

香砂六君丸对糖尿病胃轻瘫大鼠的血清代谢组学研究

冯小可^{1,2}, 刘佳莅³, 王岚^{1,2}, 谢立群^{1,2*}

(1. 南京医科大学第一附属医院, 南京 210029;

2. 南京医科大学中西医结合研究所, 南京 210029; 3. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:研究香砂六君丸对糖尿病胃轻瘫大鼠血清代谢产物的影响。方法:SD 大鼠随机分为正常组,糖尿病胃轻瘫模型组,香砂六君丸组。应用气相色谱和质谱联用仪的代谢组学方法检测经香砂六君丸治疗 2 型糖尿病大鼠血清中代谢物的变化。分别通过偏最小二乘-判别分析方法(PLS-DA)及正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),比较糖尿病胃轻瘫模型组及香砂六君丸组大鼠的血清小分子代谢物的区别。结果:正常组,糖尿病胃轻瘫模型组,香砂六君丸组大鼠的血清代谢物有显著差异,比较并鉴定出 D-阿糖醇、草氨酸等氨基酸含量组间有显著差异。结论:香砂六君丸改变糖尿病胃轻瘫大鼠血清的代谢产物,其作用机制可能体现为对氨基酸代谢的调节作用。

[关键词] 香砂六君丸; 糖尿病胃轻瘫大鼠; 代谢组学; 气相色谱和质谱联用仪

[中图分类号] R285.5;R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0087-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230087

Effect of Xiangsha Liujun Pills on Serum Metabonomics in Diabetic Gastroparesis Rats FENG Xiao-ke^{1,2}, LIU Jia-li³, WANG Lan^{1,2}, XIE Li-qun^{1,2*} (1. *The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China*; 2. *Integrated Traditional and Western Medicine Institution of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China*; 3. *Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China*)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effect of Xiangsha Liujun pills on serum metabolites in rats with diabetic gastroparesis. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group, diabetic gastroparesis model group, and Xiangsha Liujun pill group. The changes of metabolites in serum were detected in both groups using gas chromatography and mass spectrometry detector. PLS-DA and OPLS-DA were used respectively to compare the difference in small molecule metabolites between model group and Xiangsha Liujun pills group. **Result:** There were statistically significant differences in small molecule metabolites in serum between normal group, diabetic gastroparesis model group, and Xiangsha Liujun pill group. **Conclusion:** Xiangsha Liujun pills could change the serum metabolites of Diabetic Gastroparesis rats, and its mechanism maybe relevant to regulation effect on amino acid metabolism.

[Key words] Xiangsha Liujun pills; diabetic gastroparesis rats; metabonomics; gas chromatography and mass spectrometry detector

代谢组学是关于生物体内源性代谢物质的整体及其变化规律的科学,它将代谢信息与病理生理过程中生物学事件关联起来,从而了解机体生命活动的代谢过程^[1]。相比较全基因组测序,其代谢物信息库简单,且直接对生物体液的代谢产物进行分析,

更准确的反映生物体的病理生理状态。糖尿病(diabetes mellitus, DM),是以糖代谢失常为主的内分泌代谢性疾病,糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DGP)是 DM 常见的慢性并发症之一,祖国医学属于“痞满”范畴,主要临床症状为胃脘胀

[收稿日期] 20150225(009)

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金面上项目(12KJB360002);第二批江苏省优秀中青年中医临床人才研修专项项目(YX1215)

[第一作者] 冯小可,硕士,住院中医师,从事中西医结合治疗糖尿病及其并发症研究, Tel: 025-68136267, E-mail: xiaokemayday@gmail.com

[通讯作者] * 谢立群,博士,主任中医师,从事中西医结合治疗糖尿病及其并发症研究, Tel: 025-68136267, E-mail: xie-liqun@163.com

