

• 实验研究 •

基于 Nrf2 通路研究二仙解毒方对弱精子症大鼠精子微环境的影响*

李河桥¹, 刘绍明², 孙樱菲², 张修举^{3△}

(1. 北京中医药大学第三附属医院泌尿外科, 北京 100029; 2. 北京中医药大学东方医院泌尿男科, 北京 100163;
3. 中国中医科学院西苑医院男科, 北京 100091)

摘要: **目的** 基于 Nrf2 信号通路研究二仙解毒方对弱精子症模型大鼠精子微环境的改善作用及可能机制。**方法** 使用奥硝唑法构建成熟雄性大鼠弱精子症模型, 随机分为模型组、二仙解毒方低剂量组、中剂量组、高剂量组、左卡尼汀组, 每组各 12 只, 连续灌胃 4 周后, 检测各组大鼠精子浓度、精子活动力、相关氧化应激指标、大鼠睾丸及附睾中基于 Nrf2 蛋白表达及 mRNA 表达。**结果** 二仙解毒方可增强弱精子症模型大鼠精子活动力, 剂量越高, 氧化应激指标改变越显著, 二仙解毒方高剂量组可将模型组大鼠的精液抗氧化能力恢复至正常大鼠水平; 二仙解毒方可促进大鼠附睾、睾丸组织 Nrf2 基因转录与蛋白表达。**结论** 二仙解毒方确有提高精子活动力的作用, 其可能的作用机制为通过诱导上调生殖细胞内 Nrf2 mRNA 和蛋白表达, 以改善弱精子症大鼠精液氧化应激状态, 从而提高精子活动力。

关键词: Nrf2 信号通路; 氧化应激; 弱精子症; 二仙解毒方

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)03-0001-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.03.001

Study on the Effect of Erxian Jiedu Recipe on the Sperm Microenvironment of Rats with Asthenospermia Based on Nrf2 Pathway

LI Heqiao¹, LIU Shaoming², SUN Yingfei², ZHANG Xiuju³

1. Department of Urology, the Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
2. Department of Urology and Andrology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100163, China;
3. Department of Andrology, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

ABSTRACT: **Objective** Based on the Nrf2 signal pathway to study the effect of Erxian Jiedu Recipe on the sperm microenvironment of rats with asthenospermia and its possible mechanism. **Methods** The ornidazole method was used to construct a mature male rat model of asthenospermia, which was randomly divided into model group, Erxian Jiedufang low-dose group, Erxianjiedufang medium-dose group, Erxianjiedufang high-dose group, and L-carnitine. In each group, 12 rats in each group. After continuous gastric administration for 4 weeks, the sperm concentration, sperm motility, related oxidative stress indicators, Nrf2 protein expression and mRNA expression in the rat testis and epididymis were detected in each group. **Results** Erxian Jiedu Decoction can enhance sperm motility in rats with asthenospermia. The higher the dose, the more significant the changes in oxidative stress indicators. The high-dose Erxian Jiedu Decoction can restore the semen antioxidant capacity of the model group to Normal rat level; Erxian Jiedu Decoction can promote Nrf2 gene transcription and protein expression in rat epididymis and testis tissues. **Conclusion** Erxian Jiedu Recipe does improve sperm motility. Its possible mechanism is to improve the oxidative stress state of semen in asthenospermia rats by inducing up-regulation of Nrf2 mRNA and protein expression in germ cells, thereby improving sperm motility.

KEY WORDS: Nrf2 signaling pathway; oxidative stress; asthenospermia; Erxian Jiedu Recipe

收稿日期: 2021-05-10

* 基金项目: 国家自然科学基金(81473527); 北京中医药大学第三附属医院科研孵化项目(2019kyfh-01)

