

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.025

血清胸苷激酶-1 水平在鼻咽癌患者治疗过程中的动态变化及与病理学特征的关系

李 军, 宋秋灵

(山东菏泽市立医院, 山东菏泽 274000)

[摘要] **目的** 考察血清胸苷激酶-1(TK1)在鼻咽癌患者治疗过程的变化及与病理学特征的关系。**方法** 收集该院 2010~2013 年在放疗科收治的鼻咽癌患者 35 例,选择同期鼻咽部炎症患者 20 例为对照。比较治疗前后血清 TK1 水平。**结果** 治疗前后,对照组 TK1 无显著变化($P>0.05$);与对照组比,治疗前后鼻咽癌组的 TK1 均较高($P<0.05$);与治疗前比,治疗后鼻咽癌组的 TK1 显著降低($P<0.05$)。治疗前后,鼻咽癌 I~II 期的 TK1 均低于 III~IV 期($P<0.05$),无淋巴结转移均低于淋巴结转移($P<0.05$),颈神经未侵犯低于颈神经侵犯($P<0.05$),颅底未受侵犯低于颅底受侵犯($P<0.05$),未分化癌高于高中分化鳞癌和低分化鳞癌($P<0.05$)。TNM IV 期、淋巴结转移、颈神经侵犯 TK1 表达较高($P<0.05$)。**结论** TK1 可反映鼻咽癌患者的肿瘤负荷和增殖活性,对鼻咽癌诊断、监测病情和预后应用前景。

[关键词] 胸苷激酶;鼻咽肿瘤;病理**[中图分类号]** R730**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)32-4532-03

The change of serum TK1 level in the treatment process of the early cure nasopharyngeal carcinoma patients and its relationship to pathological features

Li Jun, Song Qiuling

(Shandong Heze Municipale Hospital, Heze, Shandong 274000, China)

[Abstract] **Objective** To learn the change of serum thymidine Kinase 1(TK1) level in the treatment process of the early cure nasopharyngeal carcinoma patients and its relationship to pathological features. **Methods** From January 2010 to December 2013, 35 cases of nasopharyngeal carcinoma patients were collected into our study, 20 cases of nasopharyngeal inflammation patients were chosen as the control. Serum TK1 level in the 2 groups was compared before and after treatment. **Results** TK1 in control group had no significant differences before and after treatment ($P>0.05$). Compared with the control group, serum TK1 in nasopharyngeal carcinoma group were higher before and after radiotherapy ($P<0.05$); after radiotherapy, serums TK1 in nasopharyngeal carcinoma group were lower ($P<0.05$). Before and after radiotherapy, serum TK1 I and II stage were lower than in III and IV stager ($P<0.05$), lymph node metastasis group were higher than no lymph node metastasis ($P<0.05$), TK1 had higher expression in TNM IV than TNM II ($P<0.05$), compared with lymph node metastasis and cervical nerve violated groups, TK1 expression was higher in none lymph node metastasis and none cervical nerve violated groups ($P<0.05$). **Conclusion** TK1 can reflect the tumor load and proliferative activity of nasopharyngeal carcinoma, which could be as a factor in nasopharyngeal carcinoma diagnosis, monitoring and prognosis.

[Key words] thymidine kinase; nasopharyngeal neoplasms; pathology

鼻咽癌(NPC)是国内常见的头颈部恶性肿瘤,全球 4/5 发病人口均在我国,南方各省是鼻咽癌的高发区。鼻咽癌早期症状无特征,容易误诊或漏诊,男性发病高于女性^[1-2]。目前鼻咽癌的诊断依据除了取组织行病理检查联合 MRI 和 CT 影像学,还增加检测血清胸腺嘧啶脱氧核苷激酶(thymidine kinase, TK),即胸苷激酶,以提高诊断率降低误诊率。TK 中的胸苷激酶-1(TK1)是 TK 家族中研究较为深入的成员,TK1 与 DNA 合成相关,在临床用于评估增殖细胞增殖度和恶性程度^[3-4],恶性肿瘤患者细胞过度增殖, DNA 合成增强,血清 TK1 则现动态增加,那么鼻咽癌患者治疗过程中 TK1 动态增加与病理特征的关系如何,本课题就此展开研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 经本院伦理委员会同意,收集本院 2010~2013 年在放疗科收治且经病理确诊的鼻咽癌患者 35 例,年龄(53.6±10.7)岁。TNM 分期: I 期 2 例, II 期 10 例, III 期 14 例, IV 期 9 例;淋巴结转移 18 例,无淋巴结转移 17 例;高中分