满、消化不良及恶心干呕,属于非机械梗阻性胃动力障碍,严重影响患者的生活质量和预后。近年来代谢组学对DM的临床及实验研究日益增多,主要方向集中在分析DM的血清代谢组学的变化特点^[2-3],DM肾病和DM骨病的病机及相关药物干预机制^[4-7]、脾气虚证等不同证型的代谢组学特点^[8-9],以及不同药物治疗DM的配伍评价^[10-11]等,提示代谢组学对DM的诊疗诊治,特别是中医药治疗DM的机制及疗效评价具有重要意义^[12-13]。祖国医学认为糖尿病胃轻瘫的病机属脾胃失营,湿浊中阻,现代医学研究显示主要与植物神经功能紊乱、血清胃肠激素异常、胃肠平滑肌的改变、微血管病变等密切相关^[14]。目前糖尿病胃轻瘫的临床治疗,除吗丁啉等促进胃肠动力药外尚无长期有效治疗方法,香砂六君丸在化湿降浊,和胃健脾,长期临床观察显示其在治疗糖尿病胃轻瘫方面效果确切^[15-17],现代医学对其作用机制研究较少,而从代谢组学角度分析其病机的研究目前尚为空白。

本研究采用气相色谱和质谱联用仪联用技术,对糖尿病胃轻瘫组、香砂六君丸组的血清代谢组学进行比较研究,以期发现二者差异性代谢物,初步探索香砂六君丸治疗糖尿病胃轻瘫的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠18只,体重(200±20)g,南京医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(苏)2002-0031,饲养于南京医科大学中西医结合研究所动物实验室。

1.2 药物及试剂 香砂六君丸(河南省宛西制药股份有限公司,批号140602),链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号S0130),L-2-氯苯丙氨酸(上海恒柏生物科技有限公司,批号103616-89-3),衍生化试剂三氟乙酰胺(BSTFA,含1%TMCS,美国Regis公司,批号CFCQ-270121)。

1.3 仪器 7890A型GC色谱仪(美国Agilent公司),Chroma TOF PEGASUS HT型质谱仪(美国Leco公司),Restek Rxi-5Sil MS型毛细管柱(美国J&W Scientific公司)。

2 方法

2.1 造模方法 首先建立糖尿病大鼠模型,SD大鼠购进适应性喂养7d后,随机分为正常组6只与糖尿病模型组10只。实验组大鼠按80 mg·kg⁻¹(溶解在0.1 mol·L⁻¹枸橼酸盐缓冲液中,pH 4.5)给予单剂量ip STZ,对照组注射等剂量的枸橼酸盐缓冲液。连续ip 7d后,检测造模组大鼠全血血糖,

血糖≥16.7 mmol·L⁻¹,且能维持1周以上者,确定为糖尿病大鼠模型,成模10只。

2.2 糖尿病胃轻瘫大鼠模型的建立 糖尿病大鼠造模成功者给予高糖高脂饲料(普通饲料-熟猪油-蔗糖-奶粉-鸡蛋58:15:20:5:2)不规则喂养,即采取单日上午和双日下午进食的办法。每2周测定体重,血糖,24h摄食量,饮水量1次,并观察其粪便量、性状、精神、活动情况等。喂养8周,检测血糖<16.7 mmol·L⁻¹者剔除实验。糖尿病胃轻瘫模型确定:具备以下2种情况中任何一种情况者则视为糖尿病胃肠动力障碍模型建立成功:①在实验大鼠的监测过程中糖尿病大鼠日平均粪便质量和性状持续与对照组有明显差别。②实验结束时监测其胃肠推进指标与正常组相比有显著差异者。最终成模10只。实验结束时因有大鼠死亡,最后存活正常组4只(A组),糖尿病胃轻瘫模型组3只(B组)、香砂六君丸组5只(C组)。

2.3 血液标本的收集 标本处理:实验8周末采集二组大鼠血样标本,保存在-80℃冰箱中。

2.4 气相色谱和质谱联用仪(GC-MS)分析过程

2.4.1 代谢物萃取 取100 μL血清样本,加入0.4 mL甲醇,再加入50 μL L-2-氯苯丙氨酸,漩涡混匀;紧接着将样本4℃,12 000 r·min⁻¹离心10 min;小心地取出0.4 mL上清于2 mL进样瓶(甲烷硅基化的)中。

