

• 论著 •

硫异维甲类化合物 A2 对结核分枝杆菌
抗菌效果的观察

邱倩 杨松 陈勇 徐小明 杨再兴

【摘要】 目的 评价硫异维甲类化合物(SHetA2)在体内外对结核分枝杆菌(MTB)的抗菌效果。**方法** (1)采用试管法,将 SHetA2(2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、10.0 $\mu\text{g/ml}$ 、20.0 $\mu\text{g/ml}$)分别加入苏通培养基内后,加入等量 MTB 标准菌株 H37RV 菌液[1 mg/ml,每支接种 0.1 ml,含 10^6 菌落形成单位(CFU)细菌],于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 周,测定 SHetA2 的最小抑菌浓度(MIC)。(2)将 76 只无特定病原体(SPF)级昆明小鼠采用雾化吸入感染装置构建肺结核感染模型,最终纳入 60 只建模成功的小鼠。采用数字表法随机将小鼠分为对照组、异烟肼组、SHetA2 组,每组 20 只,分别采用生理盐水、异烟肼、SHetA2 进行治疗。治疗 45 d 后,观察各组小鼠体征及体质量变化、肺组织细菌载量计数及组织病理学变化。**结果** (1)体外实验结果显示,SHetA2 对 MTB 标准菌株 H37RV 的 MIC 为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。(2)体内抗结核实验显示,治疗 45 d 后,对照组小鼠体质量为 (27.21 ± 2.85) g,明显低于异烟肼组 $[(37.98 \pm 3.09)$ g]和 SHetA2 组 $[(38.28 \pm 3.43)$ g],差异有统计学意义($F=4.05$, $P=0.023$);异烟肼组与 SHetA2 组比较,小鼠体质量差异无统计学意义($q=0.10$, $P=0.998$);对照组小鼠肺组织重度病变的构成比(80.0%,16/20)明显高于异烟肼组(15.0%,3/20)和 SHetA2 组(10.0%,2/20),差异有统计学意义($\chi^2=32.18$, $P<0.01$);对照组小鼠肺脏感染细菌数量[经对数转换($\lg 10$ CFU/ml)]为 7.01 ± 1.23 ,明显高于异烟肼组 (2.59 ± 0.87) 和 SHetA2 组 (2.25 ± 0.94) ,差异有统计学意义($F=6.71$, $P=0.002$);而异烟肼组与 SHetA2 组比较,差异无统计学意义($q=0.33$, $P=0.970$)。**结论** SHetA2 在体内外均对 MTB 有抗菌作用,或可成为新的抗结核化学药物的候选。

【关键词】 分枝杆菌;结核;结核,肺;药物评价;动物实验;硫异维甲类化合物

Antibacterial effect of sulfur heteroarotinoid A2 on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo QIU Qian, YANG Song, CHEN Yong, XU Xiao-ming, YANG Zai-xing. Institute of Tuberculosis Research, Chongqing Public Health Medical Center, Chongqing 400036, China

Corresponding authors: XU Xiao-ming, Email: xuxiaoming13579@163.com; YANG Zai-xing, Email: 2464629225@qq.com

【Abstract】 Objective To evaluate the antibacterial effect of sulfur heteroarotinoid A2 (SHetA2) on *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in vitro and in vivo. **Methods** (1) SHetA2 with different doses (2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, and 20.0 $\mu\text{g/ml}$) was added to Sutong medium in test tube, followed by the addition of the equal volume of MTB standard strain H37RV solution (1 mg/ml, 0.1 ml/each inoculation, containing 10^6 CFU). After cultured at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 weeks, the minimum inhibitory concentration (MIC) of SHetA2 was determined. (2) Seventy-six specific pathogen free Kunming mice were inoculated with nebulizer inhalation device to establish tuberculosis infection model. Sixty mice were modeled successfully and randomly divided into control group, isoniazid group, and SHetA2 group in equal numbers ($n=20$), accordingly, the mice were treated with saline, isoniazid, and SHetA2, respectively, in different groups. After 45 days of treatment, the changes in physical signs, body weight, lung tissue bacterial load, and histopathology were observed. **Results** (1) In vitro results showed that MIC of SHetA2 against standard strain MTB H37RV was 10 $\mu\text{g/ml}$. (2) In vivo anti-tuberculosis experiments showed that after 45 days of treatment, the body weight of the control group was (27.21 ± 2.85) g, which was



