

本文引文格式:张业森,尚毓淳,姜之全,等. VEGF对缺氧复氧小鼠海马神经元细胞线粒体凋亡的抑制作用[J]. 右江民族医学院学报, 2022, 44(2): 190-194.

【论著与临床报道】

## VEGF对缺氧复氧小鼠海马神经元细胞线粒体凋亡的抑制作用

张业森, 尚毓淳, 姜之全, 苏贺先, 赵永轩

(蚌埠医学院第一附属医院神经外科, 安徽 蚌埠 233004)

**摘要:**目的 研究血管内皮生长因子(VEGF)对缺氧复氧小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞凋亡与线粒体动力相关蛋白 1(Drp1)表达情况的影响。**方法** 取对数生长期的 HT22 细胞,随机分 3 组:正常对照组(Control)、缺氧复氧组(Model)、Model+VEGF 组(Model+VEGF)。除 Control 组外,其余各组细胞在缺氧缺糖处理 6 h 后,进行复氧复糖继续培养 18 h, Model+VEGF 组在缺氧复氧结束后加入 VEGF 164 处理 24 h。倒置显微镜观察各组细胞形态, Hoechst 33258 染色及流式细胞术检测细胞凋亡情况, Western Blot 检测细胞中 Drp1 的表达情况。**结果** Control 组细胞呈两级或者多级,胞体明显,细胞更为短小与饱满,细胞交织成片连接在一起; Model 组细胞皱缩,胞体变圆,细胞显微镜下观察细胞突触变长,细胞间连接减少; Model+VEGF 组细胞形态与 Model 组相比有所缓解;与 Control 组相比, Model 组细胞凋亡与 Drp1 蛋白表达量显著增加( $P < 0.05$ );与 Model 组相比, Model+VEGF 组细胞凋亡率与 Drp1 蛋白表达量明显下降( $P < 0.05$ )。**结论** VEGF 可能通过抑制细胞线粒体凋亡对缺氧复氧的 HT22 细胞起到保护作用。

**关键词:**血管内皮生长因子; HT22 细胞; 缺氧复氧; 线粒体动力相关蛋白 1

**中图分类号:** R651.1<sup>+</sup>5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2022)02-0190-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.010

### Inhibitory effect of VEGF on mitochondrial apoptosis in hippocampal neurons of mice with hypoxia-reoxygenation

Zhang Yesen, Shang Yuchun, Jiang Zhiquan, Su Hexian, Zhao Yongxuan

(Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the apoptosis of cell line HT22 and the expression of mitochondrial dynamic-related protein 1 (Drp1) in hippocampal neurons of mice with hypoxia-reoxygenation. **Methods** HT22 cells in the logarithmic growth phase were randomly divided into 3 groups: the control group (Control), hypoxia-reoxygenation group (Model), and Model + VEGF group. Except for the control group, cells in other groups were treated with deficiency of hypoxia and glucose for 6 h, and then co-cultured with hypoxia-reoxygenation for 18 h. The Model+VEGF group was treated with VEGF 164 for 24 h after co-culture with hypoxia-reoxygenation. The cell morphology of each group was observed under inverted microscope. Apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining and flow cytometry, and Drp1 expression by Western Blot. **Results** The control group had two or more levels of cells with obvious bodies which were short and full, interwoven into slices and joined together. Cells in the Model group shriveled, the cell body becoming round, with cell synapses becoming longer and intercellular connections decreasing under the cell microscope. Compared with that of the Model group, the cell morphology of the Model

**基金项目:**蚌埠医学院自然科学重点项目(BYKY2019093ZD)

**第一作者简介:**张业森(1987-),男,硕士,主治医师,研究方向:颅脑损伤及肿瘤, E-mail: zhangsysx@163.com

**通讯作者简介:**赵永轩(1979-),男,硕士,副主任医师,研究方向:颅脑损伤、肿瘤及功能神经外科, E-mail: naofukang@sohu.com

+ VEGF group alleviated. Compared with the control group, the Model group had significantly increased apoptosis rate and expression of Drp1 ( $P < 0.05$ ). Compared with the Model group, the Model+VEGF group had significantly decreased apoptosis rate and expression of Drp1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** VEGF may protect HT22 cells of hypoxia-reoxygenation by inhibiting mitochondrial apoptosis.

