

## 五味子乙素对慢性酒精中毒大鼠海马组织 PSD-95 蛋白表达的影响

张丽凤,张玲童,易思,朱延红,黄芳妮,韦妙,朱塘冲,庞艳芳,黄俊杰

(右江民族医学院,广西 百色 533000)

**摘要:**目的 探讨五味子乙素(Schizandrin B,Sch B)对慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力的作用及对大鼠海马组织 PSD-95 蛋白表达的影响。**方法** 40 只成年 Wistar 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、Sch B 低剂量组、Sch B 中剂量组和 Sch B 高剂量组。除正常组给予蒸馏水灌胃,其余 4 组建立慢性酒精中毒动物模型,56°北京红星二锅头白酒连续灌胃 8 周;动物模型建立成功后,Sch B 低、中、高剂量组分别按 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg 给予 Sch B 灌胃,1 d 1 次,连续灌胃 30 d。应用 Morris 水迷宫检测各组大鼠的学习记忆能力;采用 Western Blot 免疫印迹法检测各组大鼠大脑海马组织中的突触后致密蛋白 95(postsynaptic density protein-95,PSD-95)蛋白的表达。**结果** Morris 水迷宫实验结果显示,与正常组比,模型组潜伏期明显变长,而平台穿越次数变少( $P < 0.05$ );与模型组比,Sch B 低、中剂量组潜伏期逐渐缩短,而平台穿越次数逐渐增多,高剂量组潜伏期明显缩短( $P < 0.05$ ),且平台穿越次数明显增多( $P < 0.05$ );Western Blot 印迹法实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠海马组织中的 PSD-95 蛋白表达减少( $P < 0.05$ );与模型组相比,Sch B 低、中、高剂量组海马组织中的 PSD-95 蛋白表达逐渐增高,中、高剂量组 PSD-95 蛋白表达水平明显增高( $P < 0.05$ )。**结论** 慢性酒精中毒可引起大鼠学习记忆能力障碍,Sch B 能明显改善慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力障碍,其可能通过调控大鼠大脑海马组织中 PSD-95 蛋白的表达水平实现。

**关键词:** Sch B;慢性酒精中毒;学习记忆能力障碍;改善;PSD-95 蛋白

**中图分类号:** R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2020)02-0142-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.02.002

### Effects of Schizandrin B on the expression of PSD-95 protein in hippocampus of rats with chronic alcoholism

Zhang Lifeng, Zhang Lingtong, Yi Si, Zhu Yanhong, Huang Fangni,  
Wei Miao, Zhu Tangchong, Pang Yanfang, Huang Junjie

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Gangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of Schizandrin B (Sch B) on learning and memory impairment in rats with chronic alcoholism and the effect on the expression of postsynaptic density protein-95 (PSD-95) protein in hippocampus tissues of rats. **Methods** Forty male adult Wistar rats were randomly divided into a normal group, a model group, a low-dose Sch B group, a medium-dose Sch B group and a high-dose Sch B group. In addition to the normal group which was given intragastrical gavage of distilled water, the other four groups were established into animal models with chronic alcoholism. The rats were continuously given intragastrical gavage of 56° Beijing Red Star Erguotou liquor for 8 weeks. After the animal models were developed successfully, the low-dose, medium-dose and high-dose Sch B groups were respectively given intragastric gavage of Sch B at doses of 10 mg/kg, 20 mg/kg and 40 mg/kg, once daily for 30 days. Morris water maze was used to detect the learning and memory ability of rats in every group. Western Blot was used to detect the expression of PSD-95 protein in the brain hippocampus tissues of rats in each group. **Results** Morris water maze test results showed that compared with the normal group, the model group had obviously lengthened latency but reduction of crossing platform times ( $P < 0.05$ ); and compared with the model group, the low- and

