中图分类号：R979.1+2；R969　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2023)10－0055－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2023.10.014

*MTHFR*基因多态性对低剂量甲氨蝶呤单药治疗低危妊娠滋养细胞肿瘤疗效与药品不良反应的影响*

倪文琳[1]，童　彤[2]，吴颖其[2△]

（1. 安徽省铜陵市妇幼保健院，安徽 铜陵　244000；2. 安徽省立医院，安徽 合肥　230001）

摘要：目的　探讨亚甲基四氢叶酸还原酶（MTHFR）中C677T位点和A1298C位点基因型对低剂量甲氨蝶呤（MTX）单药治疗低危妊娠滋养细胞肿瘤（LR－GTN）的疗效与药品不良反应（ADR）的影响。**方法**　收集安徽省立医院2017年9月至2021年9月收治的行MTX单药化学药物治疗（简称化疗）的LR－GTN患者30例，治疗前采集患者DNA并对*MTHFR*中C677T位点和A1298C位点基因多态性进行检测，分析MTHFR酶活性和各基因型对MTX疗效和ADR的影响。**结果**　MTHFR不同的酶活性组（包括25%，48%，61%，66%，83%，100%酶活性组）MTX疗效无显著差异，*MTHFR* C677T位点（包括CT型、CC型、TT型）及A1298C位点（AA型、AC型、CC型）的不同基因型间MTX疗效无显著差异（$P>0.05$）。ADR发生率排名前3的为骨髓抑制（23例，76.67%），口腔黏膜炎（17例，56.67%），肝损伤（16例，53.33%），MTHFR不同的酶活性组间的骨髓抑制、口腔黏膜炎和肝损伤ADR的发生率无显著差异（$P>0.05$）；*MTHFR* C677T及A1298C双位点不同基因型间上述ADR的发生率无显著差异（$P>0.05$）。**结论**　*MTHFR*中C677T位点和A1298C位点基因多态性对低剂量MTX在治疗LR－GTN中的疗效与ADR未产生显著影响，但仍需进一步扩大样本量进行验证。

关键词：亚甲基四氢叶酸还原酶；基因多态性；C677T位点；A1298C位点；低危妊娠滋养细胞肿瘤；甲氨蝶呤；低剂量

Effects of *MTHFR* Gene Polymorphism on the Efficacy and Adverse Drug Reactions of Low－Dose Methotrexate Monotherapy for Low－Risk Gestational Trophoblastic Neoplasia

NI Wenlin[1], TONG Tong[2], WU Yingqi[2]

(1. Tongling Maternal and Child Health Hospital, Tongling, Anhui, China　244000; 2. Anhui Provincial Hospital, Hefei, Anhui, China　230001)

Abstract: Objective　To investigate the effects of C677T and A1298C genotypes in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) on the efficacy and adverse drug reactions (ADRs) of low－dose methotrexate (MTX) monotherapy for low－risk gestational trophoblastic neoplasia (LR－GTN). **Methods**　Thirty LR－GTN patients treated with MTX single drug chemotherapy in the Anhui Provincial Hospital from September 2017 to September 2021 were collected. Before treatment, the patients' DNA was collected to detect the C677T and A1298C gene polymorphisms in *MTHFR*. The effects of MTHFR enzyme activity and each genotype on the efficacy and ADRs of MTX monotherapy for LR－GTN were analyzed. **Results**　The efficacy of MTX monotherapy for LR－GTN among groups with different activities of MTHFR (including groups with 25%, 48%, 61%, 66%, 83% and 100% enzyme activities) was similar ($P>0.05$). The efficacy of MTX monotherapy for LR－GTN between different genotypes of *MTHFR* C677T (including CT type, CC type, TT type) and A1298C (AA type, AC type, CC type) was similar ($P>0.05$). The incidence of ADRs was highest in the bone marrow suppression (23 cases, 76.67%), followed by oral mucositis (17 cases, 56.67%) and liver injury (16 cases, 53.33%). The incidence of bone marrow suppression, oral mucositis and liver injury among groups with different activities of MTHFR was similar ($P>0.05$). The incidence of the above three ADRs between different genotypes of *MTHFR* C677T and A1298C was similar ($P>0.05$). **Conclusion**　The C677T and A1298C gene polymorphisms in *MTHFR* had no significant effect on the efficacy and ADRs of low－dose MTX monotherapy for LR－GTN, but further expansion of sample size is still needed for verification.

