

重构腺相关病毒转导 PDX-1 对 C2C12 分化为胰岛素分泌细胞的作用

杨 川, 李 莉, 王 川, 陈黎红, 黎 峰, 严 励, 程 桦
(中山大学附属二医院内分泌科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】重构含有 PDX-1 的腺相关病毒载体, 将 PDX-1 转导入 C2C12 细胞, 观察胰岛素分泌量的改变。【方法】应用 PCR 方法将 PDX-1 从 pZL1 质粒中克隆出来, 安装到 Stratagene 公司的腺相关病毒(AAV Helper-Free System)表达系统中, 转染 HEK293 细胞, 培养 72 h, 提取病毒悬液, 转导 PDX-1 进入 C2C12 细胞中, 检测细胞培养液中的胰岛素含量。【结果】用 X-gal 染色系统检测, 可见有蓝色的阳性细胞。病毒的粗略的浓度经计算后大约为 10^{12} /mL, 转导的病毒数约为 10^{11} 。PCR 结果: 用重构的腺相关病毒转导后 C2C12 有胰岛素及 PDX-1 的 mRNA 的表达。用重构的腺相关病毒转导 PDX-1 进入 C2C12 后的培养液的胰岛素浓度为 $(5.5 \pm 1.1) \mu\text{U/mL}$, 较其他方法也有较明显的增加 ($P < 0.05$)。【结论】通过应用含有 PDX-1 基因的重构腺相关病毒载体可以转导 PDX-1 在 C2C12 细胞中表达, 且可以提高 C2C12 分化为胰岛素分泌细胞的分泌量。

关键词: PDX-1; 成肌细胞; 胰岛素分泌细胞; 腺相关病毒

中图分类号: R587

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)-05-0486-05

Role of Recombinant AAV Vectors with PDX-1 in Transdifferentiation Myoblast C2C12 Cells into Insulin-secreting Cells

YANG Chuan, LI Li, WANG Chuan, CHEN Li-hong, LI Feng, YAN Li, CHENG Hua

(Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To transduce PDX-1 gene into C2C12 cells with recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors and observe the excretion change of insulin. 【Methods】The PDX-1 gene was cloned from pZL1 plasmids by RT-PCR. A recombinant adeno-associated virus containing the cDNA encoding PDX-1 was prepared using AAV Helper-Free System. 72 h after transfection, cell lysate was obtained from the HEK293 cell and transformed into the C2C12 cell. Then we detected the insulin content of supernatant. 【Results】There were some blue positive cells by means of X-gal staining system after transferring into HEK293 cell. Viral titers were about 10^{12} /mL. The transduction virus number was about 10^{11} . PCR results: the mRNA of insulin and PDX-1 were expressed in the C2C12 cells after infecting the recombinant adeno-associated virus which containing PDX-1. The insulin content of supernatant was $5.5 \pm 1.1 \mu\text{U/mL}$ in the C2C12 cells which were transfected with recombinant adeno-associated virus containing the PDX-1 cDNA. It was higher than the control ($P < 0.01$) or the groups which were differentiated by other means ($P < 0.05$).【Conclusions】Recombinant AAV vector carrying PDX-1 can not only transduce PDX-1 gene into C2C12 cells, but also increase insulin excretion of insulin-secreting cells differentiated from C2C12 cells.

Key words: PDX-1; myoblast; insulin-secreting insulin cells; adeno-associated virus

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):486-490]

