

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2020.04.003

· 基础研究 ·

mTORC1 信号通路在张应力下对小鼠骨髓间充质细胞成骨分化的作用

彭海艳, 蒋校文, 黄华庆, 陈金勇

南方医科大学附属郴州市第一人民医院口腔科 南华大学转化医学研究所, 湖南 郴州(423000)

【摘要】 目的 探讨哺乳动物雷帕霉素复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)信号通路在周期性单轴牵张力作用下对小鼠骨髓间充质细胞(bone marrow mesenchymal cells, BMMSCs)的成骨分化的作用。方法 对体外分离培养的小鼠BMMSCs施加形变量10%的单轴动态牵张力,在牵张后0、1、2、4、8 h利用western blot检测内源性mTORC1信号通路主要分子mTOR、Raptor、核糖体蛋白S6激酶(ribosomal protein S6 kinases, S6K)的表达变化,并利用化学比色法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性变化,ELISA法检测骨钙素(osteocalcin, OCN)表达量,RT-PCR法检测Runt相关转录因子(Runt-related transcription factor 2, Runx2)的mRNA表达变化。将BMMSCs分为抑制组、激活组及对照组,分别加入工具药PP242、MHY1485及PBS,加力2 h后用上述方法检测S6K与成骨信号相关因子的活性或表达变化。结果 Western blot结果显示,mTORC1信号通路主要分子在牵张力作用后的8 h内均有表达,并在加力后2 h表达最高。与对照组相比,抑制mTORC1信号通路表达后,ALP活性、OCN表达下降,Runx2的mRNA水平上升,差异均具有统计学意义($P < 0.001$);激活mTORC1信号通路表达后,ALP活性、OCN表达上升,而Runx2 mRNA水平下降,差异均具有统计学意义($P < 0.001$)。结论 mTORC1信号通路参与了牵张力下小鼠BMMSCs成骨分化过程,激活该信号通路可以促进其成骨分化。

【关键词】 骨髓间充质细胞; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体1; 周期性单轴牵张力; 牵张成骨; 碱性磷酸酶; 骨钙素; Runt相关转录因子; 核糖体蛋白S6激酶

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2020)04-0219-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 彭海艳,蒋校文,黄华庆,等. mTORC1信号通路在张应力下对小鼠骨髓间充质细胞成骨分化的作用[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28(4): 219-223.

The role of the mTORC1 signaling pathway during osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal cells under tension stress PENG Haiyan, JIANG Xiaowen, HUANG Huaqing, CHEN Jinyong. Department of Stomatology, The First People's Hospital of Chenzhou City, The South Medical University & Institute of Translation Medicine, University of China South, Chenzhou 423000, China

Corresponding author: JIANG Xiaowen, Email: jxw0927@163.com, Tel: 86-735-2343899

【Abstract】 Objective To investigate the expression of the mTORC1 signaling pathway during the osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal cells (BMMSCs) under cyclic uniaxial tension and explore its possible role. **Methods** The BMMSCs of mice were affected by uniaxial dynamic tensile force. Western blot was used to detect the expression changes of major molecules (mTOR, Raptor, S6K) in the endogenous mTORC1 signaling pathway at 0, 1, 2, 4, and 8 hours after stretching. Chemical colorimetry, ELISA and PCR were used to detect alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) and Runx2 mRNA, respectively. Then, inhibition, activation and control groups were established by administration of the drugs PP242, MHY1485 and PBS, respectively. Two hours after the stress, the expression of S6K was detected by western blot, and the expression of the osteogenic signal was continuously detected by the

【收稿日期】 2019-06-24; **【修回日期】** 2019-8-25

【基金项目】 国家自然科学基金(81301651);湖南省自然科学基金(2018JJ2015);郴州市第一人民医院重点项目(N2019-003)

