

综述

聚集蛋白聚糖与椎间盘退变的研究进展

熊晓芊, 邵增务, 杨述华

(华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科 430022 武汉市)

中图分类号: R681.5, Q591.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2005)-01-0054-04

椎间盘退行性变是椎间盘突出症、椎体滑脱、椎管狭窄等脊柱退行性病变的首要诱因。椎间盘组织具有以基质为主要结构, 细胞散在分布于基质内的结构特点。蛋白聚糖和胶原是椎间盘基质内最主要的蛋白质, 对于基质结构和功能的完整性不可或缺, 因而它们的损耗是椎间盘退变中的重要环节。聚集蛋白聚糖(Aggrecan)是椎间盘蛋白聚糖中最主要的一种; 基质内 Aggrecan 的损耗(质、量的下降)是椎间盘退变的首要早期改变, 也是治疗椎间盘退变时必须改善的部分。笔者着重就 Aggrecan 损耗的机制、后果以及改善 Aggrecan 损耗的措施等研究进展作一综述。

1 Aggrecan 的结构与功能

Aggrecan 是以核心蛋白(core protein)为核心, 结合糖胺多糖链(glycosaminoglycan chain)构成的糖蛋白。其单体在连接蛋白的帮助下牢固结合透明质酸而形成 Aggrecan 聚合体, 并以聚合体的形式在椎间盘基质内发挥作用。核心蛋白是 Aggrecan 结构和功能的关键。

核心蛋白由 2000 多个氨基酸构成, 成熟的核心蛋白包括 G1、G2、G3 三个折叠形式各不相同的球状区域(globular region), G1 和 G2 构成核心蛋白的氨基端, G3 则位于核心蛋白的羧基端。G1 区域和 G2 区域结构和功能相似, 均包含两个蛋白聚糖串联重复序列(proteoglycan tandem repeat, PTR)和一个免疫球蛋白基序。PTR 是透明质酸结合区域, 并在 Aggrecan 的分泌过程中起重要作用^[1, 2]。G3 的某些氨基酸序列分别和表皮生长因子(EGF)、C 型凝集素(C-type lectin)、补体相关蛋白有同源性。G3, 特别是其中的凝集素区域, 对核心蛋白的胞内、胞外成熟过程均起重要作用。G1 与 G2 相隔较近, 它们之间的区域称为球间区(interglobular domain, IGD), 分布有多种蛋白酶的切割位点; G2 与 G3 之间则分布着多个糖胺多糖链结合位点, 核心蛋白在这些结合位点结合硫酸软骨素链和硫酸角质素侧链后成为带负电荷的 Aggrecan 单体。

基质内的 Aggrecan 大量结合透明质酸, 形成富含负电荷、具有弹性和亲水性的聚合体。聚合体分子与胶原结合形成涵养大量水分的网眼状结构。这种结构一方面维持了椎间盘内水和离子浓度的相对稳定, 另一方面使椎间盘组织保持于凝胶状态而具有适当的粘弹性, 从而满足人体

第一作者简介: 男(1978-), 在读博士, 研究方向: 脊柱外科
电话: (027)85726196 E-mail: tony_xiong@263.net

- proach to the anterior cervical spine Contemp[J].Neurosurg, 1991, 13(1):1-6.
14. Dickman CA, Locantore J, Fessler RG. The influence of transoral odontoid resection on stability of the craniocervical junction[J].Neurosurg, 1992, 77(4):525-530.
 15. Crockard HA, Koksels T, Watkin N. Transoral transclival clipping of anterior inferior cerebellar artery aneurysm using new rotating applier[J].J Neurosurg, 1991, 75(3):483-444.
 16. Veres R, Bago A, Fedorcsak I. Early experiences with image-guided transoral surgery for the pathologies of the upper cervical spine[J].Spine, 2001, 26(12):1385-1388.
 17. Yang Y, Liu S, Jiang H, et al. Transoral microsurgical treatment of craniocervical malformation [J].Zhonghua Waike Zazhi, 2000, 38(2):114-115.
 18. Hadley MN, Spetzler RF, Sonntag VK. The transoral approach to the superior cervical spine: a review of 53 cases of extradural cervicomedullary compression[J].J Neurosurg, 1989, 71(1):16-23.
 19. Wilkins RH, Rengachary SS, Aaslid R, et al. Transoral approach to the clivus and upper cervical spine[J].Neurosurg Update, 1990, 33(2):306-313.
 20. Crawford NR, Dickman CA. Construction of local vertebral coordinate systems using a digitizing probe Technical note[J].Spine, 1997, 22(1):559-563.
 21. Crawford NR, Crockard HA, Pozo JL, et al. Transoral decompression and posterior fusion for rheumatoid atlanto-axial subluxation[J].J Bone Joint Surg(Br), 1986, 68(3):350-356.
 22. Yang SY, Gao YZ. Clinical results of the transoral operation for lesions of the craniocervical junction and its abnormalities[J].Surg Neurol, 1999, 51(1):16-20.
 23. Kothe R, Wiesner L, Ruther W. Rheumatoid arthritis of the cervical spine current concepts for diagnosis and therapy[J].Orthopade, 2002, 31(12):1114-1122.

