

·基础研究·

·论著·

肝细胞生长因子/血管内皮生长因子165双基因疗法加速皮肤全层缺损创面愈合的实验研究

闫洪伟¹, 赵毅², 刘华¹, 洪城¹, 朱逢源³, 田诗政¹

[1.十堰市人民医院(湖北医药学院附属人民医院)烧伤整形科 湖北十堰 442000; 2.锦州医科大学 辽宁锦州 121000; 3.湖北医药学院 湖北十堰 442000]

[摘要]目的: 探讨以腺病毒为载体的肝细胞生长因子/血管内皮生长因子165 (Ad-HGF/VEGF165) 双基因疗法在促进皮肤全层缺损创面愈合中的作用。方法: 体外构建HGF/VEGF165双基因腺病毒载体, 取30只雄性SD大鼠随机分为3组, Ad-HGF/VEGF165治疗组、Ad-VEGF165治疗组和空白对照组, 每组10只, 于大鼠背部正中制作直径为3.0 cm圆形全层皮肤缺损创面模型。造模成功后, 距创缘外侧5 mm处, 于3、6、9、12点方位, 治疗组分别注射病毒滴度为 2×10^8 PFU/ml的Ad-HGF/VEGF165溶液、Ad-VEGF165溶液, 对照组注射等量0.9%氯化钠溶液, 注射深度为浅筋膜层, 每点注射量0.25 ml, 总量1 ml; 分别观察三组7 d、14 d、21 d创面愈合率, 治疗后第7天创缘组织HE染色情况, 治疗后3 d、7 d、14 d免疫组化观察微血管密度(MVD)及VEGF表达情况; Western blot法测定VEGF蛋白表达水平。结果: 三组创面治疗后7 d、14 d、21 d愈合率实验组高于对照组, 且Ad-HGF/VEGF165组优于Ad-VEGF165组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 三组创面不同时间点(治疗后3 d、7 d、14 d)免疫组化测得VEGF表达水平及Western blot测定VEGF蛋白表达量均高于对照组, Ad-HGF/VEGF165组高于Ad-VEGF165组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: Ad-HGF/VEGF165双基因疗法和Ad-VEGF165单基因治疗均能有效加速创面愈合, 双基因疗法效果更为显著, 其加速创面愈合可能机制为增加创面VEGF表达量、加速血管新生、改善创面愈合微环境, 加速上皮化。

[关键词]创面; 基因疗法; 腺病毒; 肝细胞生长因子(HGF); 血管内皮生长因子(VEGF); 血管新生

[中图分类号]R641 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2025)05-0001-05

Experimental Study on Hepatocyte Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor 165 Dual Gene Therapy for Accelerating Wound Healing of Skin Defects

YAN Hongwei¹, ZHAO Yi², LIU Hua¹, HONG Cheng¹, ZHU Fengyuan³, TIAN Shizheng¹

(1. Department of Burn and Plastic Surgery, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine College, Shiyan 442000, Hubei, China; 2. Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China; 3. Hubei University of Medicine College, Shiyan 442000, Hubei, China)

Abstract: Objective To investigate the role of adenovirus-based hepatocyte growth factor/vascular endothelial growth factor 165(Ad-HGF/VEGF165) double gene therapy in promoting the healing of full-layer skin defect wound. **Methods** The HGF/VEGF165 double-gene adenovirus vector was constructed in vitro, and 30 male SD rats were randomly divided into 3 groups: Ad-HGF/VEGF165 treatment group, Ad-VEGF165 treatment group and blank control group, 10 rats in each group. A circular full-thickness skin defect wound model with a diameter of 3.0cm was made in the middle of the back of the rat. After successful molding, Ad-HGF/VEGF165 solution and Ad-VEGF165 solution with a virus titer of 2×10^8 PFU/ml were injected in the treatment group at 3, 6, 9, and 12 o'clock 5 mm outside the wound edge, respectively. The same amount of 0.9% sodium chloride solution was injected into the control group, and the injection depth was the superficial fascia layer. The injection volume at each point was 0.25 ml and the total amount was 1 ml. The wound healing rate at 7 d, 14 d and 21 d of the three groups were observed, and HE staining was observed at the 7th day after treatment. Microvascular density (MVD) and VEGF expression were observed by immunohistochemistry at 3 d, 7 d and 14 d after treatment. The protein expression level of VEGF was determined by Western blot. **Results** The wound healing rate of the experimental group was higher than that of the control