**基金项目:**广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA138113)

**第一作者简介:**张丽凤(1991-),女,助理实验师,在读硕士研究生,研究方向:神经系统病理生理,E-mail:570122844@qq.com

**通讯作者简介:**黄俊杰(1970-),男,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:神经系统病理生理,E-mail:1559199466@qq.com

medium-dose Sch B groups had gradually shortened latency but gradual increase of crossing platform times, and high-dose Sch B groups had obvious shortened latency ( $P < 0.05$ ), moreover, obvious increase of crossing platform times ( $P < 0.05$ ). Western Blot results showed that compared with normal group, the expression of PSD-95 protein in hippocampus tissues of rats in the model group was reduced ( $P < 0.05$ ); and compared with the model group, the expressions of PSD-95 protein in hippocampus tissues of rats in the low-dose, medium-dose and high-dose Sch B groups were gradually increased, and those in the medium-dose and high-dose Sch B groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Chronic alcoholism can cause learning and memory impairment in rats, and Sch B can significantly improve learning and memory impairment in rats with chronic alcoholism, which can be possibly achieved by regulating the expression level of PSD-95 protein in the brain hippocampus tissues of rats.

**Key words:** Schizandrin B; chronic alcoholism; learning and memory impairment; improvement; postsynaptic density protein-95

如今,随着经济社会的迅猛发展,人们生活水平在不断提高,生活方式慢慢改变,社交活动变得频繁,饮酒呈现一种社会趋势,尤其在一些民族地区更为突出。长期过量饮酒,酒精在体内大量堆积,可引起慢性酒精中毒。慢性酒精中毒起病隐匿,且病情表现多样,对脑损伤尤为严重,可导致记忆力减退、认知功能障碍等多种表现,因此,寻找有效解酒药物和改善慢性酒精中毒导致的学习记忆能力障碍的药物具有重要意义。五味子乙素(Schizandrin B, Sch B)是一类联苯环辛烯类木脂素,在中药北五味子中含量最高。目前, Sch B对大脑、神经元的保护作用及改善学习记忆方面的研究已取得了很大成就,但 Sch B对慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力障碍的影响作用方面的研究尚未见相关报道,本实验旨在探讨 Sch B对慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力障碍的影响作用及其相关机制,为开发改善学习记忆能力的辅助药物提供实验依据。

## 1 材料与方 法

1.1 动物、材料与试剂 实验所用的动物均为清洁级健康成年雄性 Wistar 大鼠,体重 180~200 g,由长沙天勤生物技术有限公司提供[许可证号:SCXK(湘)2014-0011],采取分笼饲养,饲料供给充足,自由饮水。Sch B 购于四川省维克奇生物科技有限公司,抗体突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95)、GAPDH,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购于 Proteintech 公司,蛋白提取试剂盒购于索莱宝科技有限公司,BCA 试剂盒、ECL 显色液购于碧云天生物制品有限公司。

1.2 实验动物分组及方法 40 只健康成年 Wistar 雄性大鼠随机分为 5 个组,每组 8 只大鼠,即为:正常组、模型组、Sch B 低剂量组、Sch B 中剂量组和 Sch B 高剂量组。除正常组每天给予蒸馏水灌胃外,其余四组建立慢性酒精中毒动物组,以 56°北京红星二锅头白酒灌胃:第一周以 8 ml/(kg·d)剂量灌胃,从第二

周起,每周增加 1 ml,直至增加到 10 ml/(kg·d)的剂量,1 周后增至 12 ml/(kg·d)的灌胃剂量,后按此剂量连续灌胃至第 8 周;动物模型建立成功后, Sch B 低、中、高剂量组分别按 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg 给予 Sch B 灌胃,1 d 1 次,连续灌胃给药 30 d 后进行 Morris 水迷宫实验。

1.3 Morris 水迷宫实验 动物模型建立完成后经过 5 d 的 Morris 水迷宫实验测试慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力, Morris 水迷宫实验包括两部分实验,定位航行实验和空间探索实验,定位航行实验检测空间记忆的获得和参照物记忆能力,过程为将动物先移入实验环境适应 1 周,实验第 1 d 将鼠放入水池中四个象限分别自由游泳 60 s 以适应环境,第 2 d 起将平台置于某一象限,进行获得性训练,每日训练 4 次即 4 个不同的象限各一次。实验时面向池壁将动物放入水中,每次实验间隔时间 10 s,共训练 4 d,动物找到平台后在平台上休息 10 s,后继续进行下一个象限训练,若规定时间内未找到平台,则由操作者将其引导上平台,在平台上休息相同时间,再进行下一次实验。4 d 的定位航行实验结束 24 h 后,撤除水下平台,选 1 个人水点将动物面向池壁放入水中,所有动物同一入水点,记录动物在 60 s 内第一次跨越平台时间即潜伏期、跨越平台次数等指标,电脑采集、描绘轨迹。