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.11.003

基金项目:重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0028);重庆市科卫联合医学科研项目青年项目

(2019QNXM038)

作者单位:400036 重庆市公共卫生医疗救治中心结核病研究室(邱倩、杨松、陈勇);解放军第九四九医院心肾血液内分泌科(徐小明);陆军军医大学第一附属医院老年医学与特勤医学科(杨再兴)

通信作者:徐小明,Email: xuxiaoming13579@163.com;杨再兴,Email: 2464629225@qq.com

significantly lower than those of isoniazid group ((37.98 ± 3.09) g) and SHetA2 group ((38.28 ± 3.43) g), with statistically significant difference ($F=4.05$, $P=0.023$). The difference of body weight between the isoniazid group and SHetA2 group ($q=0.10$, $P=0.998$) was not statistically significant. In the control group, the ratio of severe lung lesions (80.0%, 16/20) was significantly higher than those of isoniazid group (15.0%, 3/20) and SHetA2 group (10.0%, 2/20), with statistically significant difference ($\chi^2 = 32.18$, $P < 0.01$). Lung bacterial load (lg10 CFU/ml) of control group was 7.01 ± 1.23 , which was obviously higher than those of isoniazid group (2.59 ± 0.87) and SHetA2 group (2.25 ± 0.94), with statistically significant difference ($F=6.71$, $P=0.002$); while no statistically significant difference was found between the isoniazid group and SHetA2 group ($q=0.33$, $P=0.970$). **Conclusion** SHetA2 has a considerable antibacterial effect on MTB both *in vivo* and *in vitro*, which may be a candidate for new anti-tuberculosis drugs.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis, pulmonary; Drug evaluation; Animal experimentation; Sulfur heteroarotinoid

目前,化疗药物是治疗肺结核的主要方法^[1],但药物引起的肝肾功能损伤发生率较高,并且抗结核药物的不良反应或引起其他并发症成为患者漏服或终止治疗的主要原因,增加了耐药结核病的发生率,是目前抗结核治疗亟需解决的问题之一。硫异维甲酸类化合物 A2(sulfur heteroarotinoid A2,SHetA2)是新合成的维生素 A 类似物。目前,发现其可选择性靶向肿瘤细胞发挥抗癌抑癌活性,而对正常细胞无影响^[2]。而 SHetA2 对 MTB 感染有无影响未见详细报道。因此,笔者探讨 SHetA2 在体内外对 MTB 的治疗效果,验证其有无抗结核作用,为临床应用提供理论依据。

材料和方法

一、实验药品及菌株

SHetA2 由美国国家癌症研究所药物合成和化学研究室提供。SHetA2 使用二氯甲烷溶解,使用前用蒸馏水配成所需浓度溶液备用。异烟肼片(北京市永康药业有限公司;批号:H11020585;1 mg/片)研粉,加生理盐水稀释,配成所需浓度的混悬液备用。MTB 标准菌株 H37Rv(ATCC25618)由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核病实验室保藏并提供。

二、实验动物

无特定病原体(SPF)级昆明小鼠 76 只,雌雄随机,6 周龄,体质量 20~25 g,平均(23.36 ± 1.81) g,均由第三军医大学动物实验中心提供。所有小鼠均行卡介苗纯蛋白衍生物(BCG-PPD)皮肤试验,观察 72 h,皮试结果为阴性者入选(76 只均阴性)。所有实验均通过重庆市公共卫生医疗救治中心动物委员