转录因子胰腺十二指肠同源框 1 (pancreatic-duodenum homeobox-1, PDX-1) 是胰腺发育、分化

及体内葡萄糖代谢稳定的关键因子之一^[1]。鼠及人的 PDX-1(-/-) 纯合子一般都由于胰腺发育障碍

收稿日期: 2005-10-19

基金项目: 教育部博士学科点专项科研基金资助项目(20020558077); 中国博士后基金资助

作者简介: 杨 川(1968-), 男, 广东惠阳人, 博士, 副教授。E-mail: bear3151@sohu.com

而早亡,在 PDX-1 缺乏的杂合子中,多在成年时由于胰岛素基因表达异常而出现葡萄糖耐量异常^[2]。现在一般认为 PDX-1 的变异是 MODY4 型糖尿病主要的发病原因^[3],因此, PDX-1 对于胚胎干细胞或成体干细胞分化为胰岛素分泌细胞具有重要的作用。为了提高成肌细胞株 C2C12 细胞分化为胰岛素分泌细胞的分泌量,重构含有 PDX-1 的腺相关病毒载体,将 PDX-1 转导入 C2C12 细胞,观察其作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

成肌细胞株 C2C12 购自 American Type Culture Collection (ATCC) (CRL-1427)。用 DMEM 高糖培养基 (FBS 100 mL/L、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL),在体积分数 5%CO₂、95%空气、饱和湿度的 37 °C 的细胞培养箱中培养。3 d 换液,5 d 传代、接种。细胞接种入 6 孔培养板,控制细胞浓度为 10⁵/mL,其中 3 个孔用重构腺相关病毒 (rAAV) 进行转导 PDX-1 的试验,另 3 个孔为阴性对照。培养细胞所应用的培养基、胎牛血清、抗生素等均购自 Gibco BRL 公司, GLP-1 购自 Sigma 公司。

1.2 PDX-1 重构腺相关病毒 (rAAV) 的构建

1.2.1 材料 质粒 pZL1 由美国 Vanderbilt University 的 Dr. Wright 惠赠,内含大鼠 PDX-1 的 cDNA 全长片断,约为 2.22 kb,克隆于质粒 pZL1 的 Sal I 和 Not I 酶切位点之间。腺相关病毒 (AAV Helper-Free System) 表达系统购于 Stratagene 公司。T4 DNA 连接酶来源于 TaKaRa 公司,限制性内切酶来自 Biolabs 公司,质粒提取及电泳凝胶回收试剂盒均购自 Qiagen 公司。

1.2.2 方法 PCR 扩增 PDX-1 表达片断:腺相关病毒 (AAV Helper-Free System) 表达系统中的质粒 (pAAV-MCS) 中没有 Sal I 和 Not I 酶切位点,且 PDX-1 表达片断仅为 820 bp 左右,设计含有 BamH I 及 Xba I 内切酶位点的引物进行 PCR 扩增。上下游引物分别是:5' GGGGATCCATG AACAGTGAGGAGCAGTAC 3'、5' GCTCTAGATCA CCGGGTTCTCTGCGG 3', PCR 扩增条件为:94 °C 1 min, 60 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环, 72 °C 10 min 末次循环。构建 PDX-1 真核表达载体

pAAV-MCS:回收 PCR 产物后,用内切酶 BamH I 及 Xba I 分别对 PCR 产物及 pAAV-MCS 进行酶切,其中每个反应体系中 pAAV-MCS 及 PCR 产物的含量为 10 μg,体系置 37 °C 水浴 2.5 h。回收酶切产物后,用 T4 DNA 连接酶连接,反应体系中酶切后的 PCR 产物约为 0.3 pmol/L,质粒 DNA 为 0.03 pmol/L,16 h 过夜;感受态大肠杆菌扩增连接后的产物,EndoFree Plasmid Maxi Protocol (Qiagen 公司) 提取目的质粒。真核表达载体 pAAV-MCS 的鉴定:用上述的 PDX-1 表达片断引物及 PDX-1 检测引物分别进行 PCR 扩增。PDX-1 检测上游引物为 5' ACATCTCCCCATACGAAGTGCC 3',下游引物为 5' AAGTTGAGCATCACTGCCAGCTCC 3'。50 μL PCR 反应体系中上、下游引物各 2.0 pmol/L, PCR 扩增条件为:94 °C 1 min, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 10 min 末次循环,以检验装载的结果。其中 PDX-1 表达全片断大约为 820 bp, PDX-1 检测片断为 364 bp。腺相关病毒的组装及提取:用常规的方法培养 HEK293 细胞,传代后 24 h 后,用 Introgen 公司的 Lipotectamin 2000 协助重构的质粒 pAAV-MCS 及 AAV Helper-Free System 中的其他两种辅助质粒 pAAV-RC 及 pHelper 共转染 HEK293 细胞,培养 72 h 后,用 X-gal 染色系统检测质粒转染的效果。用物理方法破碎细胞后,提取病毒悬液,用分光光度仪检测 260 nm 的 A 值来评价病毒的浓度。

