

银杏叶提取物对泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞增殖及 Survivin, TIP30 基因表达的影响

牛坡¹, 赵新霞^{2*}, 燕飞³, 周雍明⁴, 简鹏⁵

(1. 河南省人民医院 肿瘤放射科, 河南 郑州 450003; 2. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003;
3. 郑州人民医院 中医科, 河南 郑州 450012;
4. 中国中医科学院 广安门中医院 肿瘤科, 北京 100053; 5. 河南推拿职业学院, 河南 洛阳 471000)

[摘要] 探讨银杏叶提取物(EGB)对泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞增殖、凋亡的影响,并从基因和蛋白水平上分析 EGB 对 Survivin 和 TIP30 基因表达的影响。不同浓度 EGB 处理体外培养的人泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞,应用 MTT 法检测细胞增殖;Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期;RT-PCR 和 Western blotting 分析 Survivin, TIP30 基因和蛋白的表达。结果发现 EGB 对 ACC-2 细胞的体外增殖具有抑制作用,量效关系显著,与对照组比较有统计学差异($P < 0.01$),半数抑制浓度(IC_{50})为 $88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经流式细胞仪检测表明,EGB 能使 ACC-2 细胞 G_0/G_1 期逐渐增加, G_2/M 期和 S 期逐渐减少,并且随着剂量的增加,ACC-2 细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。RT-PCR 与 Western 杂交结果一致表明随着 EGB 浓度的升高,Survivin 基因表达明显减少($P < 0.01$),而 TIP30 基因表达则显著提高($P < 0.01$)。因此,EGB 能有效抑制人泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞 Survivin 基因表达,并促进 TIP30 的表达,诱导 ACC-2 细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞增殖。该研究为中药成分在肿瘤治疗中的应用提供了一定的理论和实验依据。

[关键词] 银杏叶提取物;ACC-2 细胞;Survivin 基因;TIP30 基因

泪腺腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma, ACC)是泪腺恶性上皮性肿瘤中最为常见并且恶性程度最高的肿瘤,其发病率约占泪腺上皮性肿瘤的 29%,仅次于多形性腺瘤,居于第 2 位^[1]。其对常规放、化疗不敏感,以手术治疗为主,但由于该肿瘤生长具有较强的浸润性,好沿神经侵袭生长^[2],手术无法根除,术后复发率高且远期疗效较差,治疗比较棘手。因此,探求新的治疗方法已成为 ACC 研究的新方向。

银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba*, EGB)对肿瘤细胞的增殖有抑制作用,能诱导多种肿瘤细胞凋亡^[3,4],并能增强化疗药物的抑瘤作用,但其对 ACC 的抗肿瘤作用及其机制研究尚未见报道。Survivin 是近年新发现的凋亡抑制因子,通过抑制 Caspase 级联反应下游的 Caspase-3 和 Caspase-7 活

性,起到抑制细胞凋亡的作用,是目前肿瘤相关基因研究的热点问题之一^[5-8]。TIP30 是一种抑癌基因,可特异性作用于 HIV-1 长末端重复序列的蛋白,具有抑制细胞增殖,促进细胞凋亡及抑制细胞血管生成的作用。本研究通过观察 EGB 对泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞增殖、凋亡及 Survivin, TIP30 基因表达的影响,探讨 EGB 可能的抗肿瘤作用机制,为其进一步临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料

1.1 药物与试剂 银杏叶提取物(EGB761, 商品名:金纳多),德国威玛舒培博士药厂生产,批号 1140808。RT-PCR 试剂盒购自德国 Qiagen 公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司;Survivin 抗体、TIP30 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;RPMI-1640 培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;MTT、二甲基亚砜、琼脂糖购自美国 Amresco 公司;Trizol 总 RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司;Taq DNA 聚合酶, Oligod, RNasin 购自美国 Promage 公司;引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 细胞株 人泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞购于

[收稿日期] 2014-06-20

[通信作者] * 赵新霞, Tel: (0371) 63388789, E-mail: zxybfq@sohu.com

[作者简介] 牛坡, Tel: (0371) 65580723, E-mail: nippi2001@tom.com

中国科学院上海生命科学研究院。用含 10% 胎牛血清、2% 的谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度条件下培养。

1.3 仪器 CO₂培养箱(MCO175, SANYO); 倒置显微镜(IX-70, Olympus); 水平流超净工作台(ZHJH-2112); 流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson); PCR 扩增仪(Roche); ELX800 型酶标仪。

