论著

文章编号:1000-5404(2011)12-1250-04

Claudin-3在胃腺癌的表达及预后意义

张真真[1],张 声[1],余英豪[2],陈 虹[1],陈余朋[1] (350005 福州,福建医科大学附属第一医院病理科[1];350025 福州,南京军区福州总医院病理科[2])

【摘要】 **目的** 探讨Claudin-3在胃腺癌组织中的表达及其临床病理学意义以及和预后的关系。**方法** 应用组织芯片和免疫组化S-P法检测139例胃腺癌患者正常胃黏膜腺上皮/肠化生的胃腺上皮、黏膜层、肿瘤中心、侵袭前沿区及淋巴结转移灶纵向侵袭胃癌组织Claudin-3表达的动态变化,分析Claudin-3的定位及表达水平与胃癌的临床病理学特征、侵袭转移及预后关系。**结果** 肠化生上皮Claudin-3中-强阳性表达率为100%(36/36),高于正常胃黏膜腺上皮(17.5%,18/103,$\chi^2=78.12$,$P<0.05$)。在胃癌组织中,Claudin-3的表达呈2种染色模式,肠型胃癌细胞Claudin-3定位于细胞膜,弥漫型胃癌细胞Claudin-3定位于细胞质,混合型胃癌细胞呈细胞膜和细胞质表达。从黏膜层、肿瘤中心、侵袭前沿及淋巴结转移灶胃癌组织,膜型染色的Claudin-3中-强阳性表达率分别为59.4%(61/88)、85.3%(75/88)、36.4%(32/88)、23.9%(21/88),呈先升后降的抛物线趋势,肿瘤中心区表达最高,淋巴结转移灶表达最低($\chi^2=110.83$,$P<0.05$),而浆型染色的Claudin-3中-强阳性表达率分别为11.8%(6/51)、33.3%(17/51)、51.0%(26/51)、15.7%(8/51),呈逐渐升高的趋势,侵袭前沿区表达最高($\chi^2=31.32$,$P<0.05$)。黏膜层胃癌细胞膜型Claudin-3高表达者的术后中位生存时间高于弱表达者($\chi^2=9.36$,$P<0.05$)。**结论** 胃腺癌Claudin-3的表达可能与胃癌细胞的组织学分型有关,在胃癌侵袭转移的不同部位呈异质性表达,黏膜层胃腺癌膜型Claudin-3的表达可作为胃癌患者潜在预后指标。

【关键词】 胃肿瘤;Claudin-3;组织芯片;免疫组织化学;预后

【中图法分类号】 R341;R730.2;R735.2 【文献标志码】 A

Expression of Claudin-3 in gastric adenocarcinoma tissue and its relation with prognosis

Zhang Zhenzhen[1], Zhang Sheng[1], Yu Yinghao[2], Chen Hong[1], Chen Yupeng[1] ([1]Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province, 350005; [2]Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command, Fuzhou, Fujian Province, 350025, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the expression of Claudin-3 in gastric adenocarcinoma tissue and its relation with the prognosis. **Methods** Expression of Claudin-3 was detected in normal gastric epithelium, gastric epithelium with intestinal metaplasia, mucosa layer, central area of tumor, invasive front area and lymph node metastasis of 139 patients with gastric adenocarcinoma by tissue microarray and immunohistochemistry, respectively. Relation between the location and expression of Claudin-3 in gastric adenocarcinoma, and the clinicopathological features, invasive metastasis, prognosis of gastric adenocarcinoma, were analyzed. **Results** The moderate-strong expression rate of Claudin-3 was significantly higher in gastric epithelium with intestinal metaplasia than in normal gastric epithelium (100.0% *vs* 17.5%, chi-square = 78.12, $P<0.05$). The expression of Claudin-3 in gastric cancer tissue showed two staining patterns. Claudin-3 was located in membranes of intestinal gastric adenocarcinoma cells, in cytoplasm of diffuse gastric adenocarcinoma, and in both membranes and cytoplasm of mixed gastric adenocarcinoma. The moderate-strong expression rate of Claudin-3 with membranous staining and weak cytoplasm staining, and mixed membrane and cytoplasm staining in mucosa layer, central area of tumor, invasive front area and lymph node metastasis was 59.4% (61/88), 85.3% (75/88), 36.4% (32/88), and 23.9% (21/88), respectively, which increased at first and then decreased. The expression level of Claudin-3 was the highest in central area of tumor and the lowest in lymphatic metastasis (chi-square = 110.83, $P<0.05$). The moderate-strong expression rate of Claudin-3 with cytoplasm staining was 11.8% (6/51), 33.3% (17/51), 51.0% (26/51), and 15.7% (8/51), respectively, and was the highest in invasive front area (chi-square = 31.32, $P<0.05$). The median survival time of gastric carcinoma patients with overexpression of Claudin-3 in membrane of gastric mucosa cells was longer than those with weak expression of Claudin-3 (chi-square = 9.36, $P<0.05$). **Conclusion** Expression of Claudin-3 in gastric adenocarcinoma may be

