

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00595

新型甲型 H7N9 流感病毒血凝素基因进化分析

关蔚, 李自雄, 林吉, 韩一芳, 苏彤, 殷建华, 张宏伟, 曹广文*

第二军医大学热带医学与公共卫生学系流行病学教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 2013 年 4 月流行的新型甲型 H7N9 禽流感病毒的表面蛋白血凝素(HA)基因的进化,以及氨基酸的变异情况。**方法** 从美国国家生物技术信息中心(NCBI)和全球禽流感基因共享数据库(GISAID)中下载 H7N9 流感病毒以及有代表性的 H7N2、H7N3、H7N7 亚型流感病毒的 HA 基因序列,运用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5.05 软件进行序列分析,用邻接法构建基因进化树;通过氨基酸序列分析 HA 蛋白受体结合位点、糖基化位点和裂解位点的变化。**结果** 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒与 2011 年浙江禽类 H7N3 流感病毒株(JQ906573.1)的相似性达到 95.3%~95.6%;受体结合位点氨基酸发生变异,为 Q226L,5 个糖基化位点高度保守;HA 裂解位点位于 aa339 和 aa340 之间,仅有 1 个碱性氨基酸:R。**结论** 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒 HA 基因是由中国禽类 H7 亚型进化而来,Q226L 变异导致的受体结合位点的变化可能是新型流感病毒具有人感染性的原因。

[关键词] H7N9 亚型流感病毒 A 型;血凝素类;进化;变异(遗传学)

[中图分类号] R 511.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0595-07

Phylogenetic analysis of hemagglutinin (HA) gene of the novel avian influenza virus A/H7N9

GUAN Wei, LI Zi-xiong, LIN Ji, HAN Yi-fang, SU Tong, YIN Jian-hua, ZHANG Hong-wei, CAO Guang-wen*

Department of Epidemiology, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the evolution and variations in coding amino acids of hemagglutinin (HA) gene of the novel avian influenza virus H7N9 in 2013 epidemic. **Methods** The HA gene sequences of influenza virus H7N9, H7N2, H7N3 and H7N7 subtypes were downloaded from the database of The National Center for Biotechnology Information (NCBI) and The Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID). MEGA 5.05 software was used for sequence analysis and N-J method was used for constructing the phylogenetic trees. The amino acid sequences at the receptor binding sites, glycosylation sites, and cleavage sites was aligned and analyzed. **Results** The HA genes this novel A/H7N9 virus in 2013 shared a 95.3%-95.6% similarity with JQ906573.1|Zhejiang (H7N3 virus) isolated in 2011. The most important variation in this novel H7N9 isolates was found at the receptor binding site: Q226L. The 5 glycosylation sites were highly conservative. One basic amino acid (R) at the HA cleavage sites, located between aa339 and aa340, was also found in this novel isolate. **Conclusion** The HA gene of this novel H7N9 isolate might originate from H7 subtypes carried by birds in China. The binding site change caused by Q226L variation might be responsible for human infection of this novel H7N9 isolate.

[Key words] H7N9 subtype influenza A virus; hemagglutinins; evolution; variation (genetics)

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6):595-601]

2013 年 3 月至 4 月,我国上海、安徽、浙江、江苏等地先后出现甲型 H7N9 流感病毒感染患者,且重症患者病情发展迅速,可由重症肺炎快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症、感染性休克,甚至多

器官功能障碍。迄今为止,世界范围内禽类感染甲型流感 H7 亚型中,H7N7、H7N2、H7N3 流感病毒出现过感染人的现象;而 H7N9 流感病毒仅在禽类中检测到,人类尚未有 H7N9 流感病毒感染病例出

[收稿日期] 2013-05-09 **[接受日期]** 2013-05-22

[基金项目] 上海市公共卫生重点学科建设项目(12GWZX0102). Supported by Key Construction Program of Shanghai Public Health (12GWZX0102).

