

不同胎龄小鼠脑组织中神经干细胞所占比例的研究

张凤兰¹, 杨璐军^{2,3}, 朱红梅¹, 张南炆¹, 沙学芳⁴, 朱柯颖⁴, 肖志成^{1,5*}

(1. 昆明医科大学分子临床医学研究院, 云南省干细胞和再生医学重点实验室, 昆明 650500; 2. 深圳市宝安区人民医院, 深圳 518101; 3. 南方医科大学珠江医院神经外科, 广东神经外科研究所, 广东省脑功能修复与再生重点实验室, 广州 510282; 4. 昆明医科大学基础医学院, 昆明 650500; 5. 澳大利亚莫纳什大学免疫与干细胞研究中心, 墨尔本 VIC3010)

【摘要】 目的 详细了解并比较不同胎龄小鼠全脑和大脑皮层组织中神经干细胞(neural stem cells, NSCs)所占比例, 为后期优化分离培养 NSCs 提供直接量化数据。**方法** 分离不同胎龄小鼠全脑(胎龄 12.5、14、16 和 18 d)和大脑皮层(胎龄 14、16 和 18 d)组织, 消化成单细胞悬液, 贴壁培养 3 ~ 4 h, 细胞免疫荧光标记 NSCs 特异性标记物 Nestin, 统计分析各组中 NSCs 所占比例。另外, 通过实时荧光定量 PCR 技术检测 Nestin mRNA 在不同胎龄(12.5、14、16 和 18 d)小鼠大脑皮层中的表达水平。**结果** 细胞免疫荧光结果显示, 分离培养的不同胎龄小鼠全脑和大脑皮层组织中均有 Nestin 阳性细胞。在分离培养的小鼠全脑组织中胎龄 12.5 d 组 NSCs 所占比例最高, 为 $53.42\% \pm 1.57\%$; 胎龄 18 d 组 NSCs 所占比例最低, 为 $25.96\% \pm 1.31\%$, 而胎龄 14 d 组和 16 d 组位于二者之间。在分离培养的不同胎龄小鼠大脑皮层组织中, 胎龄 14 d 组 NSCs 所占比例最高, 为 $33.65\% \pm 0.29\%$; 胎龄 18 d 组比例最低, 为 $25.29\% \pm 0.28\%$, 胎龄 16 d 组位于二者之间($26.82\% \pm 0.30\%$)。实时荧光定量 PCR 结果显示, 当把胎龄 12.5 d 组的小鼠大脑皮层组织中 Nestin mRNA 表达水平设定为 1, 胎龄 14 d 组的小鼠大脑皮层组织中 Nestin mRNA 的相对表达量为 0.83 ± 0.04 , 胎龄 16 d 组为 0.77 ± 0.05 , 胎龄 18 d 组为 0.44 ± 0.05 。因此, 随着小鼠胎龄增加, 小鼠大脑皮层中的 Nestin mRNA 的表达水平逐渐下降。**结论** 在小鼠大脑发育过程中, 随着胎龄增加, 分离培养的小鼠全脑和大脑皮层组织中神经干细胞比例逐渐降低。

【关键词】 小鼠; 不同胎龄; 神经干细胞; 全脑; 大脑皮层

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0048-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.009

Proportion of neural stem cells in brain tissues of mice at different embryonic days

ZHANG Feng-lan¹, YANG Lu-jun^{2,3}, ZHU Hong-mei¹, ZHANG Nan-yang¹,
SHA Xue-fang⁴, ZHU Ke-ying⁴, XIAO Zhi-cheng^{1,5*}

(1. Key Laboratory of Stem Cell And Regenerative Medicine, Institute of Molecular And Clinical Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Department of Neurosurgery, Baoan People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518101; 3. Neurosurgery Institute, Key Laboratory on Brain Function Repair And Regeneration of Guangdong Province, Department of Neurosurgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282; 4. Basic Medical College, Kunming Medical University, Kunming 650500; 5. Department of Anatomy And Developmental Biology, Monash University, Clayton, Victoria 3800 Australia)

【基金项目】 云南省高端人才引进计划(编号:20080A004); 云南省干细胞和再生医学重点实验室(编号:2015DG027)。

【作者简介】 张凤兰(1986-), 女, 博士研究生, 研究方向: 神经干细胞与 miRNAs。Email: FenglanZhang2016@126.com

【通讯作者】 肖志成(1957-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经退行性疾病。Email: zhicheng.xiao@monash.edu

