

# 安神养血口服液对更年期综合征大鼠的影响

梁 鹏， 郭富双， 蒋璐慧， 陈俐秀， 焦爱军\*， 王 捷\*

(广西医科大学药学院，广西 南宁 530021)

**摘要：**目的 研究安神养血口服液对更年期综合征大鼠的治疗效果及机制。方法 大鼠随机分为正常对照组，假手术组，模型组，安神养血口服液低、中、高剂量组，戊酸雌二醇组，每组10只。各组小鼠灌胃给予相应药物28 d后，HE染色观察子宫组织病理变化，ELISA法检测血清雌二醇(E<sub>2</sub>)、促黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)、促性腺激素释放激素(GnRH)、睾酮(T)及下丘脑多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、五羟色胺(5-HT)、五羟吲哚乙酸(5-HIAA)、β-内啡肽(β-EP)水平，WST-1法、TBA法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平。结果 与模型组比较，安神养血口服液组大鼠血清E<sub>2</sub>、T、SOD水平升高(P<0.05, P<0.01)，LH、FSH、GnRH、MDA水平降低(P<0.05, P<0.01)，下丘脑5-HT、5-HIAA水平降低(P<0.01)，DA、NE、β-EP水平升高(P<0.05, P<0.01)，子宫系数增加(P<0.05)，可有效改善子宫组织病理变化。结论 安神养血口服液可以改善更年期综合征模型大鼠血清相关性激素及下丘脑单胺类神经递质水平，同时有效提高血液过氧化物酶活性，增强抗氧化作用。

**关键词：**安神养血口服液；更年期综合征；性激素；单胺类神经递质；抗氧化酶

**中图分类号：**R285.5

**文献标志码：**B

**文章编号：**1001-1528(2022)02-0593-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.049

更年期综合症是指妇女在绝经前后，由于卵巢功能的衰退或消失，导致性激素波动或减少，从而引起的一系列以自主神经系统功能紊乱为主，同时伴有神经心理症状的症候群，典型的临床表现为潮热、潮红、经期紊乱<sup>[1-2]</sup>。根据相关的流行病学调查统计报告显示，我国的更年期综合症发生率约为60%，其中20%左右的妇女会因为症状严重而被迫就医<sup>[3-4]</sup>。目前，西医治疗更年期综合症主要以雌激素补充治疗为主，治疗效果明显，可有效改善各种更年期症状。但长期使用雌激素，会引起机体产生各种不良反应，如水钠潴留、增加心脑血管危险性等，同时会提高子宫内膜癌、卵巢癌与乳腺癌的发生率<sup>[5]</sup>。相较而言，由于中医药对更年期综合症的治疗具有疗效确切，不良反应少等优点，越来越受到关注。中医认为“肾精亏虚为其本”，肾虚是引起更年期综合症的根本。因此，滋阴补肾是治疗更年期综合症的关键<sup>[6]</sup>。安神养血口服液，由广西医科大学制药厂研发生产。其中主要含有钩藤、金不换、制何首乌、首乌藤、松针、鸡血藤、生地黄等中药成分，当前主要用于肝血不足引起的失眠、健忘，治疗效果明显，毒副作用小。本研究采用将雌性大鼠去势的方法建立大鼠更年期综合症模型<sup>[7]</sup>，研究安神养血口服液对更年期综合症的治疗效果及其可能的作用机制，为安神养血口服液新的临床适应症开发提供理论依据。

## 1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠，雌性，体质量(200±20)g，由广西医科大学动物实验中心提供，饲养环境符合SPF等級要求，实验动物生产许可证号SCXK(桂)2014-0002，动物使用许可证证号SYXK(桂)2014-0003。给予SPF级大鼠配合饲料，自由饮用纯净水，适应性饲养1周后，开始实验。

