

# 杏苧氯化钠注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制

任弋<sup>1</sup>, 刘鄂湖<sup>2</sup>, 兰丽<sup>1</sup>, 宋洋洋<sup>1</sup>, 徐阳美<sup>1</sup>, 季晖<sup>1\*</sup>

(中国药科大学<sup>1</sup>药理学教研室,<sup>2</sup>天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 研究杏苧氯化钠注射液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响。将大鼠随机分为伪手术组、模型组、银杏内酯注射液组(3 mg/kg)、杏苧氯化钠注射液高(14 mg/kg)、低(7 mg/kg)剂量组,除伪手术组外其他大鼠均采用线栓法制备局灶性脑缺血再灌注损伤模型,尾静脉给药3 d,检测大鼠脑神经功能学损伤程度、脑组织含水量、脑梗死面积、脑组织病理形态学改变及脑组织生化学指标。结果表明,与模型组比较,杏苧氯化钠注射液在7和14 mg/kg的剂量下能明显改善脑缺血再灌注所致的大鼠神经功能损伤,降低脑含水量、减小脑梗死面积;此外14 mg/kg杏苧氯化钠注射液剂量组能显著改善脑病理组织学改变,降低脑组织中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和丙二醛(MDA)含量,提高微量还原型谷胱甘肽(GSH)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力、超氧化物歧化酶(SOD)活力及抵抗超氧阴离子自由基和羟自由基的能力。杏苧氯化钠注射液可提高脑组织抗氧化能力,明显改善大鼠脑缺血再灌注损伤。

**关键词** 杏苧氯化钠注射液;川芎嗪;脑缺血再灌注;中动脉缺血再灌注模型;抗氧化

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2015)06-0719-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150614

## Protective effects and possible mechanism of *Xingxiong* sodium chloride injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

REN Yi<sup>1</sup>, LIU Ehu<sup>2</sup>, LAN Li<sup>1</sup>, SONG Yangyang<sup>1</sup>, XU Yangmei<sup>1</sup>, JI Hui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** The purpose of this research was to study the effect of *Xingxiong* sodium chloride injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. Rats were divided into five groups, namely sham group, model group, ginkgolide injection group (3 mg/kg), *Xingxiong* sodium chloride injection high-dose group (14 mg/kg) and low dose group (7 mg/kg). Except for the sham group, animals in other groups were subjected to ischemia for 2h and reperfusion for 72 h by middle cerebral artery occlusion (MCAO) with thread technique, and then drugs were administered continuously by tail intravenous injection during reperfusion period for 3 days. The neurological deficit score and the histopathological score were evaluated; infarction ratio, brain water content and biochemical indexes of animals in each group were determined. Compared with model group, reduction of neurological deficit score, brain water content and infarction area were observed obviously at 7 mg/kg and 14 mg/kg of *Xingxiong* sodium chloride injection. Additionally, reduction of histopathological score, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA content, increase of the level of GSH, GSH-Px, SOD and also the capacity of inhibition of superoxide anion radical ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) and hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) were observed at 14 mg/kg. The results suggested that *Xingxiong* sodium chloride injection could effectively enhance the ability of anti-oxidation in the brain tissues, and protect brain from ischemia-reperfusion injury.

**Key words** *Xingxiong* sodium chloride injection; ligustrazine; cerebral ischemia-reperfusion; middle cerebral artery occlusion reperfusion model; antioxidation

脑血管病的发病率随着中国老龄化速度的加快而呈逐年上升趋势,属临床多发病<sup>[1-2]</sup>。脑缺血

再灌注损伤是一种由多种机制引起的复杂病理过程,氧自由基增多是其主要机制之一<sup>[3]</sup>。杏苧氯

化钠注射液是由银杏叶提取物和磷酸川芎嗪制成的复方制剂,有效成分包括银杏总黄酮、银杏总内酯、磷酸川芎嗪<sup>[4]</sup>。大量文献表明<sup>[5–7]</sup>,3种成分均具有改善微循环、保护脑缺血再灌注损伤的作用。本实验采用大鼠脑中动脉闭塞(MCAO)模型,观察脑缺血再灌注大鼠的神经行为学变化、脑组织病理形态学改变、测定脑梗死面积、脑含水量和各项生化指标,研究杏芎氯化钠注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及其抗氧化机制,为临床提供更多的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

