

间充质干细胞移植治疗慢性阻塞性肺疾病的相关研究进展

张春雨 张捷

【摘要】 慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种重要的慢性呼吸系统疾病,主要包括慢性支气管炎和肺气肿,患病人数多,病死率高,由于其缓慢进行性发展,COPD 是以上调炎症过程导致诸如上皮细胞凋亡、终末肺泡间隔及肺泡外基质蛋白水解事件发生为特征,严重影响患者的劳动能力和生活质量。近来一些研究揭示,间充质干细胞对肺组织的修复和再生有重要作用,所以外源性干细胞的治疗可能成为下一代治疗 COPD 的有力手段。本文就间充质干细胞治疗 COPD 的相关基础及临床研究作一综述。

【关键词】 间充质干细胞;移植;慢性阻塞性肺疾病;再生;修复

Progress in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease with mesenchymal stem cell ZHANG Chun-yu*, ZHANG Jie.* *Department of Respiratory Medicine, Siping Hospital of China Medical University, Siping 136000, China*

Corresponding author: ZHANG Jie, Email: doctorzhangj@sina.com

【Abstract】 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is an important chronic respiratory system disease with high morbidity and mortality. It mainly consists of chronic bronchitis and pulmonary emphysema, characterized by slow progressive development. Pathogenesis of COPD is characterized by an upregulation of inflammatory processes leading to irreversible events such as apoptosis of epithelial cells, proteolysis of the terminal air-space and lung extracellular matrix components. The patients with COPD have weak work ability and poor life quality. Recent studies have revealed that mesenchymal stem cell contribute to lung tissue repair and regeneration, and thus administration of exogenous stem cells may be a potent next-generation therapy for COPD. The literature concerning the basic and clinical researches of BMSCs associate with the treatment of COPD was reviewed in this article.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Transplant; Chronic obstructive pulmonary disease; Repair; Regeneration

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)由于其患病人数多,病死率高,社会经济负担重,已成为一个重要的公共卫生问题。COPD 目前居全球死亡原因的第 4 位,世界银行/世界卫生组织公布,至 2020 年 COPD 将位居世界疾病经济负担的第 5 位。在我国, COPD 同样是严重危害人民身体健康的重要慢性呼吸系统疾病。近期对我国 7 个地区 20 245 名成年人进行调查, COPD 患病率占 40 岁以上人群的 8.2%, 其患病率之高十分惊人。COPD 是一种具有气流受限特

征的可以预防和治疗的疾病,气流受限不完全可逆、呈进行性发展,与肺部对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关。COPD 主要累及肺脏,但也可引起全身(或称肺外)的不良效应。现有的治疗手段大多属于对症治疗,目前尚缺乏可以从根本上逆转疾病的方法。近年来随着干细胞在医学其他领域的基础及临床研究不断取得进展,干细胞移植治疗 COPD 的相关研究也不断取得令人鼓舞的发现,本文将近年来相关进展综述如下:

1 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)的特性

骨髓干细胞包括造血干细胞、MSC 和内皮祖细胞。1976 年 Fridenshtein 首次发现 MSC,将骨髓种在含有 FBS 的培养基中,出现成纤维样细胞集落贴

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-436X. 2011. 023. 013

作者单位: 136000 四平, 中国医科大学四平医院呼吸内科(张春雨); 130041 长春, 吉林大学附属第二医院呼吸内科(张捷)

通信作者: 张捷, Email: doctorzhangj@sina.com

壁,并能够分化成骨和脂肪细胞。近年来体内、外研究发现, MSC 可以向多种组织细胞分化,除了骨、软骨等中胚层细胞外,还能向外胚层如神经细胞以及内胚层如肝细胞分化^[1-4]。MSC 来源于发育早期的中胚层的一类多能干细胞,在特定诱导条件下可以分化成多种类型的细胞。学者们常使用碱性磷酸酶作为干细胞分化潜能的指标,而从天然种系的 banna 微型猪骨髓中得到的 MSC 或高或低的表达碱性磷酸酶^[5],另外, RT-PCR 也能在 MSC 中检测出碱性磷酸酶^[5],这在分子学上证明了其分化的潜力。MSC 来源广、渠道多是其研究的一个优势,但因其来源和分离培养的方式不同,使得某些实验数据很难进行比较。MSC 易分离培养,扩增迅速,并有向伤处迁移的能力,所以 MSC 是很好的基础研究的基础材料,是比较理想的细胞和基因治疗的载体。MSC 凭借以上特点,将为干细胞生物工程学提供一个很好的细胞来源,同时为临床疾病的治疗开辟一个新的天地。