2.4.2 代谢物衍生化 在真空浓缩器中干燥提取物;向干燥后的代谢物加入80 μL甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐,溶于吡啶20 g·L⁻¹),轻轻混匀后,放入烘箱中37℃孵育2h;向每个样品中迅速加入100 μL BSTFA(含有1% TCMS),将混合物70℃孵育1h;冷却至室温,向每组任一样本中加入10 μL FAMES(饱和脂肪酸甲酯标准混合液,溶于三氯甲烷C8-C16为1 g·L⁻¹;C18-C30为0.5 g·L⁻¹);混匀,上机检测。

2.4.3 上机检测 气相色谱-飞行时间质谱联用仪配有Restek Rxi-5Sil MS毛细管柱(250 μm×30 m×0.25 μm)。GC/TOFMS具体分析条件如下:进样量1 μL,不分流模式;载气为氦气;前进样口吹扫流速3 mL·min⁻¹;柱流速1 mL·min⁻¹;柱温50℃保持1 min,以10℃每分钟的速率上升至330℃,保持5 min;前进样口温度280℃;传输线温度280℃;离子源温度220℃;电离电压-70 eV;扫描方式85~600 m/z;扫描速率20 spectra·s⁻¹;溶剂延迟366 s。

3 结果

3.1 数据预处理 对原始数据中缺失值进行模拟,数值模拟方法为最小值 1/2 法进行填补;为了能够对下游数据进行更好的分析,对数据进行过滤,目的是去除噪音数据;所用方法为:总数里面包含 80% 以上的空值数据;对过滤完以后的数据进行标准化处理,方法是内标归一法。

3.2 主成分 (PCA) 分析 使用 SIMCA-P + 软件对归一化后的数据进行模式识别多变量分析,主成分分析使用 UV 格式化处理的数据标度换算方式。对数据进行自动建模分析。Total PCA 得分图 (scores plot) 见图 1,组别之间的区分在得分图上并不是很显著,样本大都处于 95% 置信区间 (hotelling T2 ellipse) 内。

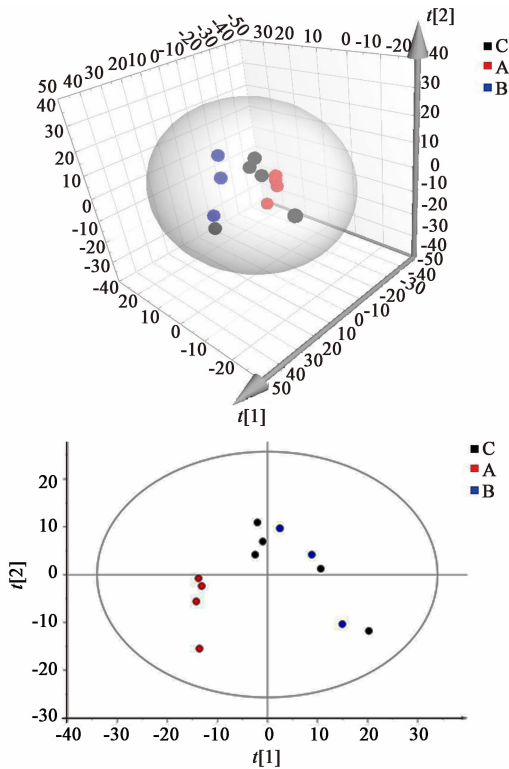


图 1 Total PCA 得分
Fig.1 Score of total PCA

3.3 偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 及对模型的验证 使用 SIMCA-P + 软件对归一化后的数据进行偏最小二乘法 (PLS) 发现数据 (X 变量) 和其他变量 (Y 变量, 分组信息) 之间的相关关系。PLS-DA 使用 UV 格式化处理的数据标度换算方式,对第一,二主成分进行建模分析。PLS-DA 对模型的质量用 7 折交叉验证进行检验,并用交叉验证后得到的 $R^2 X$ 和 Q^2 (分别代表模型可解释的变量和模型的可预测度) 对模型有效性进行评判。在此之后,通过排列

