

· 论 著 ·

## Sox2 上调 EGFR 并促进胶质瘤干细胞的自我复制机制的实验研究\*

陶虹<sup>1</sup>, 宿延煌<sup>1</sup>, 余强<sup>1</sup>, 贾海涛<sup>3</sup>, 扈启宽<sup>2△</sup>

(1. 宁夏医科大学基础医学院生理学系, 银川 750004; 2. 宁夏颅脑疾病重点实验室, 银川 750004; 3. 甘肃省兰州市中国人民解放军第一医院麻醉手术科 730030)

**摘要:**目的 观察性别决定区 Y 框蛋白 2(Sox2)对表皮生长因子受体(EGFR)的调控及 Sox2 对胶质瘤细胞成球率的影响。**方法** 构建表皮生长因子同源受体 ErbB2、ErbB3、ErbB4 启动子报告质粒,并用双报告基因检测分析方法检测 Sox2 对 ErbB2、ErbB3、ErbB4 表达的调控;Sox2 表达质粒转染胶质瘤 U251 细胞,采用悬浮成球的方法培养 U251 细胞并计数成球率,观察 U251 细胞的自我复制;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 EGFR 和 ErbB2 蛋白的表达情况。**结果** Sox2 可以增加悬浮培养 U251 细胞的成球率( $P < 0.05$ );上调 ErbB2、ErbB3、ErbB4 启动子介导的荧光素酶蛋白表达活性,且表现出剂量依赖性。此外,Sox2 可以提高 EGFR 和 ErbB2 受体的表达。**结论** Sox2 可以上调 EGFR 受体并促进胶质瘤干细胞的自我复制。**关键词:**性别决定区 Y 框蛋白 2;胶质瘤干细胞;受体,表皮生长因子;DNA 复制

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.34.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)34-4105-03

## Experimental study on mechanism of Sox2 upregulate EGFR and promote selfrenew of glioma stem cell\*

Tao Hong<sup>1</sup>, Su Yanhuang<sup>1</sup>, Yu Qiang<sup>1</sup>, Jia Haitao<sup>3</sup>, Fu Qikuan<sup>2△</sup>

(1. Physiology Department of Basic Medicine College, Ningxia Medical University, Yingchuan, Ningxia 750004, China;

2. Department of anesthesiology, the First Hospital of People's Liberation Army in Lanzhou, Lanzhou, Gansu 730030, China)

**Abstract: Objective** To observe the regulation of sry-related high-mobility-group box-containing 2 (Sox2) on epidermal growth factor receptor(EGFR)and on the sphere formation rate of glioma stem cells. **Methods** Promoter reporter plasmids of epidermal growth factor homologous receptor ErbB2, ErbB3, ErbB4 were respectively constructed. Sox2 expression plasmid was co-transfected together with the reporter plasmid into U251 cells. Then the luciferase activity was analyzed by dual-luciferase reporter assay system to test the regulation of Sox2 on ErbB2, ErbB3, ErbB4 promoters. Sphere formation assay was used to observe selfrenew of the cancer stem cells after transfection of Sox2. The expression of EGFR and ErbB2 proteins in the spheres was examined by Western blot. **Results** Sox2 could dose-dependently increase the ErbB2, ErbB3, ErbB4 promoter driven luciferase activity. Sox2 promotes the sphere-forming rate of U251 cells and upregulates the expression of EGFR and ErbB2 in the spheres. **Conclusion** Sox2 could upregulate the expression of EGFR and promote selfrenew of glioma stem cells.**Key words:** sry-related high-mobility-group box-containing 2; glioma stem cells; receptor, epidermal growth factor; DNA replication

