论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0924-04

单核细胞趋化蛋白-1在恶性骨肿瘤中高表达

胡 旭,初同伟,廖通权,余世明,刘玉刚,周 跃 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

【摘要】 **目的** 探讨单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1,MCP-1)在人转移性骨肿瘤、恶性原发性骨肿瘤、良性骨肿瘤组织中差异性表达及其意义。**方法** 2008年12月至2010年9月期间,收集转移性骨肿瘤15例、原发性恶性骨肿瘤15例、良性骨肿瘤15例,总共45例骨肿瘤标本。半定量RT-PCR检测各组MCP-1 mRNA的表达水平。应用免疫组织化学S-P法检测MCP-1蛋白的表达水平、Image-Pro Plus(IPP)分析标本中阳性细胞的累积光密度值和阳性表达面积。**结果** 转移性骨肿瘤组MCP-1 mRNA相对表达量(0.862±0.042)高于恶性原发组(0.612±0.051)和良性组(0.171±0.021)($P<0.05$)。转移性骨肿瘤组织中MCP-1免疫组化累积光密度(4 532.12±190.02)和阳性面积[(513.32±89.08) μm^2]均高于原发性恶性骨肿瘤组[(2 592.11±120.21)、(308.34±79.33) μm^2]和良性骨肿瘤组[(551.22±79.12)、(115.91±32.68) μm^2],且其在原发恶性组中的表达水平也高于良性组($P<0.05$)。**结论** MCP-1在恶性骨肿瘤中高表达,在转移性骨肿瘤表达更显著。

【关键词】 骨肿瘤;肿瘤转移;逆转录聚合酶链反应;免疫组织化学;单核细胞趋化蛋白-1
【中图法分类号】 R738.1;R341;R730.2 【文献标志码】 A

High expression of monocyte chemotactic protein-1 in malignant bone tumor

Hu Xu, Chu Tongwei, Liao Tongquan, Yu Shiming, Liu Yugang, Zhou Yue (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To identify the expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in human metastatic bone tumors, primary malignant bone tumors and benign bone tumor tissues, and the correlation between its expression and pathologic features of metastatic bone tumor. **Methods** A total of 15 tissue samples of metastatic bone tumor, 15 samples of primary malignant bone tumor and 15 samples of benign bone tumor were collected. The mRNA and protein expression of MCP-1 were detected with RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. Image-Pro Plus image analyzer was used to analyze the integrated optical density and positive expression area. **Results** The mRNA level of MCP-1 was higher in metastatic bone tumor than in primary malignant bone tumor and benign bone tumor (0.862±0.042 *vs* 0.612±0.051 and 0.171±0.021, $P<0.05$). The positive expression of MCP-1 protein was strongly higher in metastatic bone tumor than in primary malignant bone tumor and benign bone tumor tumor (integrated optical density: 4 532.12±190.02 *vs* 2 592.11±120.21 and 551.22±79.12, positive area: 513.32±89.08 *vs* 308.34±79.33 and 115.91±32.68 μm^2, $P<0.05$). **Conclusion** MCP-1 is highly expressed in malignant bone tumors and more strongly in metastatic bone tumors.

【**Key words**】 bone tumor; neoplasm metastasis; RT-PCR; immunohistochemistry; monocyte chemotactic protein-1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071523). Corresponding author: Chu Tongwei, Tel: 86-23-68774080, E-mail: chtw@sina.com

肿瘤的骨转移发生率约占所有转移性肿瘤的15%~20%,居第3位[1]。癌症患者一旦出现骨转移将导致进行性疼痛、运动功能障碍、高钙血症,严重者发生病理性骨折、脊髓压迫等并发症。同时,骨转移的发生也意味着肿瘤的恶性程度较高,患者的病死率增加。临床上治疗手段有限,通常只能采取药物镇痛或者肿瘤切除等,极大的降低了患者的生存质量。

研究表明,单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1,MCP-1)与某些肿瘤的发生、肿瘤细胞的黏附、肿瘤的转移有密切的联系。MCP-1作为一种细胞趋化因子,具有广泛的生物学效应,在免疫缺陷性疾病、移植物免疫反应、血脑屏障透性相关疾病、动脉粥样硬化、肾病、肿瘤等中都发挥重要作用[2]。某些肿瘤细胞和肿瘤基质细胞会分泌MCP-1,从而激活相关因子,引起破骨-成骨系统的失衡,进而造成骨骼的破坏和重塑[3]。但具体的分子机制尚有待进一步研

