

- motif (TRIM) proteins[J]. J Biol Chem, 2011, 286(32):27959-27970
- 6 James LC, Keeble AH, Khan Z, *et al.* Structural basis for Pryspry-mediated tripartite motif (TRIM) protein function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(15):6200-6205
- 7 Huang S, Kamihira M. Development of hybrid viral vectors for gene therapy[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(2):208-223
- 8 Mak AB, Moffat J. A versatile lentiviral expression system to identify mammalian protein-protein interactions[J]. Methods, 2012, 57(4):409-416
- 9 Ozato K, Shin DM, Chang TH, *et al.* TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(11):849-860
- 10 McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, *et al.* Tripartite-motif proteins and innate immune regulation[J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(1):46-56
- 11 Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding[J]. J Biol Chem, 2006, 281(13):8970-8980
- 12 Sardiello M, Cairo S, Fontanella B, *et al.* Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties[J]. BMC Evol Biol, 2008, 8:225. doi:10.1186/1471-2148-8-225
- 13 Meyer M, Gaudieri S, Rhodes DA, *et al.* Cluster of TRIM genes in the human MHC class I region sharing the B30.2 domain[J]. Tissue Anti, 2003, 61(1):63-71
- (收稿日期:2013-05-13)
(修回日期:2013-06-20)

DNA 损伤修复通路相关蛋白 ATM、pCHK2 在乳腺癌中的表达及临床意义

冯 丹 王 宁 贾朝阳 王雅杰

摘 要 **目的** 研究 ATM、pCHK2 蛋白在乳腺癌中的表达及与乳腺癌临床病理参数的相关性。**方法** 利用组织芯片技术,通过免疫组化方法检测 292 例乳腺癌组织及 49 例癌旁组织中 ATM、pCHK2 蛋白的表达情况。统计相应乳腺癌病例的临床病理学特征,并分析与 ATM、pCHK2 蛋白表达的相关性。**结果** ATM 蛋白在癌和癌旁组织中的阳性表达无统计学差异(74.62% vs 59.88%, $P=0.526$),与 ER 及 PR 表达呈正相关(ER: $r=0.194$, $P=0.002$; PR: $r=0.149$, $P=0.002$)。pCHK2 蛋白在癌组织中的阳性表达显著高于癌旁组织(20.06% vs 0, $P=0.005$),与肿瘤病理类型、大小、淋巴结转移数目、TNM 分期、ER、PR、Her-2 等临床病理特征相关性均无显著性差异($P>0.05$)。ATM 和 pCHK2 蛋白表达呈正向直线相关($r=0.130$, $P=0.049$)。pCHK2 阳性患者总生存率低。**结论** DNA 损伤修复通路相关蛋白 ATM 和 pCHK2 的表达在乳腺癌的发生发展中具有一定的作用,有可能作为乳腺癌潜在的治疗靶点。

关键词 乳腺癌 免疫组化 ATM 磷酸化 CHK2

Expression and Clinical Significance of ATM and pCHK2 in Patients with Breast Cancer. Feng Dan, Wang Ning, Jia Zhaoyang, Wang Yajie. Department of Oncology Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To investigate the expression of ATM and pCHK2 in breast cancer, and analyze the correlation between protein expression and its clinical significance. **Methods** Tissue microarrays of 292 breast cancer and 49 corresponding adjacent noncancerous tissues were used to test ATM and pCHK2 expression by immunohistochemical technique. The correlation between protein expressions and clinicopathological parameters was explored. **Results** There was no significant difference between cancer and adjacent noncancerous tissues in the expression of ATM protein(74.62% vs 59.88%, $P=0.526$). ATM expression was positively correlated with ER and PR expression(ER: $r=0.194$, $P=0.002$; PR: $r=0.149$, $P=0.002$). pCHK2 protein expression in cancer tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues(20.06% vs 0, $P=0.005$). There was no correlation between pCHK2 distribution and clinicopathological parameters. ATM and pCHK2 protein expression was positive linear correlation($r=0.130$, $P=0.049$). The survival rate of the patients

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072175;81102010);上海市科委基金资助项目(06DZ19505;114119a7500);上海市卫生局科研基金资助项目(2009113;2011198);上海市重点学科建设项目(B905)

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院肿瘤科

通讯作者:王雅杰,电子信箱:yajiewa0459@163.com

with pCHK2 – positive expression was lower than negative ones. **Conclusion** ATM and pCHK2,two important proteins of DNA damage repair pathway,may play an important role in the development of breast cancer,and may be considered as valuable targets for the therapy of breast cancer.