1.4 Western Blot 免疫印迹 Morris 水迷宫实验结束后,冰面上断头取出大鼠脑组织,迅速分离海马组织,取 100 mg 海马组织加入 1 ml 预冷裂解液,冰上匀浆,后置于冰盒中裂解 30 min,将裂解完全后的样品于冷冻离心机上 10 000~14 000 g 离心 3~5 min,取上清液,采用 BCA 法进行蛋白定量检测,配置上样体系并煮沸使蛋白变性,电泳,转膜,封闭,一抗 4℃ 孵育过夜,洗膜,二抗室温振荡孵育 1 h,显影定影,凝胶成像系统扫描灰度值,进行蛋白半定量分析。

1.5 统计学方法 实验数据采用 SPSS 22.0 进行统

计分析, Morris 水迷宫实验结果寻找平台潜伏期、平台穿越次数以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Sch B 对慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力的影响 Morris 水迷宫实验结果显示, 从定位航行实验轨迹采集图像看出, 与正常组相比, 模型组大鼠运动轨迹趋向性较差, 多呈边缘化运动, 偏离平台, 且在目标象限运动轨迹明显减少, 说明慢性酒精中毒导致学习记忆能力障碍, 与模型组比较, 各 Sch B 实验组运动轨迹较少趋向边缘化, 运动轨迹更多趋向于目标平台(见图 1)。定位航行实验结束 24 h 后, 进行空间探索实验, 结果显示, 与正常组比, 模型组潜伏期明显变长, 而平台穿越次数变少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比, Sch B 低、中剂量组潜伏期逐渐缩短, 而平台穿越次数逐渐增多, 高剂量组潜伏期明显缩短 ( $P < 0.05$ ), 且平台穿越次数明显增多 ( $P < 0.05$ ); 并且可从运动轨迹图看出正常组、Sch B 低剂量组、Sch B 中剂量组、Sch B 高剂量组游泳轨迹探索目标方向明确, 在目标象限探索时间及路程都较模型组明显(见表 1、图 2), 说明 Sch B 能明显增强慢性酒精中毒大鼠寻找目标平台的记忆保持能力。

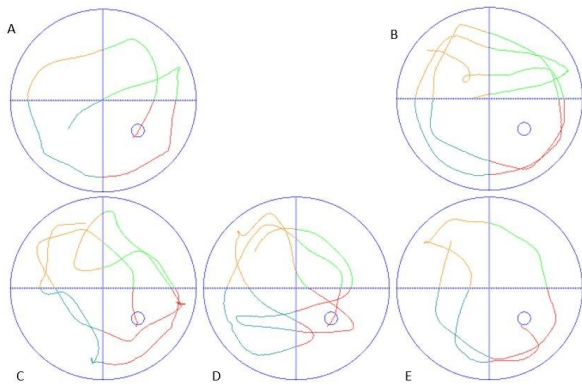


图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫定位航行实验游泳轨迹图  
注: A: 正常组; B: 模型组; C: Sch B 低剂量组; D: Sch B 中剂量组; E: Sch B 高剂量组

表 1 Morris 水迷宫空间探索实验潜伏期和平台穿越次数实验结果

组别	n	潜伏期/s	平台穿越次数/次
正常组	8	16.88±10.88	3.62±2.07
模型组	8	41.13±18.93 <sup>a</sup>	1.13±1.13 <sup>a</sup>
Sch B 低剂量组	8	36.75±19.78	1.63±1.19
Sch B 中剂量组	8	33.00±18.62	1.88±0.99
Sch B 高剂量组	8	21.88±19.32 <sup>b</sup>	2.75±1.71 <sup>b</sup>

注: ①与正常组比较, a:  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, b:  $P < 0.05$ ; ②表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示