化鳞癌 9 例,低分化鳞癌 16 例,未分化癌 10 例。所有病例接受标准的放射治疗。选择同期鼻咽部炎症患者 20 例为对照组,包括 8 例扁桃体炎、7 例急性慢性咽炎和 5 例鼻前庭囊肿。所有受试者均签署知情同意书。排除标准:已接受过放疗或化疗的鼻咽癌患者;伴心、肝、肺和肾功能异常者,远处转移,有感染表现,卡氏功能状态评分标准(KPS)<70;血红蛋白小于 90 g/L;既往有除鼻咽癌恶性肿瘤病史;先天性或获得性免疫缺陷性疾病者;6 个月内有献血史者;维生素缺乏者;处于月经期、哺乳或妊娠期者。两组年龄、BMI、性别比、血红蛋白、功能状态评分差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法 鼻咽癌患者均接受根治性放疗。I 期和 II 期患者采用单纯放射治疗, III 期和 IV 期患者给予铂类辅助化疗 1 个疗程后进行放疗,采用直线加速器 6MVX 线分割照射,每次 2 Gy, 5 次/周,照射剂量:鼻咽部组织 70 Gy,颈淋巴结转移者 70 Gy,颈淋巴结未转移者行预防性照射 60 Gy,疗程 6 周^[5]。鼻咽部炎症患者给予对症治疗。

1.3 指标检测^[6]

1.3.1 检测治疗前后的血清 TK1 采用印迹免疫-增强化学发光法检测血清 TK1。所有患者分别在治疗前和治疗结束后 5 d 内抽取空腹静脉血 5 mL,鼻咽部炎症者于体检日空腹抽取静脉血 5 mL,所有收集的全血,离心分离血清。

1.3.2 治疗前鼻咽组织的 TK1 表达 采用免疫组化法,将石蜡包埋的组织切片、脱蜡、水化,滴加一抗鼠抗人 TK1 多克隆抗体,对照采用 PBS,滴加二抗,固封,观察。TK1 阳性为细胞质为棕黄色或棕褐色。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行统计学处理,将计数资料采用例数或构成比表示,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验或组间方差分析, $\alpha = 0.05$ 为检验水平, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组治疗前后 TK1 变化 治疗前后,对照组的 TK1 无显著变化($P > 0.05$);与对照组比,治疗前后鼻咽癌组的 TK1 均较高($P < 0.05$);鼻咽癌组治疗前后 TK1 差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组治疗前后 TK1 变化($\bar{x} \pm s$, pmol/L)

时间	对照组(n=20)	鼻咽癌组(n=35)	t	P
治疗前	1.08±0.34	1.82±0.53	5.61	<0.05
治疗后	1.07±0.22	1.43±0.64	3.54	<0.05
t	0.11	2.78		
P	>0.05	<0.05		

2.2 鼻咽癌患者治疗前后血清 TK1 水平与病理学参数分析 治疗前后,鼻咽癌 I~II 期的 TK1 显著低于 III~IV 期($P < 0.05$),无淋巴结转移 TK1 显著低于淋巴结转移($P < 0.05$),颈神经未侵犯显著低于颈神经侵犯($P < 0.05$),颅底未受侵显著低于颅底受侵($P < 0.05$),未分化癌显著高于高中分化鳞癌和低分化鳞癌($P < 0.05$),见表 2。

