

- irreversible cytochrome P450 inhibition: current status on methodologies and their utility for predicting drug-drug interactions [J]. AAPS J, 2008, 10(2): 410-424.
- [7] AI C H, SUN H X, LI H, et al. In vitro inhibition of cytochrome P450 activities by active constituents of Chinese herbal drugs [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2011, 27(4): 519-523.
- [8] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2008: 337-339.
- [9] Food and Drug Administration. Drug interaction studies-study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations [S]. Draft Guidance for Industry, 2012: 41-44
- [10] HE F, BI H, XIE Z, et al. Rapid determination of six metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry: application to high-throughput inhibition screening of terpenoids [J]. Rapid Commun Mass SP, 2007, 21(5): 635-643.
- [11] TRIGGLE D J, TAYLOR J B. Comprehensive Medicinal Chemistry [M]. 2th ed. Elsevier Science Ltd, 2007: 246.
- [12] WRIGHTON S A, VANDENBRANDEN M, RING B J. The human drug metabolizing cytochromes P450 [J]. J Pharmacokinet Biop, 1996, 24(5): 461-473.
- [13] PEI L, LIU S, ZHENG J, et al. A sensitive method for determination of furanodiene in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2012, 26(7): 826-832.
- [14] XU C, LUO M Y, JIANG H D, et al. Involvement of CAR and PXR in the transcriptional regulation of CYP2B6 gene expression by ingredients from herbal medicines [J/OL]. Xenobiotica, 2015, 45(9): 773-781.
- 收稿日期: 2015-08-04

## 黄连素对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用

姚必瑜, 黄智铭\* (温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325401)

**摘要:** 目的 探讨黄连素对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制。方法 30 只 C57 小鼠, ♂, 随机分为对照组、 $\text{CCl}_4$  组和黄连素组, 每组 10 只。黄连素组在  $\text{CCl}_4$  注射前 1 h 腹腔注射黄连素( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),  $\text{CCl}_4$  组和黄连素组腹腔注射  $\text{CCl}_4$  橄榄油溶液( $0.5\%$ ,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 对照组腹腔注射橄榄油溶液( $0.5\%$ ,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。24 h 后麻醉下处死小鼠, 收集血清和肝脏标本, 采用生化检测 ALT 和 AST, HE 染色后观察肝脏病理学形态, Western blot 检测 JAK2 和 STAT3, p-JAK2 和 p-STAT3。RT-PCR 和 ELISA 检测炎症因子白介素-6(IL-6)和白介素 8(IL-8)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达和分泌。结果 与对照组相比,  $\text{CCl}_4$  组病理改变明显增加, p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达量明显增加, JAK2 和 STAT3 表达无明显变化, IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  表达和分泌明显增加。与  $\text{CCl}_4$  组相比, 黄连素组病理改变明显减轻, p-JAK2、p-STAT3 表达明显减少, IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  表达和分泌也明显减少, 但 JAK2 和 STAT3 表达仍无明显变化。结论 黄连素预处理可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活而减少炎症反应, 从而减轻  $\text{CCl}_4$  诱导的急性肝损伤。

**关键词:** 黄连素; 四氯化碳; 急性肝损伤; 炎症; JAK2/STAT3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)04-0424-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.04.009

### Berberine Protect Mice Against $\text{CCl}_4$ -induced Acute Liver Injury

YAO Biyu, HUANG Zhiming\* (*The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325401, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate potential protection and mechanism of berberine in  $\text{CCl}_4$ -induced acute liver injury. **METHODS** 30 male C57 mice were randomly divided into three groups: control group,  $\text{CCl}_4$  group and berberine group. The mice in berberine group were injected berberine( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip) before 1 h of  $\text{CCl}_4$  injection. Moreover, the mice in berberine group and  $\text{CCl}_4$  group received  $\text{CCl}_4$  olive oil injection( $0.5\%$ ,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip), and the control group injected with olive oil( $0.5\%$ ,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip). These mice were sacrificed after 24 h  $\text{CCl}_4$  olive oil injection under anesthesia. Blood samples and liver tissue were collected. The liver dysfunction were evaluated by examining ALT and AST. The pathology of liver tissues was observed according to HE staining. And the protein level of JAK2, STAT3, p-JAK2 and p-STAT3 were measured by Western blotting. Moreover, the expression of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  were evaluated by RT-PCR and ELISA. **RESULTS** Compared with the