1.2 试剂与药物 安神养血口服液由广西医科大学制药厂提供，规格0.564 g/mL生药，批号20180201；戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司，批号404A)。瑞氏染色液(合肥博美生物科技有限责任公司，批号BMB2135)；丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所，批号分别为20181007、20190114)；血清雌二醇(E<sub>2</sub>)、促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、促性腺激素释放激素(GnRH)、睾酮(T)、下丘脑多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、五羟色胺(5-HT)、五羟吲哚乙酸(5-HIAA)、β-内啡肽(β-EP)ELISA试剂盒(上海源叶生物科技有限公司，批号分别为E20181001A、E20181001A、E20181001A、E20181001A、E20181001A、E20181101A、E20181101A、E20181101A、E20190101A、E20190101A)。

1.3 仪器 CD-UPH-II-20 L型超纯水器(成都越纯科技有

收稿日期：2020-03-03

基金项目：南宁市青秀区科学研究与技术开发计划项目(2016055)

作者简介：梁 鹏(1992—)，男(壮族)，硕士，从事中药民族药研究与开发工作。Tel：15878171930，E-mail：380272564@qq.com

\*通信作者：焦爱军(1967—)，女，硕士，教授，从事中药民族药研究与开发工作。Tel：13377131348，E-mail：807249683@qq.com

王 捷(1969—)，男，硕士，副教授，从事新药研究。E-mail：2218250952@qq.com

限公司); DTY-ZBJ-K45型颗粒制冰机(北京德天佑科技发展有限公司); UW620H型电子天平(日本岛津公司); TDL-5-A型台式离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司); Micro CL17R型高速低温离心机、MULTISKAN MK3型全波长酶标仪(美国Thermo公司); CX31+DP73型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

## 2 方法

2.1 模型制备 采用摘除大鼠双侧卵巢致大鼠去势, 制备更年期综合征模型<sup>[8]</sup>。

2.2 分组及给药 将70只大鼠按体质量随机分为正常对照组(10只)、假手术组(10只)、去势组(50只), 去势组再随机分为模型组, 安神养血口服液低、中、高剂量组(1.36、2.73、5.46 g/kg), 戊酸雌二醇组(0.18 mg/kg), 每组10只, 正常对照组、假手术组、模型组灌胃给予等量蒸馏水, 其他各组灌胃给予相应药物, 每天1次, 连续28 d。

2.3 采血 末次给药24 h后, 大鼠以1%戊巴比妥纳麻醉后固定, 腹主动脉取血, 3 000 r/min离心10 min, 取血清, 分装后置于-80℃冰箱中保存。

2.4 剖检及取材 大鼠采血后分离子宫, 保存于10%福尔马林溶液中, HE染色用于子宫组织的病理检查, 在光学显微镜下观察子宫病理变化, 分离摘取大鼠下丘脑, 精密称定质量后, 加入生理盐水(1:9)进行组织匀浆, 4℃、

3 000 r/min离心10 min, 取上清液待测。

2.5 血清相关性激素水平检测 ELISA法检测血清血清雌二醇(E<sub>2</sub>)、促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、促性腺激素释放激素(GnRH)、睾酮(T)水平。

2.6 血清超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)水平检测 WST-1法检测血清SOD活性, TBA法检测血清中MDA水平。

2.7 下丘脑组织中单胺类神经递质及β-内啡肽水平检测 ELISA法检测下丘脑多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、五羟色胺(5-HT)、五羟吲哚乙酸(5-HIAA)、β-内啡肽(β-EP)水平。

2.8 统计学分析 通过SPSS 20.0软件进行处理, 数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示, 计量资料先用Levene's做方差齐性和正态性检验, 若方差齐则采用单因素方差分析, 组间比较采用LSD检验; 若方差不齐则采用秩和检验。P<0.05表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 安神养血口服液对大鼠脏器指数的影响 与正常对照组、假手术组比较, 模型组大鼠子宫指数、肾上腺指数降低(P<0.05, P<0.01), 脾脏指数升高(P<0.05, P<0.01); 与模型组比较, 安神养血口服液高剂量组大鼠的子宫指数、肾上腺指数升高(P<0.05, P<0.01), 脾脏指数降低(P<0.01), 见表1。