1.3 PDX-1 的 rAAV 转导

将培养完成的 C2C12 细胞用 DMEM 培养液洗涤 2 次,将病毒原液用 DMEM 培养液按 1:100 稀释后加入 C2C12 细胞,在体积分数 5%CO₂、95%空气、饱和湿度的 37 °C 的细胞培养箱中培养 48 h 后,完成其他的细胞学及分子生物学实验。细胞 PDX-1 表达的测定:0.1 mol/L PBS 将细胞洗 3 遍后,用总 RNA 提取试剂盒提取细胞的总 RNA。两步法分别进行 cDNA 合成及 PCR 扩增。25 μL cDNA 合成体系中,总 RNA 约 1 μg。逆转录条件为 70 °C 5 min 后,37 °C 温浴 60 min, 95 °C 5 min。50 μL PCR 反应体系中上、下游引物各 2.0 pmol, PCR 扩增条件为:94 °C 1 min, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 10 min 末次循环。经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳确认。其中,β-Actin 与 PDX-1 检测引物同管扩增。β-Actin 的上游引物为 5' CTCTTTGATGTACGACGATTTTC 3',下游引物为

5 ATCGTGGGCGCTCTAGGCACC 3。总 RNA 提取药盒购于 Genra 公司, 引物由英国 ACGT 公司合成。

1.4 放射免疫测定细胞培养液中的胰岛素浓度

将各个孔的培养液收集, 按放免试剂盒的说明测定其中的胰岛素含量。再按浓缩倍数计算出培养液中的胰岛素浓度。药盒的批间变异率及批内变异率均小于 10%。

1.5 统计方法

放射免疫测定结果用平均值 \pm 标准差表示。用单因素方差分析, 组间对比方法为 LSD 法。统计软件为 SPSS 10.0。

2 结果

2.1 PCR 结果

图 1A 为重构的质粒 pAAV-MCS 的 PCR 结果, 图中 PDX-1S 道的亮带为扩增的 PDX-1 片断; 图 1B 为 rAAV 转导 C2C12 细胞后 PDX-1 的 RT-PCR 结果, 图中 1 道为转导后的 C2C12 细胞的结果; 亮带为扩增的 PDX-1 片段, 2 道为阴性对照, 未见亮带; 图 1C 为 rAAV 转导 C2C12 细胞后胰岛素的 RT-PCR 结果, 图中 1 道为转导后的 C2C12 细胞的结果; 其中的亮带为扩增的 insulin 片断, 2 道为阴性对照, 未见亮带。