Key words Breast cancer;Immunohistochemistry;ATM;pCHK2

近 20 年来,我国城市妇女乳腺癌的发生率持续上升,且发病呈年轻化的趋势,中位发病年龄较西方发达国家提早了 10 ~ 15 年,为社会造成了沉重的医疗负担^[1]。继 BRCA1 之后,很多乳腺癌遗传易感基因被发现,如 BRCA2,细胞周期激酶 2 (CHEK2),毛细血管扩张性共济失调突变基因 (ATM) 和 p53 等。这些基因的突变已经证实可以增加乳腺癌的风险,都参与了 DNA 损伤修复通路的信号转导。该通路对维持基因组稳定,减少基因突变,降低肿瘤发生概率等发挥着不可或缺的作用。ATM 是 DNA 损伤后应激反应的中心。CHEK2 激酶是 DNA 双链断裂损伤中重要的信号转导蛋白。pCHK2 – T68 是 CHK2 蛋白最先出现的活化形式。ATM/CHK2 通路在 DNA 损伤修复通路中扮演重要的角色^[2]。因此本研究通过免疫组化方法对 ATM、pCHK2 蛋白在乳腺癌中的表达情况进行检测,对 ATM、pCHK2 蛋白表达与乳腺癌临床病理参数之间的关系做以探讨。

材料与方法

- 1. 基本情况:收集 1991 ~ 2011 年间,第二军医大学长海医院、上海交通大学医学院附属瑞金医院及上海市黄浦区中心医院经治的女性乳腺癌患者组织标本 292 例、部分相应癌旁标本 49 例,进行组织芯片制备。所有病例均经病理确诊,标本采集前未经过放化疗及免疫治疗。整理随访乳腺癌患者的病理资料和生存期。研究中采用 AJCC (Chicago, Illinois) 进行乳腺癌分期,采用 Nottingham 进行乳腺癌组织学分级。
- 2. 免疫组化检测:兔抗人 ATM 抗体购自 R&D 公司 (美国),磷酸化 CHK2 – T68 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司,免疫组化 SP 试剂盒及其他试剂均取自上海申能博彩公司。应用组织芯片制作仪制作石蜡方块并打孔制备组织芯

片。按试剂盒说明书推荐的步骤严格进行免疫组化操作,组织芯片脱蜡至水、抗原修复、SP 法免疫组化染色。用已知的乳腺癌阳性切片作为阳性对照,细胞阳性染色为淡黄色、棕黄色、棕褐色,以细胞核表达为阳性定位。用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

3. 结果判定标准:结果判读采用双盲法,由两位经验丰富的病理科医师各自判定结果,对结果不一致者再进行复核。采用二级计分法:高倍镜 (×100) 下取 5 个不同的视野观察,每视野平均 250 个细胞,计数阳性细胞百分比并计算平均值:≤5% 为 0 分,6% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分,>75% 为 4 分。染色强度以多数阳性细胞呈现的染色记分:不着色为阴性计 0 分,淡棕黄色为弱阳性 (+) 计 1 分,深棕黄色为强阳性 (+++) 计 3 分,阳性介于弱阳性和强阳性之间为 (++) 计 2 分。综合判定取两者分值之积:0 分为 (–),1 ~ 4 分为 (+),5 ~ 8 分为 (++),9 ~ 12 分为 (+++),0 ~ 4 分为阴性,5 ~ 12 分为阳性。

4. 统计学方法:数据应用 SPSS 17.0 软件进行检验,以双侧 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。根据资料的具体情况采用不同的统计方法。组间比较采用 Pearson χ^2 检验,两者相关性利用 Spearman 相关系数检验。蛋白表达与各项临床病理学指标的关系应用 Pearson χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。利用 Kaplan – Meier 法,估计不同组别的生存情况,并做时序检验 (log – rank test)。Cox 比例风险回归模型进行独立预后因素分析。