表1 安神养血口服液对大鼠脏器指数的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=10)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	子宫指数/(mg·g <sup>-1</sup> )	肾上腺指数/(mg·g <sup>-1</sup> )	脾脏指数/(mg·g <sup>-1</sup> )
正常对照组	—	4.230±0.304	0.240±0.020	2.450±0.190
假手术组	—	4.527±0.272	0.239±0.018	2.337±0.129
模型组	—	0.487±0.061 <sup>△△#</sup>	0.210±0.027 <sup>△#</sup>	2.705±0.309 <sup>△#</sup>
戊酸雌二醇组	0.18×10 <sup>-3</sup>	0.939±0.111 <sup>**</sup>	0.244±0.034 <sup>*</sup>	2.429±0.344 <sup>*</sup>
安神养血口服液低剂量组	1.36	0.492±0.080	0.204±0.034	2.533±0.265
安神养血口服液中剂量组	2.73	0.593±0.061 <sup>**</sup>	0.230±0.037	2.388±0.203 <sup>**</sup>
安神养血口服液高剂量组	5.46	0.712±0.134 <sup>**</sup>	0.241±0.019 <sup>*</sup>	2.342±0.330 <sup>**</sup>

注:与正常对照组比较, <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01;与假手术组比较, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01;与模型组比较, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01。

3.2 安神养血口服液对大鼠血清性激素水平的影响 与正常对照组、假手术组比较, 模型组大鼠血清E<sub>2</sub>、T水平降低(P<0.01), FSH、GnRH、LH水平升高(P<0.01); 与假手术组比较, 正常对照组大鼠血清激素水平无显著差异

(P>0.05), 表明造模成功; 与模型组比较, 安神养血口服液高剂量组大鼠血清E<sub>2</sub>、T水平升高(P<0.05, P<0.01), FSH、GnRH、LH水平降低(P<0.05, P<0.01), 见表2。

表2 安神养血口服液对大鼠血清性激素水平的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=10)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	E <sub>2</sub> /(pmol·L <sup>-1</sup> )	FSH/(IU·L <sup>-1</sup> )	T/(nmol·L <sup>-1</sup> )	GnRH/(mIU·L <sup>-1</sup> )	LH/(mIU·mL <sup>-1</sup> )
正常对照组	—	27.89±3.17	5.75±0.23	2.54±0.26	35.58±2.29	23.65±0.67
假手术组	—	28.01±3.93	5.79±0.38	2.47±0.55	36.88±3.44	23.68±1.64
模型组	—	23.62±1.73 <sup>△△#</sup>	7.15±0.44 <sup>△△#</sup>	1.92±0.22 <sup>△△#</sup>	41.59±2.38 <sup>△△#</sup>	29.95±2.08 <sup>△△#</sup>
戊酸雌二醇组	0.18×10 <sup>-3</sup>	27.88±3.32 <sup>**</sup>	5.53±0.26 <sup>**</sup>	2.52±0.30 <sup>**</sup>	36.72±3.97 <sup>**</sup>	25.51±3.05 <sup>**</sup>
安神养血口服液低剂量组	1.36	25.44±2.71	6.96±0.40	2.01±0.34	41.22±3.12	28.67±1.77
安神养血口服液中剂量组	2.73	26.75±1.99 <sup>*</sup>	6.72±0.52 <sup>*</sup>	2.19±0.33 <sup>*</sup>	38.60±5.34	26.15±3.30 <sup>**</sup>
安神养血口服液高剂量组	5.46	27.69±3.87 <sup>**</sup>	6.05±0.34 <sup>**</sup>	2.32±0.32 <sup>**</sup>	37.14±3.26 <sup>*</sup>	25.97±2.50 <sup>**</sup>

注:与正常对照组比较, <sup>△△</sup>P<0.01;与假手术组比较, <sup>#</sup>P<0.01;与模型组比较, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01。

3.3 安神养血口服液对大鼠下丘脑单胺类神经递质水平的影响 与正常对照组、假手术组比较, 模型组大鼠下丘脑5-HIAA、5-HT水平提高(P<0.01), NE、DA水平降低(P<0.01); 与假手术组比较, 正常对照组大鼠相关神经递

质水平无显著差异(P>0.05), 表明造模成功; 与模型组比较, 安神养血口服液高、中剂量组大鼠下丘脑5-HIAA、5-HT水平降低(P<0.01), NE、DA水平提高(P<0.01), 见表3。