(收稿日期: 2004-02-26 修回日期: 2004-08-09)

(本文编辑 彭向峰)

活动对椎间盘的生物力学要求。

2 Aggrecan 与椎间盘退变的关系

椎间盘退变始于椎间盘基质的退化,而 Aggrecan 损耗则是基质退化最早的表现。椎间盘是由基质和椎间盘细胞组成的复杂体系,细胞是体系的主角,它接受环境刺激而改变分泌基质成分和蛋白酶的效率,从而调节基质代谢的平衡;基质承受外部的力学作用,维持细胞生存环境的相对稳定,细胞与基质之间存在密切的互动关系。由于 Aggrecan 对维持基质完整性所起的重要作用,其损耗会削弱基质的结构和功能而导致整个椎间盘的退变。

椎间盘内的 Aggrecan 主要分布在髓核,髓核细胞是主要分泌细胞。Aggrecan 损耗的直接后果是以髓核为主的椎间盘基质含水量减少,粘弹性下降。基质力学性能的下降会加重髓核细胞的受力劳损,而过度劳损的髓核细胞又会加速对基质的破坏,即减少有助于维持髓核粘弹性的 Aggrecan 和 II 型胶原的合成,增加弹性较差的 I 型胶原的合成,分泌蛋白酶增多。随着胶原等蛋白质成分的改变,基质网状结构遭到破坏,髓核粘弹性进一步丧失,向纤维环均匀分散应力的作用进一步削弱。纤维环受力不均,又会引发纤维环的劳损,整个椎间盘组织的退变就此形成^[3,4]。

3 影响 Aggrecan 代谢的因素

Aggrecan 的损耗是 Aggrecan 代谢平衡失调的结果。已知的椎间盘退变的诱因,如机械应力、老化、局部微环境、吸烟、糖尿病等,均会干扰椎间盘细胞的功能状态。受到干扰的椎间盘细胞主要通过减少 Aggrecan 合成和增强蛋白酶的酶解两种途径,并借助白细胞介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、一氧化氮 (NO) 等细胞因子的介质作用,引起 Aggrecan 代谢失衡和功能减弱,进而导致椎间盘退变。

3.1 酶解

酶解是 Aggrecan 损耗的两种主要机制之一。在对 Aggrecan 聚合体的各种酶切作用中,对 IGD 的切割最具破坏性。这种切割会使核心蛋白 G2 及其羧基端的部分与 G1 分离,游离于聚合体之外并被进一步降解,从而导致聚合体功能的严重损害。对退变椎间盘内 Aggrecan 的分析表明,随着椎间盘退变程度的加剧,G1 残基的累积明显增多,这反映出 IGD 酶切对椎间盘退变的影响^[5,6]。此外,蛋白酶还具有切割糖胺多糖侧链、核心蛋白 C 端等多种能力,这些都会加重 Aggrecan 的损耗^[7]。

椎间盘内降解 Aggrecan 的蛋白酶主要包括基质金属蛋白酶 (MMPs) 和聚集蛋白聚糖酶 (Aggrecanase) 两大类。MMPs 对椎间盘基质成分有广泛的降解作用,其中 MMP-3、MMP-13 等对 IGD 有酶切作用。Aggrecanase 于 1999 年才被正式确认和克隆^[8],属于 ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) 家族,在椎间盘内发挥作用的主要是 ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) 和 ADAMTS-5 (Aggrecanase-2) 两种。这两种 Aggrecanase 在

Aggrecan 上的切割位点相似,均可以切割 IGD 和糖胺多糖侧链^[9]。Aggrecanase 已经被公认为软骨基质降解的主要蛋白酶,并且被作为防治软骨基质降解的重要研究方向,因而有作者据此推论在椎间盘基质内 Aggrecanase 亦可能起主要酶解作用^[10,11]。Aggrecanase 和 MMPs 的功能并非完全相互独立,两者在 IL-1、TNF、TGF、NO 等因子影响下酶解活动均会增强,受 IGF 等作用则均会减弱。

