

· 药理 ·

六味地黄丸含药血清对树突状细胞增殖的影响

孙小艳¹, 刘祖德², 张欢², 李锦毅^{2*}

- (1. 辽宁医学院武警总医院研究生培养基地, 北京 100039;
2. 中国人民武装警察部队总医院, 北京 100039)

[摘要] 目的:研究六味地黄丸含药血清对 SD 大鼠骨髓源性树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDC)增殖的影响。方法:制备六味地黄丸含药血清,观察含药血清作用下的细胞生长情况,进行细胞计数及细胞活力测定;用四甲基偶氮唑盐(MTT)法,检测不同浓度、不同时间六味地黄丸含药血清作用下的细胞增殖变化,寻找最佳六味地黄丸浓度和作用时间;ELISA 法检测细胞上清中树突状细胞分泌细胞因子 IL-12 的浓度;混合淋巴细胞反应(MLR)检测其刺激 T 淋巴细胞活化和增殖能力。结果:与空白对照组比较,成熟型 DC 含药血清组显著促进 DC 细胞增殖,且这种增殖在含药浓度 15%,作用时间 48 h 时最为显著。其 IL-12 分泌量显著提高($P < 0.05$)。六味地黄丸含药血清培养的成熟型 DC 对异基因 T 淋巴细胞具有增殖刺激作用,且随着细胞数量的增加作用增强($P < 0.05$),呈量效关系。结论:六味地黄丸含药血清具有诱导大鼠骨髓源性树突状细胞增殖的作用。

[关键词] 六味地黄丸; 含药血清; 大鼠骨髓源性树突状细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0103-05

[doi] 10.11653/syfy2014040103

Effects of Liuwei Dihuang Wan Containing Serum on Dendritic Cell

SUN Xiao-yan¹, LIU Zu-de², ZHANG Huan², LI Jin-yi^{2*}

- (1. The General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces of Liaoning Medical Postgraduate Training Base, Beijing 100039, China;
2. The General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** To study Liuwei Dihuang wan drug serum on SD rat bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) proliferation. **Method:** Made Liuwei Dihuang wan drug serum, drug serum was observed under the action of cell growth, cell count and cell viability test. Using tetrazolium salt (MTT) method to detect different concentrations and time Liuwei Dihuang wan pills drug serum changes under the action of cell proliferation, finding the best Liuwei Dihuang wan concentration and time. ELISA assay supernatants of dendritic cells secrete cytokines IL-12 concentration. mixed lymphocyte reaction (MLR) test which stimulate T cell activation and proliferation. **Result:** Compared with the control group, mature DC-containing serum significantly promote the DC cell proliferation, and this proliferation of drug-containing concentrations of 15%, reaction time 48h of the most significant. Its IL-12 secretion significantly increased ($P < 0.05$). Liuwei Dihuang wan drug serum mature DC cultured allogeneic lymphocytes proliferation stimulating effect, and with the enhanced role of the

[收稿日期] 20130922(033)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072969,81273980)

[第一作者] 孙小艳, 硕士, 住院医师, 从事六味地黄丸在胃癌侵袭与转移中的作用机制研究, Tel: 010-57976846, E-mail: 10070683@qq.com

[通讯作者] * 李锦毅, 博士后, 主任医师, 从事六味地黄丸在胃癌侵袭与转移中的作用机制研究, Tel: 010-57976846, E-mail: Lijinyi.li@vip.sina.com

increase in the number of cells ($P < 0.05$), showed a dose-effect relationship. **Conclusion:** Liuwei Dihuang wan drug serum has induced the role of rat bone marrow dendritic cells proliferation.