表3 安神养血口服液对大鼠下丘脑5-HIAA、5-HT、NE、DA水平的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=10)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	5-HIAA/(pg·mg <sup>-1</sup> )	5-HT/(ng·mg <sup>-1</sup> )	NE/(ng·mg <sup>-1</sup> )	DA/(ng·mg <sup>-1</sup> )
正常对照组	—	213.60±8.80	0.80±0.03	1.13±0.07	13.77±0.65
假手术组	—	215.93±11.18	0.81±0.05	1.16±0.11	13.84±0.87
模型组	—	262.13±9.77 <sup>△△#</sup>	0.93±0.04 <sup>△△#</sup>	0.90±0.05 <sup>△△#</sup>	11.72±0.58 <sup>△△#</sup>
戊酸雌二醇组	0.18×10 <sup>-3</sup>	220.08±8.59 <sup>**</sup>	0.76±0.03 <sup>**</sup>	1.13±0.07 <sup>**</sup>	14.02±0.64 <sup>**</sup>
安神养血口服液低剂量组	1.36	255.15±8.47	0.93±0.02	0.97±0.06 <sup>*</sup>	12.67±0.78 <sup>**</sup>
安神养血口服液中剂量组	2.73	246.63±9.09 <sup>**</sup>	0.89±0.03 <sup>*</sup>	1.03±0.08 <sup>**</sup>	13.11±0.72 <sup>**</sup>
安神养血口服液高剂量组	5.46	233.85±7.39 <sup>**</sup>	0.84±0.05 <sup>**</sup>	1.12±0.08 <sup>**</sup>	14.06±0.63 <sup>**</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>△△</sup>P<0.01;与假手术组比较,<sup>##</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>\*</sup>P<0.05,<sup>\*\*</sup>P<0.01。

### 3.4 安神养血口服液对大鼠血清SOD活性及MDA水平的影响

与正常对照组、假手术组比较,模型组大鼠血清中SOD活性降低(P<0.01),MDA水平提高(P<0.01);与

模型组比较,安神养血口服液各剂量组大鼠血清SOD活性均提高(P<0.05,P<0.01),MDA水平降低(P<0.01),见表4。

表4 安神养血口服液对大鼠血清SOD活性及MDA水平的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=10)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )
正常对照组	—	137.50±7.01	8.68±1.17
假手术组	—	133.22±8.38	9.65±1.37
模型组	—	113.74±4.34 <sup>△△#</sup>	15.26±1.09 <sup>△△#</sup>
戊酸雌二醇组	0.18×10 <sup>-3</sup>	140.22±6.33 <sup>**</sup>	10.06±0.59 <sup>**</sup>
安神养血口服液低剂量组	1.36	123.76±3.80 <sup>*</sup>	11.71±1.39 <sup>**</sup>
安神养血口服液中剂量组	2.73	132.18±4.52 <sup>**</sup>	11.43±0.60 <sup>**</sup>
安神养血口服液高剂量组	5.46	136.05±7.76 <sup>**</sup>	11.14±2.32 <sup>**</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>△△</sup>P<0.01;与假手术组比较,<sup>##</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>\*</sup>P<0.05,<sup>\*\*</sup>P<0.01。

### 3.5 安神养血口服液对大鼠下丘脑β-EP水平的影响

与正常对照组、假手术组比较,模型组大鼠下丘脑β-EP水平降低(P<0.01);与模型组比较,安神养血口服液中、高剂量组大鼠下丘脑β-EP水平升高(P<0.01),见表5。

表5 安神养血口服液对大鼠下丘脑β-EP水平的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=10)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	β-EP/(pg·g <sup>-1</sup> )
正常对照组	—	264.61±23.07
假手术组	—	274.83±15.70
模型组	—	206.36±27.26 <sup>△△#</sup>
戊酸雌二醇组	0.18×10 <sup>-3</sup>	254.73±24.89 <sup>**</sup>
安神养血口服液低剂量组	1.36	226.65±28.94
安神养血口服液中剂量组	2.73	253.46±28.90 <sup>**</sup>
安神养血口服液高剂量组	5.46	282.48±15.92 <sup>**</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>△△</sup>P<0.01;与假手术组比较,<sup>##</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>\*\*</sup>P<0.01。