结 果

1. 一般资料分析:由于脱片未观察到免疫组化染色结果、病例信息缺项太多以及既往有其他部位肿瘤史的病例被排除。最终进入分析的病例分别为 ATM 组 264 例,pCHK2 组 269 例,ATM/pCHK2 联合检测组 257 例,一般情况分析见表 1。

表 1 各检测对象临床资料分析 (%)

分析对象	n	平均年龄 (岁)	临床分期 (I / II / III / IV)	病理诊断 (浸润性导管癌/ 非浸润性导管癌)	组织学分级 (1 级 / 2 级 / 3 级)
ATM	264	54.88 ± 11.12	20.8 / 56.3 / 22.4 / 0.4	82.3 / 17.7	0.4 / 72.5 / 27.1
pCHK2	269	54.59 ± 11.14	21.2 / 56.8 / 21.6 / 0.4	83.0 / 17.0	0.4 / 72.6 / 27.0
ATM / pCHK2	257	54.62 ± 11.08	20.9 / 56.5 / 22.2 / 0.4	83.4 / 16.6	0.4 / 72.4 / 27.2

2. 乳腺癌和癌旁组织中 ATM、pCHK2 的表达情况:ATM 免疫组化染色以细胞胞核内出现黄色颗粒者为阳性细胞 (图 1)。癌组织阳性表达率均值

74.62% (95% CI:71.56% ~ 77.68%),癌旁组织中,胞核阳性表达率均值 59.88% (95% CI:51.95% ~ 67.82%),经 Pearson χ^2 检验,ATM 蛋白表达在癌和

癌旁组织中的分布无显著差别 ($\chi^2 = 0.346, P = 0.556$)。成对癌和癌旁组织用于检测 ATM 表达的病例共有 35 例。经 *Spearman* 相关系数检验, ATM 蛋白在同一病例的癌和癌旁组织中表达阳性率没有相关性 ($r = 0.318, P = 0.063$)。

pCHK2 阳性染色为淡黄色、棕黄色、棕褐色, 定位于核 (图 1)。癌组织中, 胞核阳性表达率均值 20.06% (95% CI: 16.14% ~ 23.97%); 所有检测的癌旁组织中, 胞核阳性表达率为 0。经 *Pearson* χ^2 检验, pCHK2 在癌组织中的表达明显高于癌旁组织 ($\chi^2 = 7.865, P = 0.005$)。成对癌和癌旁组织用于检测 pCHK2 表达的病例共有 35 例。经 *Spearman* 相关系数检测, pCHK2 在同一病例的癌和癌旁组织中表达呈正相关 ($r = 0.354, P = 0.002$)。经 *Spearman* 相关系数检验, ATM 和 pCHK2 蛋白在癌组织中的表达呈正向直线相关 ($r = 0.130, P = 0.049$)。

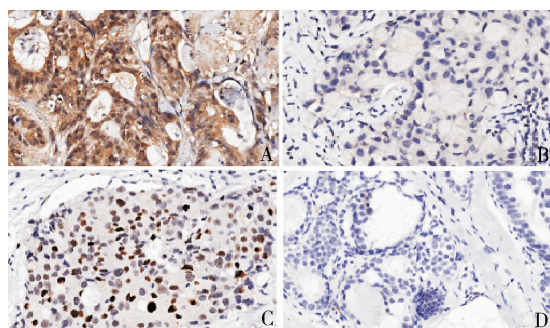


图 1 ATM 和 pCHK2 蛋白在乳腺癌组织中的表达 (SP, $\times 200$)

A. ATM 蛋白在癌组织表达 (+++); B. ATM 蛋白在癌组织表达 (-); C. pCHK2 蛋白在癌组织表达 (+++); D. pCHK2 蛋白在癌组织表达 (-)

3. ATM、pCHK2 的表达与乳腺癌临床病理特征的关系: ATM 及 pCHK2 的阳性表达分布在不同的肿瘤大小、淋巴结转移数目、临床分期、Her-2 状态、病理类型、组织学分级中均无明显差异。此外, pCHK2 的阳性表达分布在不同激素受体表达状态下亦没有统计学差异 (P 均 > 0.05)。ATM 阳性表达率在 PR (+++) 组中明显高于 PR (++) 组 (65.6% vs 35.9%, $P < 0.01$) 及 PR 阴性组 (65.6% vs 43.1%, $P < 0.01$)。ATM 阳性表达率在 ER (++) 组中明显高于 ER (+) 组 (58.0% vs 28.6%, $P < 0.0125$) 及 ER 阴性组 (58.0% vs 38.5%, $P < 0.01$)。ATM 表达与 PR 和 ER 表达均呈正相关 (PR: $r = 0.149, P = 0.018$; ER: $r = 0.194, P = 0.002$)。