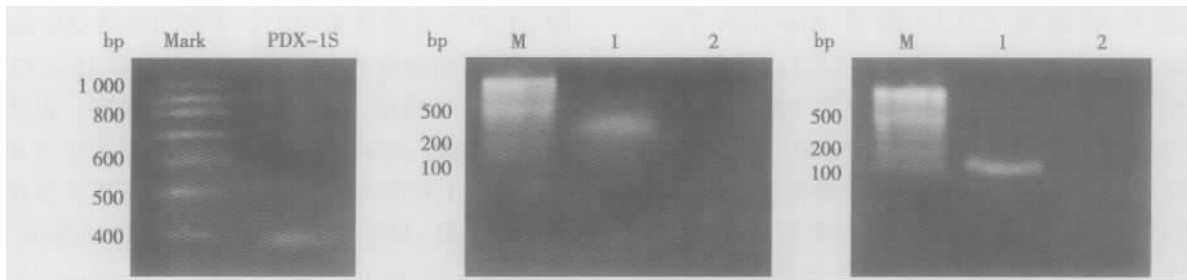


图 1 PDX-1 及 Insulin 的 PCR 结果

Fig.1 The electropherogram of PDX-1 and insulin PCR

A: PCR product of pAAV-MCS plasmid. B: PCR PDX-1 product of C2C12 cells transduced by rAAV. lane 1 was amplification of PDX-1; lane 2 was negative control (no bright tape). C: PCR insulin product of C2C12 cells transduced by rAAV. lane 1 was amplification of insulin; lane 2 was negative control (no bright tape)

2.2 HEK293 细胞形态的变化及 X-gal 检测的结果

重构质粒 pAAV-MCS 及质粒 pAAV-RC 及 pHelper 共转染 HEK293 细胞后的细胞形态的变化及用 X-gal 染色系统检测的结果, 见图 2。图 2A-

图 2D 为 HEK293 的细胞形态变化, 其分别是转染前、转染后 24、48、72 h 的细胞形态, 可见细胞的数目及密度有明显的减少, 有些细胞聚集, 培养液中有漂浮的细胞(图中未显示), 图 2E 为 X-gal 染色系统检测的结果。可见有蓝色的阳性细胞。

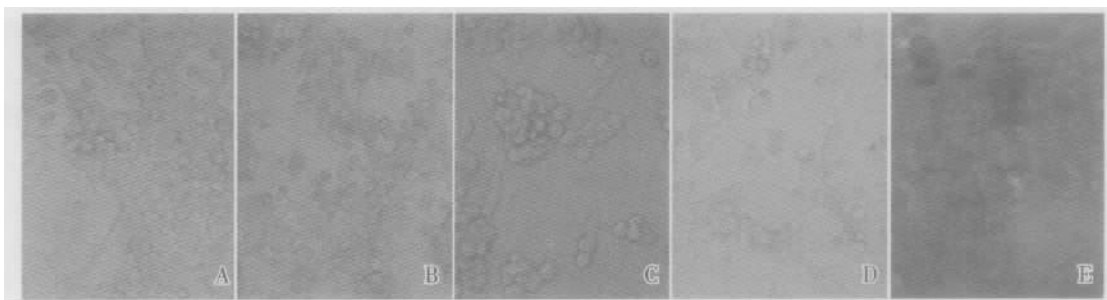


图 2 HEK293 细胞后的细胞形态的变化及用 X-gal 染色系统检测的结果

Fig.2 The transformation of HEK293 cells and the result measured by X-gal staining system

A~D: were the morphologic changes of HEK293 cells untransfection and post-transfection 24, 48, 72 hours ($\times 40$); E was the result measured by X-gal staining system ($\times 200$)

2.3 病毒的浓度

病毒的粗略的浓度经计算后大约为 $10^{12}/\text{mL}$,

转导的病毒数约为 10^{11} 。

2.4 胰岛素浓度的比较

本课题组各种方法诱导 C2C12 分化后, 培养液中(见图 3): 其中对照为未经任何处理的 C2C12 细胞培养液中的胰岛素的含量 (0.54 ± 0.45) $\times 10^{-6}$ IU/mL; 用 GLP-1 40 nmd/L 浓度诱导后的结果 (2.29 ± 1.69) $\times 10^{-6}$ IU/mL; 瞬间表达及稳定表达均为用质粒 pCDNA3.1(+) 转染 PDX-1 入 C2C12 后的结果, 其中瞬间表达是 G418 筛选前的结果 (2.45 ± 1.48) $\times 10^{-6}$ IU/mL, 稳定表达是 G418 筛选后的第 1 代细胞培养液中胰岛素的含量 (3.59 ± 1.07) $\times 10^{-6}$ IU/mL, rAAV 转导表示用重构的腺相关病毒转导 PDX-1 进入 C2C12 后的结果 (5.47 ± 1.12) $\times 10^{-6}$ IU/mL。可见用 rAAV 转导表示用重构的腺相关病毒转导 PDX-1 进入 C2C12 后, 细胞培养液中的胰岛素含量较对照组有明显的增加 ($P < 0.001$), 较其他方法也有较明显的增加 ($P < 0.05$)。