组织金属蛋白酶抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs) 是一类对酶解起重要调控作用的蛋白质,它们特异性地抑制这两类金属蛋白酶,使椎间盘内 Aggrecan 的降解保持一个恰当的水平。当 TIMPs 受某些因素作用而含量下降时,也会导致 Aggrecan 的损耗^[12,13]。

3.2 力学因素

力学因素对椎间盘退变的影响很早已被人们所认识,事实上,这种影响是双方面的:适当的静水压力(如 3 个大气压,相当于正常体重状态下椎间盘内压力)可以增加 Aggrecan 和 TIMPs 的分泌,而过度的压力(30 个大气压,相当于弯腰负重条件下椎间盘内压力)下,Aggrecan 合成减少,蛋白酶酶解增强^[14]。Taylor 等^[15]研究震动、扭转等动力劳损对羊椎间盘 Aggrecan 的影响时也证实,劳损最重的 L7/S1 椎间盘内 Aggrecan 含量和形成聚合体的比例下降最严重,且存在更显著的酶解活动迹象,而适度的间断压力却对 Aggrecan 等基质成分具有保护作用。

力学因素影响椎间盘细胞功能合成和分解 Aggrecan 的机制尚未完全明了。Salter 等^[16]认为,力学因素可能通过“整合素依赖的白介素 4 自分泌/旁分泌循环”(integrin-dependent interleukin-4 autocrine/paracrine loop) 引起细胞膜的超极化或去极化,进而影响细胞内相应基因(如 IL-1) 的表达。Rannou 等^[17]的研究证实 NO 是一种对 Aggrecan 代谢有重要影响的因子,在适当压力或震动的情况下,椎间盘细胞通过增强转录而加快 Aggrecan 的合成,对基质起代偿性保护作用;而在过度受力或震动时,椎间盘内 NOS (NO 合成酶,包括 cNOS 和 iNOS) 基因表达增加,基质内 NO 含量显著提高。大量的 NO 一方面对 Aggrecan 的合成表现出明显的抑制效应,抵消甚至逆转 Aggrecan 的代偿性合成增加,另一方面会提高 IL-1、TNF 等炎性介质的表达,加速 Aggrecan 的酶解,最终导致其代谢失衡^[18-21]。

3.3 老化

年龄因素同样通过影响 Aggrecan 的合成和分解两方面引起代谢失衡。由于髓核细胞随着年龄增长数量下降且合成代谢减弱,对生长因子反应减弱,Aggrecan 合成的量会逐渐减少,在新合成的蛋白聚糖中 Aggrecan 所占比例也会下降^[22]。随着酶解作用的积累,Aggrecan 除含量下降以外功能也会明显削弱,例如,对核心蛋白 C 端的酶切,会影响 Aggrecan 与胶原结合形成网状结构的能力,而对糖胺多糖链的切割会减少 Aggrecan 聚合体所含的负电荷,削弱糖胺多糖链对核心蛋白的保护作用^[7]。Taylor^[15]的实验

较好地反映了酶解随着年龄增长而加重的趋势:不同年龄羊椎间盘细胞新合成的 Aggrecan 并没有显著品质差异。但体内条件下,新生羊的 Aggrecan 较完整,糖胺多糖链长,结合透明质酸的能力强,形成的聚合体牢固且富含负电荷;而成年羊的大部分 Aggrecan 表现出酶切痕迹,侧链较短,结合透明质酸能力下降,形成的聚合体也较松散。酶解的累积加重了合成不足造成的 Aggrecan 功能下降。

3.4 其它因素

除了力学因素和年龄因素之外,基因、内分泌等因素也会干扰椎间盘细胞而引起 Aggrecan 损耗。核心蛋白基因的 VNTR 多态性(various number tandem repeat,可变长度重复序列)已经被确认为诱发椎间盘退变的因素。这可能是因为 VNTR 多态性影响了核心蛋白结合糖胺多糖链数目,从而削弱了 Aggrecan 的功能和耐酶解能力^[24]。糖尿病患者的胰岛素相对不足,Aggrecan 合成效率会随之明显降低,新合成的 Aggrecan 还可能出现硫酸角质素缺失等结构异常^[25]。甲状腺素也具有提高 Aggrecanase-2 表达从而加速 Aggrecan 的降解的作用^[26]。

4 对 Aggrecan 损耗的干预

以上对 Aggrecan 质、量下降机制的研究表明,理想的干预 Aggrecan 代谢失衡的方式应该从恢复 Aggrecan 的代谢平衡着手,并注重提高 Aggrecan 的品质。目前已有一些治疗 Aggrecan 质、量下降的研究,但离适度、有效调节尚有差距,在临床应用前还需进一步完善。