Key words: methylenetetrahydrofolate reductase; gene polymorphism; C677T locus; A1298C locus; low－risk gestational trophoblastic neoplasia; methotrexate; low dose

妊娠滋养细胞肿瘤（GTN）包括侵蚀性葡萄胎和绒癌[1]。侵蚀性葡萄胎恶性程度一般不高，预后较好，而绒癌反之。低危[国际妇产科联盟（FIGO）妇科肿瘤委员会临床分期（简称FIGO分期）中预后评分（简称FIGO评分）小于6分]妊娠滋养细胞肿瘤（LR－GTN）多采用单药治疗[2－3]。2018年的FIGO癌症报告和美国国立综合

*基金项目：2020年高等学校省级质量工程项目[2020jyxm2307]。

第一作者：倪文琳，女，硕士，主管药师，研究方向为妇产科临床药学，（电子信箱）814034572@qq.com。

△通信作者：吴颖其，女，硕士，副主任药师，研究方向为妇产科临床药学，（电子信箱）wyq0551@126.com。

癌症网络(NCCN,2020年)推荐LR－GTN可选择的药物均主要为甲氨蝶呤(MTX)。MTX属叶酸还原酶抑制剂,最少引起严重毒性[4]。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是人体叶酸代谢中的重要酶。有研究显示,*MTHFR*基因多态性可降低酶活性,引起叶酸缺乏,从而导致细胞周期不正常等系列异常生化反应,增加MTX清除及使用风险[5]。大量证据表明,*MTHFR* C677T位点与A1298C位点的基因多态性与高剂量MTX在血液系统疾病中出现的药品不良反应(ADR)存在关联[6－8]。在类风湿关节炎的治疗过程中,*MTHFR*基因多态性与ADR相关[9－11]。但目前未见关于*MTHFR*基因多态性对低剂量MTX治疗LR－GTN的疗效与ADR影响的研究。因此,本研究中探讨了*MTHFR*基因多态性对低剂量MTX治疗LR－GTN的疗效和ADR的影响,以期为患者提供个体化用药服务。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取安徽省立医院2017年9月至2021年9月收治行MTX单药治疗的LR－GTN患者30例,排除FIGO评分≥7分,单用MTX前采取其他化学药物治疗(简称化疗)方案,采用MTX周给药法或MTX 8日给药法的患者。患者侵蚀性葡萄胎含Ⅰ期6例,Ⅲ期22例;绒癌含Ⅰ,Ⅲ期各1例。详见表1。本研究经安徽省立医院医学伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

表1 患者一般资料[例(%),n=30]

Tab. 1 General data of patients [case (%), n=30]

项目		数值	项目		数值
年龄	<40岁	19(63.33)		>10 000~100 000	12(40.00)
	≥40岁	11(36.67)	临床病理类型	侵蚀性葡萄胎	28(93.33)
前次妊娠结局	葡萄胎	28(93.33)		绒癌	2(6.67)
	流产	2(6.67)	FIGO分期	Ⅰ期	7(23.33)
距前次妊娠时间	<4个月	29(96.67)		Ⅱ期	0(0)
	4~12个月	0(0)		Ⅲ期	23(76.67)
	>12个月	1(3.33)	FIGO评分	≤3分	25(83.33)
治疗前HCG值(IU/L)	≤1 000	4(13.33)		4~6分	5(16.67)
	>1 000~10 000	14(46.67)			