【基金项目】 卫生部科研基金课题(WJH2007-3-001);福建省卫生厅青年基金课题(2005-2-12)

【通信作者】 张 声,E-mail:zhgshg@126.com

related with the histological typing of gastric cancer cells. Claudin-3 is heterogenetically expressed in different sites of invasive gastric metastasis. Expression of Claudin-3 in mucosa layer of gastric adenocarcinoma may be a potential prognostic marker for its prognosis.

[Key words] stomach neoplasm; adenocarcinoma; Claudin-3; immunohistochemistry; prognosis

Supported by the Science Foundation of Ministry of Health of China (WJH2007-3-001) and the Project of Youth Science Foundation of Department of Health of Fujan Province (2005-2-12). Corresponding author: Zhang Sheng, E-mail: zhgshg@126.com

Claudins 是构成紧密连接的骨架蛋白,参与维持细胞极性、屏障及信号传导功能,表达具有组织特异性。近年来研究发现 Claudins 主要在卵巢癌[1]、直肠癌[2]、前列腺癌[3]等肿瘤表达异常。Claudin-3 是产气荚膜梭菌肠毒素碳末端的受体,是肿瘤靶向治疗的研究热点[4],Matsuda 等[5]发现其在胃癌中表达明显升高,国内王军等[6]也报道 Claudin-3 mRNA 和蛋白在食道腺癌及肠化型贲门腺癌中含量特异性增高,但 Claudin-3 蛋白在胃癌侵袭转移过程中的表达变化尚不清楚。本研究通过选择正常胃黏膜上皮/肠化上皮及胃癌侵袭转移过程中不同位点建立组织芯片,检测 Claudin-3 在胃癌发生、发展过程中的表达模式,探讨其表达变化的临床病理学意义及与胃癌预后关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2000 年 5 月至 2006 年 12 月福建医科大学附属第一医院病理科胃癌手术切除、有完整随访资料的存档蜡块 139 例,其中男性 98 例,女性 41 例,中位年龄 61 岁(23 ~ 84 岁)。按 WHO 肿瘤病理学和遗传学(2000 消化系统肿瘤分册)分组:肠型胃癌 47 例,弥漫型胃癌 40 例(包括黏液腺癌及印戒细胞癌),混合型胃癌 52 例;黏膜层及肌层浸润 81 例,浆膜及浆膜外层浸润 58 例;均有淋巴结转移(N_1 86 例,N_2 53 例),Ⅱa 期(T_2N_1)41 例,Ⅱb 期(T_3N_1,T_2N_2)59 例,Ⅲa 期(T_3N_2)39 例。所有病例均为死亡病例,随访时间 1 ~ 76 个月,中位生存时间 19 个月。

1.2 组织芯片制备

根据 HE 染色切片在供体组织蜡块上选取 5 个目标区域位点:黏膜层非肿瘤性胃黏膜(正常胃黏膜上皮 103 例,肠化生上皮 36 例)、黏膜层、肿瘤中心区(即黏膜层与侵袭前沿间)、侵袭前沿区(肿瘤纵向侵犯胃壁最深处)及淋巴结转移灶胃癌组织,每个位点取 3 个组织芯;将相应组织芯由供体蜡块转移至受体蜡块的阵列孔中,每个孔芯的直径 2 mm,每个蜡块含有 31 个位点,最后一个为标志点[7]。

1.3 免疫组织化学染色

兔抗人 Claudin-3 多克隆抗体(浓缩型,1∶400 稀释,德国 Thermo Scientific 公司);二抗(羊抗兔试剂盒,SP 法,美国 Labvision 公司)。操作严格按照说明书进行,苏木精复染,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 判读标准