2 方法

2.1 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期的 ACC-2 细胞制成 2 × 10⁷ 个/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 培养 24 h。然后加入 EGB, 使其终浓度分别为 0, 10, 20, 40, 80, 160 mg · L⁻¹, 同时设对照孔和调零孔, 每组 6 个复孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 g · L⁻¹), 再培养 4 h 后吸去全部上清液, 然后每孔加入 200 μL 二甲基亚砷, 振荡摇匀终止反应, 使用酶标仪在 490 nm 处测吸光度(A), 计算肿瘤细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{药物组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.2 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期的 ACC-2 细胞制成 1 × 10⁶ 个/mL 细胞悬液, 接种于 12 孔培养板中, 每孔 2 mL, 加入 EGB 使其终浓度分别为 0, 10, 40, 160 mg · L⁻¹。培养 48 h 后, 调整待测细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/mL, 取 1 mL 细胞悬液, 4 °C 1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 冷 PBS 重悬细胞, 再重复离心, 弃上清, 加入 200 μL 结合缓冲液重悬, 再加入 10 μL Annexin V-FITC, 5 μL PI, 混匀, 室温避光孵育 15 min, 加入 300 μL 结合缓冲液, 立即用流式细胞仪检测细胞凋亡率并分析细胞周期。

2.3 RT-PCR 检测 Survivin 和 TIP30 mRNA 的表达

取对数生长期的 ACC-2 细胞, 培养 24 h, 加入 EGB 使其终浓度分别为 0, 10, 40, 160 mg · L⁻¹, 继续培养 48 h 后, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 电泳检测 RNA, 逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板 PCR 扩增 Survivin 和 TIP30, β-actin 为内参照基因。Survivin 上游引物 5'-GGCACCAGAGGCAGTAACCA-3', 下游引物 5'-GGACCTTCGGTACTGATGATCTAA-3'; TIP30 上游引物 5'-GTCTTTATTTTGGCGCCAG-3', 下游引物 5'-CCCAGCTTCCCTCTGGTGG-3'; β-actin 上游引物 5'-AACGGATTTG-GTCGTATTGGG-3', 下游引物 5'-AGTCTTCTGGGT-

GGCAGTGAT-3'。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。分别取 2 种基因的 PCR 产物 12 μL 于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统观察记录结果。

2.4 Western blotting 检测 Survivin, TIP30 蛋白表达

取 0, 10, 40, 160 mg · L⁻¹ EGB 作用 48 h 后的 ACC-2 细胞, 各收集 1 × 10⁷ 个细胞, 加入 200 μL 蛋白裂解液, 于 4 °C 裂解 1 h, 12 000 r · min⁻¹ 4 °C 离心 20 min 取上清, 用考马斯亮蓝蛋白质测定法测定蛋白浓度。取 80 μg 样品总蛋白变性 10 min 后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分离的蛋白带电转至 PVDF 膜上, 经 5% BSA 37 °C 封闭 1 h, 加入抗 Survivin 的单克隆抗体或抗 TIP30 的单抗 4 °C 孵育 16 h, 洗膜 3 次。再加入羊抗鼠二抗, 37 °C 孵育 1 h, 洗膜 3 次。化学发光显色检测分析结果。对蛋白条带灰度进行相对定量分析, 并以 β-actin 条带作为参照。

2.5 统计学方法 用 SPSS 15.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验或单因素方差分析, 率的比较采用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 EGB 对 ACC-2 细胞增殖的抑制作用 EGB 不同浓度对 ACC-2 细胞的体外增殖均有一定的抑制作用, 并且随着 EGB 浓度的增高, 抑制作用也在增强, 量效关系显著。各剂量组与对照组比较均有统计学差异(*P* < 0.01), 经 Logit 方法计算半数抑制浓度(IC₅₀)为 88 mg · L⁻¹, 见表 1。

表 1 EGB 对 ACC-2 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibitory action of EGB on cell proliferation of ACC-2 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ mg · L ⁻¹	A	抑制率/%
对照	-	0.835 ± 0.037	-
EGB	10	0.643 ± 0.016 ¹⁾	22.99
	20	0.561 ± 0.018 ¹⁾	32.81
	40	0.457 ± 0.020 ¹⁾	45.27
	80	0.415 ± 0.021 ¹⁾	50.30
	160	0.382 ± 0.019 ¹⁾	54.25

