , 高于正常组织的表达 0.90 ± 0.41 和 0.87 ± 0.56 (P 均 < 0.05)。(3) EphrinB2 的表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移及临床分期有密切关系($P < 0.05$),而与年龄、性别、肿瘤大小无明显相关性($P > 0.05$)。肿瘤组织中 LVD 与肿瘤分化程度、淋巴结转移、远处转移及临床分期相关($P < 0.05$), Spearman 秩相关分析发现 EphrinB2 的表达与 LVD 呈正相关性。结论 EphrinB2 在肿瘤中高表达,与胃肠道肿瘤的转移和进展密切相关,并与 LVD 呈正相关性,EphrinB2 可能诱导 LVD 的形成参与淋巴结转移的调控。

【关键词】 胃肠肿瘤; 免疫组织化学; 印迹法,蛋白质; EphrinB2; 淋巴管密度

Expression and their clinical significance of EphrinB2 and lymphatic vessel density in gastrointestinal carcinomas YUE Wen-jing, LIU Cheng-xia, LIAN Hai-feng, GAO Fang-mei, ZHU Yu-hong, LI Ming. Department of Digestive System, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China
Corresponding author: LIU Cheng-xia, Email: phdlex@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the expression and clinical significance of EphrinB2 and lymphatic vessel density (LVD) in gastrointestinal carcinomas and normal tissue. **Methods** To examine the expression of EphrinB2 by using immunohistochemistry and western blot technique in 45 samples of gastric carcinoma, 57 samples of colorectal carcinoma, 15 samples of gastric normal tissue and 15 samples of colorectal normal tissue. LVD was marked by D2-40 with immunohistochemistry. **Results** (1) Staining of EphrinB2 was mainly in cytoplasm of the carcinoma cell. The brown and field of view lumen was observed by the means of D2-40 in normal and carcinoma tissue. (2) IHC: The positive rate of EphrinB2 in carcinomas was higher than that in normal tissue (stomach 82.2% vs. 26.7%, large intestine 75.4% vs. 33.3%, $P < 0.05$), LVD in carcinomas was significantly higher than that in the normal tissue ($P < 0.05$). Western blot: Protein level in carcinomas was 2.30 ± 0.86 and 1.89 ± 0.89 respectively, which was also higher than that in normal (0.90 ± 0.41 and 0.87 ± 0.56 , $P < 0.05$). (3) The high expression of EphrinB2 in gastrointestinal carcinoma was closely correlated with histological type, metastasis of lymph nodes and the surgical-pathological stages ($P < 0.05$). LVD by the means of D2-40 was correlated with the histological type, metastasis of lymph nodes, distant metastasis and surgical-pathological stages ($P < 0.05$). Spearman analysis showed that the expression of EphrinB2 was positively correlated to the LVD of the tumor ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of EphrinB2 in gastrointestinal carcinomas were significantly high and they may play important roles in the process of metastasis and development in gastrointestinal carcinoma, and EphrinB2 also has positively correlated to the LVD. EphrinB2 has effects on the lymphangiogenesis of gastrointestinal carcinoma and regulating lymphatic metastasis.

【Key words】 Gastrointestinal neoplasms; Immunohistochemistry; Blotting, western; EphrinB2; Lymphatic vessel density

全世界范围内,肿瘤发病率逐年升高,我国也不例外,胃癌、结直肠癌发病率已分别上升至第二位、第三位,死亡率位分别位于第二位、第五位^[1]。其中,淋巴结转移与否严重影响着患者的预后,也是预示患者肿瘤复发及死亡的强有力指标^[2]。对于 EphrinB2 (Eph 亚家族成员) 研究显示其在淋巴管的形成中有重要作用^[3]。D2-40 是一种新近发现特异性和敏感性均较高的淋巴管内皮细胞标志物^[4]。关于二者在胃肠道肿瘤中的研究未见相关报道,胃肠道肿瘤发病机制相似,因此我们将一起检测胃肠道肿瘤中 EphrinB2 的表达以及 D2-40 标记的阳性淋巴管密度 (lymphatic vessel density, LVD), 探讨它们与胃肠道肿瘤的淋巴结转移等临床生物学行为的关系。