Claudin-3 在胃腺癌细胞及癌旁正常胃黏膜腺上皮呈异质性表达,根据着色强度判别结果:"+"为细胞膜不完整着色或胞质着色呈淡黄色;"++"为细胞膜完整着色或细胞质着色,呈棕黄色颗粒状;"+++"为细胞膜完整着色或细胞质着色,呈棕褐色颗粒状。

1.5 统计学分析

运用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,用 Wilcoxon 检验比较黏膜层胃癌细胞与正常胃表面上皮/肠化生上皮表达的差异,用 χ^2 检验进行 Pearson 相关分析,并用 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析;用 Friedman 检验纵向比较不同部位 Claudin-3 表达变化,用 Mann-Whitney U 检验横向比较不同部位 Claudin-3 表达的差异。

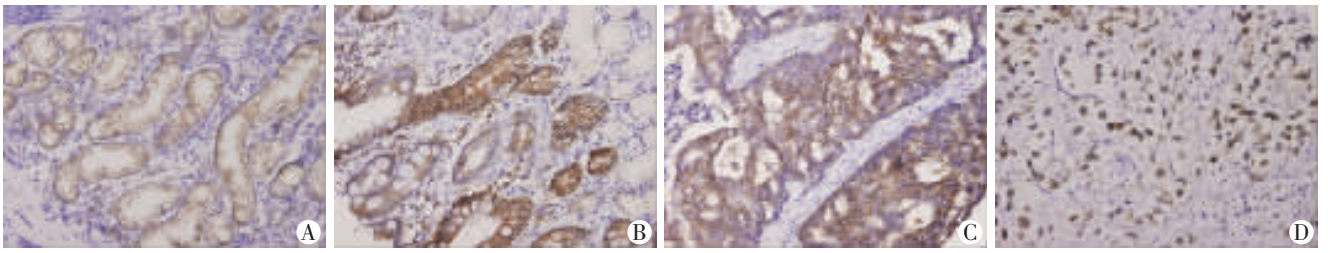
2 结果

2.1 Claudin-3 在胃黏膜腺上皮中的表达

139 例非肿瘤性胃黏膜腺上皮中,Claudin-3 主要定位于细胞膜和细胞质,正常胃黏膜腺上皮呈弱阳性表达,而 36 例伴有肠上皮化生的胃黏膜腺上皮 Claudin-3 的表达强度明显高于正常胃黏膜腺上皮($\chi^2 = 78.12$, $P < 0.01$)。黏膜层胃腺癌细胞 Claudin-3 染色低于伴有肠上皮化生的胃黏膜腺上皮($Z = -2.75$, $P < 0.01$);而高于正常胃黏膜腺上皮($Z = -4.10$, $P < 0.01$),见图 1,表 1。

2.2 Claudin-3 在胃癌侵袭转移过程中的表达变化

按照在胃腺癌上皮中的染色定位情况,Claudin-3 的染色可分为膜表达型和浆表达型两类,其中膜表达型 88 例,浆表达型 51 例。在胃腺癌侵袭转移过程中,膜表达型 Claudin-3 的表达水平呈现抛物线形式,肿瘤中心区表达最高,淋巴结转移灶表达



A:正常胃黏膜;B:肠上皮化生的胃黏膜;C:肠型胃癌;D:弥漫型胃癌

图 1 Claudin-3 在正常胃黏膜腺上皮、肠化生腺上皮以及胃癌组织中的表达 (S-P ×200)

最低($\chi^2=110.83$, $P<0.05$)；而浆表达型 Claudin-3 表达水平逐步增加，侵袭前沿表达最高($\chi^2=31.32$, $P<0.05$)，无论膜表达型还是浆表达型，Claudin-3 在淋巴结转移灶中均表达最低(表1、2)。

表1 膜表达型 Claudin-3 在胃腺癌细胞不同位置的表达变化 [例(%)]

部位	n	+	++	+++	平均秩
正常胃黏膜腺上皮	52	34(65.4)	16(30.8)	2(3.8)	2.63[a]
肠化上皮	36	0	27(75.0)	9(25.0)	3.86
黏膜层	88	27(30.7)	51(58.0)	10(11.4)	3.31[a]
肿瘤中心	88	13(14.8)	43(48.9)	32(36.4)	4.03
侵袭前沿	88	56(63.6)	30(34.1)	2(2.3)	2.35[ab]
淋巴结转移灶	88	67(76.1)	16(18.2)	5(5.7)	2.18[a]

a：$P<0.05$，与肿瘤中心比较；b：$P<0.05$，与淋巴结转移灶比较

表2 浆表达型 Claudin-3 在胃腺癌细胞不同位置的表达变化 [例(%)]