**Key words:** vascular endothelial growth factor; HT22 cell; hypoxia-reoxygenation; dynamic-related protein 1

急性颅脑损伤后脑挫裂伤周边会形成一个局部脑血流下降的缺血半暗带,这种局部缺血缺氧的脑组织面积是脑挫裂伤面积的数倍,脑内出血压迫血管活性物质异常增多,挫裂伤周边进行性细胞坏死是神经功能进行性恶化的主要原因<sup>[1]</sup>,并且脑缺血引起的脑外伤相关损伤很显著<sup>[2]</sup>。急性颅脑损伤治疗效果确不令人满意,其原因可能是没有深入探讨急性缺血缺氧损伤是如何影响细胞器功能及没有提出针对性细胞保护措施有关,因此深入细胞及细胞器层面探究并阐明急性缺血缺氧损伤的发生机制,对提出更为有效的防治措施有重要的临床意义,目前国内外很多研究聚焦缺血缺氧损伤的治疗方法<sup>[3-4]</sup>。本实验将体外缺氧复氧神经元细胞模拟颅脑损伤中缺血缺氧损伤的神经元细胞<sup>[5]</sup>,研究外源性血管内皮生长因子(VEGF)对缺氧复氧神经元细胞的保护作用,为颅脑损伤后缺氧复氧神经元的保护提供新的治疗方法。

## 1 材料与仪器

1.1 实验细胞 HT22 细胞系购于普诺赛生物有限公司。

1.2 实验试剂与仪器 DMEM 高糖培养基(KGM-12800S,凯基生物);DMEM 无糖基础培养基(2217-367,Gibco);VEGF 164 (50159-MNAB,Sino Biological);Hoechst 33342 染色液(C1026,Beyotime);Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit (AP101-100-kit, MULTI SCIENCES 联科生物);RIPA 细胞裂解液(C1053,北京普利莱基因技术有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(BCA Protein Assay Kit)(E-BC-K318-M,Elabscience);Mouse Monoclonal Anti-Actin(TA-09,中杉金桥,1/2000);辣根酶标记山羊抗鼠 IgG(H+L)(ZB-2305,中杉金桥,1/2000);Rabbit Anti Drp1(12957-1-ap,Proteintech,1/500);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(ZB-2301,中杉金桥,1/2000);三气培养箱(YCP-100S,长沙华曦电子科技有限公司);光学相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司);荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);DYY-7B 型稳压稳流电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);垂直电泳槽(美国伯乐公司);转移电泳槽(美国伯乐公司);转膜仪(美国 Hoefler 公司)。

1.3 HT22 细胞培养 HT22 细胞用含有 10%胎牛

血清与 1%青链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基并置于 CO<sub>2</sub> 培养箱(37 °C,5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度)中进行培养。

1.4 HT22 细胞缺氧复氧模型的建立 取对数生长期的 HT22 细胞,随机分成 3 组:正常对照组(Control)、缺氧复氧组(Model)、Model+VEGF 164 组(Model+VEGF)。除正常对照组外,其余各组细胞均进行氧糖剥夺 6 h 处理后,进行复氧复糖培养 18 h 处理,建立缺氧复氧细胞模型:弃去正常细胞培养基,PBS 润洗细胞后(2 次后),DMEM 无糖培养基加入培养皿,然后放入含 94%N<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>+1%O<sub>2</sub> 的 37 °C 三气培养箱中培养 6 h 后,将无糖 DMEM 培养基更换为正常培养基,放入 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 18 h;Model+VEGF 组细胞在复氧复糖 18 h 后,加入 VEGF 164(终浓度为 25 μg/L)继续培养 24 h 后,观察细胞形态变化并进行相应检测。