基金项目: 湖北省十堰市科技局指导项目(编号: 21Y61)

第一作者: 闫洪伟, 硕士研究生; 研究方向为烧伤整形与慢性创面修复。E-mail: 312698647@qq.com

通信作者: 田诗政, 主任医师、研究生导师; 研究方向为烧伤整形与慢性创面修复、瘢痕防治及面部年轻化治疗。E-mail: sztian88@163.com

group at 7 d, 14 d and 21 d after treatment, and the Ad-HGF/VEGF165 group was better than the Ad-VEGF165 group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The VEGF expression levels measured by immunohistochemistry and the VEGF protein expression measured by Western blot were higher than those of control group at different time points (3 d, 7 d and 14 d after treatment), and the Ad-HGF/VEGF165 group was higher than that of Ad-VEGF165 group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Both Ad-HGF/VEGF165 dual gene therapy and Ad-VEGF165 single gene therapy could effectively accelerate wound healing, and the effect of double gene therapy was more significant. The possible mechanism of accelerating wound healing were increasing the expression of VEGF on the wound, accelerating vascularization, improving the microenvironment of wound healing and accelerating epithelialization.

Key words: wound; gene therapy; adenovirus; hepatocyte growth factor (HGF); vascular endothelial growth factor (VEGF); angiogenesis

创面修复是一项复杂的生理学过程,而血管形成是创面修复过程的基础,临床上影响创面愈合的因素主要表现为血管新生不良、创面局部营养供应欠缺、炎症反应持续存在等^[1-2],研究表明,在促进血管新生方面,血管内皮生长因子、肝细胞生长因子具有重要作用^[3],目前已有学者采用腺病毒载体介导血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)等的基因疗法,通过局部注射作用于缺血部位,可以观察到对血管新生具有明确促进作用^[4-7]。外源性给予各种类型生长因子可加速创面愈合已被广泛应用于临床,但已获得的数据表明,使用单个血管生成生长因子可能不足以对缺血性疾病患者产生长期的积极影响。如何通过内在干预激发机体自身修复能力,通过加速血管新生、增强细胞合成功能、改善局部炎症状态,进而促进创面修复是目前研究的热点。本研究拟应用腺病毒为载体的肝细胞生长因子/血管内皮生长因子165(Ad-HGF/VEGF165)双基因疗法,通过大体观察、HE染色、免疫组化、蛋白印迹等实验方法,综合评价Ad-HGF/VEGF165双基因疗法,在体内促进创面愈合中的作用,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂: Ad-HGF/VEGF165、Ad-VEGF165为湖北医药学院附属人民医院临床研究所王家宁博士惠赠, AlphaTubulin Monoclonal Antibody(武汉沃瑞生物科技有限公司), Mouse/Rat CD31/PECAM-1 Antibody(RND公司), VEGF-Polyclonal Antibody(Abcam公司), Tween20、SABC试剂盒(武汉博士德公司)。

1.1.2 主要仪器: 普通/荧光显微镜(Nikon公司)、数显恒温水浴锅(常州金坛三和仪器公司)、 -20°C 冰箱(DW-YL270)、掌上离心机(Sigma公司)、功能成像仪(上海天能科技有限公司)、电泳仪及转膜仪(BIO-RAD)、石蜡切片机(Lecia德国)。

1.2 动物模型建立与分组

1.2.1 实验动物创面模型建立^[11]: 选用健康雄性SD大鼠(购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司)30只,体重200~250 g。将大鼠用异氟烷吸入麻醉后,背部创面造模区

去毛,标记直径为3 cm的圆形创面,消毒。在无菌条件下,沿标记线剪去皮肤、皮下组织至筋膜层,凡士林纱块及无菌敷料覆盖创面,即创面造模成功。

1.2.2 实验动物分组: 将造模后的大鼠随机分为A、B、C三组,每组10只。

1.2.2.1 A组: A组为Ad-HGF/VEGF165组,创面皮肤周围用碘伏彻底消毒,用生理盐水润洗创面肉芽组织,距创缘5 mm周围处均匀分布共注射 2×10^8 PFU(含有 10^8 病毒滴度单位的Ad-HGF/VEGF165)的生理盐水液1 ml,注射完毕后用凡士林纱布、无菌纱布覆盖创面并予以包扎固定,单笼喂养。