【作者简介】 彭海艳, 硕士, 副主任医师, Email: 359227119@qq.com

【通信作者】 蒋校文, 博士, 主任医师, Email: jxw0927@163.com, Tel: 86-735-2343899

above methods. **Results** Western blot analysis showed that the main molecules of the mTORC1 signaling pathway were all expressed within 8 hours after traction, and the highest expression was 2 hours after the stress. Compared with those in the control group, the ALP activity and OCN expression decreased and the Runx2 mRNA levels increased after the mTORC1 signal pathway was inhibited ($P < 0.001$); ALP activity and OCN expression increased after the mTORC1 signal pathway was activated, while the Runx2 mRNA levels decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** The mTORC1 signaling pathway participates in the osteogenic differentiation of mouse BMMSCs under tension. The osteogenesis of BMMSCs under cyclic uniaxial tension would be enhanced if the mTORC1 signaling pathway was activated.

[Key words] bone marrow mesenchymal cells; mammalian rapamycin target protein complex 1; cyclic uniaxial tension; distraction osteogenesis; alkaline phosphatase; osteocalcin; Runt related transcription factors; ribosomal protein S6 kinase

J Prev Treat Stomatol Dis, 2020, 28(4): 219-223.

牵张成骨是口腔颌面及整形外科畸形缺损的重要整复手段,具有同时延长软、硬组织等其它整复手段不能比拟的优势,但治疗时间长、并发症较多等一直是限制其广泛临床应用的瓶颈^[1-2]。探讨对牵张力最敏感的应答细胞和新骨生成的主要细胞—骨髓间充质细胞(bone marrow mesenchymal cells, BMMSCs)在牵张成骨过程中的具体机制对于丰富牵张成骨的分子机制及研究治疗靶点具有重要意义。多单元细胞拉伸装置能够对细胞施加周期性的牵张力,并具有易控制、易重复的特点,是体外研究牵张力对细胞影响的较好模型^[3-4]。

近年来研究发现雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin, mTOR)信号通路在骨发育及病理生理中具有重要的作用^[5,6]。其中研究较多的哺乳动物雷帕霉素复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)信号通路主要由mTOR、mTOR相关调节蛋白(Raptor)和mTOR必须蛋白亚基带SEC13哺乳动物致死蛋白8(mammalian lethal SEC13 protein 8, mLST8)组成,能接受激素、生长因子、营养及能量、应激等刺激,并对大环内酯药物雷帕霉素(rapamycin)敏感^[7],但其在牵张成骨方面的研究较少。本实验以多单元细胞拉伸装置为平台对小鼠BMMSCs施加周期性单轴牵张力后观察内源性mTORC1信号通路的表达变化规律,同时通过工具药改变内源性mTORC1信号通路的表达来探讨该通路对张应力下BMMSCs成骨的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验动物为1月龄雄性小鼠(SYXK <湘> 2010-0006,南华大学动物实验中心),本研究获得

郴州市第一人民医院伦理委员会批准(N2015094562)。多单元细胞拉伸装置(四川大学);分光光度仪(罗氏,瑞士)。Percoll分离液(Pharmacia,美国);LG-DMEM培养基(Gibico,美国);I型鼠尾胶(ABI,美国);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo,美国);ALP试剂盒(建成,中国);OCN试剂盒(BIM,美国);mTOR一抗(Abcam,英国);p-mTOR一抗(Abcam,英国);GAPDH一抗(Santa-Cruz,美国);Raptor一抗(Cell Signaling,美国);p-Raptor一抗(Cell Signaling,美国);S6K一抗(Cell Signaling,美国);p-S6K一抗(Cell Signaling,美国);Trizol试剂盒(Gibico,美国);PP242(Cayman,美国);MHY1485(MedChemExpress,美国)。

1.2 小鼠BMMSCs的分离和培养

无菌条件下分离1月龄雄性小鼠双侧股骨和胫骨,剪开干骺端用培养基冲出骨髓,离心弃去脂肪层后吹打制成细胞悬液,加入Percoll分离液后离心吸取界面细胞层,用含5%胎牛血清的PBS溶液洗涤细胞3次后弃上清,加入10%胎牛血清的LG-DMEM培养基吹成细胞悬液接种于培养瓶内,培养2d后更换培养基,倒置显微镜下观察当细胞融合达70%~80%时用0.25%的胰蛋白酶消化细胞传代,选用第3代细胞计数后进行下一步实验,每个检测指标收集8个样本行检测。