资料与方法

一、一般资料

收集 2010 年 10 月至 2012 年 2 月经滨州医学院附属医院外科治疗的胃腺癌标本 45 例、结直肠癌组织 57 例、胃和大肠正常黏膜组织各 15 例。患者术前均未行放疗和免疫治疗,标本收集取得患者及家属的同意。肿瘤离体 30 min 内收集标本,其中一块放入甲醛溶液中固定,石蜡包埋,其余均放入液氮中冻存备用。

二、主要实验试剂

兔抗人 EphrinB2 抗体购自 Santa Cruze 公司,二氨基联苯胺(DAB)购自迈新公司,鼠抗人 D2-40(淋巴管内皮)单克隆抗体、PV-6000 二步法免疫组织检测试剂、HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司,细胞裂解液、凝胶配制试剂盒、电泳缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Marker、Actin 鼠单克隆抗体、硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC 膜)购于碧云天生物技术研究所, ECL 发光液购于 Millipore 公司。

三、实验方法

1. 免疫组织化学:每例组织均作 3 μm 厚连续切片 3 张,1 张行苏木精-伊红(HE)染色确定病理类型,另 2 张分别进行 EphrinB2 (1:100)、D2-40 (1:100) 免疫组织化学染色。免疫组织化学采用 Elivison 二步法。阴性对照用 PBS 代替一抗,其他实验步骤与上述步骤相同。EphrinB2 阳性的肛周组织切片, D2-40 阳性的扁桃腺组织切片作阳性对照。

2. 蛋白质印迹(Western blot):取新鲜冻存组织液氮研磨后加入裂解液冰上静置 40 min 充分裂解,离心取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度,0.9% 生理盐水调整浓度后 5 \times 上样缓冲液混合(5:1),95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 使蛋白变性。10% SDS-PAGE 凝胶分离电泳,然后湿转

法电转移至 NC 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h。加入一抗 EphrinB2 (1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, TBST 洗膜,加入二抗(1:6000),室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜后, ECL 增强发光, ChemiScope Mini 化学发光成像系统曝光并分析灰度值。重新洗膜、封闭、加 actin 一抗(1:1000)直至曝光、分析灰度值。

四、结果判定

1. 免疫组织化学结果判断:使用奥林巴斯 DP72 显微镜,由 2 位研究者采用盲法评分。EphrinB2 阳性反应主要定位于细胞质,呈浅棕到棕色颗粒。表达强度判定标准参照文献^[5]。染色强度评分:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;由阳性细胞数所占百分比得出标记指数 (labeling index, LI): LI = 阳性瘤细胞数/1000 个瘤细胞 \times 100%, 阳性细胞 < 10% 为 0 分, 阳性细胞占 10% ~ 24% 为 1 分, 阳性细胞占 25% ~ 49% 为 2 分, 阳性细胞 50% ~ 74% 为 3 分, 阳性细胞 \geq 75% 为 4 分;两项评分结果之和即为该标本的免疫组织化学阳性分度:0 ~ 3 为阴性(-), 4 ~ 5 为阳性(+), \geq 6 为强阳性(++)。前组视为阴性,后两组都视为阳性。

D2-40 标记阳性的淋巴管为棕黄色管腔样结构,参照 Kaiserling^[4] 计数方法,先在低倍镜下选择淋巴管最丰富区域,然后在高倍镜下计数 3 个视野淋巴管数,取其均值作为该切片 LVD。

2. 蛋白质印迹:目的蛋白的灰度值除以内参 actin 的灰度值以校正误差,所得结果代表所测样品的目的蛋白相对含量。

五、统计学分析

用 SPSS 19.0 统计软件分析。具有正态性和方差齐性检验的数据:计量资料两组间比较采用 *t* 检验,多组比较用方差分析(*F*)。方差不齐:两组计量资料用近似 *t* 检验 (*t'*), 多组比较应用 Kruskal-Wallis *H* 检验 (*H*)。计数资料用 χ^2 检验。采用 Spearman 进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. EphrinB2、D2-40 在胃肠道组织中的表达定位: EphrinB2 阳性反应主要定位于肿瘤细胞胞质内(图 1, 2)。胃癌组织中 EphrinB2 阳性表达率是 82.2%, 明显高于在正常组织中的阳性表达率 26.7% ($P < 0.05$), 见表 1; EphrinB2 在大肠肿瘤组织中阳性表达率为 75.4% (43/57), 在正常组织的阳性表达率为 33.3% (5/15), 两者比较有显著差异性 ($P < 0.05$), 见表 2。