[作者简介] 关蔚,硕士生. E-mail: muyuweiwei@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

现^[1]。

甲型流感病毒属正粘病毒科,基因组含有8个节段的负链RNA。病毒颗粒表面存在两种糖蛋白:血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)。目前已从甲型流感病毒的天然宿主水禽中分离到16种HA和9种NA,这两种糖蛋白决定了病毒的分型^[2]。编码HA的基因位于其RNA第4区段,是一种重要的抗原成分,刺激机体产生中和性抗体。在病毒感染人的过程中,HA蛋白能够和宿主细胞表面的受体结合,介导膜融合,使病毒侵入宿主细胞,而HA蛋白氨基酸序列上的受体结合位点则对病毒宿主范围的选择起到关键性作用。

我们通过研究新型H7N9流感病毒HA基因序列,分析新毒株的进化特征及氨基酸的变异情况,探讨新型流感病毒出现的抗原位点变化及感染人类的原因,为有效防控流感病毒、提高治愈率、降低病死率提供一定的理论依据。

1 资料和方法

1.1 资料来源

1.1.1 H7N9流感病毒基因序列的获得 截止到2013年4月22日已公布9条新型甲型H7N9流感病毒HA基因序列,包括美国国立生物技术信息中心(NCBI)^[3]中的2条和全球禽流感基因共享数据库(GISAID)^[4]中的7条;其中上海患者2例(439486、439502),安徽患者1例(439507),杭州患者2例(440095、KC853766.1),浙江患者1例(KC885956),鸡(440685)、鸽子(440701)、环境中(440693)各1例。另从NCBI下载2013年以前各地各时期的H7N9病毒序列23条。

1.1.2 其他H7亚型的HA基因序列的获得 从NCBI下载2013年之前检测到的H7亚型的甲型流感病毒HA基因序列,主要检索对象是曾经感染过人的3种H7亚型流感病毒:H7N2、H7N3、H7N7,根据发布的时间和地点,从中选择31条作为代表进行分析。

1.2 构建进化树 利用Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5.05软件进行核苷酸序列比对,采用邻接(neighbor-joining, NJ)法(bootstrap=1 000)绘制H7N9禽流感病毒HA

基因的进化树;首先对曾经出现的所有H7N9流感病毒进行进化分析,观察进化树中H7N9亚型的进化方向;然后选择新型流感病毒以及与之进化距离最近的两条H7N9亚型流感病毒,连同H7N2、H7N3、H7N7流感病毒共42条HA基因序列进行进化树分析,研究2013年新型流感病毒的进化来源。

1.3 变异分析 比对HA蛋白的氨基酸序列,分析其抗原位点、糖基化位点和裂解位点。以2013年甲型H7N9流感病毒毒株KC853766.1作为参考序列。

2 结果

2.1 不同时期甲型H7N9流感病毒HA基因的进化分析 通过对32条H7N9流感病毒HA基因序列的分析,绘制了H7N9亚型流感病毒的进化树(图1)。从该进化树可得知:H7N9亚型流感病毒HA基因的进化大致可以分为两大支:2013年流行的病毒与以往亚洲、欧洲散发的H7N9流感病毒为一大分支,另一分支为各个时期在北美散发的H7N9流感病毒。根据进化距离的结果,新型H7N9流感病毒与2008年蒙古流感病毒株(AB481212.1)进化距离最近,为0.067~0.074,其次为2002年的瑞典流感病毒株(AY999981.1),进化距离为0.078~0.086。

2.2 新型甲型H7N9禽流感病毒HA基因的进化分析 42条H7N2、H7N3、H7N7、H7N9亚型的流感病毒基因进化树结果提示,2011年浙江禽类H7N3流感病毒株(JQ906573.1)与2013年新型甲型流感病毒的进化距离最近。序列的相似性分析发现新型H7N9流感病毒HA基因之间有很高的相似性,达到99%以上,与H7N3流感病毒(JQ906573.1)的HA基因相似性为95.3%~95.6%,与2003年江西H7N7流感病毒(EU158101.1)间的相似性接近95%。见图2。