2 MSC 在肺疾病的应用基础

MSC 因其具有多向分化潜能、造血支持、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注。MSC 最初在骨髓中发现,他们长期存在于相应组织内,在维持组织更新和损伤修复中起着重要作用。在一定的条件下,干细胞可以分化成机体内的多功能细胞,形成任何类型的组织和器官,以实现机体内部建构和自我康复能力。大量研究证实 MSC 可以分化成肺上皮细胞^[6],并诱导其表达气道和(或)肺泡上皮细胞的标记,可表达 HLA I, HLA II 以及其他共刺激分子,使得 MSC 可以成功逃避机体免疫监测^[7],赵峰等^[8]将 DAPI 标记的 MSC 异体移植到 BLM 诱发的肺损伤大鼠体内,发现 MSC 可在损伤大鼠肺组织中分化为肺泡上皮细胞,并首次发现 MSC 可在损伤的同种异体大鼠肺组织中分化为支气管上皮细胞,这些结果为异体干细胞移植治疗肺疾病提供了实验依据,也为 MSC 应用于临床造福人类提供的良好的基础。

3 MSC 在 COPD 的组织修复和重建

COPD 以不完全可逆的气流受限为特征,病情呈进行性发展,病理学改变累及肺脏的多级结构,包括中央及周围的气道、肺实质乃至肺血管,属于不可逆病变,故依靠机体自身的能力无法达到组织的完全修复。因此,迫切需要寻找到一种参与肺部组织

结构的修复和重建的有效方法。根据 COPD 诊治指南,现有的可行性治疗方案包括药物与非药物,基本上是对症处理,虽可缓解气流受限、减轻慢性炎症、降低患者肺功能受损速率以及改善患者的生活质量等优点,但对于肺组织结构的修复与重建几乎无作用。修复肺部结构和功能是治疗 COPD 的一种理想结果。鉴于 MSC 在体外可诱导分化成肺上皮细胞,且在炎症等因素的趋化下,外源的骨髓 MSC 有向肺损伤部位汇集的现象。故 MSC 将可能是 COPD 在细胞水平上的新型治疗方法,也是目前很多学者希望突破药物治疗的研究方向。有研究证明外源 MSC 可修复肺损伤^[6],一方面通过在局部微环境作用下诱导 MSC 分化为肺泡上皮和支气管上皮细胞等结构细胞^[6,9],参与组织的修复过程;另一方面通过免疫调节作用,抑制炎症反应为其损伤提供修复的有利环境。同时,肺脏作为全身静脉血氧合的惟一器官的特殊定位,更有利于干细胞的滞留与定植。

3.1 MSC 与 COPD 肺血管的修复和重建

MSC 本身具有部分内皮细胞的表型:表达 CD105(内皮糖蛋白 endoglin), endoglin 主要分布在内皮细胞,与血管的发育有关;表达黏附分子 VCAM21、ICAM21、Integrin β 3 以及内皮细胞特异性的血管内皮生长因子受体 VEGFR22(KDR/flk21)等。有研究人员从骨髓、外周血、脐血等组织分离出内皮祖细胞^[10-12],其特征为 CD133⁺、CD34⁺、KDR⁺或 CD14⁺。也有研究人员从骨髓 MSC 诱导分化出内皮细胞^[13], MSC 在鼠体内也被发现能分化为内皮细胞^[14]。

3.2 MSC 修复损伤肺组织

3.2.1 MSC 体外诱导修复损伤肺组织

体外诱导干细胞向肺上皮细胞和肺血管内皮细胞等细胞分化早期的研究通过人 MSC 与热休克处理的人小气道上皮细胞共同体外培养,表明 MSC 的亚群能迅速分化为上皮样细胞并表达多种正常小气道上皮细胞的基因,部分 MSC 直接分化为上皮细胞。Popov 等^[15]研究者又进一步探讨优化 MSC 的体外分化条件以及影响 MSC 分化的分子机制,并试图利用药物干预 MSC 的分化途径从而达到治疗某些肺部疾病的目的。但是 MSC 体外向肺上皮细胞和肺血管内皮细胞等细胞分化的研究并不多,故对其具体机制的认识也不深。

