DOI:10.16016/j.1000-5404.201511022

永生化食管上皮恶变细胞中核干细胞因子、细胞周期蛋白 B1 和 PTEN 的表达

胡梦竹[1],王 娟[2],张 巧[3],高社干[4],张功员[1] (450001 郑州,郑州大学公共卫生学院:流行病与卫生统计学教研室[1],卫生毒理学教研室[3];050000 石家庄,河北省人民医院病案统计室[2];471000 河南 洛阳,河南科技大学第一附属医院肿瘤内科[4])

[**摘要**] **目的** 观察核干细胞因子(nucleostemin,NS)、细胞周期蛋白 B1(Cyclin B1)及抑癌基因 PTEN mRNA 和蛋白的表达情况。**方法** 正常食管上皮细胞(shantou human embryonic esophageal epithelial cell line,SHEE)和永生化食管上皮恶变细胞(shantou human embryonic esophageal carcinoma epithelial cell line,SHEEC)连续传代培养,取对数生长期 SHEE 和 SHEEC 细胞,采用 RT-PCR 及 Western blot 方法检测细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN mRNA 和蛋白的表达并做相关性分析,MTT 法检测抑制 NS 表达后的细胞增殖活性。**结果** 以 SHEE 细胞中 NS、Cyclin B1 和 PTEN mRNA 的表达量为 1,SHEEC 细胞中对应的相对表达量分别为(2.047 ±0.507)、(2.214 ±0.213)及(0.668 ±0.188),两组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);SHEE 及 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN 蛋白表达量分别为(1.142 ±0.113),(3.161 ±0.108)、(1.585 ±0.056),(2.173 ±0.058)及(1.894 ±0.341),(1.162 ±0.524),两组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);NS mRNA 和蛋白与 Cyclin B1 mRNA 和蛋白的表达呈正相关($r=0.832$,$P<0.01$;$r=0.991$,$P<0.05$),与 PTEN mRNA 和蛋白的表达呈负相关($r=-0.924$,$P<0.01$;$r=-0.769$,$P<0.05$);MTT 检测结果显示,NS RNA 干扰(RNA interference, RNAi)组与空白对照组和阴性对照组在干扰后 12 h 细胞增殖能力差异无统计学意义($P>0.05$),而在干扰后 24、36、48 h 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 mRNA 和蛋白的表达量均高于 SHEE,而 PTEN 的表达量低于 SHEE,NS 可能对细胞恶变有影响。

[**关键词**] 永生化食管上皮恶变细胞;核干细胞因子;细胞周期蛋白 B1;PTEN
[**中图法分类号**] R329.28; R730.23; R735.1 [**文献标志码**] A

Expression of nucleostemin, Cyclin B1 and PTEN in immortalized esophageal epithelial malignant cells

Hu Mengzhu[1], Wang Juan[2], Zhang Qiao[3], Gao Shegan[4], Zhang Gongyuan[1] ([1]Department of Epidemiology and Health Statistics, [3]Department of Health Toxicology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450001; [2]Medical Record and Statistics Room, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei Province, 050000; [4]Department of Medical Oncology, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan Province, 471000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of nucleostemin (NS), Cyclin B1 and tumor suppressor gene, phosphatase and tensin homolog (PTEN) at mRNA and proteins levels in Shantou human embryonic esophageal epithelial cell line (SHEE) and Shantou human embryonic esophageal carcinoma epithelial cell line (SHEEC). **Methods** The SHEE and SHEEC cells were continuously subcultured, and the cells at the logarithmic growth phase were selected for the expression of NS, Cyclin B1 and PTEN at