注: 与对照组相比¹⁾ *P* < 0.01 (表 3 同)。

3.2 EGB 对 ACC-2 细胞周期和凋亡的影响 EGB

使 ACC-2 细胞 G_0/G_1 期逐渐增加, G_2/M 期和 S 期逐渐减少, 并且随着剂量的增加, ACC-2 细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 2。

表 2 EGB 对 ACC-2 细胞周期和凋亡的影响
Table 2 Effect of EGB on the cell cycle and apoptosis of ACC-2

组别	剂量/ $mg \cdot L^{-1}$	$G_0/G_1/\%$	$G_2/M/\%$	S/ $\%$	凋亡率/ $\%$
对照	-	46.37	8.11	45.52	8.68
EGB	10	52.97	7.15	39.88	17.96
	40	56.68	5.93	37.39	21.72 ²⁾
	160	61.38	4.59	34.03	24.53 ¹⁾

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 Western blotting 分析 EGB 对 Survivin, TIP30 蛋白表达的影响 随着 EGB 浓度的升高, Survivin 蛋白表达明显减少, 而 TIP30 表达则明显升高, 量效关系明显, 见图 1。

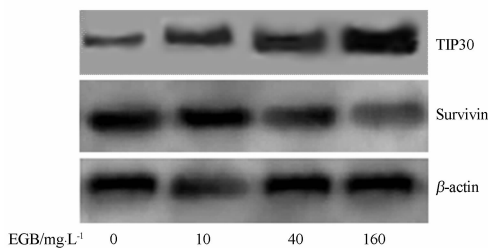


图 1 EGB 对 Survivin, TIP30 蛋白表达的影响
Fig. 1 Effect of EGB on Survivin, TIP30 expression

3.4 EGB 对 ACC-2 细胞 Survivin, TIP30 基因相对含量及 Suivivin 基因表达抑制率的影响 EGB 不同浓度对 ACC-2 细胞 Survivin 基因均有一定的抑制作用, 并且随着 EGB 浓度的增高, 抑制作用也在增强, 量效关系显著; 与之相反, TIP30 基因的相对含量则随着 EGB 给药剂量的增大而逐渐增高。各剂量组与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.01$), 见图 2 和表 3。

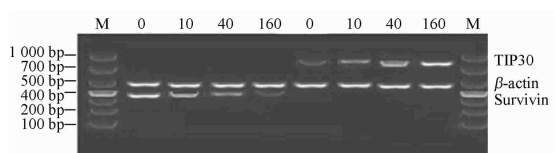


图 2 EGB 对 Survivin, TIP30 基因表达的影响
Fig. 2 Effect of EGB on the expression of Survivin and TIP30

表 3 EGB 对 ACC-2 细胞 TIP30, Survivin 基因相对含量及其表达抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of EGB on the relative amount and expression inhibition rate of TIP30 and Survivin gene in ACC-2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $mg \cdot L^{-1}$	TIP30 相对含量	Survivin 相对含量	Suivivin 表达抑制率/ $\%$
对照	-	0.13 \pm 0.03	0.85 \pm 0.06	-
EGB	10	0.39 \pm 0.06 ¹⁾	0.52 \pm 0.07 ¹⁾	38.82
	40	0.76 \pm 0.08 ¹⁾	0.44 \pm 0.08 ¹⁾	48.24
	160	0.91 \pm 0.12 ¹⁾	0.31 \pm 0.06 ¹⁾	63.53

3 讨论

泪腺腺样囊性癌是一种浸润性强预后差的肿瘤, 其发病机制及治疗一直是临床亟待解决的重要课题, 虽经多年研究, 目前仍未找到有效的治疗手段^[9]。由于中药具有多途径、多靶点、毒副作用低等优点, 已成为抗肿瘤研究的热点之一^[9-10]。EGB 是从银杏叶中分离纯化的有效组分, 主要含有黄酮和内酯类化合物。近年来, 有研究证明 EGB 具有一定的抗肿瘤活性, 对胃癌^[11]、肝癌^[12]、肠癌^[13]及乳腺癌^[14]均有一定的杀伤作用, 但其抗肿瘤作用的确切机制尚不十分明确。本研究中 EGB 不同浓度对 ACC-2 细胞的体外增殖有一定的抑制作用, 并且量效关系显著 ($P < 0.01$), 经 Logit 方法计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $88 mg \cdot L^{-1}$ 。