实验随机多次 ($n = 200$) 改变分类变量 y 的排列顺序得到相应不同的随机 Q^2 值对模型有效性做进一步的检验。B 组与 C 组比较的 PLS-DA 的得分见图 2,置换检验见图 3。样本都处于 95% 置信区间内。PLS-DA 得分如图 3 所示 (横坐标为第 1 主成分得分,用 $t[1]$ 表示;纵坐标为第 2 主成分得分,用 $t[2]$ 表示)。 $R^2 X$ (即模型的可解释变量) 及 $R^2 Y$ (即监督模型的解释率) 接近 1 说明 PLS-DA 模型已经可以很好地解释两组样本之间的差异。置换检验截距 $R^2 = 0.683$, $Q^2 = -0.155$ 可以很好体现模型的真实性和

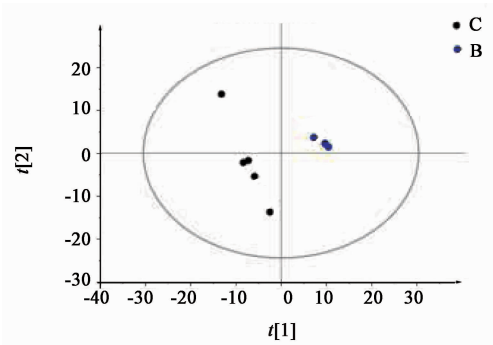


图 2 B 组和 C 组的 PLS-DA 的得分
Fig.2 Score of PLS-DA in B group and C group

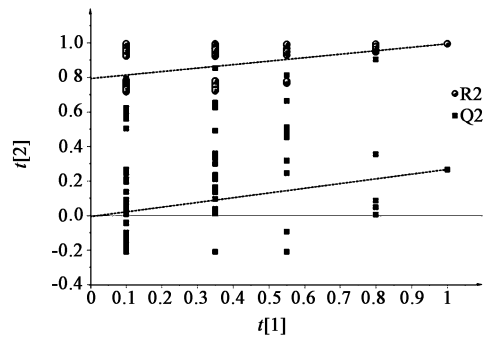


图 3 B 组与 C 组的 PLS-DA 置换检验
Fig.3 permutest of PLS-DA in B group and C group

3.4 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 对 PLS-DA 模型进行正交矫正处理 OPLS-DA,使用 SIMCA-P + 软件进行 OPLS-DA,最大化地凸显模型内部不同组别之间的差异。正交的偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 使用 UV 格式化 (处理的数据标度换算方式,对第一,二主成分进行建模分析。B 组和 C 组比较的 OPLS-DA 的得分见图 4。两组样本之间的差异。

3.5 差异代谢物的筛选及鉴定 通过 OPLS-DA 分析过滤掉了不相关的正交信号,因而获得的差异性代谢物更加可靠。本项目采用 OPLS-DA 模型第一

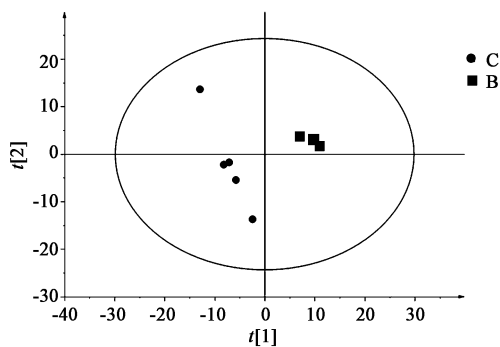


图 4 B 组和 C 组的 OPLS-DA 得分

Fig. 4 Score of OPLS-DA in B group and C group

主成分的变量投影重要性(VIP)值(阈值 > 1),并结合学生氏 t 检验(t -test)的 P 值(阈值 0.05)来寻找差异性表达代谢物。据原始参数建立的差异代谢物的筛选见表 1(表中为取阈值 VIP > 1 且 $P < 0.05$ 的差异物)。