[**基金项目**] 河南省基础与前沿技术研究计划项目(132300410129)
[**通信作者**] 张功员,E-mail: zgy@zzu.edu.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160126.1536.030.html(2016-01-26)

mRNA and proteins levels by RT-PCR and Western blotting. The levels were analyzed for correlation. Cell viability was detected by MTT assay after interference expression of NS. **Results** The mRNA expression of NS and Cyclin B1 were 2.047 ± 0.507 and 2.214 ± 0.213 times higher, while that of PTEN was 0.668 ± 0.188 times lower in the SHEEC cells than the SHEE cells ($P < 0.05$). Significance differences were also seen in the protein levels of NS, Cyclin B1 and PTEN between the SHEE and SHEEC cells (1.142 ± 0.113 *vs* 3.161 ± 0.108, 1.585 ± 0.056 *vs* 2.173 ± 0.058, 1.894 ± 0.341 *vs* 1.162 ± 0.524, $P < 0.05$). The mRNA and protein expression levels of NS were positively correlated with those of Cyclin B1 ($r = 0.832$, $P < 0.01$; $r = 0.991$, $P < 0.01$), and negatively correlated with PTEN ($r = -0.924$, $P < 0.01$; $r = -0.769$, $P < 0.05$). MTT assay showed that there were no significant difference in cell proliferation among NS RNAi group, MOCK group, and NC group at 12 h after RNA interference, but significant differences were seen in 24, 36 and 48 h thereafter ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of NS and Cyclin B1 at mRNA and protein levels are higher, while those of PTEN is lower in SHEEC cells than SHEE cells. NS may affect the malignant progression of cells.

[**Key words**] Shantou human embryonic esophageal carcinoma epithelial cell line; nucleostemin; Cyclin B1; phosphatase and tensin homolog

Supported by the Project of Basic and Advanced Technology Research Plan of Henan Province (132300410129). Corresponding author: Zhang Gongyuan, E-mail: zgy@zzu.edu.cn

目前,食管癌仍是需要我国重点防控的恶性肿瘤之一[1]。核干细胞因子(nucleostemin,NS)是2002年Tsai等[2]发现的一个集中在大多数干细胞和许多肿瘤细胞中的新型蛋白,可能有维持干细胞和癌细胞增殖的作用,并能使细胞保持在不分化的状态[3]。有研究发现,NS基因在宫颈癌、胃癌、肝癌、肾癌以及乳腺癌等细胞中均有高表达,同时又对肿瘤细胞的恶性增殖、周期进展和凋亡逃逸有着重要的作用[4]。细胞周期蛋白B1(Cyclin B1)是细胞周期蛋白家族中最早被发现的,其基因定位于5q12,在人类恶性肿瘤中过表达,促使细胞进入G_2/M期,加速细胞周期进程,对细胞有丝分裂和细胞增殖有调控作用[5],并有研究发现其异常表达与肿瘤的侵袭、转移及预后相关,提示Cyclin B1在肿瘤发生发展中起作用。PTEN是1997年发现的一种具有磷酸酶活性的抑癌基因[6],由人染色体10q23纯合性缺失导致。PTEN基因可以抑制肿瘤细胞的生长及调节肿瘤细胞的侵袭和转移,并且在多种肿瘤中发生突变和转移,其低表达或缺失与肿瘤的发生、发展密切相关[7]。有研究表明NS可能与Cyclin B1是细胞通过G_2/M检验点的关键因子,PTEN是参与细胞周期调控重要的抑癌基因,可与NS结合,从而抑制其转录激活作用,并且NS可能通过PI3K/AKT/PTEN通路来影响细胞增殖。本实验采用RT-PCR、Western blot检测正常食管上皮细胞(shantou human embryonic esophageal epithelial cell line,SHEE)和永生化食管上皮恶变细胞(shantou human embryonic esophageal carcinoma epithelial cell line,SHEEC)中NS及与细胞增殖有关的Cyclin B1和抑癌基因PTEN mRNA和蛋白的表达差异,并用RNA干扰技术抑制NS的表达,然后检测细胞增殖活性,初步探索NS对SHEEC细胞癌变的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SHEE及SHEEC细胞,由河南科技大学第一附属医院高社干教授惠赠。