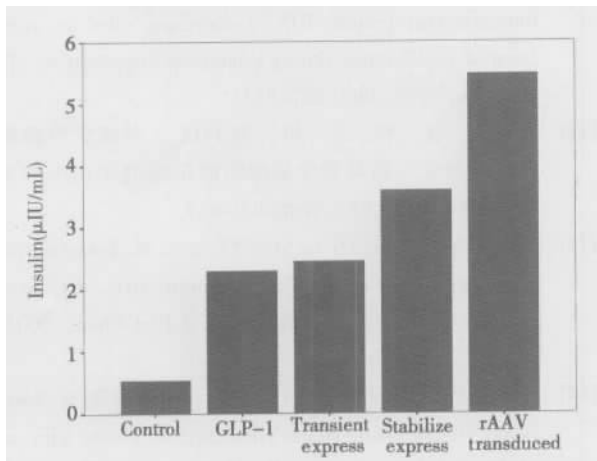


图3 各种方法诱导 C2C12 分化后, 培养液中胰岛素含量的比较

Fig.3 Comparison of insulin content of supernatant in C2C12 cells differentiated by various methods

3 讨论

目前有关干细胞分化成分泌胰岛素细胞的调节机制的研究资料主要来源于胚胎干细胞, 其中对真核细胞基因表达起重要作用的同源域蛋白 (homeodomain protein) 的研究十分深入^[4]。在已发现的同源域蛋白中, 碱性螺旋-环-螺旋 (basic Helix-loop-Helix, bHLH) 家族^[5]及 PDX-1^[6]与胚胎干细胞分化为分泌胰岛素细胞密切相关, 但与成体干细胞分化的关系还有待深入的研究。

在小鼠胚胎发育的第 8.5 天可以检测到背侧胰芽的发育, PDX-1 就在其中各种细胞(包括内分泌及外分泌细胞)中出现, 但在整个胰腺发育完成后, PDX-1 仅在 细胞及 PP 细胞中表达, 因此人们认为其对于胰岛素及生长抑素细胞发育分化的作用尤为重要^[7,8]。鼠及人的 PDX-1(-/-) 纯合子一般由于胰腺发育障碍而早亡, 在 PDX-1 缺乏的杂合子中, 多在成年时胰岛素基因表达异常而出现葡萄糖耐量异常^[9]。现在一般认为 PDX-1 的变异是 MODY4 型糖尿病主要的发病原因^[10]。PDX-1 对胰岛 细胞发育的重要作用亦可以在于糖尿病动物模型的研究中得到证实^[11], 在鼠 90% 的胰腺切除后的第 1 天, PDX-1 蛋白仅仅出现在导管上皮细胞, 而且表达量非常低, 第 2、3 天, PDX-1 的表达有了明显的提高, 而且这种提高的速度随着细胞增殖速度的提高而提高, 到了 3~7 d 后, PDX-1 在细胞中的表达量甚至超过了对照组的表达量, 提示 PDX-1 在胰腺再生中的重要作用。我们以前的研究也发现 PDX-1 在 C2C12 细胞分化为胰岛素分泌的细胞中有重要的作用^[12]。虽然 PDX-1 在胰岛 细胞发育过程中的作用机理还不是十分清楚, 但其不可或缺的关键作用通过其他实验还是表现得十分明显。近期对于胰岛胚胎发育中的基因变化有了进一步深入的研究, 发现对于胰岛发育具有重要作用的因子大部分都是转录因子, 如 is1-1、PDX-1、BETA2、Nkx2.2、PAX4、PAX6 等, 而在这些因子中, PDX-1 具有“总开关”(“master regulator”)的作用, 它调节着各种其他转录因子对胰岛 细胞发育的作用^[13]。