1.5 Hoechst 33258 染色 细胞固定 15 min 后,适当洗涤去除固定剂;Hoechst 33342 染色液覆盖样本;室温放置 5 min;PBS 充分洗涤。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 收集  $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$  个细胞,加 1 ml PBS 1 500 r/min 离心,3 min,洗两遍;用双蒸水将  $5 \times$  Binding Buffer 稀释为  $1 \times$  Binding Buffer;取 300 μl 预冷的  $1 \times$  Binding Buffer 重悬细胞;每管各加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI;轻微混匀后,室温避光孵育 10 min;再向每管中加入 200 μl 预冷的  $1 \times$  Binding Buffer。混匀后上流式仪检测。

1.7 Western blot 检测 将 3 组细胞分别加入裂解液,在冰上裂解 30 min 后,4 °C,离心机上离心 10 min (10 000 r/min),轻轻吸取上清液,即为提取的总蛋白。利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。首先蛋白变性,再上样,凝胶电泳 2 h,后湿法转膜 30 min。一抗溶液孵育,4 °C 冰箱过夜;二抗溶液在室温下摇晃孵育 1 h。将 ECL 曝光液滴加在膜上,通过凝胶成像系统曝光。用“Quantity one”软件分析各抗体条带灰度值。

1.8 统计学方法 实验数据通过 SPSS 20.0 软件进行统计分析。定量结果采用( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间定量数值比较采用独立样本  $t$  检验,多组间定量数值比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法。 $P <$

0.05 为差异具有统计学意义。

### 2 实验结果

2.1 倒置显微镜下观察缺氧复氧 HT22 细胞的形态变化 倒置显微镜下观察结果,如图 1 所示,Control 组细胞贴壁生长,细胞呈两级或多级,胞体明显,细胞

更为短小与饱满,细胞交织成片连接在一起;与 Control 组相比,Model 组细胞皱缩,胞体变圆,细胞显微镜下观察细胞突触变长,细胞间连接减少;与 Model 组相比,Model+VEGF 组细胞形态大部分与 Control 组细胞形态相近,细胞间连接有所增多。