3.6 安神养血口服液对大鼠子宫组织病理变化的影响 与正常对照组、假手术组比较,模型组大鼠子宫明显萎缩,子宫内膜萎缩变薄,内径狭窄,子宫内腺体极少;与模型组比较,各给药组大鼠子宫内膜厚度有所增加,子宫内径变宽,子宫内腺体增多,见图1。

## 4 讨论

更年期综合征的发病机理,其本质是卵巢功能的衰退或消失。由于卵巢是机体分泌血清雌二醇(E<sub>2</sub>)、睾酮(T)的主要器官,更年期综合征患者体内E<sub>2</sub>、T水平会出现大幅的降低<sup>[9]</sup>。与此同时,通过负反馈调节机制,下丘脑会提高促性腺激素释放激素(GnRH)的释放,进而促进垂体代偿性释放促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素

(LH)。因此,本实验通过摘除雌性大鼠双侧卵巢的方法复制更年期综合征模型,采用E<sub>2</sub>、T、GnRH、FSH、LH等指标以及子宫病理学评价安神养血口服液对更年期综合征所引起的雌激素紊乱及子宫的影响。结果显示,给予安神养血口服液干预治疗后,各项指标均出现了不同程度的缓解现象,表明安神养血口服液能有效改善更年期综合征模型大鼠的雌激素紊乱和对子宫的影响。

神经内分泌系统是机体重要的调控网络,网络功能的正常运转依赖于神经递质、激素以及免疫分子之间的相互作用<sup>[10]</sup>。研究表明,单胺类神经递质水平的改变是引起更年期综合征中抑郁不安、潮热出汗、失眠多梦、狂躁易怒等症状发生的重要原因<sup>[11]</sup>。实验发现,更年期模型大鼠下丘脑羟色胺(5-HT)、五羟吲哚乙酸(5-HIAA)水平升高,去甲肾上腺素(NE)、下丘脑多巴胺(DA)水平降低,分析可能与下丘脑-垂体-卵巢轴调节有关。给予安神养血口服液干预治疗后,去势模型大鼠5-HT、5-HIAA水平降低,NE、DA水平提高,趋于正常组水平,说明安神养血口服液可有效调节更年期模型大鼠下丘脑单胺类神经递质水平,改善其植物神经功能。

更年期综合征患者卵巢功能的衰退是由于卵巢老化、卵细胞过度耗竭所导致的。研究表明,体内自由基水平及其所诱发的脂质过氧化与衰老密切相关。其中,丙二醛(MDA)是重要的脂质过氧化物,是衰老的主要标志之一<sup>[12]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)能有效清除体内自由基和其代谢产物,是最主要的抗氧化酶之一<sup>[13-14]</sup>。实验结果显示,更年期模型大鼠血清中MDA水平提高,SOD活性下降,安神养血口服液能提高模型大鼠血清中SOD的活性,