新生牛血清(美国Gibco公司),DMEM-F12培养基(美国Abcam公司),超纯RNA提取试剂盒、cDNA第1链合成试剂盒和Nc-细胞核/质蛋白抽提试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),SYBR Green Master Mix、MTT Cell Counting Kit(南京诺唯赞公司),鼠抗人多克隆NS抗体、鼠抗人多克隆Cyclin B1抗体和鼠抗人多克隆PTEN抗体(美国Abcam公司),辣根山羊抗兔Ig-G二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。主要实验仪器7500 Fast Real-time PCR (System Applied Biosystems,ABI公司),HFsafe-1200超净工作台和细胞培养箱(上海Heal Force公司),荧光化学成像仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 细胞培养

用含10%新生牛血清和支原体抗生素M-Plasmocin

(5 mg/L)的 DMEM-F12 完全培养基,在 5% CO_2、37 ℃、95%湿度的恒温培养箱中培养,1 ~2 d 换液,2 ~3 d 传代。

1.3 RT-PCR 检测 SHEE 及 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN mRNA 的表达

细胞处于对数生长期时收集各组细胞并计数,用康为世纪公司超纯 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,微量核酸测定仪检测 RNA 浓度和纯度,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

按康为世纪公司的 cDNA 第 1 链合成试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA 第 1 链。从 GenBank 上查找到 NS(NM_206826.1)、Cyclin B1(NM_031966.3)、PTEN (NM_000314)的基因序列,以 β-actin 为内参,所有引物由上海生工生物有限公司设计并合成。NS 引物上游:5′-AAAGCCATTCGGGTTGGAGT-3′;下游:5′-ACCACAGCAGTTTGGCAGCAC-3′,产物片段长度 240 bp。Cyclin B1 引物上游:5′-GCCAATAAGGAGGGAGCAGT-3′;下游:5′-ACCTACACCCAGCAGAAACC-3′,产物片段长度 101 bp。PTEN 引物上游:5′-AGACCATAACCCACCACAGC-3′;下游:5′-ACACCAGTTCGTCCCTTTCC-3′,产物片段长度 126 bp。β-actin 引物上游:5′-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3′;下游:5′-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3′,产物片段长度 200 bp。

RT-PCR 反应体系为 20 μL,其中 AceQTMQpcr SYBR® Green Master Mix 10 μL,Primer F(10μmol/L) 0.4 μL,Primer R(10 μmol/L) 0.4 μL,ROX Reference Dye2 0.4 μL ,模板 DNA 2 μL,RNase-Free Water 6.8 μL。采用两步法进行反应,反应条件为 95 ℃预变性 10 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,95 ℃ 15 s,绘溶解曲线。反应结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各组中目的基因的相对表达量,每组重复 6 次,取平均值。RT-PCR 产物的鉴定采用 2%的琼脂糖凝胶电泳,根据产物大小来判断目的条带以及有无非特性条带。

1.4 Western blot 检测 SHEE 及 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN 蛋白的表达

采用康为世纪公司的 Nc-细胞核/质蛋白抽提试剂盒提取各细胞组的核蛋白,并用 BCA 法测定蛋白样品的浓度。制备 10%分离胶和 5%浓缩胶,将测定好浓度的蛋白样品与 5 × SDS 上样缓冲液、RNase-Free Water 按比例混匀,95 ℃ 5 min 进行变性,室温冷却后短暂离心,每孔 20 μL 的上样量,按照 80 V 40 min,120 V 80 min 进行 SDS-PAGE 电泳,然后按纤维垫-滤纸-PVDF 膜-滤纸-纤维垫的顺序进行转膜,并赶走“三明治”中的气泡,恒流 290 mA 90 min 转膜。5%脱脂奶在 37 ℃恒温摇床上封闭 2 h,然后分别加入 NS 一抗 (1∶7 000)、Cyclin B1 一抗(1∶1 000)、PTEN 一抗(1∶500)和内参 β-actin 一抗(1∶5 000),4 ℃过夜后,TBST 漂洗 3 × 10 min,再加入羊抗兔 Ig-G 二抗(1∶10 000)在 37 ℃摇床上孵育 1 h,TBST 洗膜 3 × 10 min 后用 ECL 化学发光显色试剂盒在荧光化学成像仪中显影。采用 Iamge J 软件对 Western blot 显影结果进行分析,其条带以灰度值来呈现,以解析度为单位,按照灰度值的高低半定量分析样品中蛋白的相对表达量。