杏芎氯化钠注射液[复方制剂,银杏叶提取物-磷酸川芎嗪(1:10),每瓶100 mL,每毫升含银杏叶提取物以总黄酮计40  $\mu$ g,磷酸川芎嗪0.4 mg,吉林长舜制药有限公司,批号:20140801];银杏内酯注射液(2 mL/支,含萜类内酯10 mg,成都百裕科技制药有限公司);MCAO 栓线(北京沙东生物科技有限公司);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,美国 Amresco 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究);微量还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢( $H_2O_2$ )、抗超氧阴离子自由基、羟自由基生化指标测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 仪器

SH-1000 全波长酶标仪(日本株式会社日立制作所);BT125D 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

### 1.3 动物

清洁级 SD 大鼠,雄性,体质量为250~280 g,由浙江省实验动物中心提供,合格证编号:SCXK(浙)2014-0001。动物在标准条件下适应性饲养后用于实验。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及给药

将动物随机分为模型组,银杏内酯注射液组(萜类内酯3 mg/kg),杏芎氯化钠注射液组(7、14 mg/kg)以及伪手术组。各组大鼠均于脑缺血再灌注后0 h经尾静脉注射给药,每天1次共3 d。

伪手术组和模型组动物均尾静脉注射等体积0.9%氯化钠注射液。

### 2.2 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的建立

手术采用水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉,大鼠脑缺血再灌注损伤模型采用 Zea Longa 改良栓线法<sup>[8]</sup>阻塞大脑中动脉(MCAO)制备。大鼠再灌注后0 h经尾静脉给药,连续给药3 d,于末次给药后2 h处死动物,进行各项指标检测。

### 2.3 神经功能缺损评分

在每次尾静脉注射给药2 h后,采用 Zea Longa 评分标准<sup>[9]</sup>进行大鼠神经功能学评分。0分,活动正常,无神经功能学损伤体征;1分,左侧前肢不能完全伸展;2分,向外侧画圈;3分,行动明显向偏瘫侧倾倒;4分,意识丧失,无自主活动。

### 2.4 脑梗死面积计算

大鼠处死后迅速取脑,冠状切片后迅速放入1% TTC 染色液中,经37  $^{\circ}$ C避光水浴10 min后再翻至另一面水浴10 min。经TTC染色后,正常脑组织呈玫红色,梗死组织呈白色。拍照后用 Image-Pro Plus 6 图像分析软件分析照片,计算公式:脑梗死面积百分比=白色区域面积/(玫红色区域面积+白色区域面积) $\times 100\%$ <sup>[10]</sup>。

### 2.5 脑含水量测定

大鼠处死后取脑,称脑湿重。后将其放至110  $^{\circ}$ C烘箱中24 h,称取脑干重。以公式计算脑含水量百分比<sup>[11]</sup>=(脑湿重-脑干重)/脑湿重 $\times 100\%$ 。

### 2.6 脑病理学检查方法

大鼠处死后取脑,经10%福尔马林保存固定。病理组织学检查内容包括观察白质水肿、白质空泡病变、出血、细胞性水肿、血管性水肿和海马区细胞核固缩情况,评分标准如下:轻微病变为0.5分,轻度为1分,中度为2分,重度为3分,极重度为4分,无明显病变为0分<sup>[12]</sup>,总分为各项累计。

### 2.7 脑组织生化指标测定方法

大鼠脑组织各项生化指标的测定实验方法均参照相应试剂盒说明书。

### 2.8 数据分析方法

各组实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,并采用软件 GraphPad Prism software 5.0 进行数据统计分析。使用单因素方差分析进行多组均数间的比较,符合方差齐性要求的数据采用 Tukey Test 进行多重比