【Abstract】 Objective To understand and compare the proportion of neural stem cells (NSCs) in the whole brain and cerebral cortex of mice at different embryonic days, and provide quantitative data for the later optimization of NSCs isolation and culture. **Methods** The whole brains (at embryonic 12.5, 14, 16 and 18 days) and cerebral cortex (at embryonic 14, 16 and 18 days) were isolated and digested into single cell suspension, and were adherently cultured for 3 – 4 h. Immunofluorescence staining of Nestin, a NSCs specific marker, was used to statistically analyze the proportion of NSCs in each group. Expression of Nestin mRNA in the cerebral cortex of mice at E12.5, E14, E16, and E18 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The result of immunofluorescence assay showed that there were Nestin-positive cells in the whole brain and cerebral cortex of mice at different embryonic days. In the whole brain, the proportion of NSCs was highest at E12.5 ($53.42 \pm 1.57\%$) and lowest at E18 ($25.96 \pm 1.31\%$), and the proportions at E14 and E16 were placed in the middle among the groups. In the cerebral cortex, the highest proportion of NSCs was at E14 ($33.65 \pm 0.29\%$), and the lowest at E18 ($25.29 \pm 0.28\%$), and the middle at E16 ($26.82 \pm 0.30\%$). The result of real-time PCR showed that when the mRNA expression of Nestin in the cerebral cortex was set to 1, the relative mRNA expression of Nestin was 0.83 ± 0.04 at E14, 0.77 ± 0.05 at E16, and 0.44 ± 0.05 at E18. Thus, the mRNA expression level of Nestin in the mouse cerebral cortex was gradually decreasing with the increase of embryonic days. **Conclusions** During the brain development, the proportion of NSCs is gradually decreasing in the whole brain and cerebral cortex of mice with the increase of embryonic days.

【Key words】 Mouse; Embryonic days; Neural stem cells; Brain development; Cerebral cortex

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是中枢神经系统中一类能够自我更新,增殖并分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的细胞^[1,2]。1992, Reynolds 和 Weiss 在成体小鼠纹状体中首次分离培养出 NSCs^[3]。自此以后, NSCs 的基础研究和临床应用成为国内外新热点^[4,5]。近年来,小鼠 NSCs 体外分离培养技术已被广泛报道,但是所用小鼠胎龄有所不同^[6]。本实验旨在统计分析分离培养的不同胎龄小鼠全脑和大脑皮层细胞中 NSCs 所占比例及差异,为后期优化培养高纯度 NSCs 提供直接量化数据和前期研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号【SCXK(京)2011-0011】,后在昆明医科大学清洁级实验动物房繁殖饲养【SYXK(滇)2005-0004】。

1.2 主要试剂

Nestin 抗体(Millipore 公司),山羊抗小鼠荧光二抗(Abcam 公司),DMEM/F12 细胞培养基(Gibco 公司),碱性成纤维生长因子(bFGF, Peprotech 公司),表皮生长因子(EGF, Peprotech 公司),B27 (Gibco 公司),0.05% EDTA-胰蛋白酶(Gibco 公司),多聚甲醛(索莱宝公司),BSA(索莱宝公司),DAPI(罗氏公司),Trizol(Sigma 公司),DNaseI(宝生物公司),PrimerScript RT reagent Kit(宝生物公司),Faststart Universal SYBR Green Master(ROX)(罗氏

公司)

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠大脑组织细胞的分离培养

将 20 ~ 26 g 左右健康成年 C57BL/6 雌性小鼠与雄性小鼠于傍晚合笼,次日观察雌性小鼠有无阴道栓,若有则表示交配成功,记为胎龄 0.5 d (embryonic 0.5 d, E0.5)。标记多只孕鼠,分别在胎龄 12.5 d (E12.5)、14 d (E14)、16 d (E16) 和 18 d (E18) 时使用。将孕鼠麻醉,在无菌条件下每组至少分离 3 ~ 4 只雌雄不限的胎鼠全脑和大脑皮层,加入适量 0.05% EDTA-胰蛋白酶在 37℃ 水浴中消化脑组织,然后轻柔吹散成单个细胞,800 rpm 离心 10 min,弃上清,加入含 2% B27, 20 ng/mL 的 EGF 和 bFGF 的 DMEM/F12 生长培养基调整细胞密度,按照 5×10^5 cells/mL 接种至已包被细胞外基质的 24 孔细胞培养板中培养 3 ~ 4 h。然后加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,用于后期细胞免疫荧光实验。