有研究表明肿瘤的发生、发展不仅与细胞的增殖分化异常有关, 还与其凋亡障碍有关^[15]。细胞凋亡是一种维持机体自身平衡所必须的生理性细胞自杀过程, 受基因调控。本研究采用 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测发现, EGB 促进 ACC-2 细胞凋亡的同时, 也使 ACC-2 细胞周期分布发生明显改变。EGB 作用 48 h 后, 停滞于 G_0/G_1 期的细胞比例明显增加, 而进入 S 期的细胞比例明显下降, 并且这种阻滞效应具有一定的剂量依赖性。提示 EGB 对泪腺腺样囊性癌细胞 ACC-2 的增殖抑制作用可能是由于 EGB 改变了细胞周期的分布, 使多数细胞停滞于细胞分化期即 G_1 期, 阻止细胞向 S 期转化, 从而减少了 DNA 合成和有丝分裂并促进其分化。

Survivin 是近年来发现的抗凋亡作用最强的细胞调节因子之一, 定位于染色体 17q25, 编码 142 个氨基酸^[16], 属凋亡抑制蛋白家族 (IAPs) 成员。Survivin 可抑制 Caspase-3 的活化, 从而阻断细胞凋亡

过程,其过度表达可能是肿瘤发生、发展及预后不良的主要因素^[17]。研究发现, Survivin 选择性表达于恶性肿瘤,并随着恶性程度增高表达增强,而在正常组织中不表达或少量表达^[18-19]。TIP30 首先是作为一个抑癌基因被发现的^[20],随后其抑癌作用被不断得到研究和证实。Mitsuhiro 等^[21]做小鼠基因剔除试验发现剔除 TIP30 基因的小鼠易自发发生肝癌、输尿管癌和膀胱癌,充分证明 TIP30 是一个重要的肿瘤抑制因子。本研究采用 RT-PCR 和 Western blotting 分别从基因水平和蛋白水平上分析 Survivin, TIP30 的表达,结果一致表明,随着 EGB 浓度的升高, Survivin 表达明显减少, TIP30 的表达量则随着 EGB 浓度升高升高。由此结果推测, EGB 抑制细胞凋亡通路中 Survivin 表达后,可解除对 Caspase-3 的抑制而活化细胞凋亡信号转导通路;另一方面, TIP30 具有促凋亡作用,它通过高表达上调一系列的促凋亡基因的表达以抑制 ACC-2 细胞的增殖。这或许是 EGB 诱导泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞凋亡的机制和 EGB 抗肿瘤作用的分子基础。

[参考文献]