1.5 MTT 法检测干扰 NS 后细胞增殖活性

取对数生长期的 SHEEC 细胞,收集细胞并计数,以(1.5 ~5) ×10^4/mL 的细胞数接种到 96 孔板,每孔 100 μL。实验设置空白对照组、阴性对照组和 siRNA 干扰组(RNAi 组)。siRNA 干扰组在铺板 24 h 后进行细胞转染,用小干扰 RNA(siRNA)干扰 NS 的表达,转染后 12、24、36、48 h 进行 MTT 实验,具体方法为吸弃转染的培养液,PBS 洗 2 次后向 96 孔板各孔中加入 50 μL 稀释好的 MTT 反应液,37 ℃恒温培养箱孵育 4 h,吸去上清,然后每孔加入 150 μL DMSO,37 ℃恒温摇床上孵育 10 min 后用酶标仪检测 490 nm 波长处的光密度值[D(490)],每组重复 3 次,取平均值。

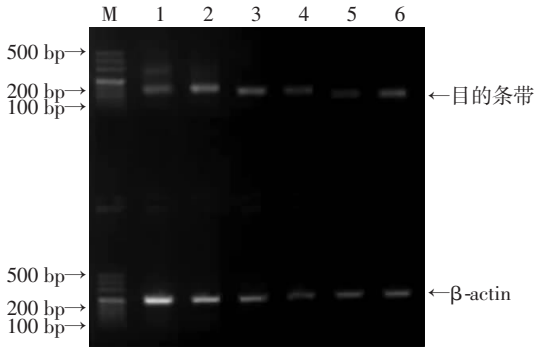
1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数的比较采用两独立样本 t 检验,两组间的相关性分析采用双变量相关分析,多组均数间的比较采用单因素方差分析,多组均数间的两两比较采用 LSD 法,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 SHEE 和 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN mRNA 表达

SHEE 和 SHEEC 细胞中均有 NS、Cyclin B1 和 PTEN mRNA 的表达,主要在 240 bp、101 bp、126 bp 和内参条带出现目的条带,见图 1。NS、Cyclin B1 mRNA 在 SHEEC 细胞中高表达,PTEN mRNA 在 SHEEC 细胞中低表达。以 SHEE 细胞中的表达量为 1,与 SHEEC 细胞中 NS(2.047 ±0.507)、Cyclin B1(2.214 ±0.213)和 PTEN mRNA(0.668 ±0.188)的表达量差异有统计学意义($P < 0.01$)。

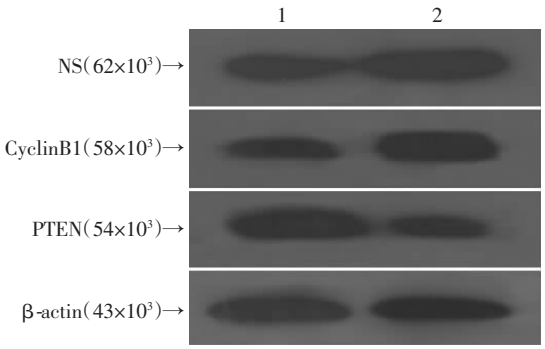


1、3、5 分别为 NS、PTEN 和 Cyclin B1 mRNA 在 SHEE 细胞中的表达;2、4、6 分别为 NS、PTEN 和 Cyclin B1 mRNA 在 SHEEC 细胞中的表达;M:标准(DL500)

图 1　RT-PCR 检测 SHEE 及 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 和 PTEN mRNA 的表达