2.3 HA蛋白氨基酸序列的变异分析 通过对HA蛋白氨基酸序列的比对,发现新型H7N9流感病毒的HA基因相对于2011年浙江禽类H7N3流感病毒株(JQ906573.1)在以下氨基酸位点发生变异:aa128、aa181、aa183、aa188、aa195、aa211、aa213、aa226、aa285、aa298、aa335、aa410、aa412、aa455、aa541。其中aa128(K)、aa181(R)、aa188(V)、aa213(V)、aa285(K)、aa298(I)、aa335(I)、aa412(V)位点

的变异,在多数 H7 亚型中均存在,不纳入分析。位点变异的具体情况如表 1 所示,新型 H7N9 流感病毒中的 8 株氨基酸高度一致,而来自 1 例上海患者

的病毒其相应位点上的氨基酸与这 8 株有明显区别。

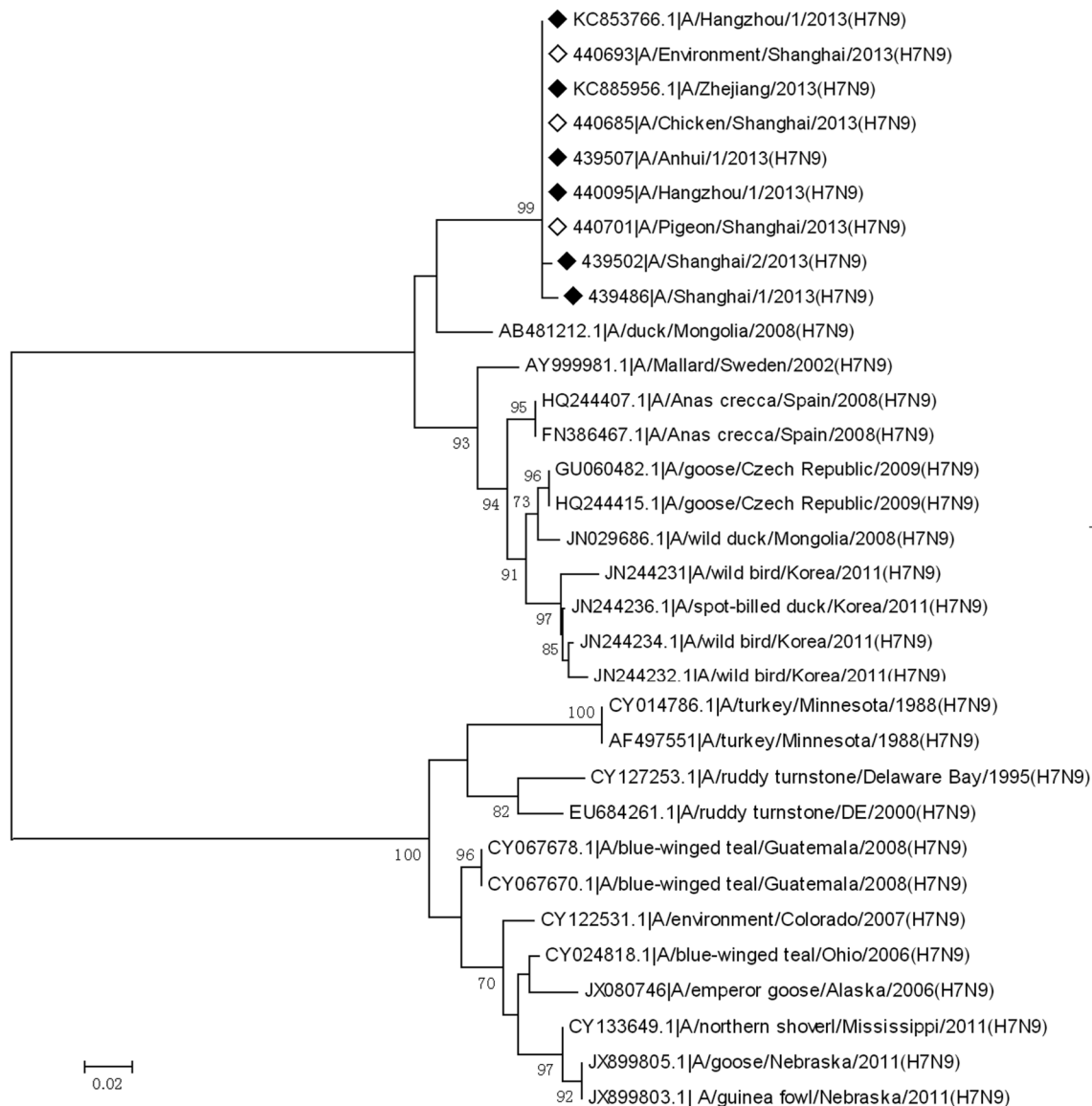


图 1 32 株不同年代 H7N9 型流感病毒 HA 基因进化树

Fig 1 Phylogenetic tree of hemagglutinin (HA) genes of 32 H7N9 strains of different years

◆: HA genes of novel human A/H7N9 in 2013; ◇: HA genes of novel avian/environmental A/H7N9 in 2013