1.3 细胞加力及分组

将高温高压灭菌后均匀涂布1.5 mL(0.012 μg/mL) I型鼠尾胶的硅胶膜组装到细胞培养单元上,同时在硅胶膜上放置硅胶膜矩形环(40 × 30 mm)以控制细胞接种范围,将2 mL密度为 2×10^4 个/mL的细胞悬液接种于硅胶膜上后在37℃体积分数5% CO₂培养箱培养24 h后取出硅胶膜矩形环,补加含10%胎牛血清的DMEM培养基10 mL培养

24 h, 更换无血清培养基同步化 12 h 后利用多单元细胞拉伸装置(四川大学)施加 10% 形变量的单轴动态牵张力 2 h (频率为 0.2 Hz)。装置见图 1。



6 stretching units and stretching devices placing in a cell incubator

Figure 1 The photo of the multi-unit cell stretching device

图 1 多单元细胞拉伸装置实物图

在同步化阶段及加力阶段加力单元中, 设立 mTORC1 信号通路抑制组(加入 PP242 100 nM)、对照组(加入等体积 PBS)和 mTORC1 信号通路激活组(加入 MHY1485 10 μ M), 加力结束后 2 h 收集培养液及细胞进行下一步研究。

1.4 mTORC1 信号通路及成骨信号的检测

1.4.1 化学比色法检测细胞碱性磷酸酶(alkaline-phosphate, ALP)活性^[4] 将硅胶膜上的单纯加力五组细胞分别 PBS 洗涤、胰酶消化, 与 3 ml 带血清培养基混匀, 离心弃上清, 再加入 2 ml PBS 经过混匀离心弃上清, 最后加入 90 μ l PBS 液收集细胞。将细胞反复冻融 3 次, 离心后收集上清液 50 μ l 加入试剂盒中基质液和缓冲液各 500 μ l, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 后加入显色剂 1.5 ml 混匀后, 利用分光光度仪检测其 405 nm 波长下吸光度值, 根据公式 $[y = 2000(\Delta_{\lambda} - \Delta_{\text{空白}})/18.5]$ 计算出 ALP 活性, 结果以 U/ml 表示。

1.4.2 ELISA 法测定骨钙素(osteocalcin, OCN)含量^[4] 使用标准品 450 nm 波长下测量后计算出标准曲线的直线回归方程。将单纯加力五组细胞培养皿内培养液 1 ml 离心后收集上清作为待测标本, 在酶标包被板中入待测样本 10 μ l, 再加样本稀释液 40 μ l 混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 弃液洗板五次后甩干, 加入酶标工作液 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min 后弃液洗板五次甩干后再加入显色剂 50 μ l 混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min 后加终止液 50 μ l 终止反应后检测其 450 nm 波长下比值, 通过方程^[1] ($y = 3.654x + 1.029$) 计算出培养液内 OCN 相对浓度。

1.4.3 Western blot 测定 mTORC1 信号通路主要分子(mTOR、Raptor 以及 S6K)表达 将硅胶膜上的单纯加力五组细胞裂解后得到总蛋白, 以牛血清为标准品, 利用 BCA 蛋白定量试剂盒建立标准曲线, 计算总蛋白浓度, 取总蛋白 20 μ g 行 SDS-PAGE 电泳, 转 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭后分别一抗工作液孵育过夜后二抗工作液 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 置于自动成像仪暗匣中加显影液, 计算机扫描收集图像, 检测 mTOR、p-mTOR、Raptor、p-Raptor、S6K 及 p-S6K 蛋白表达水平, GAPDH 作为内参。