1.3.2 细胞免疫荧光染色

将固定的细胞用 PBS 洗 3 遍,孔内加入 0.3% Triton X-100 打孔 10 min,然后加入 10% BSA 室温封闭 1 h。再次用 PBS 洗 3 遍,加入 Nestin 一抗(1:50)4℃ 孵育过夜,次日用 PBS 清洗后加入相应的二抗(1:1000)室温孵育 1 h(此后需避光),最后加入 DAPI 细胞核染色 5 min。荧光显微镜下观察,然后每个样品随机采集至少 5 张细胞分布较均匀的图片,计数 Nestin 阳性细胞和 DAPI 阳性细胞并计算二者比例。

1.3.3 RNA 抽提及 real-time PCR

每组至少分离 3 只 12.5 d (E12.5)、14 d (E14)、16 d (E16) 和 18 d (E18) 胎龄的雌雄不限的胎鼠大脑皮层,加入适量 Trizol 研磨至组织完全溶解,按照说明书操作步骤抽提总 RNA,加入 DNaseI 去除基因组 DNA。然后按照 Primer Script RT reagent Kit (Perfect Real-time) 说明书逆转获取 cDNA。应用 ABI7300 型荧光定量 PCR 仪,使用 Faststart Universal SYBR Green Master(ROX) 进行扩增。*Nestin* 上游引物序列为 5'-AAAGTTCCAGCTGGCTGTGG-3',下游引物序列为 5'-TGGGGTCAGGAAAGCCAAGA-3',*Gapdh* 上游引物序列为 5'-TGACGTGCCCGCCTGGAGAAA-3',下游引物序列为 5'-AGTGTAGCCCCAAGATGCCCTTCAG-3'。实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析。

1.4 统计学方法

实验结果用均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示,利用 GraphPad prism5.0 软件采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 Tukey's 或 Bonferroni's post hoc 分析 3 组及以上数据之间的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 不同胎龄小鼠全脑 NSCs 的比例及差异

通过观察 4 组细胞免疫荧光图发现,不同胎龄小鼠全脑组织细胞经消化分离后,未见细胞团块几乎全为单细胞,且未发现碎裂细胞残片。细胞贴壁培养 3 ~ 4 h 后,能较好贴壁。DAPI 阳性细胞呈蓝色,在细胞核中均匀分布。*Nestin* 阳性细胞呈绿色,在细胞质中均匀分布。且胎龄 12.5 d 组 *Nestin* 阳性细胞比例较胎龄 14、16 d 和 18 d 组高 (图 1)。

细胞免疫荧光统计分析显示,胎龄 12.5 d 组分离培养的全脑细胞中 NSCs 所占比例最高,为 $53.42\% \pm 1.57\%$,并与其他三组差异有显著性 ($P < 0.001$)。胎龄 18 d 组所占比例最低,为 $25.96\% \pm 1.31\%$,胎龄 14 d 和 16 d 组位于二者之间。另外,胎龄 14 d 组 NSCs 比例 ($33.77\% \pm 1.12\%$) 与胎龄 18 d 组之间差异有显著性 ($P < 0.05$,未标注) (图 2)。

2.2 不同胎龄小鼠大脑皮层 NSCs 的比例及差异

观察 3 组不同胎龄小鼠大脑皮层细胞的免疫荧光图,发现无细胞团块,无碎裂细胞残片 (与图 1 类似),且胎龄 14 d 组 *Nestin* 阳性细胞比例较胎龄 16 d 和 18 d 组高 (图 3)。

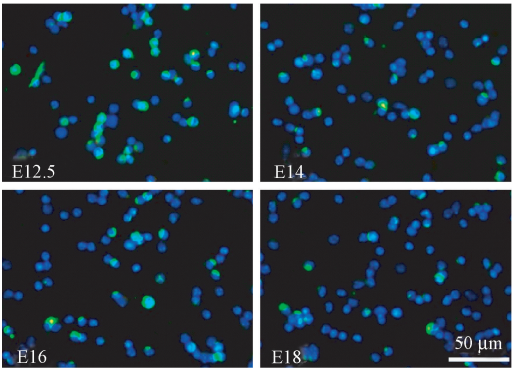
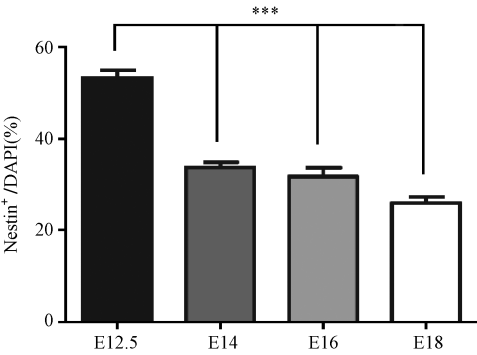


