

# 红景天苷抑制NLRP3炎症小体活性干预相关疾病的研究进展<sup>△</sup>

闫 珊<sup>1,2,3\*</sup>,周 俊<sup>1,2,3</sup>,余文君<sup>1,3</sup>,王启斌<sup>2,3</sup>,郑 涛<sup>1,2,3</sup>,陈 黎<sup>1,2,3#</sup>(1.湖北医药学院药学院,湖北十堰 442000;2.湖北医药学院附属太和医院药学部,湖北十堰 442000;3.湖北医药学院附属太和医院武当中医药研究所,湖北十堰 442000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)22-2794-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.22.19



**摘要** 目的:综述红景天苷抑制NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体活性干预相关疾病的研究进展,以期红景天苷的开发利用提供参考。方法:查阅相关文献,对红景天苷抑制NLRP3炎症小体活性干预相关疾病的研究进行归纳总结。结果与结论:红景天苷可通过激活腺苷一磷酸活化蛋白激酶,抑制硫氧还蛋白交互蛋白/NLRP3信号通路活性以及胱天蛋白酶1(caspase-1)、白细胞介素1 $\beta$ 的表达而发挥改善动脉粥样硬化、室性心律失常、糖尿病肾病、糖尿病神经性疼痛、非酒精性脂肪性肝病、肝损伤、肝纤维化、结肠炎的作用;可通过抑制NLRP3/caspase-1/消皮素D(GSDMD)介导的细胞焦亡过程而发挥改善帕金森病的作用。但红景天苷可否通过抑制NLRP3炎症小体活性发挥对其他疾病的干预治疗作用,仍需进一步研究。

**关键词** 红景天苷;NOD样受体蛋白3炎症小体;炎症反应;药理作用

红景天 *Rhodiola rosea* L.为景天科Crassulaceae红景天属 *Rhodiola* 植物,在《本草纲目》中被描述为“本经上品,祛邪恶气,补诸不足,已知补益药中所罕见”<sup>[1]</sup>。相关研究发现,红景天苷是红景天的主要活性成分<sup>[2]</sup>,具有保护心血管系统、消化系统、神经系统以及抗糖尿病等药理作用<sup>[2-4]</sup>。

NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体是由核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族成员NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)和胱天蛋白酶1(caspase-1)组成的蛋白复合物<sup>[5]</sup>。经高浓度葡萄糖、棕榈酸、C反应蛋白和尿酸等诱导活化后,NLRP3炎症小体可使caspase-1发生自剪切并产生酶活性,进一步促进白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的活化,从而作用于细胞自身或其他细胞,引起炎症反应<sup>[6]</sup>。目前,大量研究证据表明,NLRP3炎症小体所介导的炎症反应与多种疾病的发生发展有关<sup>[6-10]</sup>。

已有研究结果表明,红景天苷可通过抑制NLRP3炎症小体所介导的炎症反应而发挥治疗多种疾病的作用,因此笔者查阅相关文献,对红景天苷通过抑制NLRP3炎症小体活性来干预相关疾病的研究进展进行综述,以期红景天苷的开发利用提供参考。

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81703582);湖北省科技计划项目(No.2016CFB153, No.2020CFB713);湖北省卫生健康委科研立项项目(No.WJ2019M057);湖北医药学院研究生科技创新项目(No.YC2021022, No.YC2021025)

\* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。电话:0719-8876606。E-mail:ys445868637@163.com

# 通信作者:主任药师,教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药资源及制剂研发。电话:0719-8801163。E-mail:chenli0201@sina.com

## 1 心血管系统疾病

### 1.1 改善动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是冠心病、脑梗死、外周血管病等的共同病理学基础。王明明<sup>[11]</sup>以高脂饲料喂养载脂蛋白E基因缺陷(*ApoE*<sup>-/-</sup>)小鼠以建立动脉粥样硬化模型,并结合体外细胞实验,研究红景天苷(50 mg/kg)对小鼠动脉粥样硬化的改善作用。结果发现,与模型组比较,红景天苷组小鼠NLRP3蛋白表达水平以及血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白1水平均显著降低( $P < 0.05$ )。由此推测,红景天苷可能通过抑制NLRP3炎症小体活性来发挥抑制泡沫细胞形成、缓解炎症反应和改善动脉粥样硬化的作用。

有研究指出,消皮素D(GSDMD)参与了细胞焦亡过程,其剪切活化过程与caspase-1有关<sup>[12]</sup>。Xing等<sup>[13]</sup>通过Western blot实验和TUNEL染色实验发现,红景天苷可通过抑制NLRP3炎症小体活性,进而减轻caspase-1介导的GSDMD剪切作用,从而抑制血管内皮细胞焦亡,发挥改善动脉粥样硬化的作用。