4. ATM、pCHK2 的表达与乳腺癌患者总生存的关系: 为了检测 ATM 和 pCHK2 不同表达状态的患者总生存是否存在差异, 我们对有随访资料的患者进行分析。经检验 ATM 和 pCHK2 不同表达状态的患者之间年龄、临床分期、病理诊断、组织学分级等基本特征差异均无统计学意义 (表 3)。患者根据 NCCN 指南及 St. Gallen 乳腺癌专家共识危险程度分层接受相应的手术、辅助化疗、放疗、靶向治疗及内分泌治疗。复发转移者接受相应的姑息性治疗。

结果显示, ATM 阴性患者平均生存期 77.5 个月 (95% CI: 72.6 ~ 82.40), ATM 阳性患者平均生存期 72.56 个月 (95% CI: 71.23 ~ 80.27)。两组生存差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.246, P = 0.620$) (图 2A)。pCHK2 阴性患者平均生存期 79.83 个月 (95% CI: 76.57 ~ 83.10), pCHK2 阳性患者平均生存期 62.60 个月 (95% CI: 50.53 ~ 74.68)。pCHK2 阳性患者总生存率较低 ($\chi^2 = 8.109, P = 0.04$) (图 2B)。COX 比例风险回归模型进行预后独立因素分析, 发现 pCHK2 的表达并不是独立预后因素。

讨 论

早在 ATM 基因被克隆的同时, Swift 等就提出了 AT 患者家属患乳腺的风险大为增加。随后 Hopper 等^[3]发现, AT 携带者在正常人群中占 1%, 而乳腺癌患者中 AT 携带者的比例则达 5%。从理论上支持 ATM 可能与乳腺癌发生发展存在关系。但也有持不同结论的研究, 如 FitzGerald 等通过对 401 例乳腺癌初发患者研究发现 ATM 杂合子的频率并不高。还有研究认为, 30% ~ 50% 浸润性乳腺癌细胞中 ATM 蛋白表达水平是下降的。Kairouz 等^[4]发现 71% 转移乳腺癌的淋巴结中有明显的 ATM 蛋白表达的下降或缺乏。本研究发现 ATM 的表达分布在癌和癌旁组织无差别。可能存在的癌旁组织的正常小叶单元中也有 ATM 杂合性的缺失导致癌旁组织中 ATM 蛋白表达水平的下降, 所以降低了检验的效力。另外, 由于条件限制, 配对癌旁组织较少、未能纳入正常人群的乳腺组织, 如果能够进一步检测匹配的癌旁及正常乳腺组织, 则所得结论将更能够说明 ATM 在乳腺癌中表达状况的全貌。

ATM 与临床病理参数之间的关系检验中发现, ATM 蛋白表达与 ER 和 PR 表达均呈正相关。可能提示在激素受体表达阳性的乳腺癌患者中, 经由 ATM 的 DNA 损伤修复通路的相对完整性更高, 对 DNA 损伤可能具有更高的耐受性。可能潜在提示我