1.4.4 Real-time PCR 测定 Runx2 mRNA 水平 将硅胶膜上的单纯加力五组细胞按 Trizol 试剂盒流程提取细胞中总 RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 进一步对总 RNA 行过柱纯化。RT-PCR 测定 Runt 相关转录因子 2(Runt-related Transcription Factor 2, Runx2) mRNA (5' 端引物为: 5'-CCCAGC-CACCTTTACCTACA-3', 3' 端引物为: 5'-TATG-GAGTGCTGCTGGTCTG-3'), 以 GAPDH 为内参(5' 端引物为: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 3' 端引物为: 5'-GGGTCGTTGATGGCAACA-3')。采用反转录试剂盒在 BioRad 1000 TM 上反转录成 cDNA。再以第一链 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green I 染料进行实时荧光定量 RT-PCR 反应。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 后结束扩增反应, 取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并在凝胶成像系统上观察电泳结果。

1.5 统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析使用 SPSS13.0 软件。组间比较使用采用单因素方差分析检验, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 单纯细胞加力后内源性 mTORC1 信号通路及成骨信号的检测

2.1.1 牵张后细胞 mTORC1 信号通路激活 Western blot 结果显示, 牵张结束后 0~8 h 后细胞均表达 mTOR、Raptor、S6K 信号, 通过对磷酸化上述因子的检测发现, 细胞中的 p-mTOR、p-Raptor 与 p-S6 在牵张结束后表达逐渐上升(0~2 h), 在 2 h 时表达最高值。2 h 后, 上述蛋白表达逐渐下降。见图 2。

2.1.2 成骨信号表达变化趋势与 mTORC1 信号通路一致 细胞牵张结束后 0~8 h 后, 化学比色法

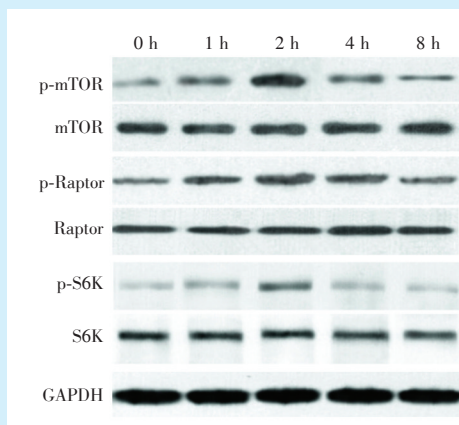


Figure 2 The expression of the major signal molecule protein of mTORC1 signal pathway of BMMSCs at 0-8 hours after the application of 10% uniaxial dynamic tensile force for 2 hours

图2 施加形变量10%单轴动态牵张力作用2 h后0-8 h mTORC1主要信号分子蛋白表达情况

检测结果显示,ALP的活性在0~2 h逐渐升高,2 h时达到最高值,2~8 h呈下降趋势。ELISA法检测OCN含量以及Real-time PCR检测Runx2 mRNA水平的结果显示,OCN、Runx2趋势与ALP一致,均出现先上升后下降趋势。见表1、图3。

2.2 内源性mTORC1信号通路变化后细胞成骨信号的改变

2.2.1 mTORC1信号通路被抑制或激活

由western blot结果可见,牵张应力作用结束2 h后,与对照组相比,mTORC1通路抑制组的p-S6K表达下降,而增强组p-S6K表达上升,说明抑制组内源性mTOR信号被抑制,增强组内源性mTOR信号被增强(图4)。

2.2.2 抑制或增强mTORC1通路可调节细胞成骨信号的表达

化学比色法检测结果显示,与对照组相比,mTORC1抑制组的ALP的活性降低($P < 0.001$),而增强组ALP活性升高($P < 0.001$);ELISA法检测OCN相对含量,与对照组相比,抑制组的相

表1 施加形变量10%单轴动态牵张力作用2 h后0~8 h BMMSCs成骨信号结果

Table 1 The osteogenic signal data results of BMMSCs after the application of 10% uniaxial dynamic tensile force for 2 hours from 0 to 8 h

	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	F	P
ALP (U/ml)	22.725 ± 4.549	68.961 ± 7.866	150.521 ± 10.500	99.083 ± 8.229	48.609 ± 6.868	315.379	< 0.001
OCN (U)	0.152 ± 0.035	0.331 ± 0.047	1.449 ± 0.333	0.825 ± 0.073	0.520 ± 0.088	81.408	< 0.001
Runx2 (E)*	0.575 ± 0.081	0.665 ± 0.072	1.369 ± 0.215	1.231 ± 0.186	1.091 ± 0.150	42.588	< 0.001