1.2 *MTHFR*基因多态型测定和治疗方法

治疗前,采用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集患者静脉血2 mL,应用DNA提取试剂盒提取DNA(安徽省立医院基因检测室),置－20 ℃冰箱保存。采用聚合酶链式反应(PCR)法检测*MTHFR*基因型,并进行焦硫酸测序。根据C677T及A1298C双位点的基因型将MTHFR酶活性进行分类,详见表2。采用MTX 5日疗法,予注射用甲氨蝶呤(山西普德药业有限公司,国药准字H14022462,规格为每支500 mg∶20 mL)0.4 mg/(kg·d),肌肉注射[12]。以人绒毛膜促性腺激素(HCG)降到2 IU/L并维持2~3个疗程为缓解,并以缓解定义为有效;未缓解、耐药及更换药物为无效。参照美国卫生及公共服务部颁布的常见不良事件评价标准(CTCAE)5.0版对骨髓抑制、口腔黏膜炎、肝损伤等不良反应进行分级。

表2 不同MTHFR酶活性患者MTX疗效

Tab. 2 Efficacy of MTX in patients with different activities of MTHFR enzyme

组别	基因型		疗效(例)		χ^2值	P值
	C677T位点	A1298C位点	有效	无效		
25%酶活性组(n=6)	TT型	AA型	1	5	7.734	0.171
48%酶活性组(n=6)	CT型	AC型	3	3		
61%酶活性组(n=1)	CC型	CC型	0	1		
66%酶活性组(n=8)	CT型	AA型	5	3		
83%酶活性组(n=3)	CC型	AC型	3	0		
100%酶活性组(n=6)	CC型	AA型	4	2		

1.3 统计学处理

采用SPSS 25.0统计学软件分析。计数资料以率(%)表示,行χ^2检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

16例(53.33%)患者达缓解。MTHFR不同的酶活性组间MTX疗效无显著差异($P>0.05$)。*MTHFR* C677T($\chi^2=4.439$,$P=0.109$)及A1298C($\chi^2=1.875$,$P=0.392$)位点的不同基因型间MTX疗效无显著差异。详见表2、表3。14例(46.67%)患者因不良反应严重、耐药而更换治疗方案;发生ADR 28例(96.67%),Ⅰ－Ⅳ级均有涉及,详见表4。25%,48%,61%,66%,83%,100%酶活性组分别发生ADR 11例次(36.67%)、16例次(53.33%)、1例次(3.33%)、14例次(46.67%)、8例次(26.67%)、14例次(46.67%)。发生率排名前3的ADR为骨髓抑制、口腔黏膜炎和肝损伤,MTHFR不同的酶活性组间骨髓抑制($\chi^2=2.050$,$P=0.842$),口腔黏膜炎($\chi^2=4.887$,$P=0.430$)和肝损伤($\chi^2=3.047$,$P=0.693$)的发生率均无显著差异,详见表5。*MTHFR* C677T位点各基因型组间骨髓抑制($\chi^2=1.544$,$P=0.462$),口腔黏膜炎($\chi^2=1.707$,$P=0.426$)和肝损伤($\chi^2=0.268$,$P=0.875$)的发生率均无显著差异。*MTHFR* A1298C位点各基因型组间骨髓抑制($\chi^2=0.932$,$P=0.628$),口腔黏膜炎($\chi^2=3.303$,$P=0.192$)和肝损伤($\chi^2=1.875$,$P=0.392$)的发生率均无显著差异。详见表6。

3 讨论

FIGO/世界卫生组织(WHO)制定了GTN临床分期,并建议预后评分≤6分的Ⅰ－Ⅲ期低危患者予单药化疗。虽然对LR－GTN单药化疗耐药后予更改化疗方案绝大部分患者仍有效,但会给患者带来更多的药品不良反应,影响将来生育,增加住院费用,延长住院时

表3 不同*MTHFR*基因分型患者MTX疗效(例,$n=30$)

Tab. 3 Efficacy of MTX in patients with different genotypes of *MTHFR* (case, $n=30$)

基因型		疗效(例)		χ^2值	P值
		有效	无效		
C677T位点	CT型($n=14$)	8	6		
	CC型($n=10$)	7	3	4.439	0.109
	TT型($n=6$)	1	5		
A1298C位点	AA型($n=20$)	10	10		
	AC型($n=9$)	6	3	1.875	0.392
	CC型($n=1$)	0	1		

表4 患者药品不良反应发生情况[例(%),$n=30$]