D2-40 阳性为棕黄色颗粒状,定位于淋巴管内皮细胞的细胞膜或胞质,管腔内无红细胞。正常胃和大肠组

表1 EphrinB2在肿瘤组和正常组胃组织的表达情况

组别	例数	免疫组织化学阳性 [例, (%)]	蛋白质印迹 ($\bar{x} \pm s$)
肿瘤组	45	37(82.2)	2.30 ± 0.86
正常组	15	4(26.7)	0.90 ± 0.41
统计值		$\chi^2 = 16.046$	$t' = 8.426$
P值		0.000	0.000

注: t' 为近似 t 检验

表2 EphrinB2在肿瘤组和正常组大肠组织的表达情况

组别	例数	免疫组织化学阳性 [例, (%)]	蛋白质印迹 ($\bar{x} \pm s$)
肿瘤组	57	43(75.4)	1.89 ± 0.89
正常组	15	5(33.3)	0.87 ± 0.56
统计值		$\chi^2 = 9.474$	$t' = 5.493$
P值		0.000	0.000

注: t' 为近似 t 检验

组织中 D2-40 阳性表达在黏膜下且稀疏分布,呈扩张状态(图3),胃和大肠癌组织中淋巴管数量较多,多腔隙狭小(图4),癌组织 LVD 均显著高于正常组织($P = 0.000$,图5)。肿瘤组织中 EphrinB2 阳性组的平均 LVD 显著高于 EphrinB2 阴性组的 LVD($P < 0.05$),用 Spearman 秩相关分析肿瘤组织中 EphrinB2 的表达与 LVD 的相关性显示两者之间有正相关性($P < 0.05$),见表3。

表3 肿瘤组织中 EphrinB2 的表达与 LVD 的相关性

组别	例数	LVD($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
胃组织			-3.890	0.000
阴性	8	10.14 ± 4.29		
阳性	37	17.15 ± 4.68		
大肠组织			-2.987	0.004
阴性	14	10.18 ± 5.01		
阳性	43	15.38 ± 5.84		

注:胃组织中 $r = 0.423$, $P = 0.001$;大肠组织 $r = 0.374$, $P = 0.004$

2. EphrinB2 在胃肠道组织中翻译后水平的检测:利用 Western blot 技术进一步检测翻译后水平的表达(图6)。数据分析得出,胃癌和大肠癌中的平均表达量分别为 2.30 ± 0.86 和 1.89 ± 0.89 ,正常组织的表达量分别为 0.90 ± 0.41 和 0.87 ± 0.56 ,统计学分析肿瘤组和正常组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),肿瘤组织中高表达 EphrinB2,与免疫组织化学结果一致(表1,2)。发生淋巴结转移组的 EphrinB2 表达量明显高于未发生淋巴结转移组的表达(图7,8),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3. 胃肠道组织中 EphrinB2、LVD 的表达与淋巴结转移等临床病理参数的关系:对临床病理参数进行分析, EphrinB2 与胃癌和大肠癌的分化程度、淋巴结转移、临床分期密切相关($P < 0.05$),与性别、发病年龄、肿瘤大小、远处转移无关系($P > 0.05$)。D2-40 标记的淋巴管密度与肿瘤的分化程度、淋巴结转移、远处转移、临床分期密切相关($P < 0.05$),但与性别、肿瘤大小无关($P > 0.05$),见表4,5。