### 1.2 改善室性心律失常

Hsiao等<sup>[14]</sup>将家兔进行冠状动脉结扎以诱导心力衰竭模型,研究红景天提取物以及红景天苷对家兔室性心律失常的治疗作用。结果发现,红景天提取物(125、250、500 mg/kg,每2天给药1次)和红景天苷(9.5 mg/kg,每2天给药1次)均可降低家兔血清中IL-17水平,从而抑制IL-17下游IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、CC趋化因子配体20(CCL20)等靶基因的转录,并可减少左心室纤维化改变和胶原生成;进一步的Western blot实验结果显示,经上述药物干预后,家兔左心室组织中NLRP3炎症小体

活性明显降低。由此推测,红景天提取物和红景天苷改善家兔室性心律失常的作用可能与抑制NLRP3炎症小体介导的炎症反应有关。

## 2 内分泌系统疾病

### 2.1 改善糖尿病

糖尿病是一种常见的代谢性疾病,其发生机制与胰岛素分泌或胰岛素信号转导障碍有关<sup>[15]</sup>。绝大多数糖尿病患者所患的为2型糖尿病(T2DM),约占糖尿病患者总数的90%~95%,其主要病理学基础是胰岛素抵抗(IR)<sup>[16]</sup>。大量研究证据表明,代谢应激条件下NLRP3炎症小体可被葡萄糖等多种物质激活,由此引起代谢性炎症反应并导致IR的发生与发展<sup>[6,17]</sup>。

腺苷一磷酸活化蛋白激酶(AMPK)是细胞内调控代谢活动的关键激酶,其激活后可通过抑制硫氧还蛋白交互蛋白(TXNIP)/NLRP3信号通路活性从而阻止NLRP3炎症小体的活化<sup>[18-19]</sup>。Zheng等<sup>[7]</sup>研究发现,红景天苷(100 mg/kg)的干预可有效抑制 $db/db$ 糖尿病模型小鼠肝组织中TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$ 的表达,并维持其胰岛素敏感性。该团队进一步的离体细胞实验结果表明,红景天苷可缓解细胞因高糖刺激所致的NLRP3炎症小体活化和胰岛素信号传递障碍,其作用机制可能与调控TXNIP/NLRP3炎症小体信号通路有关。

高迁移率族蛋白B1(HMGB1)是一种与炎症反应相关的核蛋白。Yang等<sup>[20]</sup>研究发现,在 $db/db$ 糖尿病模型小鼠中,HMGB1可通过影响核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和激活NLRP3炎症小体介导的代谢性炎症反应来加剧小鼠的糖脂代谢紊乱,从而降低其胰岛素敏感性。该团队进一步以红景天苷(80 mg/kg)干预后发现,小鼠糖脂代谢紊乱及胰岛素敏感性均得到改善,其作用机制可能与抑制HMGB1表达,进而抑制NLRP3炎症小体活性有关。

持续性高血糖引起的晚期糖基化终末产物(AGEs)生成可导致炎症和氧化应激反应,从而加剧糖尿病进展<sup>[21]</sup>。Hu等<sup>[22]</sup>采用AGEs诱导建立人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤模型,以考察红景天苷的干预作用。结果发现,经红景天苷干预后,HUVECs活力增强。该团队进一步研究发现,红景天苷可通过激活AMPK来抑制NF- $\kappa$ B/NLRP3炎症小体信号通路的活性,从而改善AGEs引起的细胞损伤。

### 2.2 改善糖尿病并发症

2.2.1 改善糖尿病肾病 糖尿病肾病是糖尿病的常见并发症,长期高血糖造成的肾小球膜细胞增殖和细胞外基质(ECM)积累是其主要病理学特征<sup>[23]</sup>。Wang等<sup>[24]</sup>在离体细胞实验中使用高浓度葡萄糖刺激大鼠肾小球系膜细胞HBZY-1以模拟体内高糖环境,并研究红景天苷的干预作用。结果发现,红景天苷可有效抑制高糖致HBZY-1细胞的异常增殖和ECM的积累,降低细胞中

TXNIP、NLRP3、ASC、caspase-1蛋白的表达水平以及活性氧簇(ROS)和丙二醛的水平。由此推测,红景天苷可能通过抑制肾小球系膜细胞中TXNIP的表达以及NLRP3炎症小体的活性,从而发挥治疗糖尿病肾病的作用。