会批准同意。

三、实验方法

1. 建立小鼠肺结核模型:采用雾化吸入感染装置构建肺结核小鼠动物模型。雾化吸入感染装置为美国 Glas-Col 公司制造,型号为 099CA-4212。根据文献[3-4]所描述的方法,采用 MTB 标准菌株 H37Rv [10^6 菌落形成单位(CFU)]对 76 只小鼠进行吸入感染实验。感染后将小鼠转移至感染实验室内饲养,7 周后采集小鼠静脉血 2 ml,测定机体内的 MTB。对于机体内含有 MTB,且影像学检查肺部存在明显的病灶部位视为建模成功。共有 62 只小鼠建模成功,为样本量统一,纳入 60 只。采用数字表法随机将实验成功建模的肺结核小鼠分为对照组、异烟肼组、SHetA2 组,每组 20 只。

2. MTB 培养:将 MTB 标准菌株 H37Rv 在 7H9 培养液内 37 °C 培养 4 周后收集细菌。

3. 最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定:采用试管法,将药物 SHetA2 ($2.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $20.0 \mu\text{g/ml}$)分别加入苏通培养基内后,加入等量的菌液(1 mg/ml ,每支接种 0.1 ml ,含 10^6 CFU 细菌),于 37 °C 培养 2 周后,每支吸 0.1 ml 转种于 2 支改良罗氏(L-J)培养基斜面,同时设空白对照管。在含药苏通培养基内培养 2 周抑制细菌生长的最小浓度即为 MIC。

4. 药物治疗:(1)异烟肼组:给予同体积的异烟肼灌胃。参照文献[5],对肺结核给予常规异烟肼($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)治疗,以正常成人体质量 70 kg,小鼠体质量 20 g,按体表面积比(0.0026)等效剂量进行换算给药,小鼠给药量为 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;每日灌胃 1 次;(2)SHetA2 组:给予同体积的

SHetA2混悬液($20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,每日灌胃 2 次;(3)对照组:给予同体积的生理盐水灌胃,每日灌胃 1 次。以上 3 组均于建模成功后给药,连续灌胃 45 d。

5. 检测指标:(1)体征及体质量变化:观察 3 组小鼠治疗 45 d 后体征(精神状态、毛色、饮食、尿便、活动)的变化和体质量变化情况。(2)肺组织细菌载菌量计数和 HE 染色:在最后一次给药后 24 h 处死小鼠,立刻解剖,取小鼠肺脏,肉眼观察肺组织有无结节、水肿、萎缩等病变,病变的严重程度及范围。然后将小鼠左肺组织剪碎,置于无菌组织匀浆器中,加入 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)研磨匀浆,视为原液,连续 6 次 10 倍稀释,取 0.1 ml 匀浆稀释液接种于直径 6 cm 改良罗氏培养平板,每个稀释度做 2 个复板,37℃培养,4 周后观察 MTB 的生长情况,计算菌落数,结果经对数转换($\lg 10$)后表示。同时将各剩余组织置于 10% 福尔马林中固定并做切片进行 HE 染色,光镜下观察,分为 4 级:无、轻、中、重度(表 1)。

表 1 肺脏病变(HE 染色)分级标准

分级	镜下表现
无	组织结构完整,细胞形态无变异,无白细胞浸润或极少量浸润
轻	组织结构完整,有白细胞浸润,炎症反应
中	组织结构部分破坏,大量白细胞聚集,类上皮细胞增多
重	组织结构大部分破坏,肺实变,形成结核结节

四、统计学分析

采用 Graphpad Prism 7.03 统计软件进行数据分析,计量资料符合正态分布,以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间多重比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组内两两比较采用 Tukey 多重比较法;计数资料以“构成比(%)”表示,组间差异的比较采用卡方检验,均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、SHetA2 体外对 MTB 生长的影响