1.2.2.2 B组: B组为Ad-VEGF165组,创面皮肤周围用碘伏彻底消毒,创周同样方法注射含有 10^8 病毒滴度单位的Ad-VEGF165的生理盐水1 ml,再用凡士林纱布、无菌纱布覆盖创面并予以包扎固定,单笼喂养。

1.2.2.3 C组: C组为对照组,创面皮肤周围用碘伏彻底消毒,创周同样方法注射1 ml生理盐水,再用凡士林纱布、无菌纱布覆盖创面并予以包扎固定,单笼喂养。各组分别于治疗0、3、7、14 d切取创缘周围0.5 cm内的创面组织,标本迅速固定于中性福尔马林液,常规石蜡包埋、切片。

1.3 观察指标

1.3.1 创面愈合情况: 分别在治疗0 d、7 d、14 d、21 d测量各个时间点的创面面积,计算创面愈合率。创面愈合率=(创面初始面积-创面形成后第n天后的面积)/创面初始面积 $\times 100\%$ 。

1.3.2 HE染色: 取术后7 d创面肉芽组织观察创面炎症细胞浸润及血管生成情况。

1.3.3 创面血管化检测: 将各时间点切取的创面组织标本,行CD31免疫组化检测。采用SABC法,检测各个时间点CD31标记的创面微血管生成数目,分别在5个高倍镜(400 \times)视野下计算血管数量,比较血管生成情况。

1.3.4 创面组织VEGF检测: 将各时间点切取的创面组织标本通过Western blot法及免疫组化方法测定VEGF蛋白的表达水平。

1.4 统计学分析: 使用SPSS 20.00软件进行统计学分析,计量资料均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据通过t检验确定两组间差异,采用Image-Pro-Plus6.0检测VEGF的

IOD值, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 创面愈合情况比较: Ad-HGF/VEGF165、Ad-VEGF165组7、14 d时创基肉芽组织新鲜, 创缘可见部分上皮化表现, 见图1; 21 d创面愈合率Ad-HGF/VEGF165、Ad-VEGF165组显著高于对照组, Ad-HGF/VEGF165组高于Ad-VEGF165组 ($P < 0.05$), 见图2。

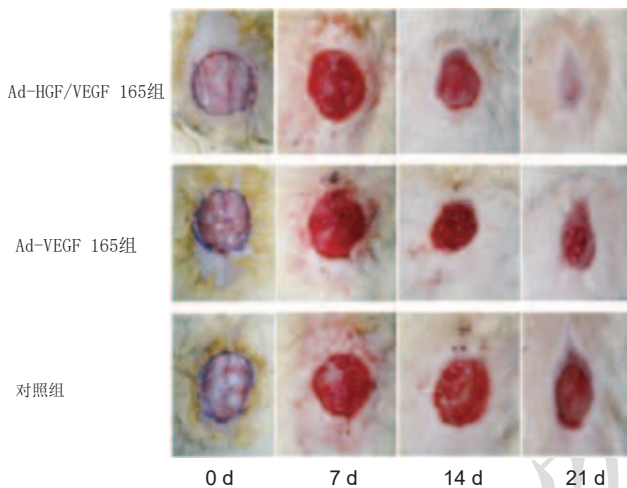


图1 三组创面不同时间点变化情况

2.2 HE染色结果: 取术后7 d的肉芽组织切片进行HE染色可见, 对照组创面肉芽组织结构疏松, 细胞排列紊, 毛细血管数量较少。Ad-HGF/VEGF165组与对照组相比, 肉芽组织

结构致密, 毛细血管数量明显增多。Ad-VEGF165组与对照组相比, 新生血管较多, 但不及Ad-HGF/VEGF165组, 见图3。

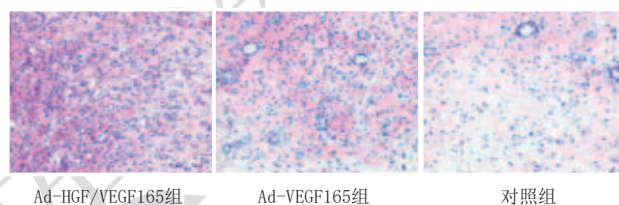


图3 术后7 d创面肉芽组织HE染色 (200×)