2.2.2 改善糖尿病神经性疼痛 糖尿病神经性疼痛是糖尿病患者因神经系统损伤而表现出的肢体疼痛或痛觉异常。相关研究发现,红景天苷对糖尿病神经性疼痛具有缓解作用<sup>[25]</sup>。Zheng等<sup>[26]</sup>以红景天苷(50、100 mg/kg)干预糖尿病神经性疼痛模型大鼠,结果发现,红景天苷可降低大鼠血糖水平,改善其痛觉超敏症状;进一步进行离体背根神经节细胞培养实验发现,红景天苷可通过激活AMPK来抑制NLRP3炎症小体的活性。

## 3 消化系统疾病

### 3.1 改善非酒精性脂肪性肝病

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是指肝脏出现与饮酒无关、以肝细胞脂质过量蓄积为主要特征的代谢综合征<sup>[27]</sup>。Zheng等<sup>[7]</sup>研究了红景天苷(100 mg/kg)对高脂饲料喂养诱导的NAFLD模型小鼠的干预作用,结果发现,红景天苷可有效降低脂质在小鼠肝组织中的沉积;进一步的免疫组化结果显示,小鼠肝组织中巨噬细胞标志物CD68明显减少,提示肝脏炎症反应得到缓解。该团队通过Western blot实验和离体肝细胞培养实验发现,经红景天苷干预后,小鼠肝组织或肝细胞中TXNIP、NLRP3、ASC、caspase-1和IL-1 $\beta$ 表达水平均显著降低,表明红景天苷改善NAFLD的作用与抑制NLRP3炎症小体的活性有关。

### 3.2 改善肝损伤、肝纤维化

Zhang等<sup>[28]</sup>以四氯化碳诱导的急性肝损伤模型小鼠为实验对象,研究红景天苷(10、30、100 mg/kg)的干预作用,结果发现,红景天苷可改善模型小鼠的肝功能,其作用机制与抑制细胞色素P<sub>450</sub>家族成员2E1的表达和NLRP3炎症小体的活性有关。岳学良<sup>[29]</sup>研究了红景天苷对肝纤维化模型小鼠的治疗作用,结果发现,红景天苷可有效减轻小鼠肝纤维化程度,其作用机制可能与抑制肝组织中NLRP3炎症小体的活性以及TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 的过度表达有关。

### 3.3 改善结肠炎

Liu等<sup>[30]</sup>采用葡聚糖硫酸钠诱导建立结肠炎模型小鼠,研究红景天苷对该模型小鼠的改善作用,结果发现,经红景天苷(15 mg/kg)干预后,小鼠结肠炎病理状态明显改善。该团队进一步研究发现,红景天苷可降低小鼠体内IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10水平,并抑制NF- $\kappa$ B、p38 MAPK的过度活化;经Western blot检测发现,红景天苷可剂量依赖性地抑制NLRP3炎症小体的过度活化。由此可知,红景天苷改善结肠炎的作用机制与抑制NLRP3炎症小体的活性有关。

## 4 其他

### 4.1 改善帕金森病

帕金森病(PD)是一种与年龄相关的神经退行性疾病<sup>[31]</sup>。Zhang等<sup>[32]</sup>以PD模型小鼠为研究对象,考察红景天苷(40、80 mg/kg)对PD的干预作用。结果发现,红景天苷可改善PD模型小鼠的症状,并可降低小鼠脑组织中IL-1 $\beta$ 、IL-18、GSDMD水平;离体细胞实验结果表明,红景天苷(2、10、50  $\mu$ mol/L)可抑制PC-12、BV2细胞中NLRP3炎症小体活性,并减轻caspase-1介导的GSDMD剪切作用。由此推测,红景天苷可能通过抑制NLRP3/caspase-1/GSDMD介导的细胞焦亡过程而发挥改善PD的作用。

### 4.2 改善肺损伤

呼吸窘迫综合征患者在临床治疗过程中往往会进行机械通气治疗,但这种治疗方式常会引起通气性肺损伤<sup>[33]</sup>。Wang等<sup>[34]</sup>通过建立通气性肺损伤模型小鼠来研究红景天苷的干预作用,结果发现,在通气前腹腔注射50 mg/kg的红景天苷可有效改善小鼠肺损伤;进一步的Western blot检测结果显示,红景天苷可抑制小鼠肺组织中NLRP3炎症小体的活性并上调沉默信息调节因子1的表达<sup>[34]</sup>。

You等<sup>[35]</sup>采用脂多糖诱导HUVECs,以模拟肺部感染时病原菌对肺部血管内皮的损伤作用,并研究红景天苷对此的干预效果,结果发现,红景天苷(50  $\mu$ mol/L)可降低HUVECs的氧化应激与凋亡水平,其作用机制可能与抑制细胞中NLRP3炎症小体的活性有关。