作者简介: 姚必瑜, 男, 硕士生, 主治医师 Tel: 13958662051  
任医师, 硕士 Tel: 13706658620 E-mail: 13706658620@126.com

E-mail: 1042157787@qq.com \*通信作者: 黄智铭, 男, 硕士, 主

control group, the liver dysfunction, the pathology change of liver tissue, the protein expression level of p-JAK2 and p-STAT3, and the expression of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in CCl<sub>4</sub> group were significantly increased. While the protein expression level of JAK2 and STAT3 had no difference. Compared with the CCl<sub>4</sub> group, the liver dysfunction, the pathology change of liver tissue, the protein expression level of p-JAK2 and p-STAT3 and the expression of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in berberine group were significantly decreased, but the protein expression level of JAK2 and STAT3 still had no difference. **CONCLUSION** Berberin pretreatment protect mice against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury by suppressing inflammation though reducing the activation of JAK2/STAT3 signal pathway.

**KEY WORDS:** berberine; CCl<sub>4</sub>; acute liver injury; inflammation; JAK2/STAT3

黄连素(berberine, BBr)又名小檗碱,是从毛茛科黄连属植物黄连的根状茎中提取的主要有效成分<sup>[1]</sup>。因其具有治疗腹泻的作用,作为非处方药被广泛用于临床<sup>[1]</sup>。最近药理学研究发现,黄连素还具有抗氧化,抗炎,抗凋亡,抗肿瘤的活性<sup>[1-2]</sup>。炎症是中毒性肝损伤的重要发病机制之一<sup>[3]</sup>。本实验中利用四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)在大鼠诱导急性肝损伤模型,研究黄连素对急性肝损伤的作用,并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

黄连素(美国 Sigma, 批号: 14050); 橄榄油(美国 Sigma); 戊巴比妥钠(武汉 GOOGLE 生物); JAK2(美国 CST); p-JAK2(美国 CST); p-STAT3(美国 CST); STAT3(美国 CST);  $\beta$ -actin(美国 abgent); ALT、AST 试剂盒(Roche, 批号分别为 061446 和 067723); CCl<sub>4</sub>(美国 Sigma)。

BX51 型显微镜(Olympus)及成像系统(HITMAS-30)均为温州医科大学病理科实验室临床病理组提供。

### 1.2 动物及分组

30 只 C57 小鼠,  $\delta$ , 20~25 g, SPF 级, 购自北京华富康实验动物中心, 质量合格证号: 410002011, 饲养于温州医科大学实验动物中心, 许可证号: SYXK(浙)2012-0157, 设施使用证明号: 013652。小鼠随机分为对照组、CCl<sub>4</sub> 组和黄连素组, 每组 10 只。黄连素组在 CCl<sub>4</sub> 注射前 1 h 腹腔注射黄连素(10 mg·kg<sup>-1</sup>), CCl<sub>4</sub> 组和黄连素组腹腔注射 CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液(0.5%, 5 mL·kg<sup>-1</sup>), 对照组腹腔注射橄榄油溶液(0.5%, 5 mL·kg<sup>-1</sup>)<sup>[4]</sup>。动物状态较好, 苏醒较快, 无死亡动物, 注射完毕后给予正常饮食饮水。

### 1.3 标本收集

各组小鼠在 CCl<sub>4</sub> 或橄榄油注射后, 24 h 后麻醉下处死小鼠, 收集血清和肝脏标本, 采用生化检测 ALT 和 AST, HE 染色后观察肝脏病理学形

态, 三分之一肝脏置于多聚甲醛做石蜡切片, 其余组织冻于-80 °C 冰箱。

### 1.4 肝脏病理检测

肝脏组织采用 10%多聚甲醛固定, 常规脱水浸蜡, 石蜡包埋, 4  $\mu$ m 切片, 脱蜡透明后由病理科实验室 HE 染色。病理评分: 0 分, 没有损伤; 1 分, 轻微损伤, 胞浆空泡变性和局灶性细胞核固缩; 2 分, 中度至重度损伤, 具有广泛的核固缩; 3 分, 肝脏重度损伤, 肝脏病理表现为广泛出血和中性粒细胞浸润解体, 乃至严重坏死<sup>[5]</sup>。