第一作者简介: 李河桥(1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治泌尿男性疾病。

△通信作者: 张修举, E-mail: 723327481@qq.com

精子生成是一系列细胞事件,与睾丸精子生成或睾丸后成熟有关的分子事件的干扰可能导致不孕不育。根据世界卫生组织的数据,全球近 1.9 亿人患有不孕不育,其中因男性因素所致者占到半数^[1]。各种条件可以不同程度地影响男性的生殖潜力,它们往往共存^[2]。越来越多的证据表明,氧化应激(OS)在男性不孕症病因学中起着独立的作用,其中超过半数的男性,基质活性氧物种水平表达过多^[3]。OS 可以通过多种途径对生育产生负面影响,包括电容干扰和精子细胞膜、DNA 可能受损,这可能损害精子受精并发育成健康胚胎的潜力^[4-5]。然而,精子拥有发达的抗氧化防御网络,包括抗氧化基因和酶,在保护精子的活力和生存能力方面发挥着至关重要的作用。抗氧化基因 Nrf2(核因子红细胞 2+相关因子 2)促进抗氧化酶表达,是抗氧化系统的重要组成部分^[6]。本团队前期临床研究发现^[7-8],二仙解毒方以补肾益精、活血解毒为组方思想,可以提高精液质量、精子的活动力(progressive and non-progressive, PR+NP),调整氧化应激状态。为了明确二仙解毒方对弱精子症(asthenospermia, AS)大鼠睾丸及附睾组织 Nrf2 蛋白表达的影响,本研究通过建立 AS 大鼠模型,对此进行研究,以进一步阐述为二仙解毒方的临床起效作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 SPF 级 SD 健康雄性大鼠 72 只,8 周,体质量 200~250 g,统一购于斯贝福(北京)实验科技有限公司。

1.2 药物 二仙解毒方:熟地黄 15 g,牡丹皮 9 g,丹参 9 g,枸杞子 12 g,茯苓 9 g,车前子 9 g,仙茅 9 g,淫羊藿 9 g,菟丝子 12 g,黄精 9 g,巴戟天 12 g,萆薢 9 g,白花蛇舌草 15 g,蒲公英 12 g,配方颗粒购自北京康仁堂药业有限公司。

左卡尼汀口服液:国药准字 H19990372,东北制药集团沈阳第一制药有限公司,规格:10mL;奥立泰:国药准字 H20031257,西安万隆制药股份有限公司,规格:0.25 g。

1.3 主要及试剂 EPS 300 电泳仪(biorad);低温离心机(Sigma,德国);LEGEND MICRO 21R 台式高速冷冻离心机(THERMO);荧光定量 PCR 仪(Applied biosystems(USA));分光光度计(THERMO);TRIZOL(10296028,Invitrogen);SuperScript III RT 逆转录 kit

(11752050,ABI-invitrogen);Sybr qpcr mix(4472920,ABI-invitrogen);DJ-1(ab18257,Abcam)。

1.4 方法 采用随机数字表法将大鼠随机分为空白组、模型组、二仙解毒方低剂量组、中剂量组、高剂量组、左卡尼汀组,每组各 12 只。除空白组外,剩下各个实验组采取奥硝唑法制备 AS 模型^[9]。二仙解毒方各组均以二仙解毒方浓缩液生药予以灌胃,其中二仙解毒方低剂量组灌胃剂量为 7.5 g 生药/kg;中剂量组灌胃剂量为 15 g 生药/kg;高剂量组灌胃剂量为生药 30 g/kg;左卡尼汀组灌胃剂量为左卡尼汀口服液 0.1 g/kg;空白组、模型组:予生理盐水 10 mL/kg 体重灌胃。各组灌胃持续 4 周。

1.5 观察指标

1.5.1 大鼠精子活动力检测 末次给药 24 h 后处死大鼠,分离睾丸、附睾,取左侧睾丸和附睾置于 37 ℃生理盐水的平皿中,称重后将附睾横切分为大致均匀的上下两部分,将左侧上半部分剪碎的附睾组织移入孵育缓冲液试管中。自大鼠输精管及附睾中留取精液标本,进一步行精子活力检测。

1.5.2 精液氧化应激指标检测 取左侧下半部分睾丸、附睾组织,分别用 4℃的生理盐水在冰水浴中制成 10%的组织匀浆,离心速度为 3 000 r/min,持续 10 min,收集上清液并冷冻保存,各小组蛋白表达将采用分光光度法进行。SOD 检测用黄嘌呤氧化法;选用硫代巴比妥法来进行 MDA 检测;考马斯亮蓝法被用来检测 GSH-Px;采用荧光探针测定精子 ROS;具体步骤说明书实施。