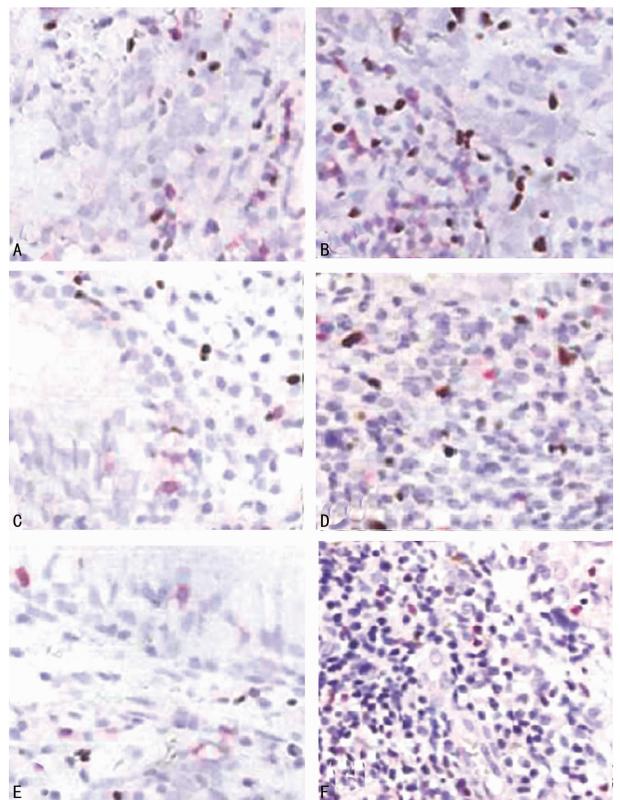
表 2 鼻咽癌患者治疗前后血清 TK1 水平与病理学参数分析

病理学参数	n	治疗前	治疗后	t	P
TNM 分期					
I~II	12	1.62±0.46	1.27±0.30	2.21	<0.05
III~IV	23	1.93±0.37	1.51±0.27	4.40	<0.05
t		2.16	2.50		
P		<0.05	<0.05		
淋巴结转移					
否	17	1.69±0.35	1.29±0.38	3.19	<0.05
是	18	1.95±0.37	1.56±0.35	3.25	<0.05
t		2.13	2.19		
P		<0.05	<0.05		
颈神经侵犯					
否	14	1.57±0.21	1.34±0.18	3.11	<0.05
是	21	1.99±0.24	1.49±0.19	7.49	<0.05
t		5.32	2.34		
P		<0.05	<0.05		

续表 2 鼻咽癌患者治疗前后血清 TK1 水平与病理学参数分析

病理学参数	n	治疗前	治疗后	t	P
颅底受侵					
否	15	1.64±0.25	1.30±0.15	4.52	<0.05
是	20	1.96±0.31	1.53±0.17	5.44	<0.05
t		3.30	4.20		
P		<0.05	<0.05		
病理类型					
高中分化鳞癌	9	1.71±0.16	1.38±0.18	4.11	<0.05
低分化鳞癌	16	1.80±0.18	1.43±0.17	5.98	<0.05
未分化癌	10	1.92±0.19	1.48±0.20	5.04	<0.05
F		3.35	0.72		
P		<0.05	<0.05		

2.3 鼻咽癌患者治疗前病理学参数 TK1 表达情况 TNM IV 期、淋巴结转移、颈神经侵犯 TK1 表达较高($P < 0.05$),见图 1。



A: TNM II 期; B: TNM IV 期; C: 淋巴结未转移; D: 淋巴结转移; E: 颈神经未侵犯; F: 颈神经侵犯。

图 1 鼻咽癌患者治疗前病理学参数 TK1 表达情况

3 讨 论

TK1 参与细胞分裂增殖,与 DNA 合成呈正相关,正常细胞基本不表达 TK1,外周血几乎检测不到 TK1。恶性肿瘤 TK1 活性是正常细胞的 4 倍,TK1 在细胞周期的不同时相表达呈波动态,G₁/S 期逐渐升高,持续至 S 晚期或 G₂ 早期,恶性肿瘤可使 TK1 羧基末梢变异而难降解,使细胞周期的 TK1 保持高度活性。多种恶性肿瘤患者组织或血清的 TK1 呈现高表

达,直结肠癌组织的 TK1 表达明显高于直肠良性病组,而直肠良性病组与正常组无显著差异^[7];宫颈癌 TK1 表达明显增高,TK1 水平也是预测宫颈癌预后的独立危险因素^[8]。非小细胞肺癌组织中 TK1 表达亦上调^[9]。因此 TK1 已作为恶性肿瘤细胞的活性、分裂增殖速率和恶性程度的重要标志,可评估消化道肿瘤、宫颈癌和肺癌等多种恶性肿瘤的发生、发展和预后^[10-12]。

治疗前,鼻咽癌血清 TK1 显著高于鼻咽炎症组,治疗后鼻咽癌血清 TK1 下降,与文献结果相似^[13-14],与治疗杀死大量增生细胞,促使肿瘤细胞死亡或阻滞肿瘤细胞 DNA 复制和转录,缩小处于 G₁~G₂ 期肿瘤细胞比例,降低了血清 TK1 水平相关。但仍需要注意的是,献血者、妊娠期妇女和维生素缺乏人群因细胞增生显著,血清 TK1 水平也会升高,这种良性或生理现象可假性拉高 TK1 水平,对这类人群的血清 TK1 高水平不能解读为病理改变。