将不同浓度的药物 SHetA2 ($2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $5.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $10.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $20.0\text{ }\mu\text{g/ml}$)分别加入含 MTB 的培养基内培养一定时间后,发现 SHetA2 可抑制 MTB 的生长,具有浓度依赖性,其 MIC 为 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

二、SHetA2 体内对结核感染小鼠的作用

1. 体征及体质量变化:SHetA2 组和异烟肼组小鼠治疗后精神状态佳、饮食及尿便正常,未出现死亡。对照组小鼠偶有咯血,毛色欠光泽,精神萎靡,活动减少。三组小鼠治疗前体质量比较差异无统计学意义;治疗 45 d 后,SHetA2 组和异烟肼组小鼠体质量高于对照组,SHetA2 组和异烟肼组之间比较,差异无统计学意义($q=0.10$, $P=0.998$),见表 2。

表 2 各组小鼠治疗前后体质量变化情况($\text{g}, \bar{x} \pm s$)

组别	治疗前	治疗 45 d 后
对照组	22.84 ± 1.93	27.21 ± 2.85
异烟肼组	23.33 ± 1.46	37.98 ± 3.09^a
SHetA2 组	23.92 ± 1.85	38.28 ± 3.43^b
F 值	0.09	4.05
P 值	0.910	0.023

注^a:与对照组治疗 45 d 后比较, $q=3.44$, $P=0.047$; ^b:与对照组治疗 45 d 后比较, $q=3.53$, $P=0.040$

2. 小鼠肺脏观察:对照组小鼠肺脏增大,膨胀充血,表面均密布粟粒样结节或散在 5~10 个大小不等结节,直径 0.1~0.5 cm,触之较硬,切开存在砂砾感。异烟肼组和 SHetA2 组小鼠肺脏略有增大,呈鲜红色或暗红色,肺脏多散在 3~6 个白色或灰白色结节,直径 0.1~0.3 cm,或偶见密布粟粒样结节。

HE 染色后观察,对照组肺组织病变以渗出为主,组织结构破坏,白细胞聚集,有大量炎性细胞浸

表 3 各组小鼠肺脏病理组织学检查病变分级情况

组别	动物数 (只)	病变分级[只(构成比, %)]			
		无	轻	中	重
对照组	20	0(0.0)	00(0.0)	4(20.0)	16(80.0)
异烟肼组	20	00(0.0)	14(70.0)	3(15.0)	3(15.0)
SHetA2 组	20	00(0.0)	15(75.0)	3(15.0)	2(10.0)

润及肺实变,肺脏可见典型结核结节,炎症反应严重;异烟肼组和 SHetA2 组均以少量渗出或少量增生性病变为主,组织结构部分破坏,见少量炎症细胞浸润。对照组小鼠肺脏炎症重度的构成比明显高于异烟肼组和 SHetA2 组($\chi^2 = 32.18, P < 0.01$),见表 3。

3. 小鼠肺脏感染细菌数量:菌落计数结果($\lg_{10}$ CFU/ml)显示,对照组、异烟肼组、SHetA2 组小鼠肺脏感染细菌数量分别为 7.01 ± 1.23 、 2.59 ± 0.87 、 2.25 ± 0.94 ,对照组明显高于异烟肼组和 SHetA2 组,差异有统计学意义($F = 6.71, P = 0.002$);而异烟肼组与 SHetA2 组比较,差异无统计学意义($q = 0.33, P = 0.970$)。

讨 论

MTB 是结核病的致病菌,主要通过呼吸道传播,可侵袭很多器官,其中以肺部感染最为常见。目前,肺结核疫情形势严峻,传统的抗结核药物治疗周期长,不良反应大;因此,国内外加快了对新型抗结核药物的研发,取得了一些成果,出现了一些新型的、不同于传统抗结核药物作用机制的药物,如贝达喹啉、德拉马尼、SQ109、PA-824、TBA-354、BTZ043 等^[6],但这些新药仍有严重不良反应,限制了其临床应用^[7]。