3.2.2 MSC 体内移植修复损伤肺组织 Ortiz 等^[16]将供鼠的 MSC 分别经外周静脉注入博莱霉素诱导的雌鼠和健康雌鼠,结果显示模型鼠肺组织内可以检测到供鼠来源的细胞,而健康鼠体内没有检测到这类细胞。Rojas 等^[6]将 MSC 移植到博莱霉素诱导的肺损伤小鼠体内,发现损伤肺分泌的可溶因子能引起数量增加并向损伤肺组织迁移、聚集、并替代损伤的肺细胞。他们还认为,干细胞向损伤肺组织的归巢至少部分原因是由于损伤肺组织产生体液调节因子,这些因子可以趋化干细胞。在深入的研究中,他们还证实了受损肺细胞能诱导 MSC 的迁移, MSC 能在受损肺细胞内调节炎症信号过程^[7]。林群等^[17]用转染的 MSC 经静脉注入大鼠体内,经验证后证实其具有良好的肺内靶向性。这些实验表明,骨髓中存在或经静脉给予的外源性 MSC 可以迁移到肺并转化为肺的分化细胞。

3.3 MSC 的免疫调节作用

3.3.1 MSC 的免疫原性 骨髓 MSC 免疫原性较小。MSC 属于未分化的前体干细胞,其表型分化尚不成熟,因此骨髓 MSC 移植同种异体后无排斥反应或反应较弱。Lazarus 等^[18]将体外培养扩增的不同浓度骨髓 MSC 通过静脉注入志愿者体内,结果发现直至输入量达到 5×10^7 均未发生明显的免疫排斥反应。

3.3.2 MSC 的免疫调节作用 MSC 不仅参与调节髓系细胞的生长,也参与淋系细胞的发育,构成早期淋巴细胞生长的微环境。有研究表明, MSC 具有与胸腺上皮表达相似的表面分子,在骨髓移植同时进行骨移植的实验中发现,供者基质细胞能够从骨髓转移至胸腺,并参与胸腺细胞的阳性选择^[19]。体外实验还发现,胸腺细胞与 MSC 共培养可促进早期 T 细胞的黏附与增殖,因此 MSC 对早期 T 细胞的选择性黏附、生存及增殖均具有重要意义^[20-21]。MSC 通过表达 MHC-I 类分子、VCAM-1、ICAM-1、CD72 及 LAF-3 等与 T 细胞发生相互作用^[22]。但 MSC 与同种异体 T 细胞共培养后不能刺激 T 细胞增殖,也不能使 T 细胞表达活化分子如 CD25、CD134 等^[22],即使将 MSC 与 IFN- γ 共孵育后使其高表达 MHC-I 类抗原并诱导其表达 MHC-II 抗原,甚至再加入 CD28 抗体以传递共刺激分子 B7 也不能引起异体 T 细胞的增殖^[23],因此 MSC 被确认为非抗原递呈细胞。进一步体外研究发现,同种异

体或自体骨髓 MSC 对 T 细胞增殖均有较强抑制作用^[24]。邓为民等^[25]研究表明, BALB/C 小鼠的 BMSC 对由 ConA 诱导的 BALB/C、BXS B 和 B6 小鼠的 T 细胞增殖均有抑制作用;而对 BALB/C、B6 小鼠由 LPS 诱导的 B 细胞增殖和分泌 Ig 方面有促进作用,从而显示 MSC 对免疫细胞功能有调节作用。但其调节作用的具体机制尚需进一步探讨。

3.3.3 MSC 的免疫调节特点

3.3.3.1 非 MHC 限制性及剂量依赖性 Le Blanc 等^[26]研究表明, MSC 的免疫调节作用不受 MHC 限制。国内外研究结果均显示 MSC 对免疫细胞的调节作用具有剂量依赖性,尤其是对 T 细胞增殖的抑制作用,随着 MSC 剂量的增加,抑制作用加强^[24-27]。