Sox(sry-related high-mobility-group box-containing)基因家族是一类重要的转录因子,成员众多。其中 Sox2 是干细胞的特异标志物,参与干细胞增殖的调节和多项分化潜能的维持<sup>[1]</sup>。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)又被称为 ErbB1,另外还有 ErbB2、ErbB3、ErbB4 等几个同源受体,与其结构域结合的配体均为表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)相关的多肽生长因子,包括 EGF、转化生长因子- $\alpha$ 、双调蛋白等。其中 EGF 是干细胞自我复制和增殖所必需的生长因子<sup>[2-3]</sup>,在肿瘤干细胞的自我复制过程中,EGF 同样是必不可少的转录因子<sup>[4-5]</sup>。ErbB 蛋白与配体结合后通过发生同源或异源二聚化而呈活化状态,其异常表达有可能引起细胞生长失控<sup>[6]</sup>。在肿瘤细胞中 EGFR、ErbB2 的表达很高<sup>[7-8]</sup>。本课题组前期研究发现,Sox2 能够通过上调 EGFR 的表达促进神经干细胞的自我复制,迅速增加干细胞的数量<sup>[9]</sup>。因此,作者推测在胶质瘤细胞的自我复制调控中,也

可能存在类似的 Sox2-EGFR 的调节机制。为了验证这样的推测,本研究进行了以下的实验,初步验证了 Sox2 对细胞 EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 表达的调控及其对胶质瘤细胞自我复制的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** U251 细胞株、HEK293 细胞株均购自协和细胞库;改良的 Eagle 培养液(dulbecco's modified eagle media, DMEM)、胎牛血清(HyClone 公司);减血清基础培养基(opti-MEM I reduced serum media, OPTI-MEM)(HyClone 公司);胰蛋白酶(trypsin)(吉诺生物公司);青/链霉素(中国医学科学院);脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000)(Invitrogen 公司);B27 添加剂(Gibco 公司);EGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(Invitrogen 公司);DH5 $\alpha$  感受态细胞(北京天根生化公司);双报告基因检测系统试剂盒(美国 Promega 公司);双报告基因检测仪(德国

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960150、31260246);973 计划前期研究专项课题(2011CBS512115、2012CB722408);宁夏医科大学校级项目(XM200915、XT200909)。 作者简介:陶虹(1975~),硕士,副教授,主要从事神经生理学研究。 △ 通讯作者, Tel:13723310685; E-mail:huqikuan@163.com。

Berthold 公司),所有抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基贴壁培养 U251 细胞、HEK293 细胞,置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中,待细胞密度约 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:3 传代。将第 3 代状态良好的细胞消化成单细胞悬液种植于培养皿中,待细胞融合率约 80% 时用于转染及蛋白质实验。

**1.2.2 构建 Sox2 表达质粒、ErbB2、ErbB3、ErbB4 荧光素酶报告基因质粒** 提取人全基因组进行纯化,并以其为模板进行 PCR,克隆 Sox2 基因编码序列,引物由上海杰瑞生物公司代理合成。将 Sox2 基因 PCR 产物、表达质粒 pcDNA3.1 同时使用 *EcoR*I 和 *Hind*III 进行双酶切,酶切产物分离纯化、切胶回收后,用连接酶将 PCR 产物 Sox2 基因片段和载体分别进行基因重组,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布于溶菌肉汤 (lysogeny broth, LB) 顶层培养板 (加入氨苄青霉素进行筛选),37 °C 培养箱培养 12 h 后挑取单个克隆菌落至 LB 培养液中 (含氨苄西林),37 °C 摇床 200 r/min 8 h 进行菌落扩增。采用试剂盒提取质粒并纯化备用。质粒构建完成后进行鉴定,完全正确后备用。同样方法构建 ErbB2、ErbB3、ErbB4 荧光素酶报告基因质粒 (转录起始位点前启动子区 951 bp,质粒载体为 PGL3)。构建 ErbB2、ErbB3、ErbB4 启动子报告基因的引物如下 (均含 *Kpn*I, *Hind*III 酶切位点),ErbB2 上游引物序列:5'-ACG TGG TAC CCA GTT GCT CGT GGT TGT AAT TCC-3',下游引物序列:5'-ACG TAA GCT TGT AAA GGG CCC CGT GGG A-3'; ErbB3 上游引物序列:5'-ACG TGG TAC CCT CCG CGT CCC ACT TCA CT-3',下游引物序列:5'-ACG TAA GCT TCC CTA GGC TAG GAC ATC GAG G-3'; ErbB4 上游引物序列:5'-ACG TGG TAC CGC AAC GGA GAA AAT GCT GAC T-3',下游引物序列:5'-ACG TAA GCT TTC CCG TGC TGA CAA TTA CAT G-3'。