异维甲类化合物(Hets)是一类新的有抗癌活性的小分子药物,最初源自于维生素 A 类似物的维甲类化合物,但它在维甲类化合物的环中插入了一个杂原子,称之为异维甲类化合物。维甲类化合物的毒性是天然维生素 A 的 1000 倍以上,而杂原子可使维甲类化合物的毒性降回原来的 1/1000 以下,达到和天然维生素 A 相似的水平^[8]。通过构效关系研究发现,Hets 有体内抗肿瘤活性^[9]。Hets 可通过两个原子(富有弹性的尿素氮或硫脲)连接元件替换,生成挠性异维甲类化合物(flexible heteroarotinoid, Flex-Hets)。和维甲类化合物及普通的 Hets 一样, Flex-Hets 可抑制细胞生长和诱导分化。不同的是, Flex-Hets 还可以不依赖核视黄酸受体的机制诱导细胞凋亡^[10]。因此, Flex-Hets 不引起其他维甲类化合物的不良反应,如皮肤刺激性

和致畸性^[11]。

Flex-Het 包含了一个硫杂原子、一个硫脲链接元件和一个 NO_2 成分。作为 Flex-Het 里一个新合成的化合物, SHetA2 有在所有的癌细胞系中最强和最有潜力的生长抑制活性,同时基本不影响正常细胞的分化。因此, SHetA2 被用于癌症治疗和预防领域。研究发现, SHetA2 可在体内外抑制肾癌、卵巢癌、肺癌等发生和发展^[12-13]。但至今未见确切报道其在肺结核方面的应用。目前,仅 Ibrahim 等^[14]在 2016 年发现 SHetA2 在体外表现为对 MTB 的生长有抑制作用,但至今未见具体直接的数据报道。

笔者采用雾化吸入感染法建立肺结核小鼠模型,通过静脉血测定和影像学检查评价造模,结果表明,本次实验肺结核小鼠模型造模成功。对肺结核小鼠模型施以不同的处理(生理盐水、异烟肼、SHetA2)后,与对照组比较,异烟肼、SHetA2 治疗肺结核小鼠后,其一般体征及客观指标等方面皆有不同程度的改善:(1)一般体征:体质量增长正常,皮毛光滑润泽,进食正常,精神状况良好,活动度佳。(2)肺脏组织形态:肉眼观察肺组织结核结节较少;光镜下治疗组肺脏炎症反应较对照组明显减轻,而 SHetA2 组与异烟肼组比较,无明显差别。并且,相对于异烟肼常见的胃肠道反应、周围神经炎、肝损伤、过敏反应、血液系统症状、内分泌失调等不良反应, SHetA2 的不良反应极小,并且对正常细胞无害^[15],表明 SHetA2 或可成为最有潜力的抗结核化学药物的候选。

Zhang 等^[16]通过高效液相色谱法/紫外线(high performance liquid chromatography/ultraviolet, HPLC/UV)方法研究了 SHetA2 在小鼠体内的药代动力学,发现标准曲线在 25 nmol/L 和 2500 nmol/L 之间呈线性关系, SHetA2 被发现在 4 °C 条件下在小鼠血浆中是稳定的, 24 h 后无明显丢失。然而,在 37 °C 条件下, SHetA2 的浓度呈单指数下降,其半衰期为 12.7 h;而以 20 mg/kg 或 60 mg/kg 的剂量口服, SHetA2 口服的生物利用度分别为 15% 和 19%。因此,笔者选用 20 mg/kg 作为口服的剂量,以每日灌胃 2 次的治疗频次进行研

究。众所周知,MTB 在肺泡巨噬细胞内存活和复制。研究发现,SHetA2 有巨噬细胞靶向作用^[14]。因此,笔者认为 SHetA2 通过靶向巨噬细胞发挥抗结核的作用,但具体机制不明,下一步我们将深入研究。