表 1 差异代谢物的筛选

Table 1 Metabolites of screening

t_R /min	代谢产物	与正常组		
		比较含量 变化	VIP	P
7.196 1	<i>D</i> -阿糖醇	升高	2.108 58	0.006 711
9.854 9	草氨酸	升高	2.056 05	0.009 381
10.973	甘油酸	降低	1.823 7	0.024 014
13.883	苯丙氨酸	升高	1.725 68	0.049 303
14.57	天门冬酰胺	降低	1.995 24	0.015 282
14.859	木糖	降低	2.031 49	0.006 142
15.567	阿糖醇	降低	1.680 87	0.044 035
16.073	鸟氨酸	升高	2.023 62	0.012 257
16.361	反式-4-羟基- <i>L</i> - 脯氨酸	降低	2.070 41	0.003 661
18.09	酪氨酸	升高	1.917 32	0.032 053

4 讨论

传统中医药几千年来在临床上显示的卓越功效正不断被现代医学从多角度揭示其客观的作用机制,代谢组学从系列关联生物标记物的综合差异角度分析使用中药方剂的血清成分变化,更符合祖国医学的整体观和辨证论治观。糖尿病是与代谢紊乱密切相关的疾病,目前运用黄连、甲基莲心碱及格列美脲等中西药物对治疗糖尿病及糖尿病肾病等方面均已代谢组学的相关临床及基础研究^[18-21]。

糖尿病胃轻瘫的病位主要在脾胃。消渴日久,损伤脾胃,脾胃升降失司,《素问·阴阳应象大论篇》中指出“浊气在上,则生瞋胀”,故治应以理气化浊,健脾和胃。香砂六君丸功在益气化浊,健脾和胃,用于脾虚气滞,消化不良,暖气食少,脘腹胀满,

大便溏泄等症状。临床研究亦显示,香砂六君丸对糖尿病胃轻瘫患者有很好的治疗作用,其作用机制可能是通过降低糖尿病胃轻瘫患者的胃肠激素水平加快胃肠运动,加强胃肠平滑肌的收缩,从而促进胃排空,缓解胃轻瘫症状^[22]。而与其相关的糖尿病胃轻瘫代谢组学研究目前尚属空白。

本研究结果发现,糖尿病胃轻瘫大鼠精神较差,毛色杂乱缺乏光泽,并出现尿量增多、多饮、多食及排便频率不规律、便质时稀时硬等糖尿病胃轻瘫的症状;经香砂六君丸灌胃后以上糖尿病表现均有不同程度减轻,精神等一般情况也有所好转。香砂六君丸组大鼠与糖尿病胃轻瘫模型组大鼠相比平均血糖下降,以上均说明香砂六君丸一定程度上有改善糖尿病病情的作用。更重要的是,大鼠糖尿病胃轻瘫模型组和香砂六君组代谢谱有明显差异,二组的代谢谱轮廓可以清晰的区分开。为了进一步证实糖尿病胃轻瘫的病理生理机制,样品进行 PLS-DA 的代谢模式比较,发现并鉴定了 10 个差异代谢物。与糖尿病胃轻瘫模型组比较,本实验发现香砂六君丸组中 *D*-阿糖醇、草氨酸、鸟氨酸、酪氨酸等代谢物含量显著升高,甘油酸、天门冬酰胺、阿糖醇、反式-4-羟基-*L*-脯氨酸等代谢物含量显著降低。其中大部分与糖尿病的发病机制密切相关。