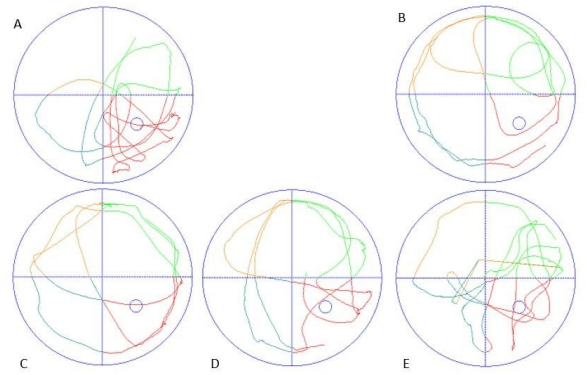
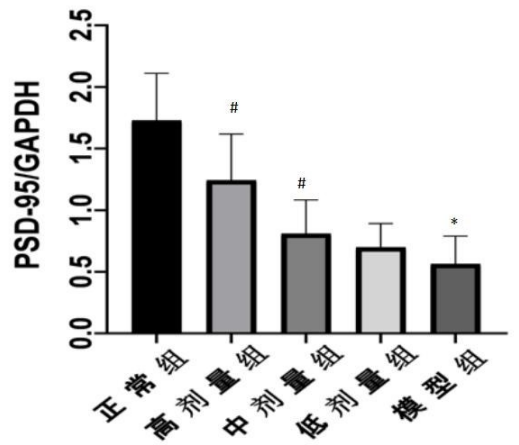
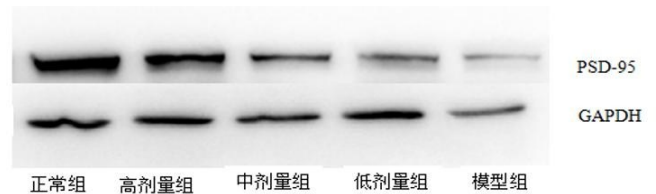


图 2 各组大鼠 Morris 水迷宫空间探索实验游泳轨迹图  
注: A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组

2.2 Sch B 对慢性酒精中毒大鼠海马组织 PSD-95 蛋白表达的影响 Western Blot 免疫印迹实验结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠海马组织中的 PSD-95 蛋白表达减少 ( $P < 0.05$ ); 给予 Sch B 药物治疗后, 与模型组相比, Sch B 低剂量组、Sch B 中剂量组、Sch B 高剂量组海马组织中的 PSD-95 蛋白表达逐渐增高, 中、高剂量组 PSD-95 蛋白表达水平增高明显, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。



PSD-95 蛋白在各组表达情况

图 3 Western Blot 法检测各组海马组织中 PSD-95 蛋白表达水平

注: A: Western blot 电泳图; B: PSD-95 蛋白相对表达量。与正常组比较, \* :  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, # :  $P < 0.05$

### 3 讨论

随着社会进步迅速发展,人们生活水平越来越好,同时社会的进步带来了许多挑战,使得人们压力越来越大,应酬成为一种常态,酒精的非正常消耗问题日益凸显,且慢性酒精中毒治疗者复饮率也在不断提高,造成一系列严重的社会问题,近年来,滥用酒精问题更加严峻<sup>[1-3]</sup>。酒精具有很好的水溶性,饮酒后会迅速被人体胃肠黏膜吸收,随血液循环到达人体的各组织、器官贮存,因此长期过量饮酒,酒精在体内大量堆积,可引起慢性酒精中毒。同时酒精具备亲脂性小分子特性,其特征驱使酒精能快速通过血脑屏障抵达大脑,作用于脑组织,与神经细胞膜有较高的亲和力,并通过作用于膜上的某些酶类和受体而影响细胞的功能,进而引起学习、记忆、认知、判断等一系列神经行为功能的改变<sup>[4-5]</sup>。本研究中,行为学实验结果显示,慢性酒精中毒模型组大鼠运动轨迹趋向性较差,多呈边缘化运动,偏离平台方向,且在平台所在目标象限运动轨迹明显减少,寻找平台潜伏期延长,跨越平台次数也明显减少,说明长期过量饮酒引起慢性酒精中毒将导致学习记忆能力障碍发生,与文献<sup>[6]</sup>报道一致,但酒精中毒引起学习记忆障碍具体发生机制还没有明确。