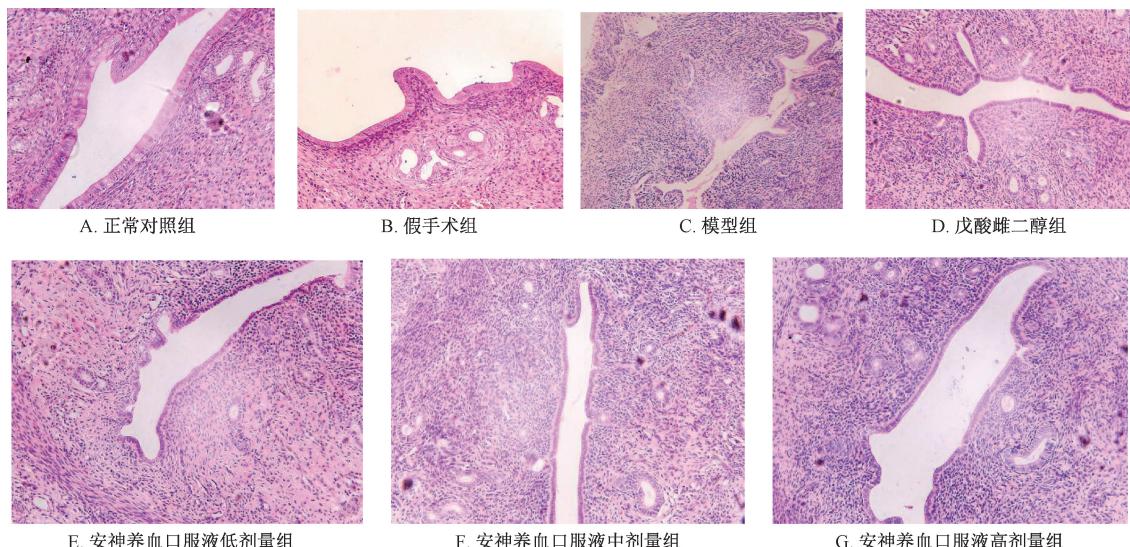


图1 安神养血口服液对大鼠子宫组织病理变化的影响 (HE,  $\times 200$ )

降低MDA水平，有效缓解衰老。

由下丘脑弓状核与垂体中叶分泌的 $\beta$ -内啡肽( $\beta$ -EP)，是一种内源性阿片肽，其通过抑制GnRH的释放，进而影响单胺类神经递质的生成和代谢，对稳定神经内分泌功能具有重要的意义。此外，研究发现，午后潮热，烘热汗出等更年期综合征临床表现也与 $\beta$ -EP水平下降息息相关<sup>[15]</sup>。实验结果表明，安神养血口服液能够提高内源性阿片肽 $\beta$ -EP的水平，更好地调节更年期综合征模型大鼠的神经内分泌水平及改善相关症状。

综上所述，安神养血口服液可以通过调节相关性激素以及单胺类神经递质等的释放，提高机体抗氧化酶的活性，加快体内脂质过氧化物的清除，起到改善更年期综合征症状的作用。

#### 参考文献：

- [1] McVeigh C. Perimenopause: more than hot flushes and night sweats for some Australian women [J]. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 2005, 34(1): 21-27.
- [2] Utian W H. Psychosocial and socioeconomic burden of vasomotor symptoms in menopause: a comprehensive review[J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2005, 3(1): 47.
- [3] 聂广宁, 王小云, 杨洪艳. 1714名城市更年期女性生存质量现状分析 [J]. 中国妇幼保健, 2013, 28 (9): 1480-1483.
- [4] 李艳华, 危秀青, 郑巧玲, 等. 妇女围绝经期综合征发生率及相关因素的调查 [J]. 海峡预防医学杂志, 2006, 12 (4): 68-69.
- [5] 李瑞奇, 苗艳艳, 苗明三. 更年期综合征发病特点及防治述评 [J]. 中医学报, 2011, 26(12): 1521-1523.
- [6] 阳松威. 补肾疗更年期综合征的机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [7] 贲凯, 罗小光, 李伟, 等. 围绝经期综合征渐衰动物模型选择 [J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42 (11): 1262-1265.
- [8] Goldman J M, Murr A S, Cooper R L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2007, 80(2): 84-97.
- [9] 王晶. 反复降调节E<sub>2</sub>高水平患者的IVF结局及人类卵巢microRNA表达图谱的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
- [10] 斯冉, 岳枫, 朱晓光, 等. 加味逍遥丸对更年期大鼠行为学及神经-内分泌的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3289-3291.
- [11] 杨艳, 吴克明. 更年归肾丸对雌性去势大鼠性激素与下丘脑神经递质调节作用的实验研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(8): 447-450.
- [12] 卢春雪, 杨绍杰, 陶荟竹, 等. 衰老机制研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(1): 248-250.
- [13] Li Y, Han X D. Microcystin-LR causes cytotoxicity effects in rat testicular Sertoli cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012, 33(2): 318-326.
- [14] He B, Zhao S, Zhang W, et al. Effect of sodium salicylate on oxidative stress and insulin resistance induced by free fatty acids [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9(1): 49-53.
- [15] 于英, 李芬, 张巧利, 等. 更年期妇女潮热与 $\beta$ -内啡肽、雌二醇及促黄体生成素的相关性 [J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(12): 1676-1678.