2.2　SHEE 和 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN 蛋白的表达

SHEE 和 SHEEC 细胞中均有 NS、Cyclin B1 和 PTEN 蛋白的表达,见图 2。NS、Cyclin B1 蛋白在 SHEEC 细胞中高表达,PTEN 蛋白在 SHEEC 细胞中低表达。各组中 NS、Cyclin B1 和 PTEN 的蛋白表达水平,见表 1。



1:SHEE 细胞;2: SHEEC 细胞

图 2　Western blot 检测 SHEE 及 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1、PTEN 蛋白的表达

表 1　SHEE 及 SHEEC 中 NS、Cyclin B1、PTEN 蛋白表达水平($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

细胞	NS	Cyclin B1	PTEN
SHEE	1.142±0.113	1.585±0.056	1.894±0.341
SHEEC	3.161±0.108	2.173±0.058	1.162±0.524
t	−27.353	−17.792	2.868
P	0.000	0.000	0.017

2.3　SHEE 和 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN 表达的相关性

2.3.1　SHEE 和 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN mRNA 表达的相关性　　SHEE 和 SHEEC 细胞中 NS 与 Cyclin B1 mRNA 的表达呈正相关($r=0.832$),NS 与 PTEN mRNA 的表达呈负相关($r=-0.924$),两组之间比较的差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.3.2　SHEE 和 SHEEC 细胞中 NS、Cyclin B1 及 PTEN 蛋白表达的相关性　　SHEE 和 SHEEC 细胞中 NS 与 Cyclin B1 蛋白的表达呈正相关($r=0.991$),NS 与 PTEN 蛋白的表达呈负相关($r=-0.769$),两组之间比较的差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4　抑制 SHEEC 细胞 NS 表达对细胞增殖的影响

酶标仪测定空白对照组、阴性对照组和 siRNA 干扰组(RNAi 组)细胞增殖活性结果见表 2,同一时间两两比较结果显示,转染 12 h 时 RNAi 组与空白对照组、阴性对照组比较细胞增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$),转染 24、36、48 h,3 组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 2　各组细胞转染后不同时间细胞增殖活性的变化

[$D(490)$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$]

组别	12 h	24 h	36 h	48 h
空白对照组	0.383±0.057	0.474±0.058	0.642±0.126	0.769±0.099
阴性对照组	0.375±0.047	0.454±0.060	0.610±0.112	0.753±0.120
RNAi 组	0.371±0.060	0.390±0.010	0.464±0.035	0.576±0.076
F	0.054	4.059	4.562	5.704
P	0.948	0.044	0.034	0.018

3　讨论

食管癌是威胁人类生命健康最常见的恶性肿瘤之一,它的浸润转移是引起食管癌恶化的主要原因。癌基因和抑癌基因相互作用,共同参与肿瘤的发生、发展[8]。核干细胞因子 NS 在多种人类癌细胞中高表达,在干细胞的早期多潜能状态时表达丰度很高,而在干细胞分化开始时 NS 基因的表达几乎完全消失,在分化的成体组织中该基因完全不表达。近年来研究发现,NS 与细胞恶性增殖、细胞周期进展以及肿瘤的发生、发展紧密相关[9]。

本研究采用正常食管上皮细胞 SHEE 及其恶变细胞 SHEEC 作为实验对象。SHEE 及 SHEEC 细胞系是由沈忠英[10]建立并培养传代,永生化食管细胞系可以研究正常食管细胞诱导恶变转化成永生化细胞以及向恶性细胞转化的条件及其发生发展的过程,为食管癌的癌变过程及其治疗提供一种新的模型[11],是近年来肿瘤研究的新热点和新领域。研究结果发现癌细胞