C2C12 细胞是一种成肌细胞株, 在一定的条件下可以诱导成为骨骼肌细胞。成肌细胞在分化为肌细胞时, 可以表达 bHLH 转录因子家族中的许多成员, 如 MyoD、BETA3、pax1 等^[14]。bHLH 家族转录因子, 在产生细胞类型专一的基因表达中起着重要作用。它们含有一个高度保守的结合 DNA 必须的碱性区, 这些蛋白质的特点是能够结合 E-box 增强子序列。首先被鉴定的 bHLH 就是 MyoD, 可以在骨骼肌中表达, 所产生的 Myo cDNA 可以诱导各种各样已经分化的细胞株表达出肌肉细胞的特征。经过几年的研究发现 bHLH 至少有 240 种以上^[15], 分布在从酵母菌到人类的各种细胞中, 尤其在血细胞、肌肉细胞、神经细胞及胰腺等。如有研究表明^[16], 在除去 BETA2/NeuroD 基因的小鼠中, 胰腺发育缺失, 而使这些动物患上严重的糖尿病; 另一方面, 有不少研究发现^[17], bHLH 家族与胰岛素分泌有关, 如 E2A 编码蛋白可以有效地激活胰岛素的基因表达

C2C12 细胞是一种成肌细胞株, 在一定的条件下可以诱导成为骨骼肌细胞。成肌细胞在分化为肌细胞时, 可以表达 bHLH 转录因子家族中的许多成员, 如 MyoD、BETA3、pax1 等^[14]。bHLH 家族转录因子, 在产生细胞类型专一的基因表达中起着重要作用。它们含有一个高度保守的结合 DNA 必须的碱性区, 这些蛋白质的特点是能够结合 E-box 增强子序列。首先被鉴定的 bHLH 就是 MyoD, 可以在骨骼肌中表达, 所产生的 Myo cDNA 可以诱导各种各样已经分化的细胞株表达出肌肉细胞的特征。经过几年的研究发现 bHLH 至少有 240 种以上^[15], 分布在从酵母菌到人类的各种细胞中, 尤其在血细胞、肌肉细胞、神经细胞及胰腺等。如有研究表明^[16], 在除去 BETA2/NeuroD 基因的小鼠中, 胰腺发育缺失, 而使这些动物患上严重的糖尿病; 另一方面, 有不少研究发现^[17], bHLH 家族与胰岛素分泌有关, 如 E2A 编码蛋白可以有效地激活胰岛素的基因表达

及胰岛素基因的增强子而使细胞分泌胰岛素。同样, BETA2 蛋白与胰岛素及类基因有高度的亲和力, 可以诱导胰岛素及胰升血糖素的分泌等。bHLH 家族大约可以分为 7 类, 而与细胞分化有关的基本上都属于第 2 类, 各个基因之间可能存在着相互的转换, 如由于 BETA2 有可能转换为 NeuroD 基因^[17], 使某些去除 NeuroD 基因的动物并不一定会出现神经发育迟钝的现象。因此, 成肌干细胞与胰岛素分泌细胞具有比较近似的基因谱。

由于肌细胞具有独特优越的生物性能: 肌细胞数量多、体积大, 具有相当多的成肌干细胞, 有利于进行相关治疗措施的实施; 肌肉组织血流丰富, 转基因后易于接触到血液循环而发挥作用, 可获得较高的生物利用度; 肌肉组织位于体表, 且当某些治疗不适合或可能对机体产生有害影响时, 较容易切除, 具有相对的可控性与安全性; 肌肉是既适合于直接基因 (in vivo) 转导的靶组织, 又适合于间接体外 (ex vivo) 基因转导的靶组织, 可能为基因治疗提供良好的靶器官等。