2.4 H7 亚型 HA 蛋白糖基化位点氨基酸序列变异分析 如表 2 所示,新型流感病毒 HA 蛋白上有 5 个潜在的糖基化位点,与以往的 H7 亚型相比未发生变异和缺失。

2.5 新型甲型 H7N9 流感病毒 HA 裂解位点 相关文献表明流感病毒在氨基酸位点 aa340 位附近存在 HA 裂解位点^[5]。本研究发现 H7N9 新型流感病毒 HA 的裂解位点是 IPKGR↓G,位于氨基酸序列 aa339 和 aa340 位之间。选择与新型病毒进化距离

较近和相似性较高的流感病毒株进行比较,结果如表 3 所示(2003 年荷兰 H7N7 流感病毒 AY338459.1 具有高致病性,且裂解位点附近存在碱性氨基酸的插入,序列较为典型,因此将其纳入,一同比较分析)。

3 讨论

现有数据显示,可感染人的禽流感病毒亚型有 H5N1、H9N2、H7N7、H7N2、H7N3,高致病性禽流

感只出现在 H5 和 H7 亚型中^[6]。H5N1 曾在亚洲家禽和野生禽类中扩散,传播至欧洲,中东,非洲,并导致人的感染且死亡率极高。对于 H7 亚型,从 1979 年开始有人类感染的病例出现,欧亚谱系和北

美谱系中低致病性和高致病性病毒株均有报道^[7]。其中,2003 年荷兰爆发的高致病性 H7N7 流感病毒导致了到目前为止最大规模的 H7 亚型的人群爆发^[8]。