SHEEC 中 NS 基因和蛋白的表达量显著高于正常细胞 SHEE,张功员等[12]研究同样发现食管鳞状细胞癌组织中 NS 蛋白的表达率显著高于癌旁不典型增生组织和正常食管黏膜组织。本研究还发现细胞周期蛋白 Cyclin B1 mRNA 和蛋白均在 SHEEC 中高表达,而抑癌基因 PTEN mRNA 和蛋白却在 SHEEC 细胞中低表达,这与 Qin 等[13]研究结果相一致。同时还做了 NS、Cyclin B1 及 PTEN mRNA 和蛋白相关性分析,在 SHEE 和 SHEEC 细胞中,NS mRNA 和蛋白与 Cyclin B1 mRNA 和蛋白的表达呈正相关,与 PTEN mRNA 和蛋白的表达呈负相关,提示 NS 可能与 Cyclin B1 共同作用,通过调控细胞周期而作用于细胞增殖,PTEN 可与 NS 结合从而抑制其转录激活作用,具体机制问题还需进一步的研究。细胞增殖实验表明干扰 NS 表达后,SHEEC 细胞增殖能力低于空白对照组和阴性对照组,提示 NS 低表达能抑制 SHEEC 细胞的增殖活性。但是,永生化食管上皮恶变细胞是由促癌物十二烷基葵豆蔻(TPA)诱导建立的,它只是具有肿瘤特征而不是真正的肿瘤细胞,此结论只能作为参考,还需进一步的研究论证。

综上,NS 可能对食管上皮恶变细胞的癌变有促进作用,可望成为食管癌研究和治疗的一个新的靶点,对食管癌的基因治疗等临床应用具有重要作用。但是 NS 的生物学功能和在肿瘤恶性增殖中的作用机制目前还不清楚,仍需进一步的探索。

参考文献:

[1] 张思维, 张敏, 李光琳, 等. 2003~2007 年中国食管癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(4): 241-247.

[2] Tsai R Y, McKay R D. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(23): 2991-3003. DOI: 10.1101/gad.55671

[3] Lo D, Lu H. Nucleostemin: Another nucleolar "Twister" of the p53-MDM2 loop[J]. Cell Cycle, 2010, 9(16): 3227-3232. DOI: 10.4161/cc.9.16.12605

[4] Yamashita M, Nitta E, Nagamatsu G, *et al*. Nucleostemin is indispensable for the maintenance and genetic stability of hematopoietic stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(1): 196-201. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.032

[5] 刘馨莲, 李淑荣, 孙静, 等. 细胞周期蛋白在食管癌中的表达及意义[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(7): 1249-1252. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2012.07.032

[6] Li J, Yen C, Liaw D, *et al*. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947.

[7] 李季林, 肖建, 于如同. 肿瘤抑制基因 PTEN 研究新进展[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(5): 1034-1037. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2010.05.74

[8] 章福彬, 朱斌, 唐郡, 等. 核干细胞因子在食管癌组织中的表达及意义[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(20): 3923-3925, 3957.

[9] 吴鑫, 胡琳, 田明妹, 等. 核干细胞因子的最新研究进展[J]. 四川生理科学杂志, 2013, 35(3): 115-118. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3885.2013.03.008

[10] 沈忠英, 沈健, 蔡维佳, 等. 人乳头状瘤病毒 18 型 E6E7 基因诱导胎儿食管永生化上皮的生物学特性[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(3): 209-212. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.1999.03.002

[11] 李健, 齐义军, 王立东. 食管上皮永生化细胞系研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(11): 1317-1321. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3079.2005.11.015

[12] 张功员, 尹磊, 李晟磊, 等. 食管鳞状细胞癌组织中核干细胞因子蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(6): 1088-1090. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6825.2007.06.023

[13] Qin Q, Cheng H, Lu J, *et al*. Small-molecule survivin inhibitor YM155 enhances radiosensitization in esophageal squamous cell carcinoma by the abrogation of G_2 checkpoint and suppression of homologous recombination repair[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7: 62. DOI: 10.1186/s13045-014-0062-8

(**收稿**:2015-11-04;**修回**:2015-12-02)

(编辑 汪勤俭)