**1.2.3 转染 Sox2 质粒和空载质粒及细胞分组** 转染前 1 d,6 cm 培养皿无抗菌药物培养基贴壁培养 U251 细胞,第 2 天细胞密度达到 80%~90% 进行转染。将 10.6  $\mu$ L 的 Sox2 质粒溶于 500  $\mu$ L 的 Opti-MEM 中,20  $\mu$ L Lipofectamine 2000 溶于 500  $\mu$ L 无血清的 Opti-MEM 中,混合均匀。室温下孵育 5 min 后,将 Sox2 质粒混合液和 Lipofectamine 2000 混合液混合,轻轻混匀室温下放置 25 min 后,将含有 Sox2 质粒和 Lipofectamine 2000 的混合液均匀滴入培养皿中,置培养箱 6 h 后

换正常培养基。同样的方法染空载质粒。对细胞进行分组,空白对照组:U251 细胞;空载质粒组:U251 细胞转染空载质粒;实验组:U251 细胞转染 Sox2 质粒。

**1.2.4 细胞成球率实验** 将转染 6 h 后的 3 组细胞消化、离心后,用成球培养基吹打成单细胞悬液,细胞计数板计数,按每孔 100 个细胞的浓度种植到 96 孔板中,每组 12 孔。每孔加无血清培养基 (SFM) 100  $\mu$ L 悬浮培养,培养 10 d 成球后,计数每孔中细胞球数量,统计成球率。无血清培养基 (100 mL) 配制:DMEM/F12 96 mL、B27 添加剂 2 mL;EGF (20 ng/mL) 4  $\mu$ L; bFGF (20 ng/mL) 40  $\mu$ L、青霉素/链霉素 1 mL、谷氨酰胺 1 mL。

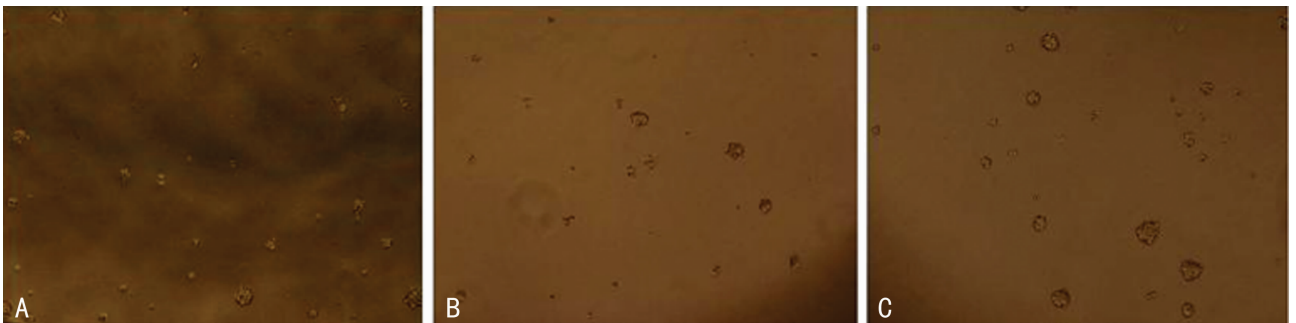
**1.2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Sox2 蛋白和 EGFR 蛋白表达** 3 组成球细胞分别提取总蛋白,蛋白质定量试剂盒 BCA (bicinchoninic acid) 法测蛋白浓度,每泳道上样 40  $\mu$ g,以 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 进行蛋白分离,然后电转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加一抗 Sox2 (1:500)、EGFR (1:1 000)、ErbB2 (1:500)、 $\beta$ -actin (1:1 000),4 °C 冰箱孵育 13 h,洗膜,二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h,洗膜,滴加 HRP 发光液,暗室曝光,显影。