Sch B是一类联苯环辛烯类木脂素,在中药五味子中含量最高,且为木脂素中的单体化合物成分,Sch B具有改善认知功能的作用,主要包括兴奋中枢、改善学习和记忆功能<sup>[7]</sup>,有研究表明,Sch B能有效地抑制体外培养的神经元网络自发突触活动,进而调控神经元网络的兴奋性和网络神经元的同步性活动,抑制胞内同步钙振荡。且其能通过调控蛋白的表达而抑制阿尔茨海默症小鼠神经元线粒体凋亡,保护受损神经元,改善其学习记忆能力<sup>[8-9]</sup>。实验中,给予每天灌胃 Sch B 治疗后,大鼠运动轨迹较少趋向边缘化,运动轨迹更多趋向于目标平台,潜伏期缩短,跨平台次数增多,说明 Sch B 对慢性酒精中毒导致的学习记忆障碍有改善作用,但其改善作用尚机制未清楚。

海马区的主要功能是参与学习记忆,海马区神经元的损伤能引起学习记忆和认知判断障碍发生。神经系统可塑性改变最敏感的部位在于突触,其作用为在神经元之间传递信息和加工信息,人类行为表现记忆过程和记忆维持都与突触密切相关,记忆得以保持的根本取决于突触数量的稳定,但突触又不是恒定不变,其数量及结构可随体内外各种环境的改变而发生变化,突触可塑性影响着学习和记忆能力,突触丧失的结果可引起神经网络功能异常,从而导致信息传递障碍<sup>[10-11]</sup>。PSD-95 是突触后致密物质中兴奋突触后致密物质主要的蛋白质成分,PSD-95 通过其特有不同结构性质域与其它蛋白相互作用,在信号转导中起关键

作用,是神经信息传递的重要基础,PSD-95 蛋白的组织性质和它动态重组的能力是酒精诱导突触效能改变的主要特征<sup>[12-13]</sup>。PSD-95 是与突触传递紧密相关的主要蛋白之一,PSD-95 表达水平与突触可塑性及其生物学功能密切相关,其表达下降说明突触可塑性降低<sup>[14]</sup>。本研究发现,酒精中毒模型组大鼠出现学习记忆功能障碍,且其海马组织中 PSD-95 蛋白呈现低表达,说明 PSD-95 蛋白表达水平降低与慢性酒精中毒导致海马突触可塑性及学习记忆能力的损伤相关,与文献<sup>[15]</sup>报道一致。Sch B 低剂量组、中剂量组、高剂量组中,慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力障碍得到改善,大鼠海马组织中的 PSD-95 蛋白表达水平逐渐升高,说明 Sch B 可能通过调控海马区 PSD-95 蛋白表达水平改善慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力障碍。

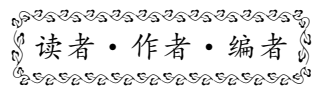
综上所述,PSD-95 是神经信息传递的重要基础,其表达下降说明突触可塑性降低,引起慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力障碍,Sch B 可能通过调控海马区 PSD-95 蛋白表达水平改善慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力,这可能是 Sch B 改善慢性酒精中毒大鼠认知能力障碍的机制之一,但其具体机制还需进一步研究和探讨。

#### 参考文献:

- [1] 向小军,王绪轶,汤宜朗,等.我国酒精相关危害的现状与策略[J].中国药物滥用防治杂志,2015,21(6):368-372.
- [2] 张娴,张应宏,杜平,等.维生素 E 联合行为治疗对慢性酒精中毒患者的效果[J].国际精神病学杂志,2017,44(5):864-866.
- [3] 康传依,胡建.慢性酒精中毒脑损伤的研究进展[J].医学综述,2017,23(24):4895-4899,4904.
- [4] 徐亚辉,王传升,苗琴,等.酒依赖患者血清同型半胱氨酸与认知功能的关系研究[J].中国现代医学杂志,2015,25(20):54-57.
- [5] Segobin SH, Chételat G, Le Berre AP, et al. Relationship between brain volumetric changes and interim drinking at six months in alcohol-dependent patients[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2014, 38(3): 739-748.
- [6] 秦浩志,姜洪波,代玄,等.氨基羟乙酸对慢性酒精中毒大鼠学习记忆的影响及可能的机制[J].中国应用生理学杂志,2018,34(6):485-489,582.
- [7] 王国丽,祝洪艳,郜玉钢,等.五味子木脂素对中枢神经系统作用的研究进展[J].上海中医药杂志,2014,48(11):99-101.
- [8] 付敏,孙朝晖,左焕琮,等.五味子乙素抑制海马神经网络自发同步钙振荡[J].西华大学学报(自然科学版),2009,28(2):60-62,73.
- [9] 李佳芮,聂文博,张佳悦,等.五味子乙素对阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力及神经细胞凋亡的影响[J].中国老年