【基金项目】 国家自然科学基金(81071523)
【通信作者】 初同伟,电话:(023)68774080,E-mail:chtw@sina.com

究。因此,本实验拟采用免疫组织化学和 RT-PCR 的方法,分析不同恶性程度骨肿瘤组织中 MCP-1 的表达差异,初步探讨 MCP-1 在骨肿瘤中表达的意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器

兔抗人 MCP-1 单克隆抗体(浓缩型,北京博奥森),兔超敏即用型二步法(非生物素)检测试剂盒(北京中杉),DAB 显色液(浓缩型,北京中杉),动物 RNAout(天净沙),PrimeScript® RT reagent Kit(TaKaRa),2 × *Taq* PCR MasterMix(TIANGEN),301 型低温超速离心机(Beckman, USA),Chemi Imager 5500 型凝胶成像仪(Alpha Innotech, USA),PTC-200 型梯度 PCR 仪器(Bio-Rad, USA),微量核算检测仪(Nano, USA)。

1.2 标本来源

共分 3 组,转移性骨肿瘤组、原发恶性骨肿瘤组、良性骨肿瘤组。各组纳入标准如下:病理诊断结果为转移性骨肿瘤者不论是否发现原发灶均纳入转移性骨肿瘤组;病理诊断结果为原发恶性骨肿瘤,且未发生转移者纳入原发恶性骨肿瘤组;病理诊断结果为良性骨肿瘤者纳入良性骨肿瘤组;排除标准为:病理诊断结果介于良恶性之间的肿瘤者;恶性原发性骨肿瘤已发生转移者;肿瘤同时并发外伤感染、免疫相关性疾病、非特性炎性疾病者。

2008 年 12 月至 2010 年 9 月期间,于新桥医院骨科住院部手术过程中,收集转移性骨肿瘤 15 例:男性 6 例,女性 9 例。平均年龄 70 岁。其中肺癌 3 例、肝癌 2 例、乳腺癌 2 例、肾癌 2 例、胃癌 1 例、甲状腺癌 2 例、前列腺癌 3 例。收集恶性原发性骨肿瘤 15 例:男性 8 例,女性 7 例,平均年龄 45 岁。其中骨肉瘤 6 例、软骨肉瘤 3 例、纤维肉瘤 2 例、尤文肉瘤 2 例、脊索瘤 2 例。收集良性骨肿瘤组织标本 15 例:男性 7 例,女性 8 例,平均年龄 59 岁。其中骨软骨瘤 4 例、骨样骨瘤 1 例、骨纤维结构不良 7 例、骨囊肿 3 例。总共 45 例骨肿瘤组织标本:男性 21 例,女性 24 例,男女比例为 1∶1.143,年龄 17 ~ 89 岁,中位年龄 53 岁,平均 62 岁。所有病例的诊断以及组织学分型、病理分级以新桥医院病理科诊断结果为准。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 液氮冻存标本,使用动物 RNAout 试剂盒提取每例标本的 RNA,并取 2 μl 的 RNA 样品在微量核酸仪(NANO DROP)上测定浓度和纯度,取 $D(260)/D(280)$ 为 1.8 ~ 2.0 的 RNA 样品进行逆转录。逆转录操作过程参照 PrimeScript® RT reagent Kit(TaKaRa)试剂盒说明书进行。逆转录合成的 cDNA 产物冻存于 -20 ℃冰箱,用于 PCR 扩增。PCR 反应操作参照 TaKaRa 试剂盒说明进行。人 MCP-1 引物序列[4]:上游 5′-TCGCGAGCTATAGAAGAATCA-3′,下游 5′-TGTTCAAGTCTTCGGAGTTTG-3′;产物长度 161 bp,PCR 反应条件:94 ℃温育 3 min,94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,72 ℃延伸 5 min;使用人 GAPDH 作为内参,校正 MCP-1 的表达量,其引物序列为:上游 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′;产物长度 452 bp,PCR 反应条件:94 ℃温育 3 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,72 ℃延伸 5 min;反应结束后取 PCR 扩增产物每孔 10 μl,在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,电压 110 V。使用 Chemi Imager 5500 凝胶分析仪观察结果,检测条带光密度值。每例标本的 MCP-1 的相对表达量 = MCP-1 光密度值/GAPDH 光密度值。