2.3 创面MVD检测: 各组创面均有CD31阳性细胞表达, 但Ad-HGF/VEGF165、Ad-VEGF165治疗组处理后3、7 d的CD31阳性细胞表达明显, 且Ad-HGF/VEGF165、Ad-VEGF165治疗组明显高于对照组, Ad-HGF/VEGF165组高于Ad-VEGF165组, 见图4~5。

2.4 创面组织VEGF比较: 治疗7 d Ad-HGF/VEGF165组VEGF表达高于Ad-VEGF165组, 且两者均明显高于对照组, 见图6~7。

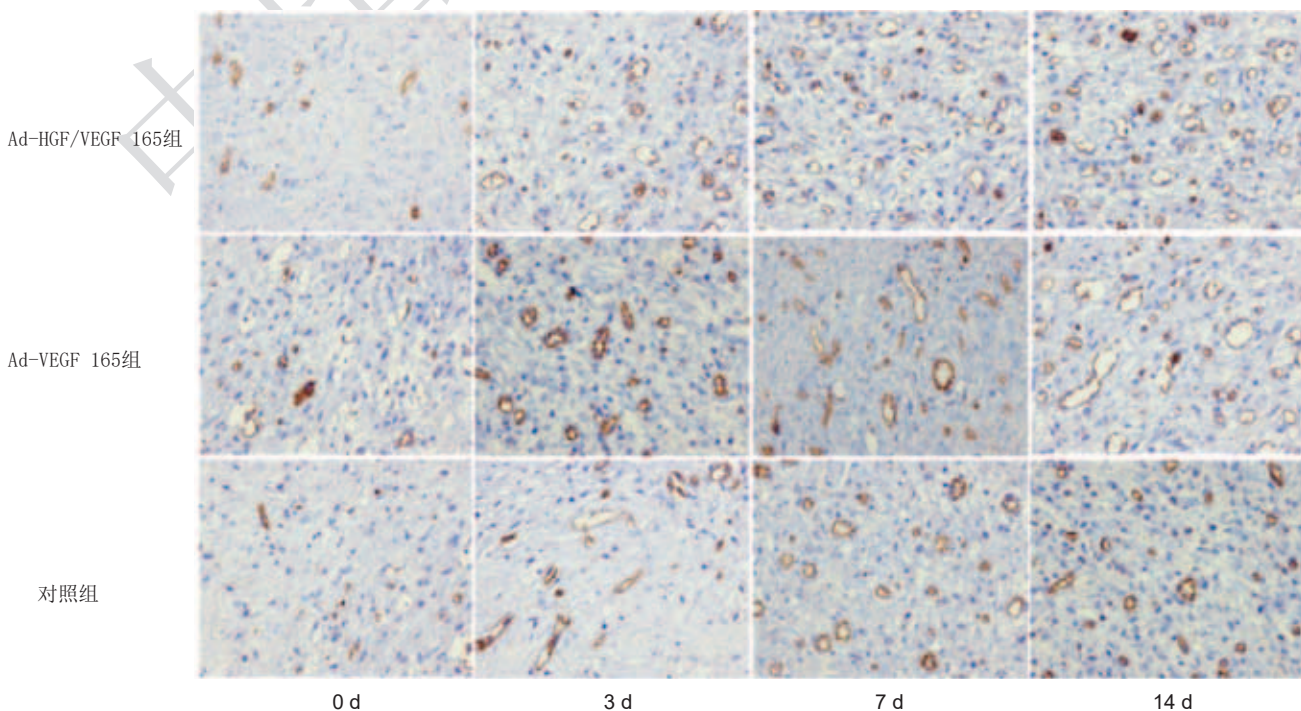


图4 三组创面不同时间点CD31标记的血管内皮细胞免疫组化染色 (400×)