1.5.3 Western Blot 检测睾丸、附睾组织 Nrf2 蛋白的表达 从-80℃冰箱中取出样品,蛋白上样量为 20 μg,进行电泳后将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上室温封闭 2 h;以 Nrf2 抗体(兔源,1:5 000)为第一抗体,HRP-山羊抗兔 IgG(1:6 000 稀释)为第二抗体进行孵育;漂洗后加入发光液,显影、定影。用 Quantity One 对蛋白条带的灰度进行定量,以 β 肌动蛋白为内参,计算相对表达量用来统计学分析。

1.5.4 RT-PCR 检测睾丸、附睾组织 Nrf2 基因的转录 取另一侧大鼠睾丸组织,用 RNA simple Total 试剂盒提取总 RNA,用 Rever TraAce qPCR RT kit 试剂盒反转录成 cDNA,设计目的基因及管家基因引物,以 cDNA 为模板,采用 SYBR Green 进行 PCR 检测。同

时测定待测样品的管家基因(β -actin)及目的基因 Ct 值和对照组管家基因(β -actin)及目的基因 Ct 值,其中数据相对定量分析,将通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	引物 序列 (5'-3')	反向序列 (5'-3')
β -actin	CCAGCCTTC-	CAATGCCTGGGTA-
	CTTCTTGGGTA	CATGGTG
Nrf2	TGCCCACATTCC-	GCTATCGAGTGACT-
	CAAACAAG	GAGCCT

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示;满足正态分布的数据选择单因素方差分析来实现多个小组之间的比较。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $P<0.01$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 精子密度及活动力比较 对比空白组与模型组大鼠精子浓度,结果表明不存在统计学差异($P>0.05$),而 PR+NP 精子百分率下降,存在统计学差异($P<0.01$),说明 AS 大鼠成功造模。与模型组比较,二仙解毒方低剂量组精子密度升高($P<0.05$);其余各组精子密度显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二仙解毒方低、中、高剂量组、左卡尼汀组中精子活动力 PR+NP 精子均上升,有显著统计学差异($P<0.01$)。见表 2。

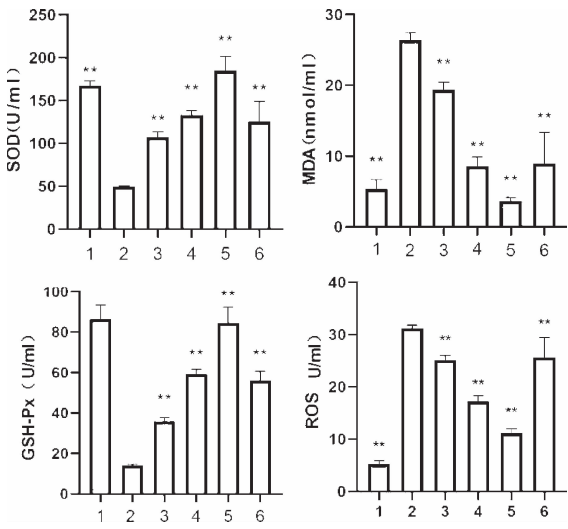
表 2 不同浓度二仙解毒方对大鼠精子的改变($\bar{x}\pm s$)

组别	数量	精子密度 /($\times 10^6\cdot L^{-1}$)	PR+NP/%
空白组	12	39.17 $\pm$ 4.62**	60.23 $\pm$ 1.72**
模型组	12	15.06 $\pm$ 4.17	41.06 $\pm$ 1.19
二仙解毒方低剂量组	12	19.94 $\pm$ 2*	45.51 $\pm$ 1.52**
二仙解毒方中剂量组	12	22.83 $\pm$ 4.65**	49.43 $\pm$ 0.77**
二仙解毒方高剂量组	12	31.30 $\pm$ 4.04**	62.31 $\pm$ 1.12**
左卡尼汀组	12	33.16 $\pm$ 3.96**	57.21 $\pm$ 0.85**

注:与模型组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$ 。

2.2 不同浓度二仙解毒方对大鼠精液氧化应激指标的影响 与正常组比较,模型组 SOD、GSH-Px 水平显著降低($P<0.01$),MDA、ROS 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各组 SOD、GSH-Px 含量明显上