表 2 ATM、pCHK2 的表达与乳腺癌临床病理学特征的关系

临床病理特征		ATM		χ^2	<i>P</i>	pCHK2		χ^2	<i>P</i>
		(-)	(+)			(-)	(+)		
肿瘤直径 (cm)									
≤2		49	41			76	15		
2 ~ 5		74	69			121	28		
>5		10	15	1.639	0.441	17	5	0.513	0.756
淋巴结个数									
0		76	64			116	28		
1 ~ 3		30	24			46	9		
4 ~ 9		13	13			19	7		
≥10		10	14	1.564	0.668	21	2	2.803 *	0.424
分期									
I		31	20			44	8		
II		73	65			114	28		
III		25	30			44	10		
IV		0	1	3.611	0.307	1	0	0.900 *	0.848
病理									
浸润性导管癌		114	100			179	40		
非浸润性导管癌		21	25	0.880	0.348	37	8	0.006	0.938
组织学分级									
1		0	1			1	0		
2		101	84			157	30		
3		31	38	2.958	0.228	53	17	2.807 *	0.303
Her-2 表达									
0		37	42			63	19		
+		25	29			45	7		
++		33	21			51	8		
+++		40	33	3.571	0.312	57	14	3.111	0.375
ER 表达									
0		59	37			74	24		
+		0	0			0	0		
++		15	6			18	2		
+++		58	80	12.103	0.002	119	21	4.467	0.107
PR 表达									
0		82	62			118	29		
+		4	7			9	2		
++		25	14			34	4		
+++		21	40	12.314	0.006	50	12	1.788	0.618

* 为 Fisher 确切概率法

表 3 生存分析病例临床资料分析 (%)

分析对象		平均年龄 (岁)	临床分期 (I / II / III / IV)	病理诊断 (浸润性导管癌 / 非浸润性导管癌)	组织学分级 (1 级 / 2 级 / 3 级)
ATM	阳性	62.43 ± 10.60	24.2 / 66.7 / 9.1 / 0	79.4 / 20.6	2.9 / 50.0 / 47.1
	阴性	55.93 ± 12.42	25.0 / 61.4 / 13.6 / 0	87.0 / 13.0	0 / 71.7 / 28.3
	<i>P</i>	0.148 *	0.810 [△]	0.366 [△]	0.075 [☆]
pCHK2	阳性	61.15 ± 11.69	16.7 / 58.3 / 25.0 / 0	80.0 / 20.0	0 / 45.8 / 54.2
	阴性	57.47 ± 11.26	22.0 / 67.8 / 10.2 / 0	85.2 / 14.8	1.7 / 69.0 / 29.3
	<i>P</i>	0.390 *	0.268 [☆]	0.537 [☆]	0.070 [☆]

* *t* 检验; [△] Pearson χ^2 ; [☆] Fisher 精确概率法

们在激素受体阳性高表达的乳腺癌治疗策略中,如果能够特异性的封闭肿瘤细胞内的 ATM 功能,将可能会增加这类乳腺癌对放射治疗及拟辐射药物的敏感度。而 ATM 高表的乳腺癌,激素受体表达概率也更高,也可能是提示内分泌治疗的效果的一个潜在的指标。当然,上述推测需要进一步前瞻性对照研究的验证。

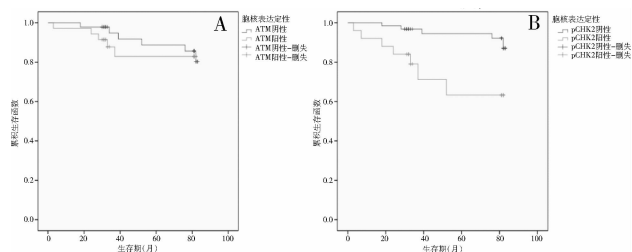


图2 ATM、pCHK2 的表达与乳腺癌患者的总生存

A. ATM 不同表达状态下患者的生存曲线; B. pCHK2 不同表达状态下患者的生存曲线

在 CHEK2 基因突变与乳腺癌临床病理特征与预后的研究中,尚存在争议。De Bock 及 Cybulski 等的研究结果都认为 CHEK2 基因突变的乳腺癌患者雌、孕激素受体阳性率高,雌激素阳性风险是无突变者的 4 倍。但 Kilpivaara 等研究则认为,CHEK2 基因突变与雌激素受体状态、病理类型以及淋巴结侵犯均无相关性^[5]。上述争议的存在反应出基因水平的研究并不能从根本上解决对生命本质的认识。基因最终转录翻译成为蛋白质,才能够行使相应的生命功能。最终能够影响蛋白活性或构象的基因突变才能称为有意义的突变。