讨 论

Eph(erythropoietin-producing hepatoma cell line)是酪氨酸蛋白激酶受体家族最大的成员。近期 Makinen 等^[3]研究发现阻断 EphrinB2 的 PDZ 结合位点,突变体小鼠中出现了淋巴系统的缺陷,如管腔瓣膜缺失、乳糜胸等现象。利用高度特异性抗体阻断 EphrinB2 的表达,发现在多种移植瘤中,抑制血管生成,同时也观察到了肿瘤周围和肿瘤中心区淋巴管的减少^[6]。我们在 60 例胃组织和 72 例大肠组织标本中的免疫组织化学研究显示, EphrinB2 在肿瘤细胞胞质中呈阳性表达,正常组织无表达或弱表达,肿瘤组和正常组的表达有统计学差异($P < 0.05$),Western blot 进一步检测也显示肿瘤组织中的表达水平明显高于正常组织($P < 0.05$),淋巴结转移组的表达量明显高于未发生淋巴结转移组的表达($P < 0.05$)。EphrinB2 阳性表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、远处转移无关,与肿瘤的分化程度、淋巴结转移、临床分期密切相关。EphrinB2 主要表达在癌巢中,周围间质少量表达,可能为肿瘤细胞分泌 EphrinB2 到间质中,通过与内皮细胞上的 VEGFR-3 结合促进淋巴管生成^[7]。在其他的肿瘤,如头颈部、子宫颈癌等多种恶性肿瘤中研究表明 EphrinB2 无论在基因水平还是在蛋白水平均出现过度表达,并与淋巴结转移有正相关^[8-9]。EphrinB2 阳性表达越高的患者,其肿瘤分化程度越差,临床分期越晚,我们可以推测 EphrinB2 在淋巴结转移、肿瘤浸润中起着促进作用,可以通过检测 EphrinB2 的表达预测患者的淋巴结转移情况和预后。

单克隆抗体 D2-40 是在 1999 年研究胚胎睾丸精原细胞瘤中癌胚抗原 M2A 的特征和分布时发现的^[10]。是一种特异性较高的淋巴管内皮细胞标记物^[4,11]。我们的研究中, D2-40 标记的棕色管腔内无红细胞,管壁较薄,未见血管被标记,肿瘤组织及正常组织均存在淋巴管,但两者之间的数量及形态均存在差异。肿瘤组织中表达较多但管腔多呈闭锁状态,正常组织在黏膜下表达分布稀疏且管腔较大,与陶茜等^[12]研究结果一致。LVD 在肿瘤的分化程度、淋巴结转移、远处转移、临床分期存在着统计学差异。提示淋巴管密度升高是

表 4 胃癌组织中 EphrinB2、LVD 表达与临床病理参数的关系

临床参数	例数	EphrinB2				LVD		
		- (例)	+ (例)	χ^2 值	<i>P</i> 值	$\bar{x} \pm s$	统计值	<i>P</i> 值
性别				2.257	0.133		<i>t</i> = -1.012	0.317
男	29	7	22			15.31 ± 5.19		
女	16	1	15			16.98 ± 5.53		
年龄				1.272	0.259		<i>t</i> = 23.065	0.004
<50 岁	13	1	12			19.39 ± 3.30		
>50 岁	32	7	25			14.48 ± 5.35		
肿瘤大小				3.066	0.080		<i>t</i> = -0.715	0.478
≤5 cm	27	7	20			15.44 ± 5.28		
>5 cm	18	1	17			16.60 ± 5.43		
分化程度				6.424	0.040		<i>H</i> = 22.337	0.000
高分化	4	2	2			9.20 ± 6.95		
中分化	19	5	14			13.12 ± 4.33		
低分化	22	1	21			19.53 ± 2.61		
淋巴结转移				11.457	0.001		<i>t'</i> = -3.713	0.001
无	16	7	9			12.20 ± 5.44		
有	29	1	28			17.95 ± 4.03		
远处转移				1.216	0.270		<i>t'</i> = -4.970	0.000
无	40	8	32			15.34 ± 5.37		
有	5	0	5			20.38 ± 1.24		
临床分期				16.723	0.001		<i>F</i> = 4.973	0.005
I	10	6	4			12.14 ± 5.79		
II	15	2	13			14.61 ± 4.62		
III	13	0	13			18.53 ± 4.74		
IV	7	0	7			19.17 ± 2.56		