升($P<0.01$),MDA、ROS 含量明显下降($P<0.01$),且二仙解毒方剂量越高,氧化应激指标改变越显著。此外,二仙解毒方高剂量组大鼠氧化应激指标与空白组相比,二者未表现出统计学差异($P>0.05$),提示二仙解毒方高剂量组可将模型组大鼠的精液抗氧化能力恢复至正常大鼠水平。见图 1。



注:1. 空白组;2. 模型组;3. 二仙解毒方低剂量组;4. 二仙解毒方中剂量组;5. 二仙解毒方高剂量组;6. 左卡尼汀组。与模型组相比,** $P<0.01$ 。

图 1 不同浓度二仙解毒方对大鼠精液氧化应激指标的影响($\bar{x}\pm s$)

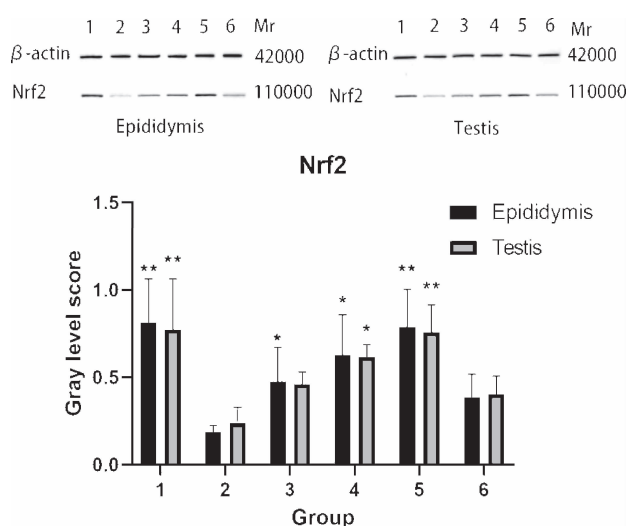
2.3 二仙解毒方对大鼠附睾、睾丸 Nrf2 mRNA 表达的影响 在附睾组织中,与模型组比较,空白组,二仙解毒方低、中、高剂量组 Nrf2 mRNA 的表达都显著上升($P<0.01$),左卡尼汀组中 Nrf2 mRNA 同样上升($P<0.05$)。睾丸组织中,各组 Nrf2 mRNA 表达均显著提高,具有一定的统计学差异($P<0.01$)。见表 3。

表 3 二仙解毒方对大鼠附睾、睾丸组织 Nrf2 mRNA 表达的影响

组别	数量	附睾	睾丸
空白组	6	7.50 $\pm$ 0.90**	7.02 $\pm$ 0.88**
模型组	6	1.05 $\pm$ 0.16	1.03 $\pm$ 0.15
二仙解毒方低剂量组	6	2.45 $\pm$ 0.40**	2.76 $\pm$ 0.27**
二仙解毒方中剂量组	6	3.62 $\pm$ 0.38**	5.23 $\pm$ 0.92**
二仙解毒方高剂量组	6	7.55 $\pm$ 1.24**	6.99 $\pm$ 1.21**
左卡尼汀组	6	1.84 $\pm$ 0.21*	1.80 $\pm$ 0.22**

注:与模型组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$ 。

2.4 二仙解毒方对大鼠附睾、睾丸组织 Nrf2 蛋白表达的影响 附睾组织中,与空白组相比较,模型组大鼠 Nrf2 蛋白表达明显降低($P<0.05$),表明弱精子症大鼠 Nrf2 蛋白受影响。除左卡尼汀组($P>0.05$)外,各组 Nrf2 蛋白表达均有所上升,有一定的统计学差异($P<0.05$),说明西药治疗弱精子症的主要靶点不在 Nrf2 蛋白上;其中高剂量组与空白组比较,结果显示不存在统计学差异($P>0.05$),说明二仙解毒方高剂量组效果最好,能在实验层面恢复大鼠 Nrf2 蛋白表达。睾丸组织中,相对于模型组,二仙解毒方中剂量组蛋白表达较高,且有一定的统计学差异($P<0.05$);空白组和高剂量组蛋白表达显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$);二仙解毒方低剂量组和左卡尼汀组 Nrf2 蛋白表达无明显变化。提示在恢复蛋白表达上,二仙解毒方效果明显,左卡尼汀无显著效果。见图 2。