部位	+	++	+++	平均秩
正常胃黏膜腺上皮	51(100)	0	0	2.44[a]
黏膜层	45(88.2)	6(11.8)	0	2.70[a]
肿瘤中心	34(66.7)	15(29.4)	2(3.9)	3.23
侵袭前沿	25(49.0)	20(39.2)	6(11.8)	3.77[a]
淋巴结转移灶	43(84.3)	6(11.8)	2(3.9)	2.86[a]

a：$P<0.05$，与肿瘤中心比较

2.3 黏膜层胃腺癌上皮 Claudin-3 的表达与胃癌临床病理学关系

由表3、4可以看出，肠型胃腺癌呈膜表达型，而弥漫型胃腺癌呈浆表达型，混合型以膜表达为主，部分呈浆表达。黏膜层胃腺癌上皮 Claudin-3 表达水平与患者的性别、年龄、侵袭深度、淋巴结转移数及临床分期无关。

表3 黏膜层胃腺癌细胞膜型 Claudin-3 表达与临床病理学参数的关系 [例(%)]

病理学参数	n	+	++	+++	平均秩
年龄					
>60岁	46	18(39.1)	22(47.8)	6(13.0)	41.72
≤60岁	42	9(21.4)	29(69.0)	4(9.5)	47.55
性别					
男	59	15(25.4)	37(62.7)	7(11.9)	46.70
女	29	12(41.4)	14(48.3)	3(10.3)	40.02
Lauren 分型					
肠型	47	1(2.1)	37(78.7)	9(19.1)	58.01[a]
混合型	41	26(63.4)	14(34.1)	1(2.4)	29.01
浸润程度					
黏膜层-肌层	53	19(35.8)	27(50.9)	7(13.2)	43.05
浆膜-浆膜外	35	8(22.9)	24(68.6)	3(8.6)	46.70
淋巴结转移灶					
1~2个	66	18(27.3)	42(63.6)	6(9.1)	45.14
3~6个	22	9(40.9)	9(40.9)	4(18.2)	42.59
临床分期					
Ⅱa期	40	8(20.0)	26(65.0)	6(15.0)	49.78
Ⅱb期	35	12(34.3)	21(60.0)	2(5.7)	41.37
Ⅲa期	13	7(53.8)	4(30.8)	2(15.4)	36.69

a：$P<0.05$，与混合型比较

2.4 黏膜层胃腺癌组织 Claudin-3 表达与胃癌预后的关系

Kaplan-Meier 生存分析发现黏膜层胃腺癌组织膜表达型的胃癌患者其 Claudin-3 高表达者的术后中位生存时间长于弱表达者($\chi^2=9.36$, $P<0.05$，图2)；浆表达型的胃癌患者未见明显差别。

表4 黏膜层胃腺癌细胞浆型 Claudin-3 表达与临床病理学参数的关系 [例(%)]

病理学参数	n	+	++	平均秩
年龄				
>60岁	25	22(88.0)	3(12.0)	26.06
≤60岁	26	23(88.5)	3(11.5)	25.94
性别				
男	39	35(89.7)	4(10.3)	25.62
女	12	10(83.3)	2(16.7)	27.25
Lauren 分型				
弥漫型	40	40(100.0)	0	23.00
混合型	11	5(45.5)	6(54.5)	36.91[a]
浸润程度				
黏膜层-肌层	28	23(82.1)	5(17.9)	27.55
浆膜-浆膜外	23	22(95.7)	1(4.3)	24.11
淋巴结转移灶				
1~2个	20	17(85.0)	3(15.0)	26.83
3~6个	31	28(90.3)	3(9.7)	25.47
临床分期				
Ⅱa期	1	1(100.0)	0	23.00
Ⅱb期	24	21(87.5)	3(12.5)	26.19
Ⅲa期	26	23(88.5)	3(11.5)	25.94