3.3.3.2 MSC 免疫调节的可逆性 Di Nicola 等^[24]将人 T 细胞与植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 及人 MSC 共培养 7 d 后重新收集淋巴细胞,并以树突状细胞 (dendritic cell, DC)、PHA 及 IL-2 重新刺激其增殖。结果发现,在 MSC 共存条件下,由 PHA 引起的 T 细胞增殖减少了 90%,但去除 MSC 并被 DC 或 PHA 或 IL-2 再刺激 2 d 后, T 细胞的增殖又回到了原来无 MSC 存在时的水平,因而得出结论 MSC 所致的免疫抑制具有可逆性。Krampera 等^[28]的工作也得到了相似的结论,因此认为 MSC 产生的免疫抑制效应具有暂时性。

3.4 MSC 治疗 COPD 的可行性

3.4.1 MSC 对 COPD 气道及肺实质损伤的修复作用 宋小莲等^[29]也发现小鼠 MSC 在 COPD 模型中主要分布于肺间质、肺泡和气管壁,并可在肺局部存留 30 d 以上,且分化为 II 型肺泡上皮和气管黏膜上皮形态,同时伴有少量血管平滑肌细胞出现。以上事实表明 MSC 有向肺组织细胞分化的潜能,并在 COPD 特定的慢性炎症驱使下向肺部趋化^[6],对损伤的肺组织进行修复,从而使肺气肿及气道病变得以改善,为 MSC 在治疗 COPD 应用上奠定坚实的基础。

3.4.2 MSC 对治疗大鼠实验性肺气肿 李旭等^[30]将 MSC 用于治疗 Wistar 大鼠肺气肿, MSC 治疗组大鼠肺组织中可见 DAPI 标记的细胞,并且观察到 MSC 在受体肺组织内分化为上皮细胞。经 MSC 治疗的肺气肿模型大鼠的肺泡数较模型组 (B

组)组和生理盐水对照组(C组)组明显增加,平均肺泡面积明显减小,且 MSC 在肺气肿模型大鼠肺组织中分化为肺泡上皮,同时在荧光显微镜下作者看到 DAPI 标记后的 MSC 进入了受损的肺组织,还发现其分化为上皮细胞,这些都说明骨髓 MSC 参与了肺组织的再生, MSC 对治疗大鼠实验性肺气肿是有效的。

3.4.3 MSC 移植治疗大鼠实验性肺动脉高压 何志旭等^[31]用 MSC 移植治疗大鼠实验性肺动脉高压并观察肺组织超微结构的变化后发现,实验动物移植 MSC 后,生存状况明显改善,食欲及活动增加,毛色顺滑、光亮,动物存活率为 100%;而模型组动物活动明显减少、食欲下降,消瘦,体质量下降或不增,在 1 个月内相继死亡,病死率为 100%。各项指标检测结果显示, MSC 移植组(M组)大鼠较单纯肺动脉高压组(H组)右心室收缩压明显降低,右心指数下降,肺小动脉的重建和超微结构的血气屏障、线粒体、板层小体等改变均有明显改善,其结果接近正常对照组。结果提示 MSC 移植后可通过形成新生血管建立侧枝循环,有效减轻野百合碱诱导的肺动脉高压和肺组织病变程度。 Patel 等^[32]使用在低氧状态下培养的 MSC 上清液离体灌注肺动脉血管环,发现能够导致肺动脉出现明显扩张,推测 MSC 中还有某种扩血管物质,在低氧刺激下释放增加,具有改善肺动脉高压时肺血管重塑、对抗内皮细胞炎性损伤和保持血管稳定性的作用。 Kanki-Horimoto 等^[33]研究发现 MSC 移植治疗 PAH 动物可明显增加有效肺循环血管床的数量,模型动物右心室肥大指数和右心室收缩压降低,动物生存率增高。

3.4.4 MSC 移植治疗大鼠 COPD 张超凤等^[34]应用 MSC 移植治疗大鼠 COPD,她们观察到 BMSC 能够归巢到 COPD 大鼠的肺组织并存活; BMSC 治疗组与模型组相比,血清中超氧化物歧化酶的活性明显增高、活性丙二醛含量显著降低($P < 0.05$);支气管肺泡灌洗液中细胞总数明显减少,中性粒细胞总数及比例均减小($P < 0.05$);病理有明显的改善,肺平均内衬间隔减小,平均肺泡数增大($P < 0.05$),说明 BMSC 对 COPD 大鼠具有治疗作用。