1.3.2 免疫组织化学检测 标本用 10% 甲醛溶液固定 24 h 后,常规石蜡包埋切片(4 μm)。采用免疫组织化学(S-P)法。①切片常规脱蜡、水化组织切片、抗原修复;②3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min,PBS 冲洗,2 min × 3 次;③滴加一抗(浓度为 1∶100),4 ℃过夜,PBS 冲洗,2 min × 3 次;④滴加 Polymer-Helper(试剂 1),37 ℃孵育 10 ~ 20 min,PBS 冲洗,2 min × 3 次;⑤滴加 Poly-HRP anti-rabbit IgG(试剂 2),37 ℃孵育 10 ~ 20 min,PBS 冲洗,2 min × 3 次。⑥DAB 试剂显色;⑦自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。使用 PBS 替代一抗作为阴性对照。MCP-1 蛋白分布于细胞核周围细胞质,细胞质出现棕黄色颗粒者为阳性。光学显微镜(400 倍)视野下随机观察 5 个组织结构及背景清晰的区域,观察染色情况。采用 Image-Pro Plus(IPP) 5.1 专业图像分析系统测量每例标本中阳性细胞的累积光密度值和阳性表达面积,对 MCP-1 蛋白表达强度进行半定量分析。

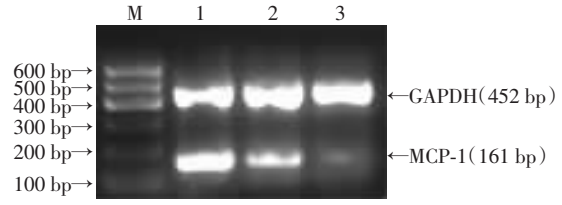
1.4 统计处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个组间计量资料比较采用方差分析,并使用 t 检验进行组间两两比较。

2 结果

2.1 MCP-1 mRNA 的表达情况

RT-PCR 电泳结果分析显示:MCP-1 mRNA 在转移性骨肿瘤中表达最强,在恶性原发性骨肿瘤中其次,在良性骨肿瘤中最弱。MCP-1 mRNA 在转移性骨肿瘤的标本中平均相对表达量为(0.862 ± 0.042);在原发性恶性骨肿瘤的标本平均相对表达量为(0.612 ± 0.051);在良性骨肿瘤中平均相对表达量为(0.171 ± 0.021),各组 MCP-1 mRNA 平均相对表达量之间有显著差别($P < 0.05$);各组 MCP-1 mRNA 相对表达量之间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。图 1 示 3 种不同类型骨肿瘤 MCP-1 mRNA 表达差异显著。