a：$P<0.05$，与弥漫型比较

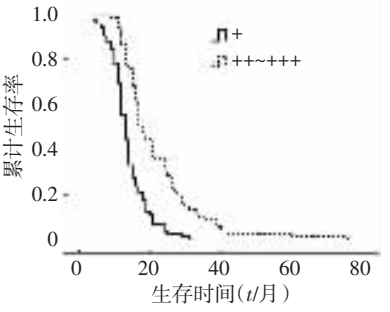


图2 黏膜层胃腺癌组织 Claudin-3 膜表达型患者胃癌术后生存曲线

3 讨论

3.1 Claudin-3 表达与胃腺上皮肠化生及肠型胃癌的关系

本研究发现，Claudin-3 在胃黏膜层的肠化生上皮及相应的肠型胃腺癌细胞呈高表达，侧膜及基底着色明显，明显高于正常胃黏膜腺上皮，提示 Claudin-3 可能与胃黏膜腺上皮肠化生及肠型胃癌的发生有关。Ozden 等[8]应用免疫组化染色发现 Claudin-3 定位于孵化后鸡小肠上皮的基底及侧膜，RT-PCR 结果提示 Claudin-3 在小鸡发育的 18~20 d 表达升高，而在小鸡孵化后 2 d 表达降低，揭示了 Claudin-3 在小鸡小肠上皮分化过程中的作用。Satake 等[9]的免疫组化结果发现 Claudin-3 及 Cdx-2 均在胃黏膜肠化生上皮及胃癌组织中表达升高，重组 Cdx-2 转染的 TMK-1 胃癌细胞 Claudin-3 mRNA 和蛋白的水平均升高，介导胃黏膜上皮向肠化上皮分化，推测 Cdx-2 诱导 Claudin-3 在胃黏膜上皮表达升高，导致紧密连接复合物结构改变，促进胃黏膜肠上皮化生，但二者在胃黏膜肠化生上皮向肠型胃癌转化过程中的作用需进一步证实。

3.2 Claudin-3 的表达与胃腺癌组织学分化的关系

本研究结果发现，肠型胃癌细胞 Claudin-3 主要定位于细胞膜呈中-强阳性表达，弥漫型胃癌细胞膜着色减弱，呈弱-中等强度细胞质着色，混合型胃癌细胞膜和细胞质呈不同程度的表达，提示弥漫型胃癌细胞 Claudin-3 膜表达丢失可能与紧密连接结构异常、细胞极性丧失、腺样结构形成不良有关。Semba 等[10]发现早期胃癌细胞 Claudin-3 呈细胞质表达，其阳性率与胃黏膜多发上皮内瘤变或癌变有关，内窥镜切除的复发率高，提示 Claudin-3 细胞质定位胃癌细胞分化较差。Enikanolaiye 等[11]用 FLAG 免疫荧光标记发现 Cldn6 在 Inv-C△187-FLAG 转基因小鼠背部表皮棘细胞层胞浆表达增加，组织学观察发现小鼠表皮发育异常，棘层增厚，排列紊乱，角化异常，提示 Cldn6 蛋白的胞浆内的特定氨基酸有膜定位作用，参与表皮渗透屏障形成，由此我们推断 Claudin-3 在胃癌细胞质异常表达可能与其跨膜蛋白结构形成不良、紧密连接屏障功能破坏有关。

3.3 Claudin-3 在胃癌侵袭转移过程中的表达变化

本研究结果显示，Claudin-3 在肠型胃癌及大部位混合性胃腺癌中呈膜表达，膜表达型胃腺癌 Claudin-3 表达水平呈现先升高后降低的抛物线形式，肿瘤中心区表达最高，淋巴结转移灶表达降低；Claudin-3 表达从黏膜层－肿瘤起源－肿瘤中心表达逐渐升高，提示 Claudin-3 膜表达升高可能与肿瘤的增殖有关，Soini 等[12]发现 Claudin-3 的表达率与胃癌细胞的增殖指数呈正相关，即阳性表达组增殖指数高于阴性表达组；Claudin-3 表达从肿瘤中心－侵袭前沿－淋巴结转移灶表达逐渐降低，提示 Claudin-3 膜表达降低可能参与肿瘤的侵袭转移，与肿瘤间质-上皮转化 EMT 的过程有关。Vincent 等[13]研究发现 SNAIL1-SMAD3/4 转录抑制复合物在乳腺癌细胞中共同抑制 Claudin-3 等相关紧密连接蛋白启动子，从而促进乳腺癌细胞的上皮-间质转化。我们的研究还发现，Claudin-3 在弥漫型胃腺癌中的细胞质呈弱-中等强度的表达，浆表达型 Claudin-3 在肿瘤侵袭转移过程中的表达逐渐升高，在侵袭前沿表达最高，提示 Claudin-3 细胞质表达增加可能增加胃癌细胞的局部侵袭能力。French 等[14]的体外实验发现：Claudin-1 在恶性黑色素细胞胞浆表达，肿瘤迁移能力增强，可能与 PKA 或 PKC 的磷酸化及 MMP-2 的分泌有关；但 Claudin-3 胞浆表达与胃癌细胞的侵袭需进一步证实。