较, 不满足方差齐性要求则采用 Dunnett's C 验证。

3 结 果

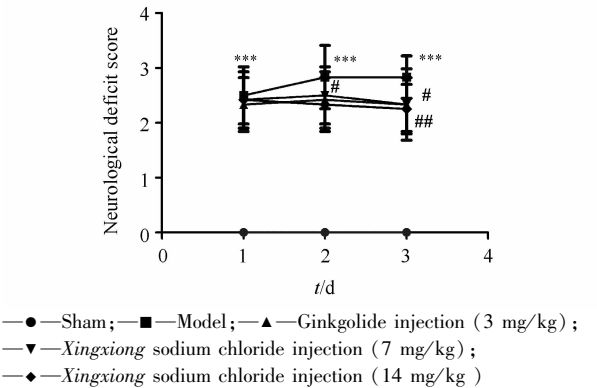
3.1 对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响  
在脑缺血再灌注后, 伪手术组大鼠未见神经功

能损害, 而模型组大鼠表现出严重的神经功能缺损症状( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 银杏内酯注射液组、杏苧氯化钠注射液低剂量组及高剂量组大鼠在连续给药至第 3 天时神经功能缺损症状有不同程度改善( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结果见表 1 和图 1。

**Table 1** Effects of *Xingxiong* sodium chloride injection on neurological deficit score in the rats subjected to cerebral ischemia and reperfusion ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

Group	Dose/( mg/kg)	Neurological deficit score		
		d 1	d 2	d 3
Sham	—	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Model	—	2.50 ± 0.52 ***	2.83 ± 0.58 ***	2.93 ± 0.39 ***
Ginkgolide injection	3	2.33 ± 0.49	2.42 ± 0.51	2.33 ± 0.65 #
<i>Xingxiong</i> sodium chloride injection	7	2.42 ± 0.51	2.50 ± 0.52	2.33 ± 0.49 #
	14	2.42 ± 0.51	2.33 ± 0.49 #	2.25 ± 0.45 ##

\*\*\*  $P < 0.001$  vs sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs model group

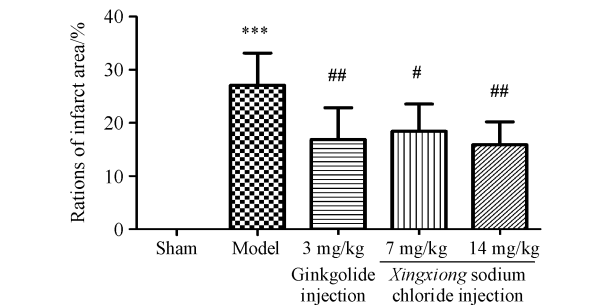


**Figure 1** Effects of 3 d on neurological deficit score in the rats subjected to cerebral ischemia and reperfusion ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

\*\*\*  $P < 0.001$  vs sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs model group

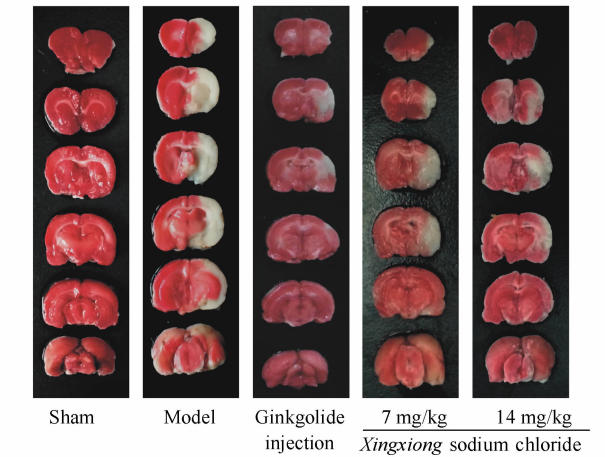
3.2 对缺血再灌注大鼠脑梗死面积的影响

将各组大鼠处死后取脑经 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色, 伪手术组未见有明显梗死区, 而模型组则出现显著的梗死区( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 杏苧氯化钠注射液高、低剂量组大鼠脑梗死面积均明显缩小( $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ )。结果见图 2 和图 3。



**Figure 2** Effect of *Xingxiong* sodium chloride injection on ratios of infarct area after cerebral ischemia-reperfusion in rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