注:*H* 为 Kruskal-Wallis *H* 检验,*F* 为方差分析

表 5 大肠癌组织中 EphrinB2、LVD 表达与临床病理参数的关系

临床参数	例数	EphrinB2				LVD		
		- (例)	+ (例)	χ^2 值	<i>P</i> 值	$\bar{x} \pm s$	统计值	<i>P</i> 值
性别				0.008	0.931		<i>t</i> = 2 - 3.62	0.719
男	32	8	24			13.84 ± 5.92		
女	25	6	19			14.13 ± 6.31		
年龄				0.014	0.906		<i>t</i> = 21.698	0.095
<50 岁	17	4	13			16.15 ± 5.19		
>50 岁	40	10	30			13.23 ± 6.23		
肿瘤大小				0.052	0.820		<i>t</i> = 20.565	0.575
≤5 cm	30	7	23			14.53 ± 6.59		
>5 cm	27	7	20			13.62 ± 5.46		
分化程度				10.682	0.005		<i>F</i> = 15.023	0.000
高分化	14	8	6			9.09 ± 3.69		
中分化	34	5	29			14.45 ± 5.65		
低分化	9	1	8			20.57 ± 3.22		
淋巴结转移				5.695	0.017		<i>t</i> = 2 - 2.739	0.008
无	29	11	18			12.06 ± 6.11		
有	28	3	25			16.21 ± 5.28		
远处转移				1.031	0.310		<i>t'</i> = -12.154	0.000
无	54	14	40			13.58 ± 5.77		
有	3	0	3			23.53 ± 0.40		
临床分期				9.344	0.025		<i>F</i> = 6.294	0.001
I	4	3	1			7.15 ± 2.75		
II	25	8	17			12.85 ± 6.17		
III	25	3	22			15.34 ± 4.89		
IV	3	0	3			23.53 ± 0.40		

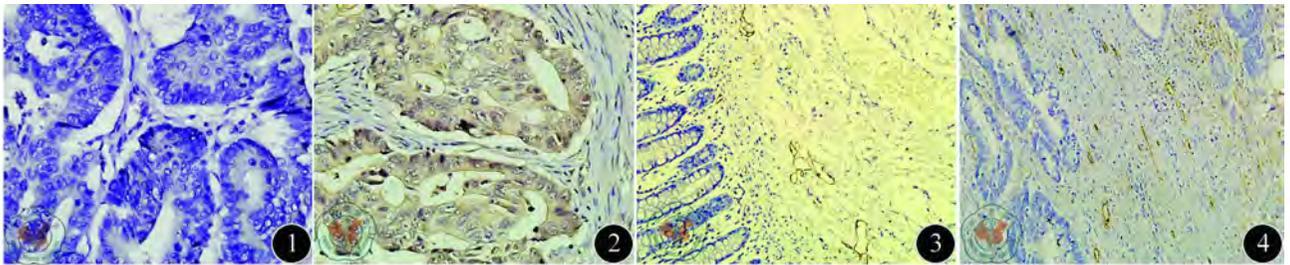


图1 EphrinB2在肿瘤组织中的阴性表达(Elivison × 400) 图2 EphrinB2在肿瘤组织中的阳性表达(Elivison × 400)

图3 D2-40在正常组织中的表达(Elivison × 200) 图4 D2-40在肿瘤组织中的表达(Elivison × 200)

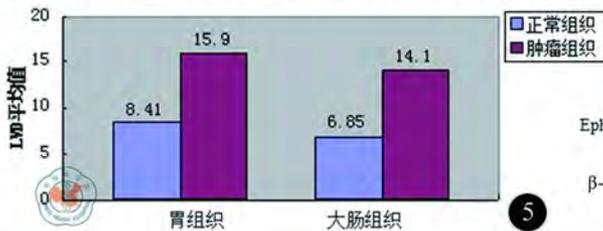


图5 LVD在正常组织和肿瘤组织中的表达。胃组织: $t'=7.077, P=0.000$; 大肠组织: $t'=8.037, P=0.000$

图6 EphrinB2在胃肠道组织中的表达。C: 无淋巴结转移的癌组织; CL: 有淋巴结转移的癌组织; N: 正常组织

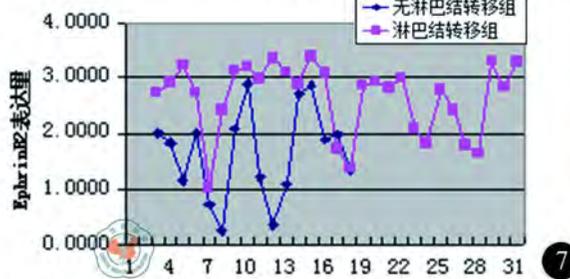
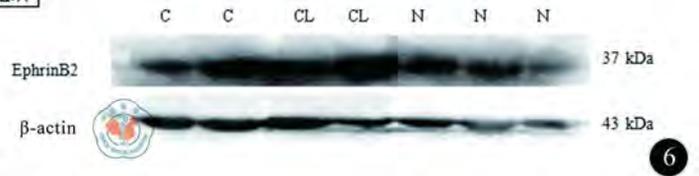