Tab. 4 Incidence of ADRs in patients [case (%), $n=30$]

不良反应	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	Ⅳ级	合计
骨髓抑制	3(10.00)	4(13.33)	6(20.00)	10(33.33)	23(76.67)
口腔黏膜炎	12(40.00)	1(3.33)	1(3.33)	3(10.00)	17(56.67)
肝损伤	8(26.67)	6(20.00)	2(6.67)	0(0)	16(53.33)
面部皮疹	5(16.67)	0(0)	0(0)	0(0)	5(16.67)
胃肠道反应	2(6.67)	0(0)	0(0)	1(3.33)	3(10.00)

表5 不同MTHFR酶活性患者药品不良反应发生情况[例(%)]

Tab. 5 Incidence of ADRs in patients with different activities of MTHR enzyme [case (%)]

组别	骨髓抑制	口腔黏膜炎	肝损伤	面部皮疹	胃肠道反应
25%酶活性组($n=6$)	4(66.67)	2(33.33)	3(50.00)	1(16.67)	1(16.67)
48%酶活性组($n=6$)	4(66.67)	5(83.33)	4(66.67)	2(33.33)	1(16.67)
61%酶活性组($n=1$)	1(100.00)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
66%酶活性组($n=8$)	6(75.00)	4(50.00)	3(37.50)	1(12.50)	0(0)
83%酶活性组($n=3$)	3(100.00)	2(66.67)	2(66.67)	1(33.33)	0(0)
100%酶活性组($n=6$)	5(83.33)	4(66.67)	4(66.67)	0(0)	1(16.67)

表6 不同*MTHFR*基因分型患者药品不良反应发生情况[例(%),$n=30$]

Tab. 6 Incidence of ADRs in patients with different genotypes of *MTHFR* [case (%), $n=30$]

基因型		骨髓抑制	口腔黏膜炎	肝损伤	面部皮疹	胃肠道反应
C677T位点	CC型($n=10$)	9(90.00)	6(60.00)	6(60.00)	1(10.00)	1(10.00)
	CT型($n=14$)	10(71.43)	9(64.29)	7(50.00)	3(21.43)	2(14.29)
	TT型($n=6$)	4(66.67)	2(33.33)	3(50.00)	1(16.67)	0(0)
A1298C位点	AA型($n=20$)	16(80.00)	10(50.00)	10(50.00)	3(15.00)	1(5.00)
	AC型($n=9$)	6(66.67)	7(77.78)	6(66.67)	2(22.22)	2(22.22)
	CC型($n=1$)	1(100.00)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

间等[13]。MTX为LR－GTN一线治疗药物,临床研究发现,5 d给药方案至今仍是包括耶鲁研究中心等在内的多个医学中心的标准治疗方案[12,14],其缓解率最高,毒副作用相对较低。但对MTX,4.00%～46.73%的患者产生耐药性,1.41%～3.69%的患者产生难以忍受的毒性反应,需挽救性化疗甚至手术[15]。因此,治疗效果和毒性间的平衡仍是MTX临床使用中亟待解决的问题。

QU等[16]首次报道了GTN患者肿瘤组织中*MTHFR* C677T与MTX的耐药有关,这一发现将*MTHFR*基因多态性与MTX疗效联系在一起。进一步研究表明,编码叶酸代谢酶的基因多态性,特别是2个常见的非同义SNPs677CNT和1298ANC,与MTHFR酶活性改变相关,影响MTX的疗效和毒性[17]。本研究中,首先根据患者*MTHFR* C677T及A1298C双位点的基因型进行MTHFR酶活性分类,发现MTX的疗效和ADR发生率与酶活性无明显关联。进一步分析单个基因型与MTX疗效和不良反应的关联,同样发现两者关联性不强。白小红等[18]的研究中采用大剂量MTX治疗急性淋巴细胞白血病患儿,结果发现CC型患儿胃肠道反应、黏膜损伤等ADR发生率均显著低于AA型患儿和AC型患儿。鉴于本研究中CC型患儿仅1例,尚需扩大样本以进一步确认*MTHFR* A1298C基因多态性对MTX单药治疗低危LR－GTN ADR的影响。