生长因子具有调节细胞增殖、分化、代谢的强大能力,因而成为重建 Aggrecan 代谢平衡、防治椎间盘退变的重要工具。已知可以调节 Aggrecan 代谢平衡的细胞因子包括表皮生长因子(EGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子(TGF)、某些 BMP 和软骨源性形态发生蛋白(cartilage-derived morphogenetic protein,CDMP)等。生长因子疗法中最成功的例子是 TGF- β 1 结合腺病毒载体进行的椎间盘退变基因治疗。Nishida 等(1999 年)通过这种方法使 Aggrecan 的合成提高了一倍,并且有后续研究表明,TGF 的增加对酶解也有调控作用。但因为目的基因表达周期相对不足、生长因子治疗还有可能带来副作用等原因,此类方法尚未进入临床应用^[27,28]。

酶抑制剂也是颇具潜力的研究方向。20 世纪 90 年代中后期曾有人进行过 MMPs 抑制剂防治椎间盘退变的研究并取得了一定的成果,但因为抑制剂的副作用而未能推广。目前各研究机构均把 Aggrecanase 抑制剂作为研究方向,并取得了一定的成功,如 Malfait 等^[29]的研究表明 Aggrecanase 抑制剂在体外对软骨 Aggrecan 的保护作用明显强于单纯的 MMPs 抑制剂。TIMPs 也是重要的研究对象,如 Van der Laan 的实验表明,对 Aggrecanase 具有较强抑制能力的 TIMP-3 (比 TIMP-1、TIMP-2 强 40~50 倍)具有更好的保护软骨的作用^[30]。

5 问题与展望

对于椎间盘退变的研究,尤其是与 Aggrecan 相关的研究使我们看到了通过非手术手段早期干预椎间盘退行性病变的光明前景。但目前的研究中尚存在需完善的地方:(1)椎间盘退变的筛查体系尚待建立。早期的诊断或对高危患者的确定有助于将椎间盘退变遏制在早期。(2)外界因素影响椎间盘细胞代谢的机制有待深入研究。对机制的了解将可能使我们找到更加事半功倍的防治手段。(3)寻找有应用潜力的目的基因、开发更有效的载体和转录调控技术。对目的基因的研究将为基因治疗提供更合适的工具,并由此发展出多基因联合治疗。能够长时间适度表达的载体将会延长生长因子的给药周期,减少生长因子的副作用。(4)研制酶抑制剂。能够长期口服给药的酶抑制剂将可能成为防治椎间盘退变的理想途径。

总之,这些以聚集蛋白聚糖为突破口的研究,将会帮助我们更好地应对椎间盘退变的发生。

6 参考文献

1. Luo W, Guo C, Zheng J, et al. Aggrecan from start to finish [J]. J Bone Miner Metab, 2000, 18(2):51-56.
2. Kiani C, Chen L, Lee V, et al. Identification of the motifs and amino acids in aggrecan G1 and G2 domains involved in product secretion [J]. Biochemistry, 2003, 42(23):7226-7237.
3. Poiraudau S, Monteiro I, Anract I, et al. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells: comparison with cartilage cells from the same animals [J]. Spine, 1999, 24 (9):837-844.
4. Sive JJ, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs [J]. Mol Pathol, 2002, 55(2):91-97.
5. Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc [J]. Spine, 2000, 25(23):3005-3013.
6. Little CB, Flannery CR, Hughes CE, et al. Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro [J]. Biochem J, 1999, 344 (Pt 1): 61-68.
7. Westling J, Fosang AJ, Last K, et al. ADAMTS4 cleaves at the aggrecanase site (Glu373-Ala374) and secondarily at the matrix metalloproteinase site (Asn341-Phe342) in the aggrecan interglobular domain [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (18):16059-16066.
8. Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins [J]. Science, 1999, 284(5420):1600-1601.
9. Tortorella MD, Liu RQ, Burn T, et al. Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4) [J]. Matrix Biol, 2002, 21(6):499-511.
10. Sandy JD, Verscharen C. Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is