- 学志, 2017, 37(14): 3390-3394.
- [10] Camp MC, Feyder M, Ihne J, et al. A novel role for PSD-95 in mediating ethanol intoxication, drinking and place preference[J]. Addict Biol, 2011, 16(3): 428-439.
- [11] 朱田田, 邢家铭, 严兴科. 针刺对单眼剥夺大鼠视皮层突触结构可塑性的调节机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2319-2322.
- [12] 向杜炼, 唐银杉, 邵淑君, 等. 电针治疗对 APP/PS1 小鼠海马区突触相关蛋白 SYP、PSD95 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5143-5146.
- [13] Li C, Zhou Y, Liu Z, et al. Spatiotemporal expression of postsynaptic density 95 in rat retina after optic nerve injury[J]. J Mol Neurosci, 2012, 46(3): 595-605.
- [14] 林江涛, 丁悦敏, 张雄. PSD-95 与老化相关学习记忆能力下降关系研究进展[J]. 生物学杂志, 2019, 36(2): 83-85, 89.
- [15] 尹美芳. 长期饮酒对大鼠空间学习和记忆的影响及突触损伤机制探讨[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.

收稿日期: 2020-02-26; 修回日期: 2020-03-17



## 本刊对论文中出现统计学分析的要求

1. 统计学符号书写格式 按照 GB/T 3358.1—2009《统计学词汇及符号》的有关规定, 一律采用斜体排印。常用: ①样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$  (中位数用  $M$ ); ②标准差用英文小写  $s$ ; ③标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ ; ④  $t$  检验用英文小写  $t$ ; ⑤  $F$  检验用英文大写  $F$ ; ⑥卡方检验用希腊文小写  $\chi^2$ ; ⑦相关系数用英文小写  $r$ ; ⑧自由度用希腊文小写  $df$ ; ⑨概率用英文大写  $P$  ( $P$  值前应给出具体检验值, 如  $t$  值、 $\chi^2$  值、 $q$  值等),  $P$  值应给出实际数值, 不宜用大于或小于表示, 而用等号表示, 小数点后保留 3 位数。
2. 研究采用的设计方法 应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计 (分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究), 实验设计 (应告知具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等), 临床试验设计 (应告知属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等); 主要做法应围绕 4 个基本原则 (重复、随机、对照、均衡) 概要说明, 尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 计量资料的描述方法 用  $\bar{x} \pm s$  表示近似服从正态分布的定量资料, 用  $M (q_{25} \sim q_{75})$  表示呈偏态分布的定量资料, 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要注意区分百分率与百分比。
4. 研究所选择的统计学方法 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料具备的条件和分析目的, 选用合适的统计学分析方法, 不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的, 选用合适的统计学分析方法, 不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析, 应在资料满足线性、独立、正态等方差基础上结合专业知识和散点图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用直线回归分析; 对具有重复实验数据检验回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计学结果的表述方法 当  $P < 0.05$  (或  $P < 0.01$ ) 时, 应说对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性 (或非常显著性) 差异; 应写明所用统计分析方法的具体名称 (如: 成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等), 统计量的具体值 (如  $t = 4.501$ ,  $r = 5.488$ ,  $F = 6.923$  等); 在用不等式表示  $P$  值的情况下, 一般情况下选用  $P > 0.05$  和  $P < 0.001$  两种表达方式即可满足需要。当涉及总体参数 (如总体均数、总体率等) 时, 在列出显著性检验结果的同时, 再列出 95%  $CI$ 。