图 1 不同胎龄小鼠全脑组织中的 NSCs (细胞免疫荧光染色)

Fig. 1 NSCs in the whole brain of mice at different embryonic days (Imunofluorescence staining)



注: *** $P < 0.001$ 。

图 2 不同胎龄小鼠全脑组织 NSCs 的比例

Note. *** $P < 0.001$ showing a significant difference at different embryonic days.

Fig. 2 Proportion of NSCs in the whole brain of mice at different embryonic days

细胞免疫荧光统计分析显示,胎龄 14 d 组小鼠大脑皮层细胞中 NSCs 所占比例最高,为 $33.65\% \pm 0.29\%$;胎龄 18 d 组所占比例最低,为 $25.29\% \pm 0.28\%$ 。胎龄 14 d 组与 16 d 组 ($P < 0.01$) 和 18 d 组 ($P < 0.001$) 之间差异有显著性,但胎龄 16 d 组与 18 d 组之间差异无显著性 (图 4)。

2.3 不同胎龄小鼠大脑皮层中 Nestin mRNA 的表达水平

Real-time PCR 检测胎龄 12.5、14、16 d 和 18 d 时小鼠大脑皮层中 *Nestin* mRNA 的表达水平结果显示,当把胎龄 12.5 d 组小鼠大脑皮层的 *Nestin* mRNA 表达水平设定为 1 时,胎龄 14 d 组的相对表达量为 0.83 ± 0.04 ,16 d 组为 0.77 ± 0.05 ,18 d 组为 0.44 ± 0.05 。其中,胎龄 18 d 组小鼠大脑皮层中的 *Nestin* mRNA 表达水平最低,与另外三组差异

有显著性($P < 0.01$ 或 0.001)。另外,胎龄 12.5 d 组与胎龄 16 d 组之间差异有显著性($P < 0.05$, 未标

注)(图 5)。由此可知,随着小鼠胎龄增加,小鼠大脑皮层中 Nestin mRNA 的表达水平逐渐下降。

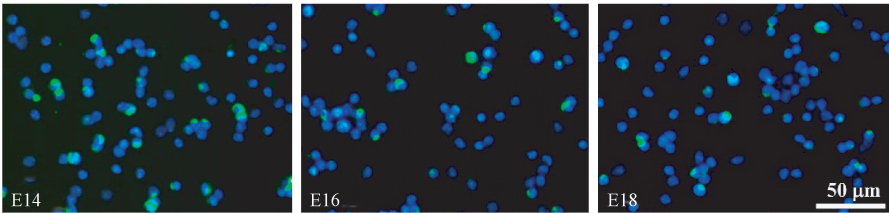
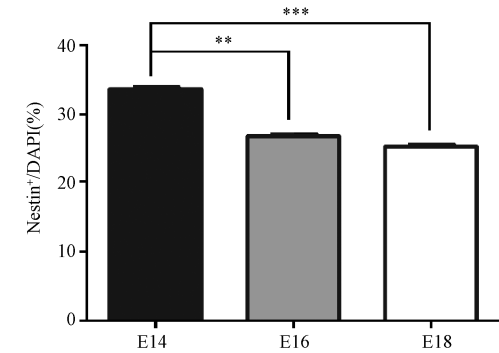


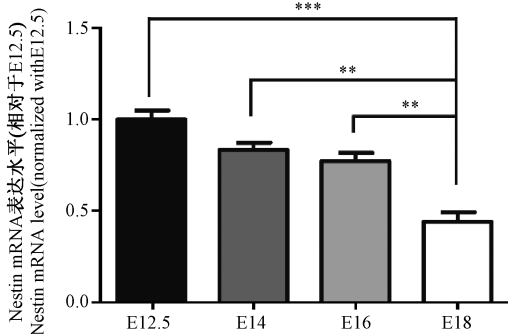
图 3 不同胎龄小鼠大脑皮层的 NSCs(细胞免疫荧光染色)
Fig.3 NSCs in cerebral cortex of mice at different embryonic days
(Immunofluorescence staining)