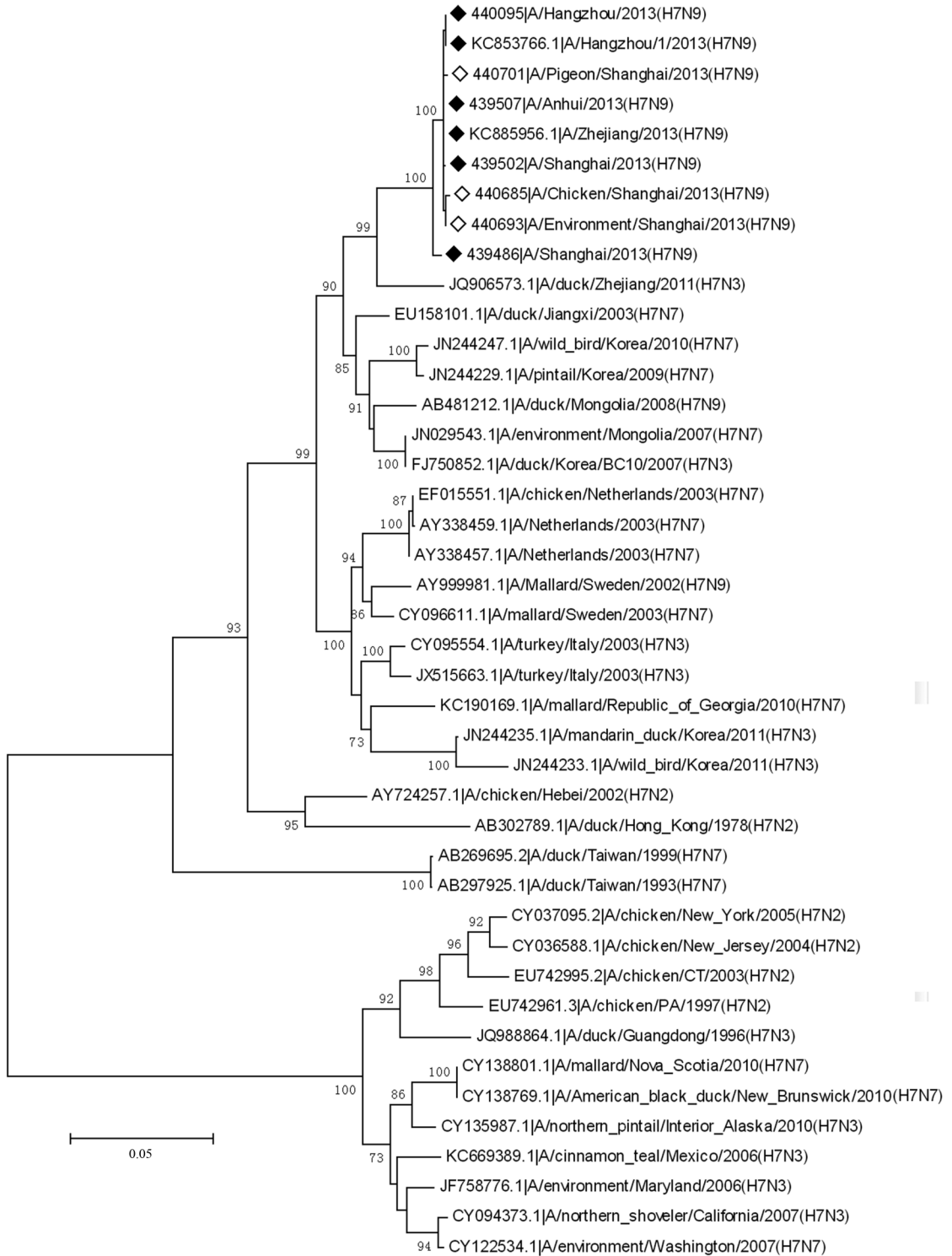


图 2 甲型 H7 亚型流感病毒 HA 基因进化树

Fig 2 Phylogenetic tree of hemagglutinin (HA) gene of different H7 subtypes of influenza virus

◆: HA genes of novel human A/H7N9 in 2013; ◇: HA genes of novel avian/environmental A/H7N9 in 2013

表 1 H7 亚型禽流感病毒 HA 蛋白氨基酸序列的变异分析

Tab 1 Amino acid substitutions of HA proteins of H7 subtype avian influenza virus