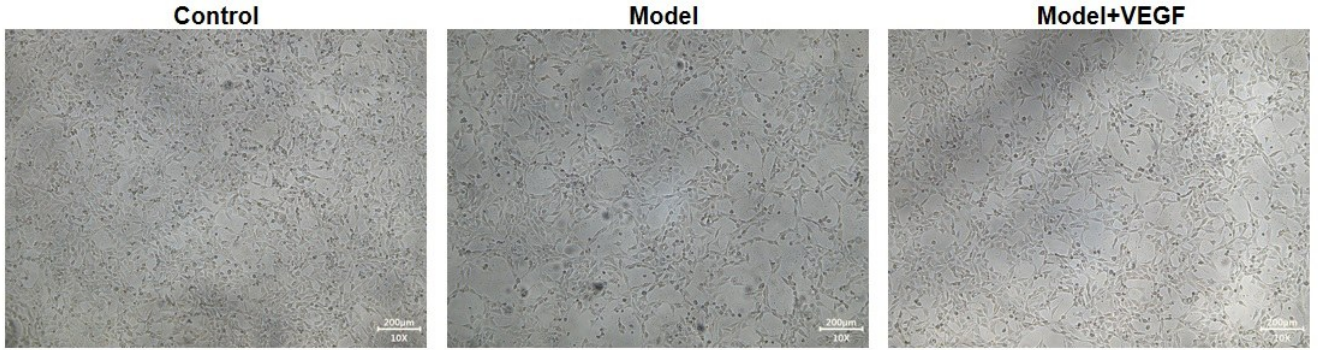
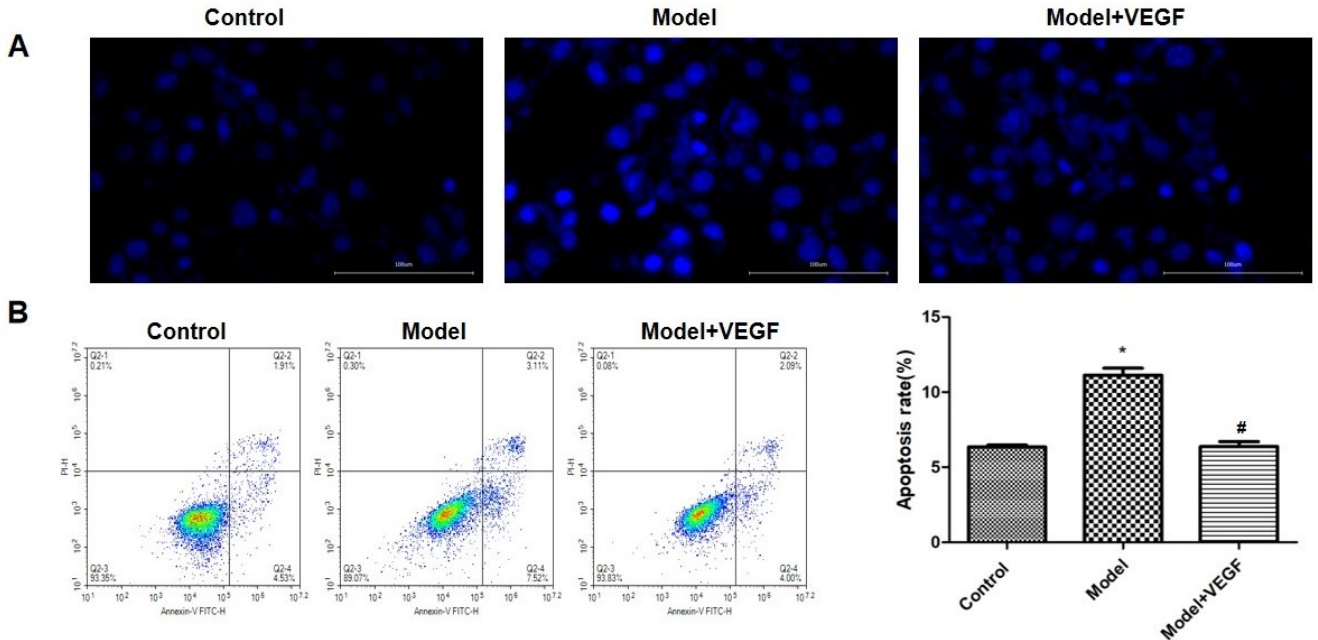


图 1 光学显微镜下各组细胞形态学观察(100×)

2.2 Hoechst 33258 染色结果与流式细胞术检测细胞凋亡结果 Hoechst 33258 染色观察不同组别的 HT22 细胞核形态变化。如图 2A 所示,Control 组大部分细胞的细胞核呈卵圆型,染色质均匀分布;Model 组细胞染色质碎裂、固缩,形态异常细胞核数目增多;

与 Model 组相比,Model+VEGF 组形态异常的细胞核数目有所减少。流式细胞术检测各组细胞凋亡情况,结果如图 2B 所示,与 Control 组相比,Model 组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.05$ );与 Model 组相比,Model+VEGF 组细胞凋亡显著降低( $P < 0.05$ )。