综上,笔者对红景天苷通过抑制NLRP3炎症小体活性发挥治疗相关疾病的作用机制进行了归纳,如图1所示。

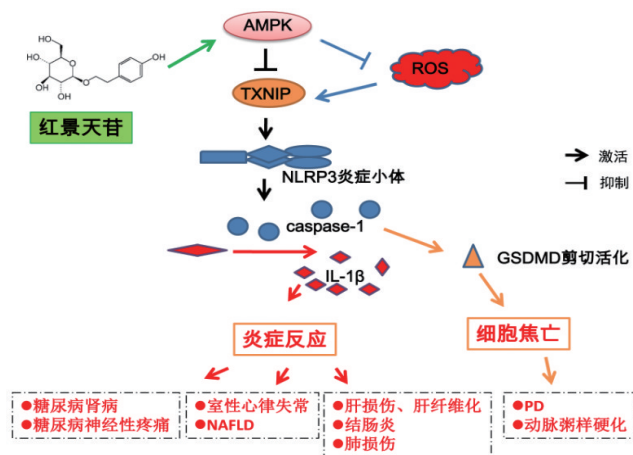


图1 红景天苷通过抑制NLRP3炎症小体活性发挥治疗相关疾病的作用机制示意图

## 5 结语

本文对红景天苷通过抑制NLRP3炎症小体活性干预相关疾病的机制研究进展进行了综述,可知红景天苷对动脉粥样硬化、室性心律失常、糖尿病及其并发症、

NAFLD、肝损伤、结肠炎等均具有良好的改善作用,其干预剂量最小为15 mg/kg<sup>[30]</sup>、最大为100 mg/kg<sup>[7,26,28]</sup>。

红景天苷对NLRP3炎症小体的抑制作用可能与激活AMPK有关。激活后的AMPK一方面可通过作用于糖应答元件结合蛋白(ChREBP)来降低TXNIP mRNA表达水平,另一方面可直接磷酸化TXNIP,使之加速降解,从而抑制NLRP3炎症小体的活性<sup>[18-19]</sup>。NF- $\kappa$ B是一种重要的核转录因子,可参与NLRP3炎症小体构成蛋白的基因转录过程,有报道认为红景天苷对NLRP3炎症小体的抑制作用可能与抑制NF- $\kappa$ B有关<sup>[20,22]</sup>。从本文综述结果可知,红景天苷可通过激活AMPK,抑制TXNIP/NLRP3信号通路活性以及caspase-1、IL-1 $\beta$ 的表达而发挥改善动脉粥样硬化、室性心律失常等疾病的作用;可通过抑制NLRP3/caspase-1/GSDMD介导的细胞焦亡过程来发挥改善PD等疾病的作用。

NLRP3炎症小体及其介导的炎症反应广泛参与了细胞内和细胞间的信号调控,与心血管系统、内分泌系统等相关疾病的发生发展密切相关。但红景天苷可否通过抑制NLRP3炎症小体发挥对其他疾病的干预治疗作用,仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] 龚舒,甘淋. 红景天苷药理作用的分子机制研究进展[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(5): 696-699.
- [2] ZHENG T, YANG X, WU D, et al. Salidroside ameliorates insulin resistance through activation of a mitochondria-associated AMPK/PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  pathway[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(13): 3284-3301.
- [3] ZHENG T, BIAN F, CHEN L, et al. Beneficial effects of rhodiola and salidroside in diabetes: potential role of AMP-activated protein kinase[J]. Mol Diagn Ther, 2019, 23(4): 489-498.
- [4] CHIANG H M, CHEN H C, WU C S, et al. Rhodiola plants: chemistry and biological activity[J]. J Food Drug Anal, 2015, 23(3): 359-369.
- [5] ZAHID A, LI B, KOMBE A J K, et al. Pharmacological inhibitors of the NLRP3 inflammasome[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2538.
- [6] ZHENG T, WANG Q, DONG Y, et al. High glucose-aggravated hepatic insulin resistance: role of the NLRP3 inflammasome in kupffer cells[J]. Obesity (Silver Spring), 2020, 28(7): 1270-1282.
- [7] ZHENG T, YANG X, LI W, et al. Salidroside attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease via AMPK-dependent TXNIP/NLRP3 pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 8597897.
- [8] BIAN F, YANG X Y, XU G, et al. CRP-induced NLRP3 inflammasome activation increases LDL transcytosis across endothelial cells[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 40.
- [9] ZHAO Y, GUO Q, ZHAO K, et al. Small molecule GL-V9