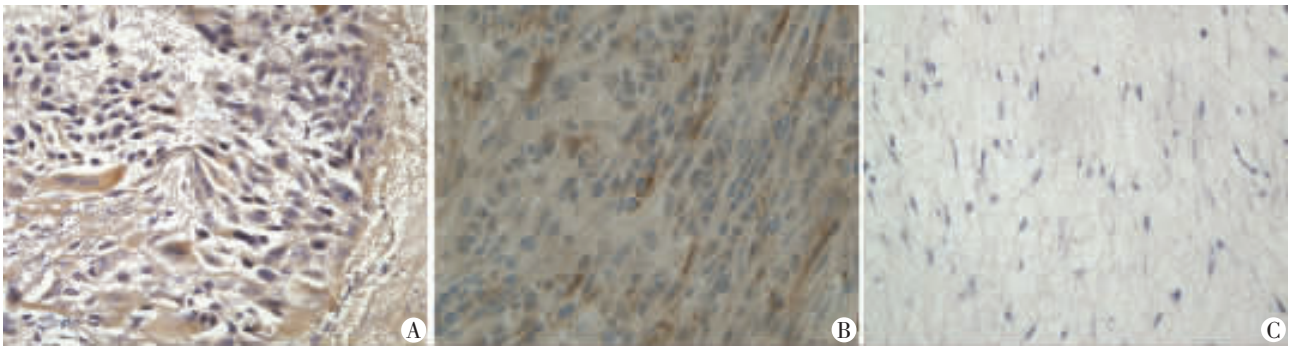


M:DNA 标准;1:转移性骨肿瘤组;2:原发恶性骨肿瘤组;3:良性骨肿瘤组

图 1 MCP-1 mRNA 在 3 种不同类型骨肿瘤中的差异性表达

2.2 MCP-1 蛋白在骨肿瘤组织中的表达

免疫组织化学染色显示 MCP-1 在各种骨肿瘤细胞以及肿瘤间质细胞的细胞质中表达(图 2)。根据 IPP 图像分析系统分析,用累计光密度和阳性表达面积两项指标进行量化评估,数据显示在转移性骨肿瘤中表达最强,恶性原发性骨肿瘤中次之,良性骨肿瘤中也可见少量弱阳性表达。各组 MCP-1 蛋白的相对表达量之间有显著差别($P < 0.05$);各组 MCP-1 蛋白的相对表达量之间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。



A：转移性骨肿瘤组；B：恶性原发性骨肿瘤组；C：良性骨肿瘤组

图2 MCP-1蛋白在骨肿瘤组织中的表达（S-P ×400）

表1 MCP-1蛋白在骨肿瘤组织中的表达情况（$n=15$，$\bar{x}\pm s$）

组别	累积光密度	面积（μm^2）
转移性骨肿瘤组	4 532.12±190.02[ab]	513.32±89.08[ab]
恶性原发性骨肿瘤组	2 592.11±120.21[a]	308.34±79.33[a]
良性骨肿瘤组	551.22±79.12	115.91±32.68

a：$P<0.05$，与良性骨肿瘤组比较；b：$P<0.05$，与恶性原发性骨肿瘤组比较

3 讨论

骨转移是恶性肿瘤晚期常见并发症，治疗困难，其发生率仅次于肺转移与肝转移。在骨肿瘤中，出现溶骨性破坏较成骨性破坏多见，肿瘤细胞释放破骨细胞激活因子，后者刺激破骨细胞吸收骨质，导致骨溶解破坏[5]。

MCP-1（CCL2）对单核细胞有强烈的诱导作用，是最早发现的CC族趋化因子之一。它最初是从小鼠3T3成纤维细胞分离提纯的[6]，后来从人胶质细胞瘤间单核细胞中分离纯化[7-8]。许多上游细胞因子可以调节MCP-1的表达[9]，多种细胞都可以分泌MCP-1。MCP-1最主要的来源是单核细胞和巨噬细胞。MCP-1在体内多种疾病中都扮演了重要的角色。例如脑利钠肽（BNP）通过对巨噬细胞的诱导，促进MCP-1的释放，但同时也能抑制TNF-α对MCP-1的促分泌作用，从而在心血管疾病中对炎症反应多向调控[10]。晚期氧化蛋白产物通过p38 MAPK信号转导途径诱导血管平滑肌细胞MCP-1的表达，从而参与肾动脉粥样硬化的调控[11]。MCP-1可以介导HIV感染的白细胞穿透血脑屏障逆向转移到中枢神经系统[12]。

骨肿瘤通过成骨和溶骨两种损害机制造成骨骼的重塑。在临床中骨肿瘤对骨的损伤能力一般与其恶性程度相关。骨骼重塑的过程中，单核巨噬细胞在骨损害位点的聚集，被认为起重要的调节作用。在单核巨噬细胞聚集的过程中MCP-1起到了非常重要的趋化作用[13]。正常骨组织中通常没有MCP-1的表达，在骨骼相关的炎症反应中可见MCP-1上调，但这种上调不是持续性存在。在单核细胞介导的骨骼重塑过程中，MCP-1对于破骨细胞的活化有很强的促进作用，同时，MCP-1不仅参与溶骨过程，而且与成骨性损害也密切相关[14]。