### 1.5 Western blot 法检测肝脏蛋白表达

每组取 50 mg 肝脏组织, 利用免疫蛋白印迹法检测肝脏 JAK2, p-JAK2, STAT3 和 p-STAT3 的表达, 方法参考文献[6]。

### 1.6 RT-PCR 检测白介素-6(IL-6)、白介素 8(IL-8)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )mRNA 水平

称取适量肝脏组织, 按照文献[5]检测各组肝脏 IL-6, TNF- $\alpha$  和 IL-8 mRNA 表达水平。TNF- $\alpha$  基因引物序列正义链为 CTGAAGTTCGGGGTGA TCGG, 反义链为 GGCTTGTCACCTCGAATTTGA GA; IL-6 基因引物序列正义链为 CTGCAAGAG ACTTCCATCCAG, 反义链为 AGTGGTATAGAC AGGTCTGTTG; IL-8 基因引物序列正义链为 ACGAACCTTGTGCAAGTGTC, 反义链为 TGCTT CCCAGGTCAAAGGTT;  $\beta$ -actin 基因引物序列正义链为 AGAGGCAAATCGTGCGTGAC, 反义链为; CAATCGTGATGACCTGGCCGT。

### 1.7 ELISA 检测血清中炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 和 IL-8 的表达水平

按 ELISA 试剂盒说明书操作步骤检测血清中 IL-6, TNF- $\alpha$  和 IL-8 表达水平。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件包进行资料分析, 实验结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 资料采用单因素方差分析(ANOVA), 多个样本之间的两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黄连素预处理对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝损伤的影响

与对照组相比, CCl<sub>4</sub> 组 ALT 和 AST 含量明显增高( $P<0.05$ ); 而黄连素组与 CCl<sub>4</sub> 组相比, ALT 和 AST 含量明显降低( $P<0.05$ )。结果显示, 黄连素预处理可以减轻 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤, 结果见表 1。

表 1 黄连素预处理对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝损伤的影响  
Tab. 1 Effect of berberine on acute liver injury mice induced by CCl<sub>4</sub>

| 组 别                | ALT/U·L <sup>-1</sup> | AST/U·L <sup>-1</sup> |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| 对照组                | 18±5                  | 12±3                  |
| CCl <sub>4</sub> 组 | 150±25 <sup>1)</sup>  | 80±11 <sup>1)</sup>   |
| 黄连素组               | 40±7 <sup>2)</sup>    | 25±8 <sup>2)</sup>    |

注: 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与 CCl<sub>4</sub> 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。  
Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with CCl<sub>4</sub> group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

### 2.2 黄连素预处理对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤小鼠的组织病理的影响

对照组损伤评分为(0.3±0.2)分, 与对照组相比, CCl<sub>4</sub> 组可见以中央静脉区为中心的大片状肝细胞坏死、肿胀、空泡和炎性细胞浸润, 其损伤评分为(5±1)分, 损伤明显增加( $P<0.05$ )。经黄连素预处理后, 肝细胞坏死、肿胀、空泡和炎性细胞浸润明显减少, 其损伤评分为(1.5±0.5)分, 显示黄连素组损伤明显减轻( $P<0.05$ ), 结果见图 1。

表 2 黄连素预处理对促炎症细胞因子 TNF-α、IL-6 和 IL-8 表达的影响

Tab. 2 Effect of berberine on the expression of pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-6 and IL-8

| 组 别                | TNF-α mRNA           | IL-6 mRNA             | IL-8 mRNA              | TNF-α/pg·mL <sup>-1</sup> | IL-6/pg·mL <sup>-1</sup> | IL-8/pg·mL <sup>-1</sup> |
|--------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组                | 1±0.05               | 1.0±0.1               | 0.95±0.1               | 120±15                    | 100±10                   | 100±5                    |
| CCl <sub>4</sub> 组 | 13±1.5 <sup>1)</sup> | 6.5±0.3 <sup>1)</sup> | 9.5±0.75 <sup>1)</sup> | 1 400±300 <sup>1)</sup>   | 750±40 <sup>1)</sup>     | 950±50 <sup>1)</sup>     |
| 黄连素组               | 4±0.5 <sup>2)</sup>  | 2.5±0.5 <sup>2)</sup> | 3.5±0.5 <sup>2)</sup>  | 550±150 <sup>2)</sup>     | 350±30 <sup>2)</sup>     | 450±30 <sup>2)</sup>     |

注: 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与 CCl<sub>4</sub> 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。  
Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with CCl<sub>4</sub> group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