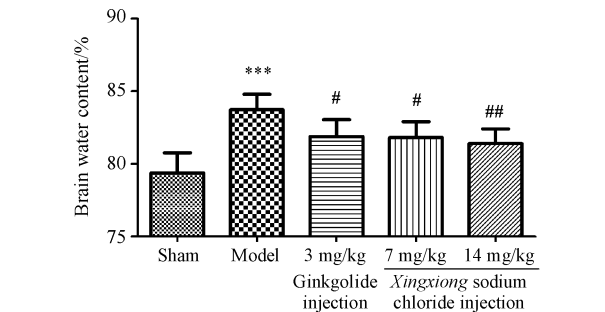
\*\*\*  $P < 0.001$  vs sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs model group



**Figure 3** TTC staining analysis of the infarcted brain regions

3.3 对缺血再灌注大鼠脑含水量的影响

脑缺血再灌注模型组大鼠脑含水量与伪手术组比较具有显著性差异( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 杏苧氯化钠注射液高、低剂量组明显减少了大鼠的脑含水量( $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ )。结果见图 4。

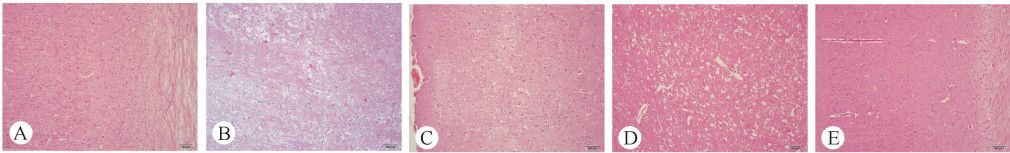


**Figure 4** Effect of *Xingxiong* sodium chloride injection on brain water content in the rats subjected to cerebral ischemia and reperfusion ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

\*\*\*  $P < 0.001$  vs sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs model group

3.4 对脑缺血再灌注大鼠脑组织形态学的影响

病理评分结果显示:与伪手术组相比,模型组大鼠脑组织病理学检查病变严重( $P<0.001$ ),表现主要为明显的白质水肿、细胞性水肿、血管性水肿。与模型组比较,杏芍氯化钠注射液高剂量能显著减轻由于缺血造成的脑组织损伤( $P<0.001$ ),杏芍氯化钠注射液低剂量也具有一定的改善作用,但无显著性差异。结果见表 2 和图 5。



**Figure 5** Effect of *Xingxiong* sodium chloride injection on neuronal injury in the ischemic cerebral cortex of rats (HE,  $\times 100$ )  
A: Sham; B: Model; C: Ginkgolide injection (3 mg/kg); D: *Xingxiong* sodium chloride injection (7 mg/kg); *Xingxiong* sodium chloride injection (14 mg/kg)

3.5 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 GSH 含量、GSH-Px 活力、MDA 含量、SOD 活力的影响

与伪手术组比较,大鼠经脑缺血再灌注损伤后脑组织中 GSH 含量、GSH-Px 活力、SOD 活力显著下降( $P<0.001$ ;  $P<0.001$ ;  $P<0.001$ ),MDA 含量显著增多( $P<0.001$ )。与模型组相比,杏芍氯化钠注射液高剂量组动物脑组织中 GSH 含量、GSH-Px 活力、SOD 活力显著升高( $P<0.01$ ;  $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ),MDA 含量显著降低( $P<0.01$ )。结果见表 3。

**Table 3** Effects of *Xingxiong* sodium chloride injection on brain level of glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), methane dicarboxylic aldehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Group	Dose/ (mg/kg)	GSH/ ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	GSH-Px/ (U/mg prot)	MDA/ (nmol/mg prot)	SOD/ (U/mg prot)
Sham	-	30.82 $\pm$ 2.53	36.30 $\pm$ 3.57	0.79 $\pm$ 0.16	119.36 $\pm$ 11.63
Model	-	22.41 $\pm$ 2.07***	23.32 $\pm$ 2.83***	1.24 $\pm$ 0.26***	85.75 $\pm$ 7.88***
Ginkgolide Injection	3	28.12 $\pm$ 3.33##	30.10 $\pm$ 2.54#	0.93 $\pm$ 0.11#	100.70 $\pm$ 7.61#
<i>Xingxiong</i> sodium chloride injection	7	26.61 $\pm$ 3.18#	30.00 $\pm$ 3.52#	1.00 $\pm$ 0.11	99.24 $\pm$ 9.07
	14	28.79 $\pm$ 2.61##	32.89 $\pm$ 7.56##	0.84 $\pm$ 0.16##	102.36 $\pm$ 12.29#