* $P = 0.247$ between 0 h and 2 h; $P = 0.077$ between 2 h and 4 h; $P = 0.073$ between 4 h and 8 h

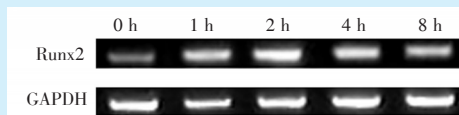


Figure 3 The PCR electrophoresis results of BMMSCs after the application of 10% uniaxial dynamic tensile force for 2 h from 0 to 8 h

图3 施加形变量10%单轴动态牵张力作用2 h后0至8 h BMMSCs Runx2 PCR电泳结果

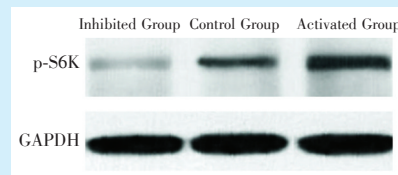


Figure 4 The expression of p-S6K protein among three BMMSCs groups 2 h after the application of uniaxial dynamic tensile force

图4 3组BMMSCs加力结束后2 h p-S6K蛋白表达情况

对含量下降($P < 0.001$),增强组则升高($P < 0.001$);同样地,Real-time PCR检测Runx2 mRNA水平的结果显示,抑制组的水平下降($P < 0.001$),增强组水平升高($P < 0.001$)。见表2。

3 讨论

mTOR是一种保守的丝/苏氨酸蛋白质激酶,在细胞多种生理活动的调控中处于核心地位,使

表2 3组BMMSCs加力结束后2 h成骨信号表达情况

Table 2 The expression of osteogenic signal at 2 hours after the end of BMMSCs in three groups

Groups	ALP(U/ml)	OCN(U)	Runx2(E)
Inhibited group	113.060 ± 26.102	0.939 ± 0.154	0.875 ± 0.172
Control group	150.170 ± 21.199	1.329 ± 0.291	1.431 ± 0.262
Activated group	186.356 ± 29.144	1.950 ± 0.314	1.950 ± 0.314
F	16.280	30.314	35.376
P	<0.001	<0.001	<0.001

得 mTOR 信号通路成为近年基础与临床研究的热点^[7-8]。mTOR 需要在细胞内与其它分子形成复合物而保持生物学活性,目前发现主要有两种复合物:mTORC1 和 mTORC2。其中研究较多的是 mTORC1 由 mTOR、Raptor 和 mLST8,该信号通路蛋白能接受激素、生长因子、应激等刺激,并对 rapamycin 敏感^[7]。S6K 和真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 是 mTORC1 的主要效应分子。近年来发现 mTORC1 信号通路在成骨过程中起着重要的作用。研究发现发现 mTORC1/Raptor 是早期成骨分化所必需的因子^[9],并通过促进 Runx2 表达来诱导成骨发育^[10]。但在大鼠骨折模型及小鼠转基因动物模型发现抑制 mTOR 信号却能够促进成骨^[11-14]。