Influenza A virus	Amino acid position												
	11	102	130	183	195	198	211	226	307	321	410	455	541
New strains (2013/H7N9)													
A/human/Shanghai/1	I	S	A	N	G	A	V	Q	D	R	T	D	A
A/human/Shanghai/2	I	S	A	S	V	A	V	L	D	R	N	D	V
A/human/Anhui/1	I	S	A	S	V	A	V	L	D	R	N	D	V
A/human/Hangzhou/1	I	S	A	S	V	A	V	I	D	R	N	D	V
A/chicken/Shanghai	I	S	A	S	V	A	V	L	D	R	N	D	V
A/environment/Shanghai	I	S	A	S	V	A	V	L	D	R	N	D	V
A/pigeon/Shanghai	I	S	A	S	V	A	V	L	D	R	N	D	V
A/human/Hangzhou/2	I	S	A	S	V	A	V	I	D	R	N	D	V
A/human/Zhejiang	I	S	A	S	V	A	V	L	D	R	N	D	V
H7 subtypes (China)													
A/duck/Guangdong/1996(H7N3)	C	T	S	K	G	N	I	Q	N	T	S	N	A
A/duck/Zhejiang/2011(H7N3)	I	S	A	D	G	A	I	Q	D	R	T	N	A
A/duck/Jiangxi/2003(H7N7)	E	S	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/chicken/Hebei/2002(H7N2)	V	N	I	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/duck/Hong_Kong/1978(H7N2)	V	N	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/duck/Taiwan/1993(H7N7)	V	N	T	E	G	T	I	Q	N	G	T	N	A
A/duck/Taiwan/1999(H7N7)	V	S	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
H7 subtypes (other districts)													
A/Netherlands/2003(H7N7)	V	S	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/bird/Korea/A72/2010(H7N7)	V	S	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/pintail/Korea/2009(H7N7)	V	S	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/duck/Korea/2007(H7N3)	I	R	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/duck/Korea/468/2011(H7N3)	V	S	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/environment/Mongolia/2007(H7N7)	I	R	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A
A/duck/Mongolia/2008(H7N9)	V	S	T	D	G	T	I	Q	N	E	T	N	A

I: Isoleucine; S: Serine; A: Alanine; N: Asparagine; G: Glycine; V: Valine; Q: Glutamine; L: Leucine; D: Aspartic acid; R: Arginine; T: Threonine; C: Cysteine; K: Lysine; E: Glutamic acid

表 2 H7 亚型禽流感病毒 HA 蛋白糖基化位点氨基酸序列的变化

Tab 2 Glycosylation site variations of HA proteins of H7 subtype avian influenza virus

Influenza A virus	Amino acid position				
	30	46	249	421	493
New strain 2013(H7N9)	N-G-T	N-A-T	N-D-T	N-W-T	N-N-T
Avian strains 1978-2005(H7N2)	N-G-T	N-A-T	N-D-T	N-W-T	N-N-T
Avian strains 1996-2011(H7N3)	N-G-T	N-A-T	N-D-T	N-W-T	N-N-T
Avian strains 1993-2010(H7N7)	N-G-T	N-A-T	N-D-T	N-W-T	N-N-T
Avian strains 1988-2011(H7N9)	N-G-T	N-A-T	N-D-T	N-W-T	N-N-T

N: Asparagine; G: Glycine; T: Threonine; A: Alanine; D: Aspartic acid; L: Leucine

表 3 H7 亚型禽流感病毒 HA 蛋白裂解位点附近氨基酸分布情况

Tab 3 Amino acid distribution around cleavage site of HA proteins of H7 subtype avian influenza virus

Influenza A virus	New strain H7N9	AB481212.1 H7N9	JQ906573.1 H7N3	EU158101.1 H7N7	AY338459.1 H7N7
Cleavage site	IPKGR ↓ GL	IPKGR ↓ GL	TPKGR ↓ GL	IPKGR ↓ GL	IPKRRRR ↓ GL

↓: The cleavage site; I: Isoleucine; P: Proline; K: Lysine; G: Glycine; R: Arginine; L: Leucine; T: Threonine