[**Key words**] Liuwei Dihuang wan; drug serum; rat bone marrow-derived dendritic cells

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前发现的功能最强的抗原呈递细胞,能有效激活初始 T 细胞,引发机体抗肿瘤免疫反应,DC 细胞在肿瘤治疗中已显示出广阔的应用前景。但目前治疗中还存在 DC 数量不足和免疫源性较低的问题,影响 DC 杀伤肿瘤的效果。因此,诱导体内 DC 分化是树突状细胞免疫治疗需要解决的关键问题。补肾中药六味地黄丸,源于宋代医学家钱乙的《小儿药证直诀》,是滋补肾阴的基础方剂,配伍组方上具有“三补三泻”的特点,临床主要用于肝肾阴虚等症。中医学认为,“肾藏精,精生髓”^[1],前期,国内学者对六味地黄丸的研究,主要集中在造血干细胞方面,缺少六味地黄丸对免疫细胞功能的进一步研究。如高东等^[2]应用六味地黄丸激活造血干细胞,影响骨髓中造血干细胞的数量和增殖能力,进而增强小鼠的免疫功能。谭峰等^[3]发现在一定浓度范围内,六味地黄丸水提液可以提高骨髓间充质干细胞的体外增殖能力。而本研究的特点是在此基础上研究六味地黄丸对免疫细胞的影响,采用六味地黄丸含药血清^[4],诱导 DC 分化,增加 DC 数量,解决体内 DC 数量不足。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料和试剂 动物:SD 和 Wistar 大鼠,雄性,体重 180 ~ 200 g,清洁级(clean animals, CL),购自中国军事医学科学院动物实验中心。

药物:六味地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号 10719577)。组成:熟地黄、油萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻,质量控制方法采用二维液相色谱对六味地黄丸组成物质进行分析。

主要试剂:IMDM 培养基、RPMI 1640 培养基及胎牛血清为 Hyclone 公司产品。脂多糖(LPS)、MTT、CCK-8 为 Sigma 公司产品。细胞因子(Rat IL-4 Rat GM-CSF)购自 Peprotech 公司。大鼠 IL-12 ELISA 试剂盒为 AMEKO 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 六味地黄丸含药血清的制备^[5] 实验动物分为空白对照组及六味地黄丸组,每组动物 10 只,随机分组。六味地黄丸根据人用剂量每日 9 g 计算,按人和鼠体表面积折算鼠的给药剂量为 $1.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续灌胃 3 d,2 次/d,每次间隔 8 h。空白对照组为等容纯水灌胃,末次双倍剂量灌胃,2 h 后

以 10% 水合氯醛麻醉动物,腹主动脉采血,以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血清,并经 $56\ ^\circ\text{C}$ 、30 min 水浴灭活补体,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤器过滤除菌。将六味地黄丸组和对 照 组 血 清 用 不 含 胎 牛 血 清 的 IMDM 按不同梯度浓度稀释,终浓度分别为 5%、10%、15%、20%。收集血清分组包装, $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 骨髓源性树突状细胞的制备^[6] 10% 水合氯醛麻醉 SD 大鼠,无菌条件下取出大鼠双侧股骨,去除附着组织,剪去骨两端,用无菌注射器吸取培养液,反复冲洗骨髓腔,直至股骨变成白色。移入离心管中,加红细胞裂解液裂解红细胞。洗涤细胞 2 次,收集沉淀骨髓细胞,用完全培养基重悬,调骨髓细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。分至六孔板,并在每孔中加入完全培养基、白细胞个数-4(IL-4)、GM-CSF 至终质量浓度 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养 72 h 后吸除悬浮细胞,保留贴壁细胞。培养至第 5 天,半量换液,补足 GM-CSF,保留悬浮细胞。继续培养至第 7 天后收集悬浮细胞,即为骨髓来源的树突状细胞。以台盼蓝染色检查细胞活性,活细胞大于 95% 方可用于实验。第 7 天加入 $\text{LPS } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 继续培养 24 h 刺激细胞成熟。

1.2.3 实验分组 实验分为 A、B、C、D 4 组,A 组:成熟型 DC + 六味地黄丸含药血清;B 组:未成熟型 DC + 六味地黄丸含药血清;C 组:成熟型 DC + 空白血清;D 组:空白对照组。