**1.2.6 双报告基因检测分析法检测 Sox2 基因对 ErbB2、ErbB3、ErbB4 基因的调控** 293A 细胞消化成单细胞悬液,均匀种植于 24 孔板中 (1 105 / 孔),24 h 后转染。依 Sox2 表达质粒不同浓度将实验分为 4 组,每组做 4 个平行孔;Sox2 表达质粒分别加每孔 0、100、300、500 ng, ErbB2、ErbB3、ErbB4 荧光素酶质粒每孔均加 300 ng,每孔不足 500 ng 的用空载表达质粒 pcDNA3.1 补齐至 500 ng。最后每孔均加 1 ng Renilla 质粒作为内参。转染 24 h 后,去除培养基,用预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate balanced solution, PBS) 溶液轻轻的洗细胞 1~2 次。根据双报告基因检测系统试剂盒说明用双报告基因检测仪检测荧光素酶表达活性。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据统计并作图,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用完全随机设计单因素方差分析,计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Sox2 促进 U251 细胞克隆成球率** 转染过 Sox2 质粒的 U251 细胞悬浮培养 10 d 后成球率为 (29  $\pm$  7)%,与空白对照组成球率 (18  $\pm$  6)% 和空载质粒组成球率 (21  $\pm$  7)% 相比,成球率明显增高 ( $P < 0.05$ ),见图 1。

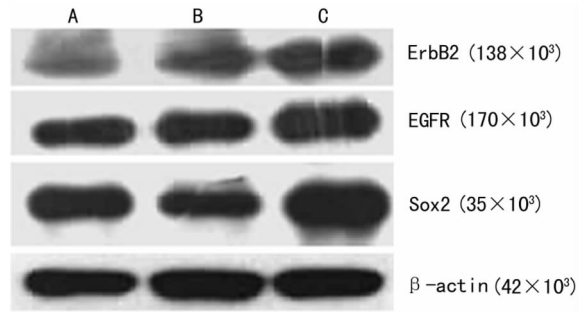


A: 空白对照组; B: 空载质粒组; C 实验组。

图 1 U251 细胞在无血清培养基中形成细胞球的形态 ( $\times 200$ )

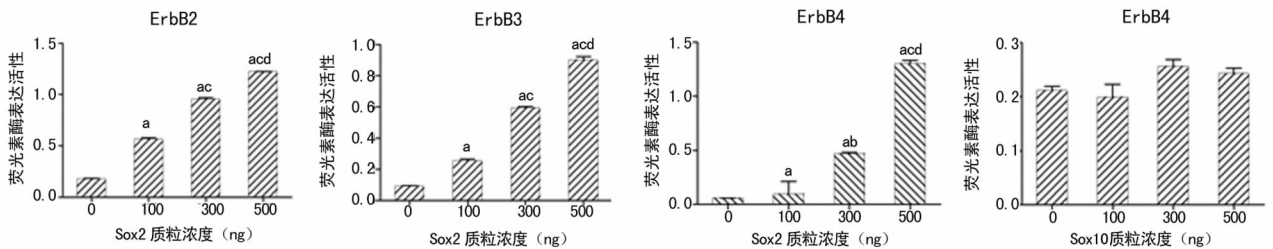
**2.2 3 组 Sox2 蛋白和 EGFR 蛋白表达比较** 实验组 Sox2 蛋白相对表达量( $8.51 \pm 0.46$ )与空白对照组( $5.54 \pm 0.42$ )、空载质粒组( $5.37 \pm 0.38$ )比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );实验组 EGFR 蛋白相对表达量( $6.21 \pm 0.38$ )与空白对照组( $4.18 \pm 0.40$ )、空载质粒组( $4.77 \pm 0.37$ )比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );实验组 ErbB2 蛋白相对表达量( $4.45 \pm 0.29$ )与空白对照组( $2.30 \pm 0.18$ )、空载质粒组( $3.29 \pm 0.24$ )比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明 Sox2 可以促进 EGFR、ErbB2 受体的表达,见图 2。

**2.3 双报告基因检测分析法检测 Sox2 基因对 ErbB2、ErbB3、ErbB4 基因的调控** 以 Sox10 调节 ErbB4 的结果为阴性作对照,Sox2 剂量依赖性地促进 ErbB2、ErbB3、ErbB4 启动子介导的荧光素酶蛋白表达,见图 3。