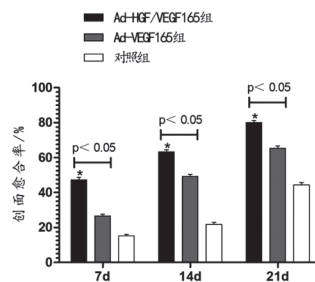


图2 各组处理后创面愈合率

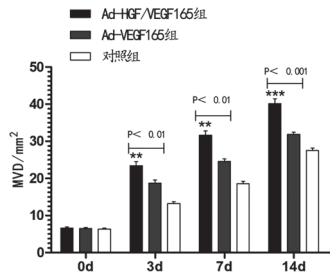


图5 三组创面不同时间点微血管密度

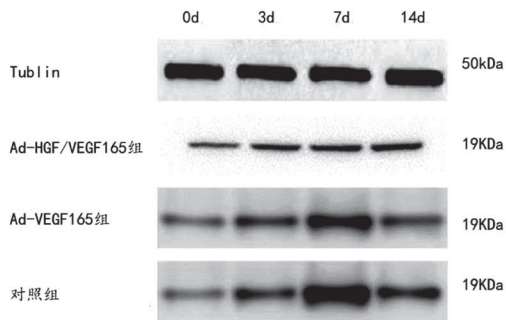


图6 三组创面不同时间Western blot方法检测VEGF表达情况

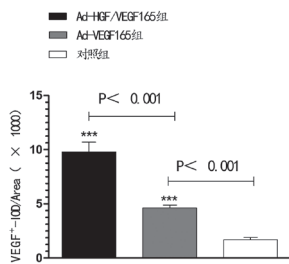
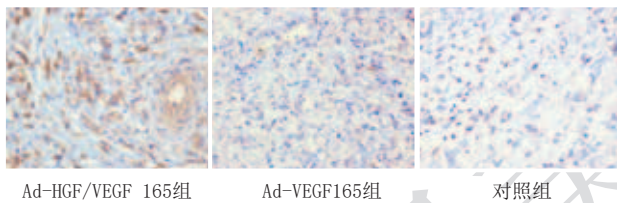


图7 三组创面治疗7 d免疫组化方法检测VEGF表达情况 (400×)

3 讨论

创面修复过程是一系列复杂的生物学过程,多种细胞因子及生长因子参与其中并发挥不同的调节作用,共同参与炎症反应、毛细血管新生、组织重构的修复过程^[8-9]。有效的创面修复需要新鲜肉芽组织形成和大量的血管生成,以保证创基的营养供应及细胞外基质的沉积,故血管新生对于创面愈合具有至关重要的作用^[1-2]。许多学者通过VEGF转基因技术直接注射于创面局部,发现外源性的VEGF可增强创面组织中VEGF受体的表达,对创面局部血管生成及细胞外基质合成具有促进作用,有利于创面愈合^[10-12]。用Ad-VEGF基因转染复合皮,可以观察到具有刺激新生血管形成作用,可有效提高皮片愈合质量^[13]。肝细胞生长因子

(HGF)作为另一种多功能性生长因子,对于多种细胞运动、生长等具有一定调节作用,通过旁分泌或自分泌方式诱导上皮细胞迁徙及促进血管生成^[14]。有研究表明,HGF不仅能够促进角质细胞的增殖与迁移,以剂量依赖方式促进毛细血管出芽生长和创面的再上皮化,发挥促进损伤修复的作用,并能抑制瘢痕形成。而且,通过HGF/c-Met信号通路诱导内皮细胞的增殖、迁移和形态学变化^[15]。对大鼠心肌细胞增殖、迁移也具有明显促进作用,并降低组织纤维化,改善了梗死后的心肌功能^[16-17]。Huang C等^[14]应用HGF 7 d后可明显增多血管内皮祖细胞(Endothelial progenitor cells, EPC)并促进其分化和动员,最终可有效增加血管数量。此外,HGF可促进骨髓间充质干细胞发生迁移,进而促进体外毛细血管样结构的发育^[18-19]。VEGF和HGF促进血管新生的作用已被证实,将两者联合使用在创面修复中,是否能够更加有效的加速血管形成,促进创面修复值得探究。

腺病毒载体转基因具有转染率高、可供转导细胞多、对宿主细胞无干扰等优点,安全性高,广泛应用于疫苗研发、生物制药及各种疾病的基因治疗。本研究构建携带血管内皮生长因子(VEGF 165)及肝细胞生长因子(HGF)双基因腺病毒载体,采用创缘局部注射给药的方法,观察其对大鼠背部皮肤全层缺损创面愈合的影响。免疫组化结果显示实验组术后第7天VEGF高表达,而对照组表达量极低,说明本实验局部应用Ad-HGF/VEGF165转染成功。大体观察显示双基因治疗组创基新鲜,肉芽生长旺盛,上皮化速度明显加快,明显优于对照组及单基因治疗组,提示双基因治疗在促进创面修复中表现出更加令人欣喜的优势。通过不同时间点创缘组织标本HE染色显示双基因治疗组创面细胞增殖旺盛,排列整齐紧密,毛细血管数量明显增加。免疫组化显示血管内皮细胞增殖活跃,双基因治疗组微血管密度(MVD)明显高于单基因治疗组和对照组,提示双基因治疗促进血管新生更加明显,进一步表明VEGF与HGF在促进血管生成方面具有协同效应,优于单一VEGF基因治疗。