注:1. 空白组;2. 模型组;3. 二仙解毒方低剂量组;4. 二仙解毒方中剂量组;5. 二仙解毒方高剂量组;6. 左卡尼汀组。与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 2 不同浓度二仙解毒方对大鼠附睾睾丸组织 Nrf2 蛋白表达的影响

3 讨论

弱精子症临床常见,降低了怀孕几率,影响胚胎质量。专家共识指出,脾肾两虚夹瘀为弱精子症缠绵难愈的关键病机,故治疗要以健脾益肾、活血养精为基本治法^[10]。尤在泾《金匱要略心典》载:“毒,邪气蕴结不解之谓”^[11]。目前一些高辐射、物理化学性有害成分可归于中医之“毒邪”。毒邪无所出路,日久蕴积体内,损伤精室,进一步致使精子活力下降。因此,弱

精子症不仅有脾肾不足的“本虚”,也有血瘀和毒素积聚过多的“标实”^[12-13]。二仙解毒方是由张景岳“赞育丹”化裁所成,在原方基础上加入活血之牡丹皮、丹参,祛湿之茯苓、车前子、萆薢,白花蛇舌草、蒲公英清热解毒。全方不仅补肾之阴阳,而且兼顾瘀血、毒邪。研究表明,淫羊藿、巴戟天可以调节下丘脑-垂体-性腺轴,菟丝子配伍枸杞子可以改善雷公藤多苷导致的精子异常^[14-15]。丹参水提物能促进小鼠睾丸生精功能的恢复,减少精子 DNA 损伤^[16],是治疗弱精子症的有效药物。通过实验研究也已证明,健脾益肾活血解毒法可以增加睾丸组织清除活性氧、抵抗氧化损伤的能力,提升精子生存状态,促使精子运动力上升^[17-19]。据了解,世界人口约 15% 受不育症的影响^[20],其中超过 25% 的男性不孕症病例是特发性的,没有可识别的原因^[21]。氧化应激(OS)和活性氧物种(ROS)被认为对精子有害,占不孕症病例的 30%~80%^[22]。OS 对男性群体的生育力和精子功能造成了较大的伤害。Nrf2 可以维持细胞内的氧化平衡,降低细胞对死亡信号的敏感性,在细胞抵抗外源性或内源性氧化应激的机制中起重要作用。在 Nrf2 缺乏的小鼠中,精子浓度和运动能力将受到损害^[23]。此外,有证据表明,与受孕男性精子中的 Nrf2 表达相比,男性不育者精子的 Nrf2 表达水平较低^[24]。因此,Nrf2 作为一种抗氧化基因,通过抑制氧化应激来维持精子动物的运动性非常重要^[25]。

本实验研究结果表明,二仙解毒方能显著提高精子活动力,能改变氧化应激指标 MDA、GSH-Px、SOD、ROS,改善弱精子症大鼠氧化应激状态,有助于恢复氧化与抗氧化的“动态平衡”。二仙解毒方能增加大鼠睾丸和附睾中 Nrf2 基因的表达。服用二仙解毒方后,大鼠睾丸、附睾组织中 Nrf2 蛋白表达显著提高,提示二仙解毒方改善精子活力可能与 Nrf2 通路激活有关。

此外,本实验观察到,二仙解毒方高剂量组在改善氧化应激状态及提高 Nrf2 mRNA、Nrf2 蛋白表达效果显著,多数指标恢复到空白组大鼠水平,表明二仙解毒方确有提高精子活动力、改善精子微环境的作用,使之有恢复至正常水平的可能性。二仙解毒方可以减少甚至逆转奥硝唑诱导睾丸和附睾的病理损伤;二仙解毒方高剂量组疗效优于左卡尼汀,体现出中医药治疗疾病的优势之处,但由于少弱精子症病理机制