### 2.4 黄连素预处理可以抑制 CCl<sub>4</sub> 诱导的 JAK2/STAT3 激活

与对照组相比, CCl<sub>4</sub> 组 p-JAK2 和 p-STAT3 表达明显增加( $P<0.05$ ), 但 JAK2 和 STAT3 表达无明显变化; 与 CCl<sub>4</sub> 组相比, 黄连素组 p-JAK2 和 p-STAT3 表达明显减少( $P<0.05$ ), 但 JAK2 和 STAT3 表达依然无明显变化。结果显示, 黄连素预处理可以抑制 CCl<sub>4</sub> 诱导的 JAK2/STAT3 激活, 结果见图 2 和表 3。

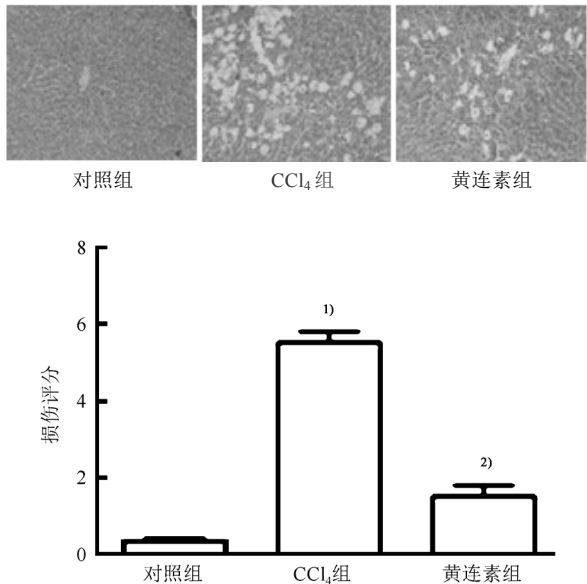


图 1 黄连素对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝损伤组织病理的影响 (HE, 400×,  $n=10$ )

与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与 CCl<sub>4</sub> 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 1 Effect of berberine on pathological damage of liver tissue induced by CCl<sub>4</sub> in mice (HE, 400×,  $n=10$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with CCl<sub>4</sub> group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

### 2.3 黄连素预处理对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠促炎症细胞因子 TNF-α、IL-6 和 IL-8 表达的影响

与对照组相比, CCl<sub>4</sub> 组的 TNF-α、IL-6 和 IL-8, 表达水平明显增加( $P<0.05$ ), 而黄连素组与 CCl<sub>4</sub> 组相比, TNF-α、IL-6 和 IL-8 表达水平明显减少( $P<0.05$ )。结果见表 2。

表 3 黄连素预处理对 p-JAK2、JAK2、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达的影响

Tab. 3 Effect of berberine on the protein expression of p-JAK2, JAK2, p-STAT3 and STAT3

| 组 别                | p-JAK2/JAK2             | p-STAT3/STAT3           |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组                | 0.12±0.03               | 0.14±0.03               |
| CCl <sub>4</sub> 组 | 0.43±0.05 <sup>1)</sup> | 0.56±0.05 <sup>1)</sup> |
| 黄连素组               | 0.23±0.04 <sup>2)</sup> | 0.27±0.03 <sup>2)</sup> |

注: 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与 CCl<sub>4</sub> 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。  
Note: compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with CCl<sub>4</sub> group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

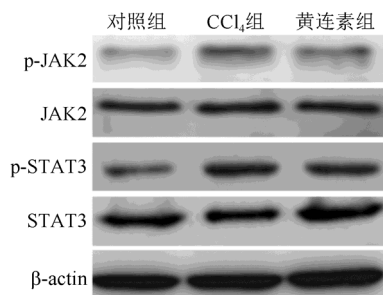


图2 黄连素预处理对 p-JAK2、JAK2、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of berberine on the protein expression of p-JAK2, JAK2, p-STAT3 and STAT3

### 3 讨论

肝脏不但是机体重要的代谢和排泄器官，还是人体重要解毒的器官。但是肝脏在清除部分有毒、有害物质的同时，往往会引起自身受损<sup>[7]</sup>。目前引起肝毒性的物质包括细菌、病毒、矿物质、污染物和化学试剂等。肝脏受损可引起机体的代谢紊乱，严重威胁人类的身心健康<sup>[7]</sup>。目前研究发现，引起肝脏毒性损伤的发病机制包括炎症、凋亡、坏死等。其中炎症在肝毒性损伤中起着举足轻重的作用<sup>[3-4]</sup>，因此抑制炎症是减轻肝脏毒性损伤的有效途径之一。