本研究发现在形变量为 10% 的单轴周期牵张力下 mTORC1 信号通路的主要信号分子(mTOR、Raptor、S6K)在加力后 8 h 内均能被检测,并且发现具有活性的磷酸化分子的表达有动态表达,均在 2 h 达到峰值后逐渐下降,这与检测到成骨指标(ALP、OCN 和 Runx2)具有相似的表达变化。Zeng 等^[15]发现周期性张应力能够通过激活 mTOR/S6k 信号通路促进人成骨样细胞的能量代谢。另外,有研究使用大鼠下颌骨牵张模型发现,p-mTOR 阳性表达升高;对体外培养下颌骨来源 BMMSCs 使用 Flexcell 加力(6%)模拟牵张成骨发现 mTOR、Raptor、p70S6k 等基因水平明显升高。这与本研究结果相似,说明 mTORC1 信号通路参与了细胞张应力下成骨过程中。为了进一步研究其在该过程中的作用,本研究利用 MHY1485(细胞渗透性 mTOR 激动剂)和 PP242(通过阻断细胞中负反馈、激活 AKT 途径来抑制 mTORC1 和 mTORC2 的新型抑制剂)改变内源性 mTORC1 信号表达强度,通过对 mTORC1 信号下游主要效应分子 S6K 表达发现工具药能够增强或抑制内源性 mTORC1 信号的表达。随后发现 mTORC1 信号被抑制后成骨信号也明显减弱,而激活该信号后成骨活性明显增强,提示 mTORC1 信号通路在张应力下细胞成骨的过程中处于核心地位。下一步通过对 mTORC1 信号通路在细胞张应力下成骨中的具体分子机制的研究不仅能够完善牵张成骨的机制,也有望成为治疗牵张成骨的靶点之一。

参考文献

[1] Hvid I, Horn J, Huhnstock S, et al. The biology of bone lengthening[J]. *J Child Orthop*, 2016, 10(6): 487-492.

- [2] Zhang RS, Lin LO, Hoppe IC, et al. Risk factors for perioperative respiratory failure following mandibular distraction osteogenesis for micrognathia: a retrospective cohort study[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2019, 143(6): 1725-1736.
- [3] 杨孝勤,张莉,陈军,等.模拟牵张成骨多单元细胞拉伸装置的研制与应用评价[J].*广东牙病防治*, 2015, 23(1): 6-11.
Yang XQ, Zhang L, Chen J, et al. Development and application evaluation of a multi cell stretch device for simulating distraction osteogenesis[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2015, 23(1): 6-11.
- [4] 陈金勇,蒋校文,杨孝勤,等.小鼠骨髓间充质细胞在牵张力作用下骨膜蛋白的表达及作用[J].*北京口腔医学*, 2018, 26(5): 260-264.
Chen JY, Jiang XW, Yang XQ, et al. Expression and function of periosteal protein in mouse bone marrow mesenchymal cells under tension[J]. *Beijing Journal of Stomatology*, 2018, 26(5): 260-264.
- [5] Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, et al. Molecular neurobiology of mTOR[J]. *Neuroscience*, 2017, 341: 112-153.
- [6] Dai Q, Xu Z, Ma X, et al. mTOR/Raptor signaling is critical for skeletogenesis in mice through the regulation of Runx2 expression[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(11): 1886-1899.
- [7] Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 72-82.
- [8] Rabanal-Ruiz Y, Otten EG, Korolchuk VI. mTORC1 as the main gateway to autophagy[J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 565-584.
- [9] Kumar V, Evans LC, Kurth T, et al. Therapeutic suppression of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling prevents and reverses salt-induced hypertension and kidney injury in dahl salt-sensitive rats[J]. *Hypertension*, 2019, 73(3): 630-639.
- [10] Chen J, Tu X, Esen E, et al. WNT7B promotes bone formation in part through mTORC1[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004145.
- [11] Karner CM, Lee SY, Long F. BMP induces osteoblast differentiation through both Smad4 and mTORC1 signaling[J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(4): e00253-16.
- [12] Chen J, Long F. mTORC1 signaling promotes osteoblast differentiation from preosteoblasts[J]. *PLoS One* 2015; 10(6): e0130627.
- [13] Yin ZY, Yin J, Huo YF, et al. Rapamycin facilitates fracture healing through inducing cell autophagy and suppressing cell apoptosis in bone tissues[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(21): 4989-4998.
- [14] Wu J, Wang A, Wang X, et al. Rapamycin improves bone mass in high-turnover osteoporosis with iron accumulation through positive effects on osteogenesis and angiogenesis[J]. *Bone*, 2019, 121: 16-28.
- [15] Zeng Z, Jing D, Zhang X, et al. Cyclic mechanical stretch promotes energy metabolism in osteoblast-like cells through an mTOR signaling-associated mechanism[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(4): 947-956.

(编辑 周春华,曾曙光)



官网



公众号