D-阿糖醇可由阿拉伯糖还原而成,阿拉伯糖具有抑制双糖水解的降糖作用,香砂六君丸治疗后血清 *D*-阿糖醇的升高,可以间接反映阿拉伯糖的升高。草氨酸是乳酸脱氢酶 A 的抑制剂,具有扰乱癌细胞代谢的作用,更重要的是已有实验显示草氨酸钠可降低小鼠血清乳酸脱氢酶的水平,从而改善小鼠胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能,降低小鼠血糖水平^[23]。甘油酸是丝氨酸降解的中间产物,木糖也是某些糖蛋白与丝氨酸的连接单位,均与糖异生或进一步糖酵解密切相关,香砂六君丸治疗后血清甘油酸及木糖含量均明显下降。苯丙氨酸是人体必需氨基酸之一,在体内大部分经苯丙氨酸羟化酶催化作用氧化成酪氨酸,并与酪氨酸一起合成重要的神经递质和激素,参与机体糖代谢^[24],本课题组前期研究显示,相较正常大鼠,糖尿病大鼠低苯丙氨酸含量水平相关神经的调节作用缺失可能是造成神经功能紊乱的重要原因之一,从而无法正确调节胃肠蠕动,而香砂六君丸治疗后,苯丙氨酸含量有一定程度的上升,从而可能改善相关精神对胃肠蠕动的调节。酪氨酸是合成蛋白质的重要氨基酸,在糖尿病中经胰岛素激活,可使其磷酸化作用增强,而蛋白酪氨酸

磷酸酶是糖脂代谢途径中的关键调节酶,相关研究证实此过程的信号传导障碍可能是诱导胰岛素抵抗的重要分子机制^[25-27];香砂六君丸治疗后的糖尿病胃轻瘫大鼠血清中络氨酸成分明显增加,可能提示相关代谢途径的正常化而使机体恢复或增强对胰岛素的敏感性,从而达到降低血糖的目的。以上这些均可能是香砂六君丸治疗糖尿病胃轻瘫的机制,不仅可以直接或间接通过抑制血糖升高水平,还可以通过调节相关神经及激素水平促进胃肠蠕动,减轻胃轻瘫症状。

综上所述,本研究采用代谢组学方法对香砂六君丸治疗糖尿病胃轻瘫模型大鼠的血清进行研究,结果显示,与模型组相比,治疗组血清内多种代谢物含量明显变化,提示这些物质的变化可能是香砂六君丸作用的结果,并与其作用机制密切相关。同时,这些生物标记物一方面可能成为新的代谢标志物,一方面也可能揭示了某些胃轻瘫发生的病理过程。今后还需结合本次实验结果进行基因组学及蛋白组学等实验,进一步明确香砂六君丸的作用机制。本研究也再次证实代谢组学技术能从整体上全面分析中药对生物系统的影响,为进一步提高临床疗效,发掘和提高中医理论提供充分的实验依据,以期临床诊断提供新方向,为揭开作用机制提供新思路。

[参考文献]

[1] Lindon J C, Holmes E, Nicholson J K. So what's the deal with the metabolomics? [J]. *J Anal Chem*, 2003, 75(17):384A-391A.

[2] 肖继,张磊,马明坤,等.糖代谢异常人群血清代谢组学研究[J].*临床检验杂志*, 2014, 32(12):909-911.

[3] 黄建华. 2型糖尿病相关的代谢组学和生物信息学研究[D].长沙:中南大学, 2014.

[4] 皮子凤,门丽慧,张静,等.五味子治疗大鼠糖尿病肾病作用机制的血清代谢组学研究[J].*分析化学*, 2015, 43(2):168-175.

[5] 梁琼麟,罗国安,王义明.基于色谱-质谱联用的糖尿病肾病临床代谢组学研究[C].北京:中国化学会首届全国质谱分析学术研讨会, 2014.

[6] 熊莉华,梁伟东,叶瑞妍,等.双黄益骨方治疗糖尿病骨代谢疾病的代谢组学研究[J].*中医药导报*, 2014, 20(10):18-21.

[7] 梁伟东.从代谢组学分析糖尿病性骨质疏松病机与中药干预机理[D].广州:广州中医药大学, 2014.