本研究发现,2013年3月至4月在中国境内流行的H7N9流感病毒属于新型流感病毒,不同于以往检测到的任何H7N9亚型的流感病毒。目前(截至2013年4月22日)测序成功的9例毒株HA基因之间具有很高的相似性,达到99%,说明这些毒株来源一致,新型H7N9病毒到目前为止变异较小。HA基因同源性分析显示,2013年爆发流行的H7N9亚型禽流感病毒的HA基因同2011年浙江鸭子携带的H7N3亚型的HA基因具有高度相似性,可认为具有同源性;与2003年江西鸭子携带的H7N7亚型的HA基因也具有高度相似性表明2013年新型甲型流感病毒HA基因的来源是中国禽类携带的H7亚型流感病毒^[9]。

HA基因编码的HA蛋白能够和宿主细胞表面含有唾液酸的寡糖结合,介导病毒侵入和膜融合。对所有检测到的H7亚型流感病毒的HA蛋白氨基酸序列分析发现,2013年流感病毒发生较一致的变异:V11I、T130A、D183S、I188V、G195V、T198A、I211V、Q226L、N307D、E321R、T410N、M427I、N455D、A541V。其中Q226L变异首次在H7N9流感病毒中发现,这种变异使得新型病毒与高致病性H5禽流感一样,更容易与人 α -2,6-唾液酸受体结合,导致感染概率大大增加^[1,5]。在对2003年荷兰发生的高致病性H7N7流感病毒的研究中发现,HA蛋白的受体结合位点在HA蛋白的末端,共有3个区域,分别在氨基酸的第120-环、180-螺旋和210-环^[7]。新型H7N9氨基酸位点的变异,可能导致HA蛋白对唾液酸和邻半乳糖的特异性发生改变,从而影响病毒限制性感染宿主的范围,相对于以往的H7N9流感病毒,更容易感染人类。从氨基酸的变异分析中我们还发现来自上海1例患者的H7N9流感病毒与其他新型H7N9流感病毒的变异情况存在不同,前者未发生Q226L变异,推测新型流感病毒株可能存在两种或两株以上^[1]。

有研究结果显示,新型H7N9流感病毒HA蛋白在第150-环氨基酸位点附近存在糖基化位点缺失,造成病毒与 α -2,3禽样受体的结合能力下降^[1],而本研究未发现H7亚型流感病毒HA蛋白可能的糖基化位点发生变异,糖基化位点高度保守。

H5和H7亚型中也存在低致病性流感病毒^[6]。有研究认为,高致病性禽流感病毒的出现,是由于低

致病性禽流感在HA裂解位点周围发生了氨基酸插入/变异^[10-12]。HA裂解位点的氨基酸序列是禽流感致病力的分子基础,直接影响病毒致病力的高低,HA在宿主细胞表面的特异性蛋白酶作用下越易裂解,则越易感染宿主细胞,高致病力毒株的HA在其裂解位点附近通常具有多个碱性氨基酸,而低致病力毒株的HA在其裂解位点只有1个精氨酸(R)^[7,13]。2003年荷兰H7N7流感病毒(A/Y338459.1)裂解位点附近,含有5个碱性氨基酸KRRRR,具有很高的宿主细胞感染能力,从HA功能层面解释了该病毒株高致病性的原因。而2013年新型H7N9流感病毒HA裂解位点仅有R碱性氨基酸,提示新型H7N9流感病毒为低致病性毒株,所以目前新型H7N9流感病毒无人传染人和禽类中快速蔓延的现象出现。因而,我们可以将能够裂解HA的酶作为治疗靶点,达到预防和治疗的目的^[14]。从HA的作用机制来说,对裂解位点及相关酶的研究非常重要。