研究表明MCP-1特异性受体CCR2在前列腺癌骨转移中的表达高于原发性前列腺癌[15]。MCP-1能够体外诱导前列腺癌细胞的增殖和浸润[3]。本实验中转移性骨肿瘤组和恶性原发性骨肿瘤组中MCP-1的表达都显著高于良性骨肿瘤组，提示MCP-1高表达与骨肿瘤的恶性程度存在一定的相关性。我们认为：肿瘤的恶性程度越高，其侵袭力越强，所可能导致的肿瘤炎症反应的几率和反应的严重程度就会相应增加，炎症反应增强可引起继发性MCP-1表达上调，而MCP-1表达上调又可以增强某些肿瘤细胞的侵袭和增殖能力，形成恶性循环，进而放大肿瘤细胞的侵袭能力。

本实验中转移性骨肿瘤组MCP-1表达高于恶性原发性骨肿瘤组，其原因可能是转移性骨肿瘤骨骼周围的炎症反应程度高于恶性原发性骨肿瘤，MCP-1表达相应增高，而MCP-1表达上调刺激单核巨噬细胞聚集增加，提高了骨损害出现的几率、加重了骨损害的程度。骨转移组中肿瘤细胞的转移性、侵袭力、恶性程度相对于原发恶性组（无转移发生）都提高，因此会造成更严重的组织损害，引起更强烈的肿瘤炎症反应。同时MCP-1的高表达对破骨细胞活化有直接的促进作用，它还通过增强炎症反应的途径间接的活化破骨细胞，在转移性骨肿瘤骨质破坏重建过程中发挥重要作用。MCP-1在转移性骨肿瘤中与肿瘤的转移能力和肿瘤骨质破坏相关，因此MCP-1在转移性骨肿瘤中表现出更显著表达上调也就不难理解了。

有研究表明，部分肿瘤中MCP-1可能通过T淋巴细胞依赖性途径，增强肿瘤特异性免疫反应，实现对肿瘤的抑制作用。在小鼠MCP-1基因敲除乳腺癌细胞中，肿瘤细胞的转移能力显著提高[16]；与之相反，有大量研究也提示MCP-1对肿瘤有促进作用。例如有学者发现MCP-1和（RANTES）的联合表达促进了乳腺癌细胞的转移[17]。MCP-1主要功能是趋化单核细胞浸润肿瘤组织，而单核细胞如何发育、分化，则更多依赖

肿瘤微环境中诱导分化因子的综合作用。M1 型巨噬细胞发挥抗原提呈功能,参与肿瘤免疫反应的调节;而 M2 型巨噬细胞,则直接促进肿瘤生长、侵袭与转移;由各种细胞因子、趋化因子、炎症细胞组成的免疫微环境,不但影响巨噬细胞发育、分化,还直接参与肿瘤生长、免疫、侵袭和转移的各个环节。在大多数已经发生了恶性肿瘤的机体微环境内,其肿瘤免疫反应是处于失衡状态的。但肿瘤微环境中调节因素众多,某些肿瘤微环境有其特殊性,肿瘤免疫的调节某些时候是可以发挥积极的防御作用的。这可以解释为什么 MCP-1 在某些肿瘤中表现出抑制肿瘤的作用。本实验转移性骨肿瘤组中的肿瘤均已经发生转移、骨质破坏,其肿瘤免疫反应早已失衡,所以其 MCP-1 的表达上调表现出了对肿瘤的促进作用。众所周知,恶性肿瘤的分化程度越低,转移能力和侵袭能力越强。我们的研究证实,转移性骨肿瘤组中 MCP-1 基因表达量高,肿瘤细胞的分化程度低,肿瘤炎症反应程度重,瘤细胞的侵袭力、浸润能力及转移能力都相应增加。但究竟是 MCP-1 高表达导致肿瘤一系列能力增强,还是肿瘤侵袭力和转移力提升引起 MCP-1 增高,或者两者相互促进,还有待进一步研究。