[8] 杨宇峰,滕飞,徐娜,等.脾气虚证2型糖尿病大鼠血液代谢组学研究[J].*中华中医药杂志*, 2014, 29(8):2464-2466.

[9] 吴小秋,刘志龙,黎莉,等.2型糖尿病气阴两虚证血清气相色谱-质谱代谢组学特点分析[J].*中医学报*,

2014, 29(7):961-964.

[10] 范雪梅,王李黎,王义明,等.基于代谢组学的复方罗格列酮配伍减毒评价研究[C].北京:中国化学会首届全国质谱分析学术研讨会, 2014.

[11] 王静,袁子民,李云兴,等.基于GC-MC代谢组学法研究黄连、生地黄治疗2型糖尿病的配伍机制[J].*中国中药杂志*, 2014, 39(3):526-529.

[12] 毛茜,朱玲英,李松林,等.代谢组学在糖尿病诊疗研究中的应用[J].*世界科学技术——中医药现代化*, 2014, 16(9):1932-1936.

[13] 庄星星,高家荣,杨晓旭,等.代谢组学在糖尿病中医药研究中应用现状[J].*中国中医药信息杂志*, 2014, 21(4):126-129.

[14] Camilleri M, Bharucha A E, Farrugia G. Epidemiology, mechanisms, and management of diabetic gastroparesis [J]. *J Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011, 9(1):5-12.

[15] 陈睿锋.香砂六君丸治疗糖尿病胃轻瘫疗效观察[J].*医药论坛*, 2014, 34(10):11-13.

[16] 潘玉庆.香砂六君丸治疗糖尿病胃轻瘫疗效观察[J].*实用中医药杂志*, 2014, 30(8):696-698.

[17] 敬满芳.香砂六君子汤加减治疗糖尿病性胃轻瘫临床研究[J].*中医学报*, 2010, 25(5):958-960.

[18] 王静,袁子民,孔宏伟,等.基于气象色谱-质谱联用的代谢组学用于黄连治疗2型糖尿病的机理探索[J].*色谱*, 2012, 30(1):8-12.

[19] 刘双梅,李桂林,汤晓丽,等.甲基莲心碱对2型糖尿病模型大鼠作用的代谢组学研究[J].*中国药理学通报*, 2012, 28(4):490-495.

[20] 牛俊,皮子凤,越皓,等.格列美脲治疗2型糖尿病大鼠的尿液代谢组学研究[J].*高等学校化学学报*, 2012, 33(10):2169-2172.

[21] 孙立业,毛璇,张冬娟,等.Ⅱ型糖尿病肾病模型db/db小鼠血浆的代谢组学研究[J].*中国医药导报*, 2012, 9(13):19-21.

[22] 赵毅鹏.加味香砂六君丸治疗2型糖尿病胃轻瘫62例[J].*中医研究*, 2013, 26(8):20-22.

[23] 张珊珊,吴木潮.草氨酸钠治疗对db/db小鼠胰岛细胞功能和血糖水平的影响[C].西安:中华医学会第十二次全国内分泌学学术会, 2013:187.

[24] 邱文娟,潘骏,顾学范.苯丙氨酸及其代谢物影响P19细胞神经分化的形态学研究[J].*神经解剖学杂志*, 2002, 18(2):118-120.

[25] 曲洪美.胰岛素受体、胰岛素受体底物-1表达及其酪氨酸磷酸化与妊娠期糖尿病胰岛素抵抗的关系[D].青岛:青岛大学, 2007.

[26] 陈明,孙金鹏,刘晶,等.糖尿病中蛋白酪氨酸磷酸酶的研究进展[J].*生理学报*, 2010, 62(2):180-188.

[27] 李红瑜,陈绮雁,刘丹阳,等.硝基酪氨酸在糖尿病肾病中的病理作用[J].*分子影像学*, 2014, 37(4):264-266.

[责任编辑 周冰冰]