注: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

图 4 不同胎龄小鼠大脑皮层 NSCs 的比例
Note. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Fig.4 Proportions of NSCs in the cerebral cortex of mice at different embryonic days



注: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

图 5 不同胎龄小鼠大脑皮层中 Nestin mRNA 的表达水平

Note. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Fig.5 Expression of Nestin mRNA in the cerebral cortex of mice at different embryonic days

3 讨论

NSCs 的发现是神经科学领域的重要进展,彻底改变了人们以往认为中枢神经不能再生的传统理念,为神经系统的研究与应用开辟了广阔的前

景^[7,8]。但是,目前 NSCs 的来源及数量不足仍是临床应用和基础研究中普遍存在的问题^[1,9]。因此,优化 NSCs 的体外培养对于研究其潜在价值具有重要意义。

目前,在小鼠的脑源性 NSCs 研究中,已经建立以胎鼠、新生鼠和成体鼠作为主要供体来源的 NSCs 培养方法^[10,11]。但就胎鼠而言,各科研机构取材时间有所不同,主要集中于胎龄 12 d 至胎鼠出生前^[12,13]。虽然取自不同胎龄小鼠脑组织的神经干细胞都能自我更新,增殖并可以诱导分化,但是如何提高 NSCs 占分离培养总细胞的比例,减少杂细胞在 NSCs 培养中造成的负面影响是 NSCs 培养实验中非常重要的前期工作^[14]。因此,充分了解并比较来自不同胎龄小鼠脑组织中 NSCs 的比例及其差异是十分必要的。

Nestin 是一种中间纤维丝,属于细胞骨架蛋白^[15,16]。它在早期胚胎发育的神经外胚层细胞中强烈表达,随着神经细胞的迁移和分化表达逐渐减弱,并在神经细胞的分化完成后表达停止^[17]。该蛋白是目前广泛使用的 NSCs 特异性标记物^[1,15],由神经组织分离培养的细胞,通过细胞免疫荧光染色认为 Nestin 阳性标记细胞即为 NSCs。

本实验细胞免疫荧光结果表明在小鼠全脑组织分离培养的细胞中,胎龄 12.5 d 组 NSCs 占总细胞的比例明显高于其他三组,并约为胎龄 18 d 组比例的两倍。胎龄 14 d 组与 18 d 组之间也有显著性差异。在小鼠大脑皮层分离培养的细胞中,胎龄 14 d 组 NSCs 占总细胞的比例明显高于胎龄 16 d 组和胎龄 18 d 组。另外,由于胎龄 12.5 d 时小鼠的大脑发育处于初期,大脑体积较小,大脑皮层较薄,消化后所得细胞量较少且细胞死亡率较高,对实验结果造成较大误差,故本实验未将其结果纳入分析。Real-time PCR 实验检测小鼠大脑皮层发育过程中

Nestin mRNA 的表达水平变化,结果显示胎龄 18 d 组小鼠的大脑皮层中 Nestin mRNA 表达水平显著低于胎龄较小的其他三组。因此,随着小鼠胎龄增加,小鼠大脑皮层中的 Nestin mRNA 表达量逐渐降低,此结果与细胞免疫荧光结果基本一致。

刘晓梅等^[18]通过对胎龄 8.5 d 至 13.5 d 的 Nestin-GFP 转基因小鼠胚胎进行冰冻切片,观察发现 Nestin 随着胚胎发育表达逐步增强,在胎龄 11.5 d 至 13.5 d 时最强。尹晓娟等^[19]通过 Nestin 免疫组化技术分别比较分析了不同胎龄人胎脑室下区 NSCs 在形态和存在方式上的差异,发现 NSCs 数量随着胎龄的增加而减少。杨蓬勃等^[20]通过 HE 染色和免疫组化实验发现人胎脑 VZ/SVZ 内含有大量 Nestin 阳性细胞,随着发育进行 Nestin 免疫反应强度和阳性细胞数都逐步降低。此三者研究结果与本研究结果较一致。吴雨岭等^[21]通过 Nestin 免疫组织化学方法检测 11、15 和 19 d 胎龄的 Wistar 大鼠脑组织中 Nestin 阳性 NSCs 的分布及比例,发现随着胎龄增加脑室室管膜及管膜下区 NSCs 逐渐增多,19 d 时 Nestin 阳性细胞多达 86.1% ± 11.72%,此结果与本研究结果及大多数已报道实验结果有较大差异。