1.2.4 光学显微镜动态观察细胞生长 倒置光学显微镜下连续观察细胞生长情况,观察细胞形态学变化并拍照。

1.2.5 MTT 法检测不同浓度和时间含药血清对细胞增殖的影响 用不含胎牛血清 IMDM,按不同梯度稀释含药血清,使其终浓度分别为 5%、10%、15%、20%,分别测药物作用 24、48、72 h 后的吸光度,检测细胞增殖情况。根据 MTT 结果,确定最佳的作用浓度和作用时间,进行后续试验。

1.2.6 ELISA 法检测细胞培养上清 IL-12 的浓度 根据最佳的作用时间和浓度,将含药血清作用于细胞,取其上清,根据试剂盒内步骤,严格按照操作程序进行试验。根据样品吸光浓度计算 R 值,以确定数据的有效性。建立直线回归方程,测定各组中 IL-

12 的浓度。

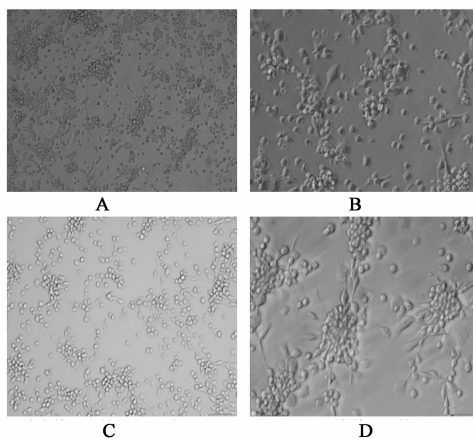
1.2.7 混合淋巴细胞反应 测各组 T 细胞增殖情况。培养细胞第 9 天时取 1×10^6 /mL 细胞悬液作为刺激细胞(经丝裂霉素处理)。同时取 Vistar 大鼠脾脏,制备单细胞悬液作为反应细胞;将刺激细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,调整密度分别为 $1 \times 10^3, 1 \times 10^4, 1 \times 10^5$ /mL,加入 96 孔板,每孔加入刺激细胞和反应细胞各 100 μ L,设自身对照。每份样品设 5 个复孔以保证数据的有效性,培养 3 d 后,在培养结束前 4 h 加入 CCK-8 试剂;继续培养 4 h 后,酶标 450 nm 处读取吸光度 A,计算刺激指数。

$$SI = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{对照组}}}{A_{\text{对照组}}}$$

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件,用单因素方差分析和 t 检验法进行数据分析,结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 倒置光镜下形态学观察 细胞在 24 h 后贴壁,72 h 后可看见散在细胞集落形成;培养第 5 d 细胞形成集落,由圆形逐渐变成不规则形态,并伸出毛刺样突起,随着培养时间的延长,细胞集落变大,树突状结构明显;培养第 7 d,细胞呈半悬浮状态,表现为显著的树突状细胞形态;高倍镜下可见表面有许多树枝状、刺状突起,部分突起较长,且粗,特征显著。见图 1。



A. 培养 5 d 的细胞形态 ($\times 200$); B. 培养 5 d 的细胞形态 ($\times 400$)
C. 培养 9 d 的细胞形态 ($\times 200$); D. 培养 9 d 的细胞形态 ($\times 400$)

图 1 细胞生长情况倒置光镜下形态学观察

2.2 六味地黄丸含药血清对 DC 增殖的影响 由图 2 可见,在给药 48 h 时,与空白对照组 ($0.071 \pm 7.52 \times 10^{-3}$) 比较,成熟型 DC 含药血清组浓度为 5% (2.226 ± 0.269), 10% (2.84 ± 0.649), 15% (3.755 ± 0.475), 20% (2.475 ± 0.848) 时,能显著

提高 DC 的 A ($P < 0.01$)。且当含药血清浓度 15% (3.755 ± 0.475) 时,与含药血清浓度 5% (2.226 ± 0.269), 20% (2.475 ± 0.848) 相比,DC 的 A 能显著升高 ($P < 0.05$)。说明六味地黄丸含药血清不仅能够显著升高 DC 细胞的数量,促进 DC 细胞的增殖。且这种效应和作用时间呈量效关系。