总之, 通过应用含有 PDX-1 基因的重构腺相关病毒载体可以转导 PDX-1 在 C2C12 细胞中表达, 且较以前的方法可以提高 C2C12 分化为胰岛素分泌细胞的分泌量^[18]。

参考文献:

- [1] ROBERTSON R P, HARMON J, TRAN P O, et al. Glucose toxicity in beta- cells: Type 2 diabetes, good radicals cone bad, and the glutathione connection [J]. *Diabetes*, 2003, 52(3):581- 587.
- [2] JONSSON J, CARLSSON L, EDLUND T, et al. Insulin-promoter factor 1 is required for pancreas development in mice[J]. *Nature*, 1994, 371(6498):606- 609.
- [3] MELLOUL D, TSUR A, ZANGEN D. Pancreatic Duodenal Homeobox (PDX- 1) in health and disease[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2002, 15(9):1461- 1472.
- [4] ZHANG YQ, MASHIMA H, KOJIMA I. Changes in the expression of transcription factors in pancreatic AR42J cells during differentiation into insulin- producing cells [J]. *Diabetes*, 2001, 50 Suppl 1:S10- 14.
- [5] SHINOZUKA Y, OKADA M, OKI T, et al. Altered expression of HES- 1, BETA2/NeuroD, and PDX- 1 is involved in impaired insulin synthesis induced by glucocorticoids in HIT- T15 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(1): 229- 235.
- [6] DUTTA S, GANNON M, PEERS B, et al. PDX: PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3):1065- 1070.
- [7] KUMAR M, JORDAN N, MELTON D, et al. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate[J]. *Dev Biol*, 2003, 259(1):109- 122.
- [8] JONSSON J, CARLSSON L, EDLUND T, et al. Insulin-promoter factor 1 is required for pancreas development in mice[J]. *Nature*, 1994, 371(6498):606- 609.
- [9] 杨川,程桦,王川,等.GLP- 1 诱导小鼠胚胎干细胞分化为胰岛素表达细胞 [J]. *中华代谢内分泌杂志*, 2004,20(3):263- 264.
- [10] MELLOUL D, TSUR A, ZANGEN D. Pancreatic Duodenal Homeobox (PDX- 1) in health and disease[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2002, 15(9):1461- 1472.
- [11] SHARMA A, ZANGEN DH, REITZ P, et al. The homeodomain protein IDX- 1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration [J]. *Diabetes*, 1999, 48(3):507- 513.
- [12] 杨川,程桦,王川,等.PDX- 1 对成肌细胞株 C2C12 分化为胰岛素分泌细胞的作用[J].*中山大学学报:医学科学版*,2005,26(4):409- 412.
- [13] CISSELL MA, ZHAO L, SUSSEL L, et al. Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by Nkx2.2[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(2):751- 756.
- [14] NARUMI O, MORI S, BOKU S, et al. OUT, a Novel Basic Helix- Loop- Helix Transcription Factor with an Id- like Inhibitory Activity[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(5): 3510- 3521.
- [15] MASSARI M E, MURRE C. Helix- Loop- Helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(2): 429- 440.
- [16] NAYA, F, HUANG H P, QIU Y, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD - deficient mice[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(18):2323- 2334.
- [17] SHARMA A, HENDERSON E, GAMER L, et al. Analysis of the role of E2A- encoded proteins in insulin gene transcription[J]. *Mol Endo*, 1997, 11(11): 1608- 1617.
- [18] 杨川,程桦,刘丹,等. GLP- 1 诱导成肌细胞株 C2C12 分化为分泌胰岛素样物质细胞[J].*中华代谢内分泌杂志*,2003,19(6):496- 497.

(编辑 张恩健)