- required for C-terminal processing in vivo [J]. *Biochem J*, 2001, 358(Pt 3):615-626.
11. Roughley PJ, Alini M, Antoniou J. The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc [J]. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30(Pt 6):869-874.
 12. Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, et al. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF- β [J]. *J Immunol*, 2002, 168(3):1405-1412.
 13. Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, et al. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4) [J]. *FEBS Lett*, 2001, 494(3):192-195.
 14. Toyoda T, Seedhom BB, Kirkham J, et al. Upregulation of aggrecan and type II collagen mRNA expression in bovine chondrocytes by the application of hydrostatic pressure [J]. *Biorheology*, 2003, 40(1-3):79-85.
 15. Taylor TK, Melrose J, Burkhardt D, et al. Spinal biomechanics and aging are major determinants of the proteoglycan metabolism of intervertebral disc cells [J]. *Spine*, 2000, 25(23):3014-3020.
 16. Salter DM, Millward-Sadler SJ, Nuki G, et al. Differential responses of chondrocytes from normal and osteoarthritic human articular cartilage to mechanical stimulation [J]. *Biorheology*, 2002, 39(1-2):97-108.
 17. Rannou F, Richette P, Benallaoua M, et al. Cyclic tensile stretch modulates proteoglycan production by intervertebral disc annulus fibrosus cells through production of nitrite oxide [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(1):148-157.
 18. Lee MS, Trindade MC, Ikenoue T, et al. Intermittent hydrostatic pressure inhibits shear stress-induced nitric oxide release in human osteoarthritic chondrocytes in vitro [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30(2):326-328.
 19. Lee MS, Ikenoue T, Trindade MC, et al. Protective effects of intermittent hydrostatic pressure on osteoarthritic chondrocytes activated by bacterial endotoxin in vitro [J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(1):117-122.
 20. Liu GZ, Ishihara H, Osada R, et al. Nitric oxide mediates the change of proteoglycan synthesis in the human lumbar intervertebral disc in response to hydrostatic pressure [J]. *Spine*, 2001, 26(2):134-141.
 21. Okuda S, Myoui A, Ariga K, et al. Mechanisms of age-related decline in insulin-like growth factor-I dependent proteoglycan synthesis in rat intervertebral disc cells [J]. *Spine*, 2001, 26(22):2421-2426.
 22. Maeda S, Kokubun S. Changes with age in proteoglycan synthesis in cells cultured in vitro from the inner and outer rabbit annulus fibrosus. Responses to interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist protein [J]. *Spine*, 2000, 25(2):166-169.
 23. Kawaguchi Y, Osada R, Kanamori M, et al. Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration [J]. *Spine*, 1999, 24(23):2456-2460.
 24. Pratta MA, Tortorella MD, Arner EC. Age-related changes in aggrecan glycosylation affect cleavage by aggrecanase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50):39096-39102.
 25. Videman T, Battie MC, Gibbons LE, et al. Disc degeneration and bone density in monozygotic twins discordant for insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *J Orthop Res*, 2000, 18(5):768-772.
 26. Makihiro S, Yan W, Murakami H, et al. Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6):2480-2488.
 27. Matsunaga S, Nagano S, Onishi T, et al. Age-related changes in expression of transforming growth factor- β and receptors in cells of intervertebral discs [J]. *J Neurosurg*, 2003, 98(Suppl 1):63-67.
 28. Hidaka C, Khan SN, Farmer JC, et al. Gene therapy for spinal applications [J]. *Orthop Clin North Am*, 2002, 33(2):439-446.
 29. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, et al. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(25):22201-22208.
 30. Van der Laan WH, Quax PH, Seemayer CA, et al. Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3 [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(3):234-242.

(收稿日期:2004-01-02 修回日期:2004-05-08)

(本文编辑 彭向峰)

消息

全国骨肿瘤治疗进展及其并发症防范策略学术研讨会征文通知

《中华外科杂志》编辑部、中华医学会骨科学分会骨肿瘤学组织及山东大学齐鲁医院骨科拟定于 2005 年 7 月 29~31 日在山东省济南市联合举办“全国骨肿瘤治疗进展及其并发症防范策略学术研讨会”。本次会议将就骨肿瘤手术治疗及综合治疗领域的进展和相关手术并发症的防范等方面进行广泛讨论。届时将邀请国内外著名骨肿瘤专家作专题演讲。欢迎广大同道踊跃投稿并届时参加。本次学术活动为国家级继续医学教育项目,会后授予 I 类教育学分。

投稿要求:凡未在国家级以上学术会议交流或未在公开刊物上发表的论文均可投送。论文全文在 3000 字以内并附 500 字左右结构式摘要一份,请用 A4 纸打印并寄送稿件软盘,欢迎通过 E-mail 投稿。

会务费:600 元/人。统一安排食宿,费用自理。截稿日期:2005 年 6 月 15 日。联系地址:山东省济南市文化西路 107 号山东大学齐鲁医院骨科 250012。联系人:李建民(13705314513)、杨志平(13505412856)。电话:(0531)2169423、2169413。E-mail:gkljm@medmail.com.cn。欢迎访问齐鲁骨科网(www.qilu-orthop.com)查询详情。