\*\*\*  $P<0.001$  vs sham group; #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$  vs model group

**Table 4** Effects of *Xingxiong* sodium chloride injection on reactive oxygen species (ROS) ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Group	Dose/ (mg/kg)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	Inhibition of $\cdot\text{O}_2^-$ / (U/g prot)	Inhibition of $\cdot\text{OH}$ / (U/mg prot)
Sham	-	6.07 $\pm$ 1.27	134.21 $\pm$ 17.64	82.96 $\pm$ 9.31
Model	-	13.17 $\pm$ 3.20***	107.01 $\pm$ 10.82*	68.86 $\pm$ 6.61*
Ginkgolide injection	3	9.45 $\pm$ 1.51#	143.18 $\pm$ 15.61##	85.89 $\pm$ 7.67##
<i>Xingxiong</i> sodium chloride injection	7	10.45 $\pm$ 1.16	138.62 $\pm$ 14.91#	84.05 $\pm$ 8.89#
	14	9.43 $\pm$ 1.91#	144.74 $\pm$ 27.08##	88.27 $\pm$ 8.26##

\*  $P<0.05$ , \*\*\*  $P<0.001$  vs sham group; #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$  vs model group

**Table 2** Effect of *Xingxiong* sodium chloride injection on histopathology scores in the rats subjected to cerebral ischemia and reperfusion ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Group	Dose/ (mg/kg)	Cerebral histopathology scores
Sham	-	1.17 $\pm$ 0.26
Model	-	5.50 $\pm$ 1.17***
Ginkgolide injection	3	2.08 $\pm$ 1.28###
<i>Xingxiong</i> sodium chloride injection	7	3.75 $\pm$ 0.83
	14	1.83 $\pm$ 1.44###

\*\*\*  $P<0.001$  vs sham group; ###  $P<0.001$  vs model group

3.6 对脑缺血再灌注大鼠脑组织中活性氧(ROS)的影响

与伪手术组比较,脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量明显增多( $P<0.001$ ),同时,抵抗超氧化阴离子自由基、抑制羟自由基的能力明显减弱( $P<0.05$ ;  $P<0.05$ )。与模型组比较,杏芍氯化钠注射液高剂量组大鼠脑组织中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量明显减少( $P<0.05$ ),抗超氧化阴离子自由基能力明显增强( $P<0.01$ )、抑制羟自由基能力明显增强( $P<0.01$ )。结果见表 4。

## 4 讨论

在本实验研究中,模型组大鼠在脑缺血再灌注损伤后期明显表现出身体倾倒等严重神经系统功能损伤表现,脑组织含水量显著增高,经 TTC 染色可见明显梗死区,脑组织病理检查发现白质水肿、细胞性水肿、血管性水肿等明显病理改变。而与模型组比较,给予杏芍氯化钠注射液能够改善脑缺血再灌注大鼠的神经功能和脑组织病理形态学变化,且能显著减少脑含水量和脑梗死面积。提示杏芍氯化钠注射液对大鼠的脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