在使用MTX治疗时应根据*MTHFR*基因多态性给予临床指导。低剂量MTX在治疗*MTHFR*突变患者的植入性胎盘时,MTHFR的遗传多态性可能是严重毒性作用预测指标之一[19]。史天陆等[20]的研究发现,C677T突变型更易发生骨髓抑制,A1298C野生型的患者更易发生白细胞减少。但近期的研究证据提示*MTHFR*基因多态性检测临床效用较低,日本[16]和欧洲[21]的两项临床研究均发现*MTHFR*基因多态性无法预测MTX的疗效。MTX进入机体后,其代谢和排泄过程受到许多重要的酶和转运蛋白(如FPGSG和GGHSLCO1B1等)影响[5],但目前的证据尚无法表明这些酶和转运蛋白基因多态性对MTX在体内的治疗作用和ADR发生率的影响。美国医学遗传学和基因组学学会(ACMG)实践指南[22]明确指出,*MTHFR*基因多态性检测对MTX临床应用指导效果的影响很小,且MTX膜转运蛋白(流入和/或流出)被认为是MTX发挥疗效的主要决定因素[23],故临床在使用MTX治疗时可能无需检测*MTHFR*基因多态性。

MTX药品说明书(国内、欧美)中未推荐MTX治疗与代谢基因多态性相关联。大量证据表明,MTX的吸收、分布、代谢和排泄过程存在较大的个体差异,少数患者MTX血药浓度偏高,维持时间较长,这是其导致ADR发生的主要因素[24－25]。故在使用MTX进行治疗时,血药浓度监测已被临床广泛认可[26]。刘娟等[27]的研究显示,在使用MTX治疗侵蚀性葡萄胎过程中,以血药浓度监测结果为依据开展个体化用药治疗,能有效控制ADR发生率,且MTX毒性取决于体内药物浓度超过阈浓度(0.2 μmol/L)的持续时间,而非体内药物峰

浓度[27]。

综上所述，本研究中发现*MTHFR*中C677T和A1298C基因多态性对低剂量MTX治疗LR－GTN的疗效与ADR未产生影响。故建议临床不应根据*MTHFR*基因多态性结果指导MTX的个体化用药。但鉴于本研究的样本量较少，*MTHFR*基因多态性对MTX单药治疗LR－GTN的疗效与ADR发生率的影响尚需进一步扩大样本量加以确认。

参考文献

[1] SOPER JT. Gestational Trophoblastic Disease: Current Evaluation and Management[J]. Obstetrics & Gynecology, 2021, 137(2): 355－370.

[2] 康海利，赵　群，吴玉梅，等. 放线菌素D、甲氨蝶呤、放线菌素D联合甲氨蝶呤、BEP化疗方案治疗低危滋养细胞肿瘤对比观察[J]. 山东医药，2021，61(18)：5－9.

[3] 杭　晨，赵绍杰，蒋傅颖. 甲氨蝶呤单疗程治疗低危无转移妊娠滋养细胞肿瘤的疗效分析[J]. 江苏大学学报(医学版)，2018，28(6)：507－511.

[4] 吴晓东，陈丽莉，沈　涛，等. 甲氨蝶呤单药治疗低危妊娠滋养细胞肿瘤的疗效及其相关因素的研究[J]. 中华医学杂志，2017，97(23)：1769－1772.

[5] 皮　婷，夏洪颖，古　曦，等. 昆明地区妊娠女性MTHFR基因多态性分布研究[J]. 药物生物技术，2017，24(2)：137－140.

[6] YAO PL, HE X, ZHANG R, et al. The influence of MTHFR genetic polymorphisms on adverse reactions after methotrexate in patients with hematological malignancies: a meta－analysis[J]. Hematology, 2019, 24(1): 10－19.

[7] 成瑞香. 探讨基因多态性对甲氨蝶呤代谢及临床的影响及意义[D]. 青岛：青岛大学，2017.

[8] 黄　琳，于芝颖，顾　群，等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与甲氨蝶呤不良反应关系的Meta分析[J]. 中国临床药理学杂志，2016，32(2)：183－185.