综上,SHetA2 治疗肺结核小鼠模型,能明显改善小鼠的一般体征及组织病变,减轻肺脏炎症反应,在体内外抑制 MTB 的生长。其抗结核的作用和异烟肼一致,因其极小的不良反应,SHetA2 或可成为有潜力的抗结核化学药物的候选。

参 考 文 献

- [1] Eedara BB, Rangnekar B, Sinha S, et al. Development and characterization of high payload combination dry powders of anti-tubercular drugs for treating pulmonary tuberculosis. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 118: 216-226.
- [2] Myers T, Chendedza S, Lightfoot S, et al. Flexible heteroarotinoid (Flex-Het) SHetA2 inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Invest New Drugs*, 2009, 27(4): 304-318.
- [3] Smith DW, Wiegshaas E, Navalkar R, et al. Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. I. Preliminary studies in BCG-vaccinated and nonvaccinated animals. *J Bacteriol*, 1966, 91(2): 718-724.
- [4] 华树成, 李丹, 杨明. 采用自动雾化吸入感染装置建立肺结核实验动物模型. *吉林大学学报(医学版)*, 2008, 34(6): 1096-1098.
- [5] Turnbull L, Bell C, Child F. Tuberculosis (NICE clinical guideline 33). *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 2017, 102(3): 136-142.
- [6] Pontali E, Visca D, Centis R, et al. Multi and extensively drug-resistant pulmonary tuberculosis: advances in diagnosis and management. *Curr Opin Pulm Med*, 2018, 24(3): 244-252.
- [7] Jeon D. WHO Treatment Guidelines for Drug-Resistant Tuberculosis, 2016 Update: Applicability in South Korea. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2017, 80(4): 336-343.
- [8] Benbrook DM, Madler MM, Spruce LW, et al. Biologically active heteroarotinoids exhibiting anticancer activity and decreased toxicity. *J Med Chem*, 1997, 40(22): 3567-3583.
- [9] Guruswamy S, Lightfoot S, Gold MA, et al. Effects of retinoids on cancerous phenotype and apoptosis in organotypic cultures of ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(7): 516-525.
- [10] Chun KH, Benbrook DM, Berlin KD, et al. The synthetic heteroarotinoid SHetA2 induces apoptosis in squamous carcinoma cells through a receptor-independent and mitochondria-dependent pathway. *Cancer Res*, 2003, 63(13): 3826-3832.
- [11] Benbrook DM, Kamelle SA, Guruswamy SB, et al. Flexible heteroarotinoids (Flex-Hets) exhibit improved therapeutic ratios as anti-cancer agents over retinoic acid receptor agonists. *Invest New Drugs*, 2005, 23(5): 417-428.
- [12] Myers T, Chendedza S, Lightfoot S, et al. Flexible heteroarotinoid (Flex-Het) SHetA2 inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Invest New Drugs*, 2009, 27(4): 304-318.
- [13] Lin YD, Chen S, Yue P, et al. CAAT/enhancer binding protein homologous protein-dependent death receptor 5 induction is a major component of SHetA2-induced apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 5335-5344.
- [14] Ibrahim M, Hatipoglu M, Benbrook D, et al. A novel tuberculosis treatment: inhalable SHetA2 microparticles for immediate release and macrophage targeting. *Respiratory Drug Delivery*, 2016, 3: 591-594.
- [15] Ibrahim M, Hatipoglu MK, Garcia-Contreras L. SHetA2 dry powder aerosols for tuberculosis: formulation, design, and optimization using quality by design. *Mol Pharm*, 2018, 15(1): 300-313.
- [16] Zhang Y, Hua Y, Benbrook DM, et al. High performance liquid chromatographic analysis and preclinical pharmacokinetics of the heteroarotinoid antitumor agent, SHetA2. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 58(5): 561-569.

(收稿日期:2019-07-09)

(本文编辑:李敬文)