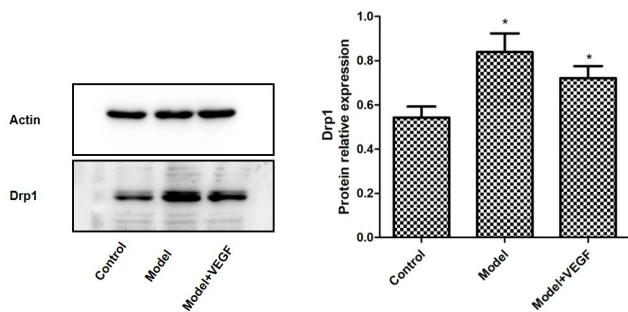
注:A:Hoechst 33258 染色结果;B:流式细胞术检测凋亡结果。

与 Control 组相比,\*  $P < 0.05$ ;与 Model 组相比,#  $P < 0.05$ 。

图 2 细胞凋亡情况

2.3 Western blot 检测结果 如图 3 所示,与 Control 组相比,Model 组与 Model+VEGF 组细胞中 Drp1 蛋白表达量显著增加( $P < 0.05$ );与 Model 组

相比,Model+VEGF 组细胞中 Drp1 蛋白表达量明显下降( $P < 0.05$ )。



注: \*  $P < 0.05$ 。

图 3 Western blot 检测各组细胞中 Drp1 蛋白表达量

### 3 讨论

VEGF 在中枢神经系统中以改善血管通透性、促进血管生成发挥生物学作用, VEGF 广泛存在于脑内血管内皮上, 调节脑循环和血脑屏障, 在中枢神经系统内作为细胞保护因子, 对脑缺血及脑缺氧损伤起保护作用, 预防及治疗脑血管疾病、神经变性。在大鼠脑缺血-再灌注区注入 VEGF 重组质粒, 神经元损伤及水肿明显减轻, 表明 VEGF 对脑缺血损伤可能起到重要的保护作用<sup>[6]</sup>。

本研究中外源性 VEGF 加入缺氧复氧神经元细胞后细胞核 Hoechst 33258 染色提示缺氧复氧的神经元细胞核破裂减少, 且流式检测细胞的凋亡率有明显的降低, 说明外源性 VEGF 对神经元细胞具有抗凋亡作用。并且发现神经元细胞在缺氧复氧后 Drp1 有明显增加, 但是加入 VEGF 后缺氧复氧神经元细胞中 Drp1 明显降低。Drp1 是一种维持细胞器结构很重要的保守蛋白, 是线粒体动力学的重要调节因子, Drp1 存在于细胞质中, 被招募到线粒体膜外部介导分裂<sup>[7]</sup>。该蛋白的突变被报道与神经退行性变、癌症和心血管疾病的发生有关<sup>[8]</sup>, 而且选择性抑制 Drp1 聚集导致其能伸长细胞线粒体与抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。

研究显示线粒体的凋亡首先就是从 Drp1 介导的线粒体分裂开始的<sup>[10]</sup>, 线粒体是一种真核细胞必需的细胞器, 除了提供能量外, 还在各种细胞过程中发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。线粒体是缺血缺氧损伤的主要靶点, 而随着缺血持续时间的延长, 线粒体损伤会加重, 这反过来又会损害细胞能量代谢<sup>[11-12]</sup>。Drp1 介导的线粒体凋亡机制是 Drp1 可以促进 Bax 向线粒体聚集、细胞色素 C 释放和 Caspase 激活, Drp1 也可以直接与 BAX 相互作用, 诱导 Bax 向线粒体移位导致凋亡<sup>[13]</sup>; Drp1 表达上调后抑制谷胱甘肽清除自由基的能力导致 ROS 水平的上调诱导凋亡<sup>[14]</sup>; 也有可能上述反应的综合作用结果。另有研究表明谷氨酸可通过 Drp1/Bax/Cyto-C/ Caspase-3 信号级联反应诱导细胞凋亡, 增加线粒体膜通透性、细胞色素 C 释放和 Caspase-3 的激活, 并且发现 Bax 和 Drp1 在线粒体中共定位并诱导细