A:空白对照组;B:空载质粒组;C:实验组

图 2 3 组 Sox2 蛋白、EGFR 和 ErbB2 蛋白表达



a:  $P < 0.01$ ,与质粒浓度为 0 ng 比较; b:  $P < 0.05$ ; c:  $P < 0.01$ ,与质粒浓度为 100 ng 比较; d:  $P < 0.01$ ,与质粒浓度为 300 ng 比较。

图 3 报告基因检测系统分析 Sox 基因与 ErbB2、ErbB3、ErbB4 基因间的调控关系

### 3 讨 论

Sox2 可以在体外结合 EGFR 的启动子,激活其转录活性,用过表达 Sox2 的病毒转染神经干细胞,可以促进 EGFR 的表达,刺激胚胎神经干细胞的增殖与体外成球率,而 RNAi 抑制 Sox2 的表达则可以抑制增殖和成球率<sup>[9]</sup>。本研究证实了 Sox2 可以上调 EGFR 的表达,说明在胶质瘤细胞中也存在 Sox2 对 EGFR 的调控。EGFR 家族还有 ErbB2、ErbB3、ErbB4 3 个受体,它们都可以对 EGF 及其相关配体应答,在肿瘤细胞增殖、黏附、转移和分化过程中起重要作用<sup>[10-12]</sup>。生物信息学的预测结果表明,在 EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 启动子区存在 Sox2 的结合位点。本研究结果也证实了这一点,Sox2 表达质粒可以上调 ErbB2、ErbB3、ErbB4 启动子介导的荧光素酶蛋白表达活性,并随 Sox2 质粒浓度的增加而增强。

肿瘤干细胞理论的提出对重新认识肿瘤的起源、本质及临床治疗提供了新的方向,但调控肿瘤干细胞的分子机制仍不清楚<sup>[13]</sup>。EGFR 对胶质瘤细胞的存活和增殖最受关注,它在胶质瘤中不但普遍表达,而且活性增强,甚至发生基因突变<sup>[14-15]</sup>。转染实验证实,Sox2 过表达可以促进胶质瘤细胞体外的克隆形成率。Western blot 实验证实 Sox2 能够增加胶质瘤细胞 EGFR 和 ErbB2 受体的表达和胶质瘤干细胞的增殖。因此,本研究推测在 EGF 的刺激下,EGFR 及 ErbB2、ErbB3、ErbB4 都会产生应答反应,不仅促进肿瘤干细胞的自我复制,而且促进非干细胞的肿瘤细胞的增殖。这使得 Sox2 引起的生长因子受体应答变得复杂,而且肯定会有另外的分子存在,与 Sox2-ErbB 家族的不同成员配合,在不同的肿瘤类型和不同的生长条件下会有不同的调节通路激活。

### 参考文献:

[1] Ellis P, Fagan BM, Magness ST, et al. SOX2, a persistent

marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult [J]. Dev Neurosci, 2004, 26(2): 148-165.

[2] Chen Y, Shi L, Zhang L, et al. The molecular mechanism governing the ncogenic potential of Sox2 in breast cancer [J]. J Biol Chem, 2008, 283(26): 17969-17978.

[3] Qin D, Gan Y, Shao K, et al. Mouse meningocytes express Sox2 and yield high efficiency of chimeras after nuclear reprogramming with exogenous factors [J]. J Biol Chem, 2008, 283(48): 33730-33735.

[4] Milanezi F, Carvalho S, Schmitt FC. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2008, 8(4): 417-434.

[5] Loew S, Schmidt U, Unterberg A, et al. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2009, 9(6): 703-715.

[6] 詹启敏. 分子肿瘤学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 71-189.

[7] Zhang T, Ma J, Cao X, et al. EGFR-Mediated cell cycle regulation [J]. Anticancer Res, 2002, 22(1A): 1-11.

[8] Bazley LA, Gullick WJ. The Epidermal growth factor receptor family [J]. Endocr Relat Cancer, 2005(12): S17-27.