- [1] Mitani Y, Li J, Rao P H, et al. Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: incidence, variability, and clinicopathologic significance [J]. Clin Cancer Res, 2010,16(19):4722.
- [2] Gomez D R, Hoppe B S, Wolden S L, et al. Outcomes and prognostic variables in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a recent experience [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008,70(5):1365.
- [3] Kang J W, Kim J H, Song K, et al. Kaempferol and quercetin, components of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells [J]. Phytother Res, 2010,24(1):S77.
- [4] 赵晶丽,史琳. 银杏叶提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):262.
- [5] 黄恺飞,庄媛,黄亦琦,等. 汉黄芩素抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭的实验研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1485.
- [6] 崔庆丽,邵梅,舒琦瑾. 南方红豆杉水提物抑制裸鼠 A549 肺癌移植瘤生长及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(20):3549.
- [7] Zhang T, Fields J Z, Opendenaker L, et al. Survivin-induced aurora-B kinase activation: a mechanism by which APC mutations contribute to increased mitoses during colon cancer development [J]. Am J Pathol, 2010,177(6):2816.
- [8] Grossi F, Spizzo R, Bordo D, et al. Prognostic stratification of stage III A pN2 non-small cell lung cancer by hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data: an alpe adria thoracic oncology multidisciplinary group study (ATOM 014) [J]. J Thorac Oncol, 2010,5(9):1354.
- [9] 林俊,李萍,陈靠山. 近 5 年多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(8):1116.
- [10] 郭林丰,童姗姗,余江南,等. 苦参碱抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(20):3409.
- [11] Jiang X Y, Qian L P, Zheng X J, et al. Interventional effect of *Ginkgo biloba* extract on the progression of gastric precancerous lesions in rats [J]. J Dig Dis, 2009,10(4):293.
- [12] Dias M C, Rodrigues M A, Reimberg M C, et al. Protective effects of *Ginkgo biloba* against rat liver carcinogenesis [J]. Chem Biol Interact, 2008,173(1):32.
- [13] Chen X H, Miao Y X, Wang X J, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract EGb761 on human colon adenocarcinoma cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2011,27(3):227.
- [14] Biggs M L, Sorkin B C, Nahin R L, et al. *Ginkgo biloba* and risk of cancer: secondary analysis of the ginkgo evaluation of memory (GEM) study [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2010,19(7):694.
- [15] Otsuki T, Kanno T, Fujita Y, et al. A(3) adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in Lu-65 human lung cancer cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2012,30(1):210.
- [16] Jha K, Shukla M, Pandey M. Survivin expression and targeting in breast cancer [J]. Surg Oncol, 2012,21(2):125.
- [17] Mita A C, Mita M M, Nawrocki S T, et al. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics [J]. Clin Cancer Res, 2008,14(16):5000.
- [18] Margulis V, Lotan Y, Shariat S F. Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer [J]. World J Urol, 2008,26(1):59.
- [19] Shirai K, Suzuki Y, Oka K, et al. Nuclear survivin expression predicts poorer prognosis in glioblastoma [J]. J Neurooncol, 2009,91(3):353.
- [20] Chen X, Cao X, Dong W, et al. Expression of TIP30 tumor suppressor gene is down-regulated in human colorectal carcinoma [J]. Dig Dis Sci, 2010,55(8):2219.
- [21] Mitsuhiro Ito, Chao Jiang, Kristy Krumm, et al. A cofactor TIP30 deficiency increases susceptibility to tumorigenesis [J]. Cancer Res, 2003,63:8763.

Influence of *Ginkgo biloba* extract on proliferation of ACC-2 cell, Survivin and TIP30 gene expression in adenoid cystic carcinoma of lacrimal gland

NIU Po¹, ZHAO Xin-xia^{2*}, YAN Fei³, ZHOU Yong-ming⁴, JIAN Peng⁵

(1. He'nan Provincial Peoples's Hospital, Zhengzhou 450003, China;

2. He'nan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China;

3. Department of Traditional Chinese Medicine, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450012, China;

4. Department of Oncology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

5. Henan Vocational College of Tuina, Luoyang 471000, China)

[Abstract] Exploring the influence of extract of *Ginkgo biloba* (EGB) on the proliferation, apoptosis of ACC-2 cell in lacrimal adenoid cystic carcinoma and analyzing the influence of EGB on the gene expression of Survivin and TIP30 based on the levels of the gene and protein. ACC-2 cell in human with ACC of lacrimal gland disposed by EGB of different concentration was *in vitro* cultured. MTT method was used for cell proliferation detection. Annexin V/PI double-staining flow cytometer was used to detect cell apoptosis and cell cycle. Survivin and TIP30 gene expression together with protein expression were analyzed by RT-PCR and Western blotting. And it is indicated that EGB has inhibitory effect on the proliferation of ACC-2 cell *in vitro*. Furthermore, the dose-effect relationship was significant. Compared with the control group, it had statistical difference ($P < 0.01$). The inhibitory concentration 50% (IC_{50}) is $88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. By flow cytometer examination, it was indicated that EGB can gradually increase ACC-2 cell in G_0 - G_1 stage and decrease it in G_2 -M and S stage. With the increase of dose, the apoptosis rate of ACC-2 cell obviously increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Both of the expression results of RT-PCR and Western hybrid proteins have showed that the concentration of EGB increased, it could be seen a significant decrease in Survivin gene expression ($P < 0.01$). Meanwhile, the TIP30 gene expression got a significant increase. Therefore, EGB can effectively inhibit ACC-2 cell Survivin gene expression in human with adenoid cystic carcinoma of lacrimal gland as well as promoting TIP30 gene expression, inducing the ACC-2 cell apoptosis and inhibiting tumor cell proliferation, which provided a certain theoretical and experimental basis for the application of Chinese herbal medicinal ingredient in the treatment of tumors.

[Key words] *Ginkgo biloba* extract; ACC-2 cell; Survivin gene; TIP30 gene

doi:10.4268/cjcmm20142431

[责任编辑 张宁宁]