- protects against colitis-associated colorectal cancer by limiting NLRP3 inflammasome through autophagy[J]. *Oncoimmunology*, 2017, 7(1): e1375640.
- [10] HONG Y, LIU Y, YU D, et al. The neuroprotection of progesterone against A $\beta$ -induced NLRP3-caspase-1 inflammasome activation via enhancing autophagy in astrocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105669.
- [11] 王明明. 基于NLRP3探讨红景天苷抑制AS中泡沫细胞形成的机制研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.
- [12] WANG K, SUN Q, ZHONG X, et al. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis[J]. *Cell*, 2020, 180(5): 941-955.
- [13] XING S S, YANG J, LI W J, et al. Salidroside decreases atherosclerosis plaque formation via inhibiting endothelial cell pyroptosis[J]. *Inflammation*, 2020, 43(2): 433-440.
- [14] HSHIAO Y W, TSAI Y N, HUANG Y T, et al. Rhodiola crenulata reduces ventricular arrhythmia through mitigating the activation of IL-17 and inhibiting the MAPK signaling pathway[J/OL]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020[2021-03-06]. <https://doi.org/10.1007/s10557-10020-07072-z>.
- [15] CZECH M P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. *Nat Med*, 2017, 23(7): 804-814.
- [16] American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes; standards of medical care in diabetes: 2020[J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(Suppl 1): S14-S31.
- [17] HOTAMISLIGIL G S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders[J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 177-185.
- [18] KAWAGUCHI T, OSATOMI K, YAMASHITA H, et al. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(6): 3829-3835.
- [19] WU N, ZHENG B, SHAYWITZ A, et al. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1[J]. *Molecular Cell*, 2013, 49(6): 1167-1175.
- [20] YANG L, ZHOU L, WANG X, et al. Inhibition of HMGB1 involved in the protective of salidroside on liver injury in diabetes mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt A): 106987.
- [21] KOSKA J, SAREMI A, HOWELL S, et al. Advanced glycation end products, oxidation products, and incident cardiovascular events in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(3): 570-576.
- [22] HU R, WANG M Q, NI S H, et al. Salidroside ameliorates endothelial inflammation and oxidative stress by regulating the AMPK/NF-kappaB/NLRP3 signaling pathway in AGEs-induced HUVECs[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 867: 172797.
- [23] DU L, WANG L, WANG B, et al. A novel compound AB38b attenuates oxidative stress and ECM protein accumulation in kidneys of diabetic mice through modulation of Keap1/Nrf2 signaling[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, 41(3): 358-372.
- [24] WANG S, ZHAO X, YANG S, et al. Salidroside alleviates high glucose-induced oxidative stress and extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells by the TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 278: 48-53.
- [25] NI G L, CUI R, SHAO A M, et al. Salidroside ameliorates diabetic neuropathic pain in rats by inhibiting neuroinflammation[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 63(1): 9-16.
- [26] ZHENG T, WANG Q, BIAN F, et al. Salidroside alleviates diabetic neuropathic pain through regulation of the AMPK-NLRP3 inflammasome axis[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 416: 115468.
- [27] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [28] ZHANG X, KUANG G, WAN J, et al. Salidroside protects mice against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury via down-regulating CYP2E1 expression and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106662.
- [29] 岳学良. 红景天苷对肝纤维化的保护作用及其机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [30] LIU J, CAI J, FAN P, et al. The abilities of salidroside on ameliorating inflammation, skewing the imbalanced nucleotide oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3/autophagy, and maintaining intestinal barrier are profitable in colitis[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1385.
- [31] POEWE W, SEPPI K, TANNER C M, et al. Parkinson disease[J]. *Eur J Neurol*, 2017, 3: 17013.
- [32] ZHANG X, ZHANG Y, LI R, et al. Salidroside ameliorates Parkinson's disease by inhibiting NLRP3-dependent pyroptosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9405-9426.
- [33] KUIPERS M T, ASLAMI H, JANCZY J R, et al. Ventilator-induced lung injury is mediated by the NLRP3 inflammasome[J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(5): 1104-1115.
- [34] WANG Y, XU C F, LIU Y J, et al. Salidroside attenuates ventilation induced lung injury via SIRT1-dependent inhibition of NLRP3 inflammasome[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(1): 34-43.
- [35] YOU L, ZHANG D, GENG H, et al. Salidroside protects endothelial cells against LPS-induced inflammatory injury by inhibiting NLRP3 and enhancing autophagy[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 146.

(收稿日期: 2021-05-19 修回日期: 2021-09-09)

(编辑: 唐晓莲)