[9] Hu QK, Zhang LR, Wen JH, et al. The EGF receptor-Sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells [J]. Stem Cells, 2010, 28(2): 279-286.

[10] Vollmann-Zwerenz A, Diermeier-Daucher S, Wege AK, et al. Multichromatic phenotyping of HER(下转第 4111 页)

无血清培养逆向诱导富集 A549 始动细胞。

实验通过检测流式细胞表达率证实富集得到的细胞亚群表达 CD133/CD326 表面分子;为了更直观地观察体外传代培养后细胞球 CD133/CD326 分子的表达情况,本实验用 FITC 标记的绿色荧光和 CY3 标记的红色荧光抗体对 CD133 和 CD326 进行共聚焦检测,结果显示第 4 代的始动细胞绝大多数表达 CD133/CD326 分子,证实紫杉醇联合证实紫杉醇联合干细胞培养基逆向诱导可有效富集 CD133/CD326 细胞亚群。多向分化潜能和更强的成瘤能力是肿瘤干细胞所具备的重要特性,在分化实验中,CD133<sup>+</sup>/CD326<sup>+</sup> 细胞在第 2 天即可以贴壁生长,其后逐渐成扁平不规则状生长,第 6 天外形和普通 A549 细胞相类似,免疫组织化学结果证实分化细胞均表达 CK8/CK18 细胞角化蛋抗原,说明其有向普通肿瘤细胞分化的潜能。成瘤实验中 10<sup>4</sup> 级 CD133<sup>+</sup>/CD326<sup>+</sup> 细胞即能形成移植瘤,而 10 倍量的普通 A549 细胞不能成瘤,说明富集细胞亚群较普通的 A549 细胞具备更强的自我更新增殖能力。

总之,实验证实了以 CD133/CD326 标记的富集细胞亚群具备干细胞的相关特性包括连续的传代成球能力、向普通肿瘤细胞分化的潜能、较普通细胞具备更强的成瘤能力,能够用于肺腺癌始动细胞后期生物学特性的研究。

#### 参考文献:

- [1] Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, et al. The CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients[J]. *Medical oncology*, 2011, 28(3): 745-752.
- [2] Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells; the dark seed of melanoma[J]. *JCO*, 2008, 26(6): 2890-2894.
- [3] Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells[J].

*Eur J Cancer*, 2006, 42(14): 1213-1218.

- [4] Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 4311-4320.
- [5] Ma S, Tang KH, Chan YP, et al. miR-130b Promotes CD133<sup>+</sup> liver tumor initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein1[J]. *Stem Cell*, 2010, 7(13): 694-707.
- [6] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(6): 313-323.
- [7] Bellizzi A, Sebastian S, Ceglia P, et al. Co-expression of CD133<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> in human colon cancer and liver metastasis[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 228(2): 408-415.
- [8] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour initiating cells in non-small-cell lung cancer[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 36(3): 446-453.
- [9] Meng X, Li M, Wang X, et al. Both CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> sub populations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(12): 1040-1046.
- [10] Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, et al. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(4): 950-958.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-11)

(上接第 4107 页)

receptor coexpression in breast tumor tissue samples using flow cytometry-possibilities and limitations[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(4): 387-398.

- [11] Griffero F, Daga A, Marubbi D, et al. Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors[J]. *J Biol Chem*, 2009, 84(11): 7138-7148.
- [12] Vollmann-Zwerenz A, Diermeier-Daucher S, Wege AK, et al. Multichromatic phenotyping of HER receptor coexpression in breast tumor tissue samples using flow cytometry-possibilities and limitations[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(4): 387-398.

- [13] Lobo NA, Shimono Y, Qian D, et al. The biology of cancer stem cells[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007(23): 675-699.
- [14] Argyriou AA, Antonacopoulou A, Iconomou G, et al. Treatment options for malignant gliomas, emphasizing towards new molecularly targeted therapies[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009, 69(3): 199-210.
- [15] Viana-Pereira M, Lopes JM, Little S, et al. Analysis of EGFR Overexpression, EGFR Gene Amplification and the EGFRvIII Mutation in Portuguese High-grade[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(2): 913-920.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-10)