本研究通过免疫组化及蛋白印迹法测定不同时间点VEGF表达情况,结果显示基因治疗组VEGF表达量约在第7天时达到高峰,持续到14 d仍维持在较高水平,提示腺病毒转染的基因治疗至少可以维持2周的作用,甚至更长时间,这对于加速创面修复来说至关重要。高浓度的VEGF可提高毛细血管通透性,以利于血浆中纤维蛋白原等大分子物质进入细胞外基质中形成纤维蛋白凝胶等,从而作为暂时性基质支持新生血管和基质细胞的内生性生长^[20-21]。同时,丰富的血液供应不仅为成纤维细胞的增殖及胶原的合成提供足够的营养成分、氧气和其他生长因子,加速肉芽组织的生长,还为肉芽组织输送足够的炎症反应物,从而提供了伤口局部抗感染能力及减少妨碍肉芽组织生长的因素^[22]。实验中还发现,双基因治疗组VEGF表达量是高于单基因组,提示HGF在VEGF表达过程中起着积极的促进作用,两者的协同能够更加有效地促进血管的新生和调节组织的修复过程,

从而加速创面修复。Awada HK等^[23]研究表明HGF和VEGF联合应用对血管内皮细胞的增殖、迁徙和生成能力具有促进作用。HGF对VEGF的表达具有诱导作用^[24]。研究证实HGF还可通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)诱导VEGF的分泌和表达,并在细胞外基质促进VEGF的活性成倍增加^[25-28]。上述研究从不同的方向亦证明了VEGF和HGF在血管新生方面具有协同作用,但其内在相互作用机制仍需进一步研究。