本实验通过将分离的脑细胞短暂贴壁培养后立即进行 Nestin 细胞免疫荧光染色,能真实反映所分离脑组织中 NSCs 数量及比例,且样品为单层细胞,便于统计分析,数据可靠性更高。另外,本方法还能检测分离脑组织细胞过程中操作是否合格,是否因操作不足有细胞团块存在或操作过度有细胞死亡或细胞碎片存在等。

综上所述,在分离培养小鼠 NSCs 实验中,我们推荐分离 12.5 d 胎龄的小鼠全脑或者 14 d 胎龄的小鼠大脑皮层进行培养,以获得起始纯度较高的 NSCs,通过快速扩增,用于后期实验。

参考文献:

- [1] English D, Sharma NK, Sharma K, et al. Neural stem cells-trends and advances[J]. J Cell Biochem, 2013, 114 (7): 764 - 772.
- [2] Murphy M, Reid K, Dutton R, et al. Neural stem cells[J]. J Invest Dermatol Symp Proc, 1997, 2 (1): 8 - 13.
- [3] Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J]. J Neurosci, 1992, 12 (11): 4565 - 4574.
- [4] Conti L, Cattaneo E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? [J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11 (3): 176 - 187.
- [5] Walker T, Huang J, Young K. Neural stem and progenitor cells in nervous system function and therapy [J]. Stem Cells Int, 2016; 1890568.
- [6] Steffenhagen C, Kraus S, Dechant FX, et al. Identity, fate and potential of cells grown as neurospheres: species matters [J]. Stem Cell Rev, 2011, 7 (4): 815 - 835.
- [7] Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, et al. Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain [J]. J Physiol Sci, 2016, 66 (3): 197 - 206.
- [8] 唐玺和, 陈志国, 张愚. 诱导神经干细胞的研究进展及应用前景 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25 (2): 67 - 70.
- [9] Azari H, Sharififar S, Rahman M, et al. Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay [J]. J Vis Exp, 2011, 114 (4): 764 - 772.
- [10] Louis SA, Mak CK, Reynolds BA. Methods to culture, differentiate, and characterize neural stem cells from the adult and embryonic mouse central nervous system [J]. Methods Mol Biol, 2013, 946: 479 - 506.
- [11] Morte MI, Carreira BP, Machado V, et al. Evaluation of proliferation of neural stem cells in vitro and in vivo [M]. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2013, Chapter 2: Unit 2D. 14.
- [12] Sirko S, von Holst A, Wizenmann A, et al. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells [J]. Development, 2007, 134 (15): 2727 - 2738.
- [13] Torrado EF, Gomes C, Santos G, et al. Directing mouse embryonic neurosphere differentiation toward an enriched neuronal population [J]. Int J Dev Neurosci, 2014, 37: 94 - 99.
- [14] Gritti A, Dal Molin M, Foroni C, et al. Effects of developmental age, brain region, and time in culture on long-term proliferation and multipotency of neural stem cell populations [J]. J Comp Neurol, 2009, 517 (3): 333 - 349.
- [15] Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, et al. Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells [J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17 (2): 259 - 273.
- [16] 曲春辉, 张玲, 武杰, 等. 大鼠羊膜细胞体外培养及其干细胞标记物的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 35 (4): 61 - 65.
- [17] Gilyarov AV. Nestin in central nervous system cells [J]. Neurosci Behav Physiol, 2008, 38 (2): 165 - 169.
- [18] 刘晓梅. Nestin 基因敲除对小鼠胚胎发育和神经干细胞的增殖与分化的影响 [D]. 广州: 中山大学. 2007.
- [19] 尹晓娟, 巨容, 封志纯. 不同胎龄人胎脑室下区神经干细胞生长特征及增殖分化实验研究 [J]. 中华儿科杂志, 2006, 44 (7): 500 - 504.
- [20] 杨蓬勃, 靳辉, 肖欣莉, 等. 人胎脑额叶下 VZ/SVZ 的发育及其内 nestin 阳性细胞的分布 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 33 (5): 708 - 712.
- [21] 吴雨岭, 余鸿, 郭勇, 等. 不同胎龄大鼠大脑神经干细胞的分布比较 [J]. 四川解剖学杂志, 2005, 13 (2): 1 - 3.