图7 胃癌中淋巴结转移组和未发生淋巴结转移组EphrinB2的表达的相对灰度值。 $t'=-4.491, P=0.000$

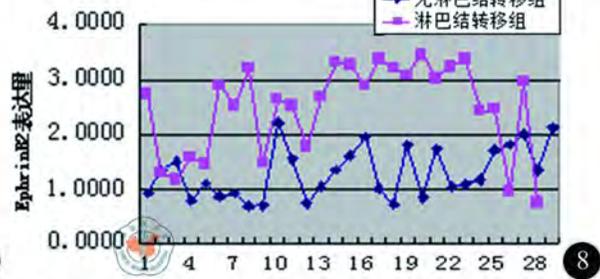


图8 大肠癌中淋巴结转移组和未发生淋巴结转移组EphrinB2的表达的相对灰度值。 $t'=-6.588, P=0.000$

肿瘤进展和淋巴结转移的一个重要因素,肿瘤通过新生的淋巴管转移到远处。此外 EphrinB2 阳性表达的肿瘤组织中 LVD 明显高于 EphrinB2 阴性性表达的肿瘤组织的 LVD ($P < 0.05$), 两者的表达有正相关性,说明 EphrinB2 具有诱导淋巴管生成的作用,导致 D2-40 标记的淋巴管密度的升高。

肿瘤的生物特点为侵袭和转移,临床和病理研究已经证实肿瘤发生转移最常见的途径为淋巴转移,淋巴转移也是大多数实体瘤播散的早期事件^[13]。我们的研究结果显示 EphrinB2 在调控淋巴管生成、淋巴结转移中起着重要作用,但具体的分子调控机制目前仍不清楚,本项研究为进一步的研究 EphrinB2 在淋巴结转移中的作用提供了理论基础,下一步我们将深入研究 EphrinB2 调控淋巴结转移的机制。

参 考 文 献

[1] 郑荣寿,张思维,吴良有,等. 中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤, 2012, 21: 1-12.
 [2] Chang GJ, Bigas MA, Skibber JM, et al. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer; systematic review. J Natl Cancer Inst, 2007, 99: 433-441.

[3] Makinen T, Adams RH, Bailey J, et al. PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. Genes and Dev, 2005, 19: 397-410.
 [4] Kaiserling E. Immunohistochemical identification of lymph vessels with D2-40 in diagnostic pathology. Pathology, 2004, 25: 362-374.
 [5] Zhong D, Li Y, Peng Q, et al. Expression of Tiam1 and VEGF-C correlates with lymphangiogenesis in human colorectal carcinoma. Cancer Biology & Therapy, 2009, 8: 689-695.
 [6] Abengozar M, Frutos S, Ferreiro S, et al. Blocking ephrinB2 with highly specific antibodies inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor growth. Blood, 2012, 119: 4565-4575.
 [7] Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. Nature, 2010, 465: 483-489.
 [8] Machiko K, Yasunuma K, Daisuke S, et al. Soluble form of ephrinB2 inhibits xenograft growth of squamous cell carcinoma of the head and neck. Int J Oncology, 2009, 34: 321-327.
 [9] Alam SM, Fujimoto J, Jahan I, et al. Coexpression of EphB4 and ephrinB2 in tumor advancement of uterine cervical cancers. Gynecologic Oncology, 2009, 114: 84-88.
 [10] Marks A, Sutherland DR, Bailey D, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. Br J Cancer, 1999, 80: 569-578.
 [11] 陈文静, 张江宇, 李文萍. D2-40 在肿瘤淋巴管标记及诊断的研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5: 1078-1080.

- [12] 陶茜,董丽娟,苏经题,等. D2-40 用于大肠癌淋巴管形成及其与转移关系的研究. 中国综合临床,2009,25:638-640. (收稿日期:2012-08-20)
(本文编辑:马超)
- [13] He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. Biochim Biophys Acta, 2004, 1654:3-12.

岳文静,刘成霞,连海峰,等. 胃肠道肿瘤中 EphrinB2 和淋巴管密度的表达及临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(1):71-76.