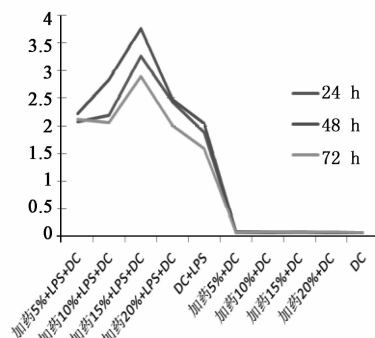


图 2 不同时间和浓度的含药血清对成熟型和非成熟型 DC 的 A

2.3 ELISA 法检测培养上清 IL-12 浓度 根据最佳作用时间和作用浓度,将含药血清作用于细胞,取其上清,根据试剂盒内步骤,样品吸光浓度计算 $R = 0.959$ 建立直线回归方 $Y = 0.17253 + 0.0062287X$,测定各组中 IL-12 的浓度。

表 1 ELISA 法检测各组细胞培养上清中 IL-12 浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	A	浓度
A	$0.5282 \pm 0.0745^{1)}$	57.101 ± 15.73
B	0.4925 ± 0.0548	51.371 ± 18.90
C	0.4749 ± 0.0456	48.544 ± 20.37
D	$0.4242 \pm 0.0865^{1)}$	40.405 ± 13.81

注: ¹⁾ A 组与空白对照组相比 $P < 0.05$ 。

2.4 含药 DC 对异基因淋巴细胞的增殖刺激作用 收集培养第 9 天的六味地黄丸含药血清组,获得的 DC 作为刺激细胞与分离得到的异基因 T 细胞混合培养,并与成熟型 DC + 空白血清组进行对照,随着 DC 数量的增加,所测的 A 随之增大,根据公式计算刺激指数(SI),结果见表 2。各数量级与对照组 SI 相比,差异均有显著性。 ($P < 0.01$) 各数量级之间比较, 1×10^3 与 1×10^4 组差异显著 ($P < 0.01$) 1×10^5 与其他 2 个数量级之间比较,差异均有显著性 ($P < 0.01$),由上可见六味地黄丸含药血清培养的成熟型 DC 对异基因淋巴细胞具有增殖刺激作用,且随着细胞数量的增加作用增强,呈量效关系。

3 讨论

树突状细胞是由 Steinman^[7] 1973 年在研究小鼠脾脏黏附细胞时,因其成熟时伸出许多树突状或

表 2 含药 DC 对异基因淋巴细胞的增值刺激作用(刺激指数 $\bar{x} \pm s$)

组别	刺激细胞密度			
	0	1×10^3	1×10^4	1×10^5
A	-	0.327 ± 0.082	1.120 ± 0.102	1.720 ± 0.255
C	0 ± 0	-	-	-

伪足样突起而得名。

DC 的分化主要经历 4 个阶段:造血干细胞、DC 前体细胞、未成熟 DC、成熟 DC^[8]。肿瘤免疫诱导通常分为 3 个阶段,肿瘤相关抗原呈递(TAA),特异性 T 细胞通过抗原呈递被激活,TAA 特异性 T 细胞趋化到肿瘤部位,识别特异性肿瘤抗原清除肿瘤。正常情况下 DC 以不成熟的形式存在,未成熟 DC 刺激 T 淋巴细胞的能力较弱,只有成熟的 DC 能刺激初始 T 淋巴细胞,捕获肿瘤抗原,提呈给 T 细胞,促进 T 细胞分化产生特异性 CTL,杀伤肿瘤细胞^[9-11]。

影响临床 DC 治疗的主要问题是患者体内 DC 数量不足和 DC 免疫源性较低,不足以达到有效的杀伤肿瘤干细胞。如何体内诱导 DC 分化问题,是树突状细胞免疫治疗的前提。