黄连素是一种常用的清热解毒药物，最近研究发现其具有广泛的抗炎的作用，但对肝毒性损伤的作用及其机制尚不清楚<sup>[1,8]</sup>。

在实验中利用化学物质 CCl<sub>4</sub> 成功构建了小鼠肝脏毒性损伤模型。既往有研究证实，黄连素对肝损伤具有保护作用<sup>[9]</sup>，故未设置阳性对照。实验结果显示，CCl<sub>4</sub> 可使小鼠肝脏出现以中央静脉区为中心的大片状肝细胞坏死、肿胀、空泡和炎性细胞浸润，肝脏损伤评分明显增加，肝脏功能严重受损，肝功能指标 ALT 和 AST 明显增高，促炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 表达明显上调。而经黄连素预处理后，黄连素组肝细胞坏死、肿胀、空泡和炎性细胞浸润明显减少，从而使肝脏损伤评分、ALT 和 AST 明显降低，促炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 表达明显降低，说明黄连素预处理可通过抑制炎症反应而减轻 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤。

JAK2/STAT3 信号通路是一经典的信号通路，参与多种细胞信号的介导，这些信号涉及细胞周期分化、转录、翻译，糖代谢，细胞生长和细胞存活等<sup>[8-9]</sup>。JAK2/STAT3 在炎症反应过程中扮演

重要作用<sup>[10-12]</sup>。本实验证实了 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤能激活 JAK2/STAT3 信号通路，给予黄连素可以抑制 JAK2/STAT3 激活，因此推测黄连素可以通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路的激活来减轻促炎症反应，进而减轻 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤。但在 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤中，黄连素抑制 JAK2/STAT3 信号通路的具体途径目前依然不清楚，除 JAK2/STAT3 信号通路外是否还有其他信号通路参与，还需要进一步研究。

本实验提示，黄连素预处理可以减轻 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝毒性损伤。这为临床预防肝毒性损伤提供了新思路。

### REFERENCES

- [1] GUPTA S, SINGH N, JAGGI A S. Alkaloids as aldose reductase inhibitors, with special reference to berberine [J]. *J Altern Complement Med*, 2014, 20(3): 195-205.
- [2] LI Z, GENG Y N, JIANG J D, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014(2014): 289264. Doi: 10.1155/2014/289264.
- [3] BIEGHS V, TRAUTWEIN C. The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease [J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(9): 446-452.
- [4] FENG Y, SIU K Y, YE X, et al. Hepatoprotective effects of berberine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats [J]. *Chin Med*, 2010(5): 33. doi: 10.1186/1749-8546-5-33.
- [5] GHANY R M, SHARAF N M, KASSEM L A, et al. Thymoquinone triggers anti-apoptotic signaling targeting death ligand and apoptotic regulators in a model of hepatic ischemia reperfusion injury [J]. *Drug Discov Ther*, 2009, 3(6): 296-306.
- [6] ZHANG J, ZOU Y R, ZHONG X, et al. Erythropoietin pretreatment ameliorates renal ischaemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signaling [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2015, 20(4): 266-272.
- [7] STREETZ K L, WÜSTEFELD T, KLEIN C, et al. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2001, 47(4): 661-673.
- [8] WANG Z, CHEN Z, YANG S, et al. Berberine ameliorates collagen-induced arthritis in rats associated with anti-inflammatory and anti-angiogenic effects [J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1789-1798.
- [9] SHENG M, ZHOU Y, YU W, et al. Protective effect of berberine pretreatment in hepatic ischemia/reperfusion injury of rat [J]. *Transplant Proc*, 2015, 47(2): 275-282.
- [10] ZHANG Z H, YU L J, HUI X C, et al. Hydroxy-safflor yellow A attenuates A $\beta$ -induced inflammation by modulating the JAK2/STAT3/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Brain Res*, 2014, 14(3): 72-80.
- [11] SI Y N, BAO H G, XU L, et al. Dexmedetomidine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidney [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(13): 1843-1851.
- [12] YAO B Y, CHEN Y L, LI S T, et al. Rosiglitazone preconditioning attenuate intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2015, 32(6): 676-681.

收稿日期: 2015-07-28