胞线粒体凋亡<sup>[15]</sup>。

最新研究显示缺血可通过 Drp1 介导的线粒体裂变引起血管功能障碍<sup>[16]</sup>, 且 Drp1 在创伤性损伤中诱导缺血细胞功能障碍<sup>[17]</sup>。体外脑缺血再灌注损伤过程中神经元细胞的线粒体分裂增加, 反之抑制线粒体分裂、抑制线粒体的片段化, 可以减轻神经元的凋亡<sup>[18]</sup>。本实验中加入外源性 VEGF 后缺氧复氧神经元细胞中 Drp1 蛋白减少, 说明外源性 VEGF 对神经元细胞的保护作用可能通过抑制 Drp1 介导的线粒体凋亡途径来抑制神经元细胞凋亡, 该机制与右美托咪定对大鼠神经元的缺氧复氧保护作用机制类似<sup>[19]</sup>, 而且有科学家证实在大鼠活体脑缺血模型中射适量的 VEGF 可改善大鼠脑缺血模型中梗死面积, 抑制神经细胞凋亡<sup>[20]</sup>。当然缺血性脑损伤是多种生物功能和通路引起的<sup>[21]</sup>, VEGF 也可能是通过多种通路联合抑制神经元细胞的凋亡。

总之, 缺氧复氧神经元细胞在加入外源性 VEGF 后细胞凋亡减少, 可能机制是抑制 Drp1 介导的线粒体凋亡, 为颅脑缺血再灌注损伤治疗提供又一理论支持。

### 参考文献:

- [1] Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, et al. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke [J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(7): 1167-1186.
- [2] J Hawryluk GW, Rubiano Am, Totten AM, et al. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury: 2020 update of the decompressive craniectomy recommendations [J]. *Neurosurgery*, 2020, 87(3): 427-434.
- [3] 贾壮壮, 何前松, 赵磊, 等. 丹参多酚酸对糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(20): 3237-3241.
- [4] Xu DD, Kong TT, Cheng BH, et al. Orexin-A alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(4): 266.
- [5] 闫向丽, 王利胜, 王圣鑫. HT22 海马神经元细胞氧糖剥夺再灌注模型的建立 [J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(1): 155-159.
- [6] 黄扬, 宋芷珩. 大鼠侧脑室注射 VEGF 重组质粒预防脑缺血再灌注损伤及其对 PI3K/AKT 通路的影响 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2014, 11(5): 265-269.
- [7] Michalska BM, Kwapiszewska K, Szczepanowska J, et al. Insight into the fission mechanism by quantitative characterization of Drp1 protein distribution in the living cell [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8122.
- [8] Banerjee R, Mukerjee A, Nagotu S. Mitochondrial dynamics and its impact on human health and diseases; inside the DRP1 blackbox [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2021, 100(1): 1-21.
- [9] Ruiz A, Alberdi E, Matute C. Mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1) protects neurons against excitotoxicity

- through the modulation of mitochondrial function and intracellular  $Ca^{2+}$  signaling. [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11:3.
- [10] Dadsena S, King LE, García-sáez AJ. Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level [J]. *Biochim Biophys Acta Biomemb*, 2021, 1863(12):183716.
- [11] Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS [J]. *Nature*, 2014, 515 (7527): 431-435.
- [12] Jawhar A, Ponelies N, Schild L. Effect of limited ischemia time on the amount and function of mitochondria within human skeletal muscle cells [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2016, 42(6):767-773.
- [13] Yen JH, Huang HS, Chuang CJ, et al. Activation of dynamin-related protein 1-dependent mitochondria fragmentation and suppression of osteosarcoma by cryptotanshinone [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):42.
- [14] Duan CY, Kuang L, Xiang XM, et al. Drp1 regulates mitochondrial dysfunction and dysregulated metabolism in ischemic injury via Clec16a-, BAX-, and GSH- pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4):251.
- [15] Zhou K, Yang HY, Tang RY, et al. Mitochondrial division inhibitor 1 protects cortical neurons from excitotoxicity: a mechanistic pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(9):1552-1560.
- [16] Tian L, Neuber-Hess M, Mewburn J, et al. Ischemia-induced Drp1 and Fis1-mediated mitochondrial fission and right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension [J]. *J Mol Med(Berl)*, 2017, 95(4):381-393.
- [17] Wu Q, Luo CL, Tao LY. Dynamin-related protein 1 (Drp1) mediating mitophagy contributes to the pathophysiology of nervous system diseases and brain injury [J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32(6):551-559.
- [18] Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, et al. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPase in neurons [J]. *EMBO J*, 2006, 25 (16): 3900-3911.
- [19] Liu J, Du Q, Zhu H, et al. Dexmedetomidine reduces hypoxia/reoxygenation injury by regulating mitochondrial fission in rat hippocampal neurons [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2017, 10: 6861-6868.
- [20] Yang JP, Guo L, Liu RC, et al. Neuroprotective effects of VEGF administration after focal cerebral ischemia/reperfusion: dose response and time window [J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(6):592-596.
- [21] 黄清, 梁萍, 欧阳扬, 等. 神经血管单元多靶点抗缺血性脑卒中的相关靶标及通路研究 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(2):167-174.