肿瘤患者免疫力低下与肾虚证密切相关,故肾阴虚者治宜滋补肾阴,根据“肾藏精”、“精血同源”理论^[12],在前期的临床实践中发现,补肾法配合树突状细胞治疗肿瘤,补肾药物具有类似细胞因子作用,可以提高体内 DC 数量,临床证明延长了患者生存期。六味地黄丸是中医滋阴补肾的代表方剂,现代医学研究发现,六味地黄丸中山茱萸对非特异性免疫功能有增强作用,能促进巨噬细胞的吞噬功能;丹皮主要成分丹皮酚有显著抗变态反应的作用;茯苓中的茯苓糖对免疫功能有增强作用;能增强巨噬细胞的吞噬功能,促进小鼠淋巴细胞转化及活性花环形成,提示其对细胞免疫和体液免疫均有促进作用^[13]。

目前临床和实验室中主要靠体外细胞因子诱导 DC 分化,如何在体内有效的诱导 DC 分化增殖,提高抗原提呈能力,是 DC 免疫治疗的前提。我们在实验中观察到,树突状细胞体外原代培养具有典型的形态学特征,并可以保持体内树突状细胞所具有的生物学特征;我们将补肾方药六味地黄丸制备成含药血清,采用 5%,10%,15%,20% 的不同浓度进行实验,首先将大鼠骨髓中分离培养原代 DC 细胞,加入不同浓度的六味地黄丸含药血清,在不同时间观察 DC 细胞的情况。笔者的研究结果显示,在实验浓度范围内六味地黄丸含药血清可显著促进成熟

型 DC 增殖,且这种增殖效应在含药浓度 15%,作用时间 48 h 时,效果最佳;而对耐受型 DC 的作用较弱。IL-12 作为一种重要的细胞因子,生理情况下它主要来源于 DC 的分泌,其分泌量受 DC 的成熟状态及某些刺激信号的影响。笔者的实验结果证实,六味地黄丸含药血清不仅可显著提高成熟型 DC 的 IL-12 分泌量,且对异基因淋巴细胞也具有增殖刺激作用,且随着细胞数量的增加作用增强,呈量效关系。笔者的实验结果验证了,形态学上的数量增殖与 IL-12 细胞因子实验功能上的增值呈正相关趋势。

近年来,以 DC 为基础诱导的特异性抗肿瘤免疫治疗已成为肿瘤生物治疗研究的热点。大量体外荷瘤动物模型研究表明 DC 免疫疗法具有确切的肿瘤治疗效果,尤其在对黑色素瘤^[14]、肾癌^[15]、卵巢癌^[16]的实验性治疗中更是取得了显著的成果。无论是基础实验还是具体的临床应用,基于树突状细胞的肿瘤疫苗在肿瘤的预防和治疗中均显示了较好的应用前景。本项研究表明,传统中药六味地黄丸可以诱导体内 DC 分化,促进 DC 增殖,从而提高体内 DC 数量,可作为刺激 DC 增殖的临床辅助治疗手段。

[参考文献]

[1] 吕爱平,杜立英. 肾藏精“形神合一”内涵的探究[J]. 中国中医基础医学杂志,2013,7(19):721.

[2] 高东,郑良朴,林久茂,等. 六味地黄丸对老年小鼠造血干细胞影响的实验研究[J]. 中药材,2008,2(31):251.

[3] 谭峰,樊巧玲,王明艳,等. 六味地黄丸对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响[J]. 中国医药导报,2011,11(7):1226.

[4] 周明眉,杨奎,姜远平,等. 中药血清药理学的方法学研究——含药血清低温保存和血清灭活的影响[J]. 中药药理与临床,1999,15(2):44.

[5] 郑良朴,胡海霞,林薇,等. 解毒消癥饮含药血清抑制胃腺癌细胞增殖的因素观察[J]. 中药药理与临床,2009,25(5):91.

[6] Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [J]. J Exp Med, 1992, 176(6):1693.

[7] Steinman R M, Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. [J]. Exp Med, 1973,137(5):1142.