3.4 Claudin-3 表达与胃癌预后的关系

我们发现黏膜层胃腺癌组织膜表达型 Claudin-3 高表达者术后生存率高于低表达者，但未发现 Claudin-3 的表达与肿瘤分期及淋巴结转移数目的关系。Jung 等[15]的研究结果发现，Claudin-3 细胞膜低表达者多为淋巴管癌栓阳性的 T3 或 T4 期患者，提示 Claudin-3 在胃黏膜活检组织中的表达可作为胃癌患者潜在的预后指标。

总之，胃腺癌 Claudin-3 在肿瘤的侵袭转移过程中的表达变化可能与癌细胞的分化、肿瘤的增殖、侵袭及患者的预后有关。

参考文献：

[1] Cocco E, Casagrande F, Bellone S, *et al*. Clostridium perfringens enterotoxin carboxy-terminal fragment is a novel tumor-homing peptide for human ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2010, 10:349.

[2] Matsuda M, Sentani K, Noguchi T, *et al*. Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis[J]. Pathol Int, 2010, 60(10):673－680.

[3] Coutinho-Camillo C M, Lourenco S V, da-Fonseca F P, *et al*. Claudin expression is dysregulated in prostate adenocarcinomas but does not correlate with main clinicopathological parameters[J]. Pathology, 2011, 43(2):143－148.

[4] Kato-Nakano M, Suzuki M, Kawamoto S, *et al*. Characterization and evaluation of the antitumour activity of a dual-targeting monoclonal antibody against Claudin-3 and claudin-4[J]. Anticancer Res, 2010, 30(11):4555－4562.

[5] Matsuda Y, Semba S, Ueda J, *et al*. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma[J]. Cancer Sci, 2007, 98(7):1014－1019.

[6] 王军，房殿春，赵晶京，等. Claudin 3 在食管腺癌和贲门腺癌的表达和意义[J]. 第三军医大学学报，2008，30(10):932－934.

[7] 邹绍静，周永宁，姬瑞，等. 应用组织芯片技术研究胃癌组织 MVD、MLD 和 PTEN 的表达及其意义[J]. 第三军医大学学报，2010，32(18):1936－1940.

[8] Ozden O, Black B L, Ashwell C M, *et al*. Developmental profile of Claudin-3, -5, and -16 proteins in the epithelium of chick intestine[J]. Anat Rec (Hoboken), 2010, 293(7):1175－1183.

[9] Satake S, Semba S, Matsuda Y, *et al*. Cdx2 transcription factor regulates Claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma[J]. Pathol Int, 2008, 58(3):156－163.

[10] Semba S, Hasuo T, Satake S, *et al*. Prognostic significance of intestinal claudins in high-risk synchronous and metachronous multiple gastric epithelial neoplasias after initial endoscopic submucosal dissection[J]. Pathol Int, 2008, 58(6):371－377.

[11] Enikanolaiye A, Lariviere N, Troy T C, *et al*. Involucrin-claudin-6 tail deletion mutant (CDelta206) transgenic mice: a model of delayed epidermal permeability barrier formation and repair[J]. Dis Model Mech, 2010, 3(3/4):167－180.

[12] Soini Y, Tommola S, Helin H, *et al*. Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype[J]. Virchows Arch, 2006, 448(1):52－58.

[13] Vincent T, Neve E P, Johnson J R, *et al*. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(8):943－950.

[14] French A D, Fiori J L, Camilli T C, *et al*. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells[J]. Int J Med Sci, 2009, 6(2):93－101.

[15] Jung H, Jun K H, Jung J H, *et al*. The Expression of Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, and Claudin-4 in Gastric Cancer Tissue[J]. J Surg Res, 2010, Mar 6. [Epub ahead of print]

（收稿：2010-12-05 修回：2011-01-27）
（编辑 栾 嘉）