综上, Ad-HGF/VEGF165双基因疗法在促进血管新生,加速急性创面上皮化中发挥着积极的作用,优于单基因疗法。VEGF和HGF在创面修复过程中表现出协同效应,两者通过改善血管通透性,增强细胞增殖、迁移、分泌功能,有助于血管生成和细胞外基质的沉积,从而加速了创面的愈合。本研究还观察到实验组在创面修复早期炎症浸润更加明显,细胞排列更加整齐,其是否在创面抗感染及抑制瘢痕形成中亦发挥着积极作用,值得继续深入研究。同时,随着我国老龄化社会的到来,血管性溃疡、糖尿病性溃疡、压疮等各种慢性创面成为整形外科修复难题,双基因疗法在促进急性创面修复中表现出来的积极作用也为慢性创面的治疗提供新的思路,笔者团队也将进一步探索研究,为双基因疗法早日实现临床应用提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 蒯权, 王宜梅, 李聪, 等. SVF-gel促进糖尿病鼠创面愈合的初步实验研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2019,15(1):13-16.
- [2] 刘鸿雁, 蒋婷, 黄文炼, 等. 同种异体PRP联合ADSC对小鼠皮肤创面再生愈合情况及血清HA、VEGF水平的影响[J]. 海南医学院学报, 2019,25(14):1041-1045.
- [3] 徐佳, 李茜, 乔嘉, 等. 外源性VEGF联合“夹心法”矫治半侧颜面短小的实验研究[J]. 中国美容医学, 2018,27(9):117-121.
- [4] 孙天骏, 韩焱福, 柴家科. VEGF基因治疗与血管化作用的研究进展[J]. 中国美容医学, 2010,19(2):288-290.
- [5] Barc P, Antkiewicz M, Sliwa B, et al. Double VEGF/HGF gene therapy in critical limb ischemia complicated by diabetes mellitus[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2021,14(3):409-415.
- [6] Slobodkina E, Boldyreva M, Karagyaur M, et al. Therapeutic angiogenesis by a "dynamic duo": simultaneous expression of hgf and VEGF165 by novel bicistronic plasmid restores blood flow in ischemic skeletal muscle[J]. Pharmaceutics, 2020,12(12).
- [7] Makarevich P, Tsokolaeva Z, Shevelev A, et al. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle[J]. PLoS One, 2012,7(6):e38776.
- [8] Eming S A, Krieg T, Davidson J M. Gene therapy and wound healing[J]. Clin Dermatol, 2007,25(1):79-92.
- [9] 李忠兴, 王嘉欣, 何金凤, 等. 富血小板血浆对下肢慢性难愈合伤口的修复作用及外观影响[J]. 中国美容医学, 2022,31(7):51-55.
- [10] 彭湃, 郭树忠, 贾宁, 等. 纳米微囊包裹血管内皮细胞生长因子对创伤组织中细胞因子表达的调控(英文)[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(22):4447-4450.
- [11] 杨加峰, 武士清, 赵冬梅, 等. pcDNA3.1-血管内皮生长因子165质粒局部注射对大鼠软组织缺损修复的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(20):3901-3904.
- [12] 陈伟, 付小兵, 孙同柱, 等. 内皮细胞生长因子表达质粒的构建及其促进烫伤愈合的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2002,9(2):48-50.
- [13] 崔正军, 雷万军, 陈海州, 等. 血管内皮生长因子基因感染对大鼠创面移植复合皮的影响[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2008,2(1):32-37.
- [14] Huang C, Zheng X, Mei H, et al. Rescuing impaired re-endothelialization of drug-eluting stents using the hepatocyte growth factor[J]. Ann Vasc Surg, 2016,36:273-282.
- [15] Fu J, Su X, Li Z, et al. HGF/c-MET pathway in cancer: from molecular characterization to clinical evidence[J]. Oncogene, 2021,40(28):4625-4651.
- [16] Shimamura M, Nakagami H, Sanada F, et al. Progress of gene therapy in cardiovascular disease[J]. Hypertension, 2020,76(4):1038-1044.
- [17] Zhang Z, Long C, Guan Y, et al. Hepatocyte growth factor intervention to reduce myocardial injury and improve cardiac function on diabetic myocardial infarction rats[J]. Eur J Histochem, 2020,64(s2):3142.
- [18] 林晓莹, 汪虹, 谭元. 肝细胞生长因子在创面修复中的作用[J]. 中国医学科学院学报, 2018,40(6):822-826.
- [19] Valente S, Ciavarella C, Pasanisi E, et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells derived from human arteries: a novel strategy to accelerate vascular ulcer wound healing[J]. Stem Cells Int, 2016,2016:3232859.
- [20] 赵兴东. VEGF促进模拟不吻合静脉兔断肢再植成活的研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2009.
- [21] 史旭锋, 魏冬, 余小平, 等. 血管内皮生长因子介导的血管新生促进创面愈合的研究进展[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2021,16(6):536-538.
- [22] 李静, 赵树铭. 血小板释放的生长因子与组织皮肤创伤愈合的关系[J]. 重庆医学, 2007,36(21):2157-2159.
- [23] Awada H K, Johnson N R, Wang Y. Dual delivery of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor coacervate displays strong angiogenic effects[J]. Macromol Biosci, 2014,14(5):679-686.
- [24] Li L, Jiang X, Zhang Q, et al. Neuropilin-1 is associated with clinicopathology of gastric cancer and contributes to cell proliferation and migration as multifunctional co-receptors[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016,35:16.
- [25] Ntellas P, Mavroeidis L, Gkoura S, et al. Old player-new tricks: non angiogenic effects of the VEGF/VEGFR pathway in cancer[J]. Cancers (Basel), 2020,12(11):3145.
- [26] Moosavi F, Giovannetti E, Saso L, et al. HGF/MET pathway aberrations as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in human cancers[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2019,56(8):533-566.
- [27] Melincovici C S, Bosca A B, Susman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. Rom J Morphol Embryol, 2018,59(2):455-467.
- [28] Barc P, Antkiewicz M, Sliwa B, et al. Treatment of Critical Limb Ischemia by pIRES/VEGF165/HGF Administration[J]. Ann Vasc Surg, 2019,60:346-354.

[收稿日期] 2023-12-20

本文引用格式: 闫洪伟, 赵毅, 刘华, 等. 肝细胞生长因子/血管内皮生长因子165双基因疗法加速皮肤全层缺损创面愈合的实验研究[J]. 中国美容医学, 2025,34(5):1-5.