综上所述,MCP-1 在骨肿瘤中可能具有以下几个方面的生物学作用:①趋化炎症细胞在肿瘤中的浸润;②诱导新生血管生成;③促进肿瘤细胞生长;④促进肿瘤侵袭和转移;⑤抑制抗肿瘤免疫应答,参与调节肿瘤免疫耐受;⑥激活破骨细胞参与骨质破坏。通过我们的研究结果及相关研究,可以推测:MCP-1 与骨肿瘤的发生、浸润、转移相关,在肿瘤炎性反应中,MCP-1 可能扮演了重要的角色。炎症反应作为机体重要的防御屏障有着积极的作用,过度的炎症反应对机体也会产生损伤,这也是国内外学者研究的热点之一。炎症反应作为一把“双刃剑”存在于人体多种生理和病理过程中,慢性炎症是多种肿瘤的危险因素[18]。MCP-1 作为炎症反应的重要调节因子,不仅对骨骼重塑具有重要作用,而且可能对骨肿瘤转移、浸润及肿瘤免疫反应、肿瘤微环境中细胞因子网络的调控都起着重要的作用。MCP-1 在骨肿瘤中具体作用机制及在恶性骨肿瘤中高表达的意义尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] Berenson J R, Rajdev L, Broder M. Pathophysiology of bone metastases[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(9): 1078 - 1081.

[2] Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(21/22): 1570 - 1579.

[3] Lu Y, Cai Z, Galson D L, *et al*. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion[J]. Prostate, 2006, 66(12): 1311 - 1318.

[4] Lu Y, Xiao G, Galson D L, *et al*. PTHrP-induced MCP-1 production by human bone marrow endothelial cells and osteoblasts promotes osteoclast differentiation and prostate cancer cell proliferation and invasion *in vitro*[J]. Int J Cancer, 2007, 121(4): 724 - 733.

[5] Yin J J, Pollock C B, Kelly K. Mechanisms of cancer metastasis to the bone[J]. Cell Res, 2005, 15(1): 57 - 62.

[6] Cochran B H, Reffel A C, Stiles C D. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor[J]. Cell, 1983, 33(3): 939 - 947.

[7] Matsushima K, Larsen C G, DuBois G C, *et al*. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line[J]. J Exp Med, 1989, 169(4): 1485 - 1490.

[8] Yoshimura T, Robinson E A, Tanaka S, *et al*. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes[J]. J Immunol, 1989, 142(6): 1956 - 1962.

[9] Sheikine Y, Hansson G K. Chemokines and atherosclerosis[J]. Ann Med, 2004, 36(2): 98 - 118.

[10] 郜攀,黄岚,郭瑞威,等. B 型利钠肽对小鼠腹腔巨噬细胞 MCP-1 蛋白表达的双向调节作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(15): 1452 - 1455.

[11] 彭侃夫,赵洪雯,余荣杰,等. 晚期氧化蛋白产物诱导血管平滑肌细胞表达 MCP-1 及其信号转导通路的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 101 - 103.

[12] Eugenin E A, Osiecki K, Lopez L, *et al*. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS[J]. J Neurosci, 2006, 26(4): 1098 - 1106.

[13] Kim Y Y, Kim S H, Oh S, *et al*. Increased fat due to estrogen deficiency induces bone loss by elevating monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production[J]. Mol Cells, 2010, 29(3): 277 - 282.

[14] Lisignoli G, Toneguzzi S, Grassi F, *et al*. Different chemokines are expressed in human arthritic bone biopsies: IFN-gamma and IL-6 differently modulate IL-8, MCP-1 and rantes production by arthritic osteoblasts[J]. Cytokine, 2002, 20(5): 231 - 238.

[15] Lu Y, Cai Z, Xiao G, *et al*. CCR2 expression correlates with prostate cancer progression[J]. J Cell Biochem, 2007, 101(3): 676 - 685.

[16] Takahashi M, Miyazaki H, Furihata M, *et al*. Chemokine CCL2/MCP-1 negatively regulates metastasis in a highly bone marrow-metastatic mouse breast cancer model[J]. Clin Exp Metastasis, 2009, 26(7): 817 - 828.

[17] Soria G, Yaal-Hahoshen N, Azenshtein E, *et al*. Concomitant expression of the chemokines RANTES and MCP-1 in human breast cancer: a basis for tumor-promoting interactions[J]. Cytokine, 2008, 44(1): 191 - 200.

[18] Weber D, Wheat J M, Curri G M. Inflammation and cancer: tumor initiation, progression and metastasis, and Chinese botanical medicines[J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2010, 8(11): 1006 - 1013.

(收稿 2010-11-22 修回 2010-12-24)
(编辑 王 红)