综上,2013年新型甲型H7N9流感病毒HA基因是由中国禽类H7亚型进化而来,氨基酸位点变异导致的病毒受体结合位点的变化可能是新型流感病毒具有人感染性的原因,影响着宿主范围的变化。HA蛋白对病毒的感染有着重要作用,对HA裂解位点的研究,联合NA抑制剂,可为新型流感的预防和治疗提供新的思路。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1888-1897.
- [2] 朱闻斐,高荣保,王大燕,杨磊,朱云,舒跃龙. H7亚型禽流感病毒概述[J]. *病毒学报*, 2013, 29: 245-249.
- [3] National Center for Biotechnology Information, Influenza Virus Database[DB/OL]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=1>.
- [4] The Global Initiative on Sharing All Influenza Data

- (GISAID) [DB/OL]. <http://platform.gisaid.org/epi3>.
- [5] Liu Q, Lu L, Sun Z, Chen G W, Wen Y, Jiang S. Genomic signature and protein sequence analysis of a novel influenza A (H7N9) virus that causes an outbreak in humans in China [J]. *Microbes Infect*, 2013, pii: S1286-4579(13)00085-3. [Epub ahead of print]
- [6] Alexander D J. An overview of the epidemiology of avian influenza [J]. *Vaccine*, 2007, 25: 5637-5644.
- [7] Yang H, Carney P J, Donis R O, Stevens J. Structure and receptor complexes of the hemagglutinin from a highly pathogenic H7N7 influenza virus [J]. *J Virol*, 2012, 86: 8645-8652.
- [8] Fouchier R A, Schneeberger P M, Rozendaal F W, Broekman J M, Kemink S A, Munster V, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 1356-1361.
- [9] Liu D, Shi W, Shi Y, Wang D, Xiao H, Li W, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses [J]. *Lancet*, 2013, 381: 1926-1932.
- [10] Hamilton B S, Sun X, Chung C, Whittaker G R. Acquisition of a novel eleven amino acid insertion directly N-terminal to a tetrabasic cleavage site confers intracellular cleavage of an H7N7 influenza virus hemagglutinin [J]. *Virology*, 2012, 434: 88-95.
- [11] Hamilton B S, Whittaker G R. Cleavage activation of the human-adapted influenza virus subtypes by kallikrein-related peptidases 5 and 12 [J]. *J Biol Chem*, 2013. Epub ahead of print.
- [12] Dong J, Sakurai A, Nomura N, Park E Y, Shibasaki F, Ueda H. Isolation of recombinant phage antibodies targeting the hemagglutinin cleavage site of highly pathogenic avian influenza virus [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e61158.
- [13] 张素霞, 王昕, 陈雪峰, 王侃, 曹槐, 张闻, 等. H5N1亚型禽流感病毒血凝素裂解位点碱性氨基酸对应 mRNA 核苷酸的二级结构分析 [J]. *科学通报*, 2008, 53: 203-209.
- [14] Böttcher-Friebertshäuser E, Lu Y, Meyer D, Sielaff F, Steinmetzer T, Klenk HD, et al. Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections [J]. *Vaccine*, 2012, 30: 7374-7380.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩

· 读者 · 作者 · 编者 ·

转化、转导、转染和感染的用法

转化(transformation)、转导(transduction)、转染(transfection)和感染(infection)是分子生物学实验中将外源基因导入受体细胞的4种技术,它们词形相近,概念上容易混淆。“转化”是指含外源基因的重组质粒(载体)将外源基因直接导入原核细胞(如细菌);“转导”指通过重组病毒载体将外源基因导入真核细胞或原核细胞;“转染”指重组质粒载体或游离核苷酸在脂质体等介导下进入真核细胞;“感染”在基因转移实验中强调重组病毒载体入侵受体细胞的过程。在使用这4个名词时,应仔细分析基因转移实验的四要素——转移物、载体、介导方法、受体细胞类型,而正确区分载体和受体细胞类型是辨析的关键点。当载体是重组质粒时,如受体细胞是原核细胞应使用“转化”,如受体细胞是真核细胞则使用“转染”;当载体是重组病毒时,如强调转移物进入受体细胞应使用“转导”,如强调重组病毒载体进入受体细胞的过程则使用“感染”。