综上所述, MSC 所特有的生物学特性及潜在的能力,将为人类疾病的治疗提供一个全新的治疗理念,具有划时代的意义。由于肺脏的特殊定位,

COPD 以组织结构破坏为特征的发病机制,以及 MSC 固有的定向分化与组织修复潜能等,我们相信随着 MSC 生物学特性及定向分化机制的不断深入研究,应用 MSC 治疗 COPD 必将具有良好的实际应用前景。

参 考 文 献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284:143-147.
- [2] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418:41-49.
- [3] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002, 109:1291-1302.
- [4] Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, et al. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100 Suppl 1:11854-11860.
- [5] Li SF, Lu XF, Sun MH. Biological characteristics of mesenchymal stem cells in vitro derived from bone marrow of banna minipig inbred line. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2002, 16:354-358.
- [6] Rojas M, Xu J, Woods CR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33:145-152.
- [7] Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells; novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8:569-581.
- [8] 赵峰,李圣青,张宇飞,等.骨髓间充质干细胞在肺损伤大鼠肺组织的分化. *解放军医学杂志*, 2007, 32:131-133.
- [9] Aliotta JM, Keaney P, Passero M, et al. Bone marrow production of lung cells; the impact of G-CSF, cardiotoxin, graded doses of irradiation, and subpopulation phenotype. *Exp Hematol*, 2006, 34:230-241.
- [10] Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*, 2001, 7:1194-1201.
- [11] Jiang S, Walker L, Afentoulis M, et al. Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101:16891-16896.
- [12] Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, 92:362-367.
- [13] Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 2004, 22:377-384.
- [14] Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution

- of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 2006, 107:1878-1887.
- [15] Popov BV, Serikov VB, Petrov NS, et al. Lung epithelial cells induce endodermal differentiation in mouse mesenchymal bone marrow stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Eng*, 2007, 13:2441-2450.
- [16] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100:8407-8411.
- [17] 林群, 雷丽华, 曾帮雄, 等. 骨髓间充质干细胞介导大鼠肺内基因转移的可行性. *中华麻醉学杂志*, 2006, 26:230-233.
- [18] Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*, 1995, 16:557-564.
- [19] Li Y, Hisha H, Inaba M, et al. Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts: A role of stromal cells in positive selection. *Exp Hematol*, 2000, 28:950-960.
- [20] Barda-Saad M, Rozenszajn LA, Globerson A, et al. Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis. *Exp Hematol*, 1996, 24:386-391.
- [21] Barda-Saad M, Rozenszajn LA, Ashush H, et al. Adhesion molecules involved in the interactions between early T cells and mesenchymal bone marrow stromal cells. *Exp Hematol*, 1999, 27:834-844.
- [22] McIntosh KR, Barthoomew A. Stromal cell modulation of the immune system. *Graft*, 2000, 3:324-328.
- [23] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 2003, 75:389-397.
- [24] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002, 99:3838-3843.
- [25] 邓为民, 韩钦, 葛薇, 等. 骨髓间充质干细胞在异基因小鼠免疫器官内的分布及其免疫功能调节作用. *中国免疫学杂志*, 2004, 20:40-45.
- [26] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 2003, 57:11-20.
- [27] Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 2003, 102:3837-3844.
- [28] Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 2003, 101:3722-3729.
- [29] 宋小莲, 白冲. 骨髓间充质干细胞移植对慢性阻塞性肺病气道及肺实质损伤的修复作用. 上海: 第二军医大学, 2009: 1-95.
- [30] 李旭, 李宝平. 骨髓间充质干细胞对大鼠实验性肺气肿的作用. *中国医药导报*, 2010, 7:11-13.
- [31] 何志旭, 汪浩文, 尚峰, 等. 骨髓间充质干细胞治疗实验性肺动脉高压后肺组织结构的变化. *中国病理生理杂志*, 2009, 25:1907-1911.
- [32] Patel KM, Crisostomo P, Lahm T, et al. Mesenchymal stem cells attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction by a paracrine mechanism. *J Surg Res*, 2007, 143:281-285.
- [33] Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, et al. Implantation of mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase improves right ventricular impairments caused by pulmonary hypertension. *Circulation*, 2006, 114(1 Suppl):I181-I185.
- [34] 张超凤, 区庆坚, 王志红, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠慢性阻塞性肺疾病. *心肺血管病杂志*, 2011, 30:62-66.

(收稿日期: 2011-09-22)