复方颐神养脑胶囊对多发性脑梗死痴呆大鼠的影响

周青罡¹, 李俊^{2,3*}, 舒心莹¹, 朱伟², 陈筱², 陈兰英^{2,3}

(1. 江西汇仁药业有限公司, 南昌 330000; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;
3. 江西中医药大学, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 观察中药复方颐神养脑胶囊(YSYN)对大鼠多发性脑梗死痴呆(MID)的疗效及作用机制。方法: 3月龄SD大鼠90只, 于左侧颈外动脉注入复合血栓诱导剂, 复制多发性脑梗死痴呆模型, 动物随机分为模型组、YSYN高剂量组(960 mg·kg⁻¹)、YSYN中剂量组(480 mg·kg⁻¹)、YSYN低剂量组(240 mg·kg⁻¹)、西药阳性组(易倍申)(0.5 mg·kg⁻¹)以及YSYN合西药阳性药组(480 mg·kg⁻¹ + 0.5 mg·kg⁻¹), 另设10只动物为假手术组, 造模后第3天, 各组均以10 mL·kg⁻¹灌胃给药, 1次/d, 连续4周, 模型组和假手术组给予等量蒸馏水。采用Morris水迷宫法进行学习记忆测试; 采用酶联免疫法测定海马组织去甲肾上腺素(NE)水平; 采用比色法测定海马组织乙酰胆碱酯酶(AchE)、乙酰胆碱转移酶(CHAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠学习记忆能力显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 海马组织AchE含量显著升高($P < 0.05$), 海马组织CHAT、NE以及GSH-Px含量显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, YSYN能够显著提高多发性脑梗死痴呆大鼠学习记忆能力($P < 0.05$); 显著降低多发性脑梗死痴呆大鼠海马组织AchE含量, 提高多发性脑梗死痴呆大鼠海马组织CHAT、NE及GSH-Px含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: YSYN对MID具有良好的保护作用, 其作用机制可能是通过调节海马组织内去甲肾上腺素、乙酰胆碱及谷胱甘肽的活性来实现的。

[关键词] 多发性脑梗死痴呆; 颐神养脑胶囊; 乙酰胆碱; 谷胱甘肽过氧化物酶; 去甲肾上腺素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0107-04

[doi] 10.11653/syjf2014040107

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131217.1235.002.html>

[网络出版时间] 2013-12-17 12:35

[收稿日期] 20130618(006)

[基金项目] 国家科技重大专项: 重大新药创制(2011ZX09101-003-02)

[通讯作者] * 李俊, 讲师, 博士学位, 从事中药药理研究工作, Tel: 18070090101, E-mail: lj19820806@163.com

- [8] Wicha M S. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(19): 5606.
- [9] 张倩倩, 李春伶, 王运平, 等. 树突状细胞转染绿色荧光蛋白基因后生长特性和表型的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(24): 2607.
- [10] Hsu D H, Paz P, Villaflor G, et al. Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides [J]. Immunother, 2003, 26(5): 440.
- [11] Tao Yang, Ying Xiang, Yucheng Li, et al. Clinical study of co-treatment with DC-CIK cells for advanced solid carcinomas [J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2011, 10(6): 354.
- [12] 张介宾, 孙玉信, 朱平生. 景岳全书[M]. 上海: 上海第二军医大学出版社, 2006: 621.
- [13] 陈谦. 六味地黄丸的药理作用与临床应用探讨[J]. 中国医药指南, 2011, 7(21): 251.
- [14] 祝和成, 吴尚辉, 黄柏英, 等. 人DC与黑色素瘤细胞融合疫苗体外诱导特异性抗肿瘤CTL[J]. 中南大学学报, 2008, 33(11): 1012.
- [15] Alexander K, Gernot S, Peter W, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. [J]. Nature Medicine, 2000; 6(3): 332.
- [16] Chiang C L, Ledermann J A, Aitkens E, et al. Oxidation of ovarian epithelial cancer cells by hypochlorous acid enhances immunogenicity and stimulates T cells that recognize autologous primary tumor[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(15): 4898.

[责任编辑 邹晓翠]