作为 CHK2 的活化形式,pCHK2 - T68 是 CHK2 蛋白最先出现的活化形式。与检测 CHK2 总蛋白相比,更能够比较直观地反映 CHK2 的活性功能。因此我们对 pCHK2 进行了检测。既往有研究发现在浸润性乳腺癌、结肠癌以及肺癌组织中绝大多数都存在着 CHK2 - T68 位的磷酸化,而正常、增生以及炎性组织中则无 CHK2 - T68 位磷酸化^[6]。我们的检测结果也同样发现,pCHK2 蛋白在癌组织中的表达明显高于癌旁组织。这提示在乳腺癌中存在着 CHK2 活化现象,为乳腺中存在着 DNA 损伤修复通路激活这一推论提供了证据。Bartkova 等报道,在黏膜期(Ta)膀胱癌和 T₁ 期膀胱癌中 CHK2 - T68 磷酸化表达强,而 T₂₋₄ 期膀胱癌中的 CHK2 - T68 磷酸化表达弱,认为在肿瘤早期存在着更高比例的 CHK2 激活。这一现象在本研究中并没有被观测到,也可能提示在 CHK2 的激活贯穿于乳腺癌发展的整个过程之中^[7]。此外,我们还检测到 pCHK2 在同一病例的癌和癌旁组织中表达呈正相关。提示通过对癌旁组织的检测也可以间接反映出癌组织中 pCHK2 的表达趋势。

本研究发现 pCHK2 阳性患者总生存率低,可能的原因之一即为 CHK2 这一 DNA 损伤修复通路中重要节点的激活,从而导致了 DNA 毒性治疗的耐受。

这提示,干预 CHK2 的异常活化可能会改善这一类患者对放化疗的反应性,进而改善预后。此外,在 CD133⁺ 的神经胶质干细胞中的研究表明,pCHK2 高表达也有可能伴有高侵袭性乳腺癌细胞亚群的比例的增高,进而导致了不良预后^[8]。因此 CHK2 很有可能是乳腺癌患者治疗的一个新靶点。

ATM/CHK2 通路在 DNA 损伤修复通路中扮演重要的角色。在本研究中,我们发现了乳腺癌组织中 ATM 和 pCHK2 蛋白表达呈正向直线相关,从蛋白表达水平证实了在乳腺癌中 ATM 与 CHK2 的内在联系。由于细胞内信号转导通路的复杂性,本实验仅是一个初步的探索。首先,ATM 总蛋白的检测不能够完全反映 ATM 的活化状态,若同时检测磷酸化 ATM,其结果则更能够全面而完整的说明该通路的活化状态。其次,ATM 除 CHK2 之外的一些其他潜在转导通路,在乳腺癌发生发展不同阶段也起到一定的作用。另外,ATM 对 CHK2 的调节还受到 Mre11 - Rad50 - Nibrin (MRN) 复合物、NBS1、E2F1、53BP1、MDC1、MRK、RPA1 等调节因子状态的影响。因此,对于 DNA 损伤修复相关蛋白 ATM 和 pCHK2 在乳腺癌的发生发展中所起的作用仍需进一步深入探讨,为乳腺癌新的临床治疗策略提供理论基础。

参考文献

- Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, *et al.* Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling[J]. *Eur J Hum Genet*, 2009,17(6):722-731
- Groep P, Wall E, Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer[J]. *Cell Oncol*, 2011,34(2):71-88
- Goldgar DE, Healey S, Dowty JG, *et al.* Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2011,13(4):R73
- Kairouz R, Clarke RA, Marr PJ, *et al.* ATM protein synthesis patterns in sporadic breast cancer[J]. *Mol Pathol*, 1999,52(5):252-256
- Kilpivaara O, Bartkova J, Eerola H, *et al.* Correlation of CHEK2 protein expression and c.1100delC mutation status with tumor characteristics among unselected breast cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2005,113(4):575-580
- Zoppoli G, Solier S, Reinhold WC, *et al.* CHEK2 genomic and proteomic analyses reveal genetic inactivation or endogenous activation across the 60 cell lines of the US National Cancer Institute[J]. *Oncogene*, 2012,31(4):535-536
- Bartkova J, Guldberg P, Grønbaek K, *et al.* Aberrations of the Chk2 tumour suppressor in advanced urinary bladder cancer[J]. *Oncogene*, 2004,23(52):8545-8551
- Ropolo M, Daga A, Griffero F, *et al.* Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures[J]. *Mol Cancer Res*, 2009,7(3):383-392

(收稿日期:2013-07-03)

(修回日期:2013-07-28)