[9] 宣依依，杨　晶，向　勇，等. 类风湿关节炎小剂量甲氨蝶呤治疗药物监测及基因多态性研究进展[J]. 郑州大学学报(医学版)，2019，54(4)：538－542.

[10] SUNDBAUM JK, BAECKLUND E, ERIKSSON N, et al. MTHFR, TYMS and SLCO1B1 polymorphisms and adverse liver effects of methotrexate in rheumatoid arthritis [J]. Pharmacogenomics, 2020, 21(5): 337－346.

[11] YUAN Y, SHAO WJ, LI YY. Associations between C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR and susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review and meta－analysis[J]. Rheumatology International, 2017, 37(4): 557－569.

[12] 沐　宇，石祥奎. 甲氨蝶呤治疗低危妊娠滋养细胞肿瘤的研究进展[J]. 临床合理用药杂志，2020，13(13)：175－177.

[13] 李　洁，向　阳. 低危妊娠滋养细胞肿瘤化疗现状及耐药发生相关因素[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2015，31(11)：1052－1054.

[14] WU XD, QIN JL, SHEN T, et al. The 16－year experience in treating low－risk gestational trophoblastic neoplasia patients with failed primary methotrexate chemotherapy[J]. Journal of Gynecologic Oncology, 2020, 31(4): e36.

[15] 王雯雯，周怀君，凌静娴，等. 低危妊娠滋养细胞肿瘤单药化疗耐药的高危因素分析[J]. 现代妇产科进展，2018，27(11)：808－811.

[16] QU J, USUI H, KAKU H, et al. Presence of the methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism MTHFR C677T in molar tissue but not maternal blood predicts failure of methotrexate treatment for low－risk gestational trophoblastic neoplasia [J]. European Journal of Pharmacology, 2017, 794: 85－91.

[17] ZHANG WC, LIU ZY, YANG ZM, et al. MTHFR Polymorphism Is Associated With Severe Methotrexate－Induced Toxicity in Osteosarcoma Treatment [J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 781386.

[18] 白小红，牛佳慧，倪美艳，等. MTHFR基因多态性与大剂量甲氨蝶呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病的临床疗效及药物不良反应的相关性分析[J]. 中国临床药理学杂志，2021，37(22)：3056－3059.

[19] TAN ZY, LIU W, GUO H, et al. Severe toxic effects of low－dose methotrexate treatment for placenta accreta in a patient with methylenetetrahydrofolate reductase mutations[J]. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 2020, 45(1): 214－217.

[20] 史天陆，张永煌，李　宇，等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因C677T和A1298C多态性与甲氨蝶呤致血液系统不良反应关系的Meta分析[J]. 药物不良反应杂志，2016，18(5)：321－329.

[21] CAMPBELL JM, BATEMAN E, STEPHENSON MD, et al. Methotrexate－induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta－analyses [J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2016, 78(1): 27－39.

[22] HICKEY SE, CURRY CJ, TORIELLO HV. ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing[J]. Genetics in Medicine, 2013, 15(2): 153－156.

[23] GAO J, WANG C, WEI W. The effects of drug transporters on the efficacy of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Life Sciences, 2021, 268: 118907.

[24] 李慧芳，王敏杰，张爱武. 低剂量注射用甲氨蝶呤致全身严重毒性反应探讨[J]. 中南药学，2018，16(12)：1807－1809.

[25] 陈海燕，王爱红. 甲氨蝶呤治疗侵蚀性葡萄胎时血药浓度监测分析[J]. 中国继续医学教育，2019，11(22)：108－110.

[26] 张相林. 甲氨蝶呤毒性相关基因多态性研究刍议[J]. 药物不良反应杂志，2019，21(3)：162－165.

[27] 刘　娟，陈志军. 临床药师参与一例小剂量甲氨蝶呤致严重骨髓抑制、肝损伤及皮肤损伤治疗的病例分析[J]. 临床合理用药杂志，2021，14(33)：173－175.

（收稿日期：2022－09－06；修回日期：2022－11－06）