收稿日期:2021-12-01;修回日期:2021-12-30

(上接第 183 页)

- [8] Varakantham V, Kurakula Sailoo AK, Nagalla B, et al. mRNA expression profile in peripheral blood mononuclear cells based on ADRB1 Ser49Gly and Arg389Gly polymorphisms in essential hypertension - a case-control pilot investigation in South Indian population [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(8):1230-1237.
- [9] Sun XJ, Zhou ML, Wen GY, et al. Paroxetine attenuates cardiac hypertrophy via blocking GRK2 and ADRB1 interaction in hypertension [J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10 (1):e016364.
- [10] Oliveira-Paula GH, Pereira SC, Tanus-Santos JE, et al. Pharmacogenomics and Hypertension: Current Insights [J]. *Pharmacogenomics Pers Med*, 2019, 12:341-359.
- [11] Snyder EM, Kelley EF, Sprissler R, et al. The importance and challenges of developing a pharmacogenetics test for hypertension [J]. *Pharmacogenomics*, 2019, 20 (8):563-566.
- [12] Rysz J, Franczyk B, Rysz-Górzyńska M, et al. Pharmacogenomics of hypertension treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13):4709.
- [13] Huang Y, Liu XL, Wen J, et al. Downregulation of the beta1 adrenergic receptor in the myocardium results in insensitivity to metoprolol and reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(2):703-711.
- [14] Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, et al. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, 74(1):44-52.
- [15] 窦晓涛. CYP2D6 及 ADRB1 基因多态性对美托洛尔代谢及疗效影响的 Meta 分析 [D]. 泸州:西南医科大学, 2020:1-68.
- [16] Kang S, Hong X, Ruan CW, et al. Effects of GRK5 and ADRB1 polymorphisms influence on systolic heart failure [J]. *J Transl Med*, 2015, 13:44.
- [17] Guerra LA, Lteif C, Arwood MJ, et al. Genetic polymorphisms in ADRB2 and ADRB1 are associated with differential survival in heart failure patients taking  $\beta$ -blockers [J]. *Pharmacogenomics J*, 2021, 22(1):62-68.
- [18] Pathak A, Mrabeti S.  $\beta$ -Blockade for patients with hypertension, ischemic heart disease or heart failure: where are we now? [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2021, 17: 337-348.
- [19] 姚超. Wnt/ $\beta$ -catenin 通路对 H9c2 心肌细胞缺血再灌注损伤作用的研究 [D]. 合肥:安徽医科大学, 2020:1-47.
- [20] 唐刚. Klotho 蛋白抑制异丙肾上腺素诱导的 H9C2 心肌细胞肥大的机制研究 [D]. 重庆:陆军军医大学, 2018:1-117.

收稿日期:2021-12-17;修回日期:2021-12-26