脑缺血再灌注损伤是一种由多机制参与的复杂病理生理过程,其中氧自由基的大量产生会导致体内氧化-抗氧化系统失衡<sup>[13]</sup>,引起组织过氧化导致脑缺血再灌注不可逆损伤。体内的 SOD、GSH-Px、GSH 对氧化损伤都具有一定的保护作用<sup>[14-16]</sup>。而活性氧簇(ROS)对启动氧自由基连锁反应有关键作用<sup>[16]</sup>,脑缺血再灌注时 ROS 大量释放,对细胞产生毒性并会导致病情加重<sup>[18]</sup>。脑缺血再灌注损伤后,模型组大鼠脑组织中 SOD、GSH-Px 的活力和 GSH 的含量显著降低, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量显著增多,抵抗超氧阴离子自由基和羟自由基的能力明显下降,抗氧化能力明显减弱。而给予杏芍氯化钠注射液后可不同程度地提高脑组织中 SOD、GSH-Px 的活力和 GSH 的含量、降低脑组织中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量、提高抵抗超氧阴离子自由基和羟自由基的能力,提示杏芍氯化钠注射液能增强脑组织中清除氧自由基的能力并有效抑制氧化作用,对脑缺血再灌注损伤大鼠具有显著的抗氧化作用。

## 参考文献

- [1] Wang W, Liu MB, Sui H, *et al.* The trend of cardiovascular disease in China and strategy of prevention[J]. *Chin J Cardio Med* (中国心血管杂志), 2012, **17**(5): 321-323.
- [2] Xie G, Yang S, Chen A, *et al.* Electroacupuncture at *Quchi* and *Zusanli* treats cerebral ischemiareperfusion injury through activation of ERK signaling[J]. *Expther Med*, 2013, **5**(6): 1593-1597.
- [3] Olmez I, Ozyurt H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease[J]. *Neurochem Int*, 2012, **60**(2): 208-212.
- [4] Liu T. The curative effect analysis of maitorkin the treatment of acute cerebral infarction[J]. *Chin J Mod Drug Appl* (中国现代

- 药物应用), 2010(3): 138-139.
- [5] Baliutytė G, Baniene R, Gendvilienė V, *et al.* Influence of ethanol extract of *Ginkgo biloba* leaves on the isolated rat heart work and mitochondria functions[J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2012, **59**(5): 450-457.
- [6] Jiang WX, Wang BH. Progress on pharmacology of ginkgolides for ischemic cerebrovascular diseases[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2015, **42**(2): 441-444.
- [7] Jiang YR, Chen KJ. Progress on cardiovascular pharmacological effects and clinical application of Ligustrazine[J]. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2013, **33**(5): 707-711.
- [8] Zhang C, Wen Y, Fan X, *et al.* Therapeutic effects of different durations of acupuncture on rats with middle cerebral artery occlusion[J]. *NRR*, 2015, **10**(1): 159.
- [9] Tang W, Dong W, Xie P, *et al.* The effect of pre-condition cerebella fastigial nucleus electrical stimulation within and beyond the time window of thrombolytic on ischemic stroke in the rats[J]. *PLoS One*, 2015, **10**(5): e0128447.
- [10] Wang T, Li Y, Wang Y, *et al.* Lyciumbarbarum polysaccharide prevents focal cerebral ischemic injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e90780.
- [11] Wu J, Chen J, Guo H, *et al.* Effects of high-pressure oxygen therapy on brain tissue water content and AQP4 expression in rabbits with cerebral hemorrhage[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, **70**(3): 1579-1584.
- [12] Ren Y, Su M, Zheng J, *et al.* Protective effects of *Naomaili* granules on cerebral ischemia-reperfusion in rats and its mechanism[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46**(1): 100-104.
- [13] Kisaoglu A, Borekei B, Yapca OE, *et al.* Tissue damage and oxidant/antioxidant balance[J]. *Eurasian J Med*, 2013, **45**(1): 47.
- [14] Chen H, Yoshioka H, Kim GS, *et al.* Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection[J]. *Antioxid Redox Sign*, 2011, **14**(8): 1505-1517.
- [15] Yuan HJ, Zhu XH, Luo Q, *et al.* Noninvasive delayed limb ischemic preconditioning in rats increases antioxidant activities in cerebral tissue during severe ischemia-reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2012, **174**(1): 176-183.
- [16] Ahamed M, Akhtar MJ, Siddiqui MA, *et al.* Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells[J]. *Toxicology*, 2011, **283**(2): 101-108.
- [17] Jomova K, Valko M. Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease[J]. *Curr Pharm Design*, 2011, **17**(31): 3460-3473.
- [18] Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, *et al.* Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, **47**(1): 9-23.