较为复杂,二仙解毒方是否可通过调控其他蛋白及通路来改善精子微环境功能,尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] AGARWAL A, PAREKH N, PANNER SELVAM M K, et al. Male oxidative stress infertility(MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility[J]. *World J Mens Health*, 2019, 37(3): 296–312.
- [2] JUREWICZ J, DZIEWIRSKA E, RADWAN M, et al. Air pollution from natural and anthropic sources and male fertility[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 109.
- [3] BUI A D, SHARMA R, HENKEL R, et al. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility[J]. *Andrologia*, 2018, 50(8): e13012.
- [4] WYCK S, HERRERA C, REQUENA C E, et al. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development[J]. *Epigenetics Chromatin*, 2018, 11(1): 60.
- [5] AITKEN R J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage[J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84(10): 1039–1052.
- [6] CHENG Q Y, KALABUS J L, ZHANG J P, et al. A conserved antioxidant response element(ARE)in the promoter of human carbonyl reductase 3(CBR3)mediates induction by the master redox switch Nrf2[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(1): 139–148.
- [7] 代宏亮, 贾玉森, 张志杰, 等. 补肾益精解毒法治疗弱精子症 36 例临床观察[J]. *中医杂志*, 2012, 53(22): 1941–1943.
- [8] 刘绍明, 丁红阳, 贾玉森, 等. 二仙解毒方水煎剂治疗弱精子症临床观察[J]. *中医药学报*, 2017, 45(1): 73–76.
- [9] OH S E, MOURADIAN M M. Regulation of signal transduction by DJ-1[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1037: 97–131.
- [10] 秦国政, 李曰庆, 裴晓华, 等. 《基于脾肾两虚夹瘀论治无症状性弱精子不育症》专家共识[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(6): 2235–2238.
- [11] 尤怡. 金匱要略心典[M]. . 北京: 中国中医药出版社, 1992: 32.
- [12] 刘绍明, 张岳阳, 郭军. 无症状性弱精子症的中医研究[J]. *中国性科学*, 2018, 27(6): 103–105.
- [13] 宾彬, 王杰. 从“脾肾两虚兼湿热瘀毒”论治少弱精子症[J]. *甘肃中医*, 2010, 23(7): 36–37.
- [14] GUAN S Q, ZHU Y T, WANG J S, et al. A combination of Semen Cuscutae and Fructus Lycii improves testicular cell proliferation and inhibits their apoptosis in rats with spermatogenic dysfunction by regulating the SCF/c-kit--PI3K--Bcl-2 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112525.
- [15] 孔祥军, 姜睿. 中药治疗少弱精子症的分子机制研究进展[J]. *中国男科学杂志*, 2018, 32(1): 68–72.
- [16] 周文, 陆杉, 周欢群, 等. 丹参水提液对小鼠睾丸生精功能及精子 DNA 损伤的影响[J]. *广东医学*, 2017, 38(8): 1159–1163.
- [17] 谢春雨, 黄智勇, 高松城, 等. 补肾生精法联合维生素 E 软胶囊对少弱精子症患者精子氧化应激损伤的影响[J]. *中国民间疗法*, 2021, 29(4): 89–91.
- [18] 刘绍明, 郭军, 张岳阳, 等. 二仙补肾益精解毒方对弱精子症大鼠模型氧化应激损伤的保护机制研究[J]. *中医药学报*, 2017, 45(6): 32–36.
- [19] 刘绍明, 郭军, 张岳阳, 等. 二仙补肾益精解毒方改善无症状性弱精子症患者精子活力临床研究[J]. *中国性科学*, 2017, 26(12): 70–73.
- [20] ZHANG Z, ZHU L L, JIANG H S, et al. Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(1): 17–26.
- [21] PUNAB M, POOLAMETS O, PAJU P, et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(1): 18–31.
- [22] SMITS R M, MACKENZIE-PROCTOR R, YAZDANI A, et al. Antioxidants for male subfertility[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 3(3): CD007411.
- [23] NAKAMURA B N, LAWSON G, CHAN J Y, et al. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(9): 1368–1379.
- [24] CHEN K, MAI Z X, ZHOU Y L, et al. Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 228(3): 259–266.
- [25] ESAKKY P, HANSEN D A, DRURY A M, et al. Modulation of cell cycle progression in the spermatocyte cell line [GC-2spd (ts)Cell-Line]by cigarette smoke condensate(CSC)via arylhydrocarbon receptor-nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Ahr-Nrf2)pathway[J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(1): 9.