TK1 水平与鼻咽癌临床分期和淋巴结转移密切相关,分期越高,TK1 水平越高,鼻咽组织的表达也越高,淋巴结转移较淋巴结未转移高,与文献结果相似^[6,14,10]。类似地,Chen 等^[15]和 Li 等^[16]报道血清 TK1 与肺癌、食道癌、甲状腺癌、食管癌、喷门癌和非小细胞肺癌的临床分期有明显相关性,临床分期越高,血清 TK1 水平也越高。TK1 水平越高提示淋巴结转移、颈神经侵犯、颅底受侵及病理恶化的概率增高,治疗时 TK1 水平较治疗前不变或升高,推测癌细胞可能远处转移,提示治疗失败。可见血清 TK1 水平与患者肿瘤临床分期和淋巴结转移相关,掌握鼻咽癌细胞增殖程度,为患者制定个性和动态放疗方案提供依据^[17]。

TK1 的检测与肿瘤的恶性程度密切相关也提供一个辩证看待鼻咽癌的观点:(1)鼻咽癌治疗后总体 TK1 水平降低,肯定了治疗效果,但分期越高、淋巴结转移、颈神经侵犯、颅底侵犯和未分化的鼻咽癌的 TK1 水平虽有降低但与分期较低、淋巴结未转移、颈神经未侵犯、颅底未侵犯和高中低分化仍较高,提示病理恶性程度较高者的预后不佳,大量临床试验证明分期 I 和 II 期的患者,单纯放疗即可达到治疗目的,5 年的存活率可超过 90%,对于 II~IV 期患者,5 年的存活率不超过 50%,造成治疗失败的原因包括局部复发与远处转移^[18-20]。(2)不论鼻咽癌的分期、转移、侵犯或分化,只要显著降低鼻咽癌患者体内 TK1 水平并确保患者的耐受与安全,那么鼻咽癌的痊愈是可以实现的,近年大量的研究结果显示通过控制 TK1 基因表达达到治疗鼻咽癌的目的^[21-22],虽然控制 TK1 基因表达还存在诸多人文伦理和耗费巨大等经济问题,但临床鼻咽癌的治愈仍具希望。

综上所述,TK1 可反映鼻咽癌患者的肿瘤负荷和增殖活性,对鼻咽癌诊断、监测病情和预后等多方面有应用前景,有望为个体化基因治疗提供新靶点。

参考文献

- [1] Han L, Lin SJ, Pan JJ, et al. Prognostic factors of 305 nasopharyngeal carcinoma patients treated with intensity-modulated radiotherapy[J]. J Chin Cancer, 2010, 29(2): 145-150.
- [2] 刘洁, 廖剑绚, 杨巧. 晚期鼻咽癌同步放疗患者营养状况监测及院内感染分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(3): 188-191.
- [3] Gasparri F, Wang N, Skog S, et al. Thymidine kinase 1

expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan assays[J]. Eur J Cell Biol, 2009, 88(12): 779-785.

- [4] 钱纪银. 消化道肿瘤患者细胞质胸苷激酶检测的临床意义[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 12(4): 427-428, 432.
- [5] Metellus P, Nanni I, Dussert C, et al. Prognostic implications of biologic markers in intracranial meningiomas; 120 cases[J]. Neurochirurgie, 2008, 54(6): 750-756.
- [6] 王娟毅, 马武, 景文江, 等. 放疗同步 TNF 方案治疗鼻咽癌的临床疗效观察[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 12(5): 1043-1045.
- [7] Korkmaz T, Seber S, Okutur K, et al. Serum thymidine kinase 1 levels correlates with FDG uptake and prognosis in patients with non small cell lung cancer[J]. Biomarkers, 2013, 18(1): 88-94.
- [8] 唐梦君. 鼻咽癌患者血清中胸苷激酶 1 的检测意义[D]. 长沙: 中南大学, 2009.
- [9] 姚伯敏, 周菊英, 俞志英, 等. 鼻咽癌患者血清胸苷激酶 1 的表达及临床意义[J]. 江苏医药, 2012, 38(3): 300-303.
- [10] Shen C, Wen Z, Qian Y, et al. Study on the relationship between TK gene regulated by enhanced suicide gene vector and telomerase activity in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2010, 24(4): 168-173.
- [11] 李小腾, 王锋, 黄平. 直结肠癌患者血清胸苷激酶检测的临床意义[J]. 江苏医药, 2009, 35(12): 1436-1437.
- [12] 朱栋元. 功能影像早期预测小细胞肺癌疗效及预后的临床应用研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [13] Chen G, He C, Li L, et al. Nuclear TK1 expression is an independent prognostic factor for survival in pre-malignant and malignant lesions of the cervix[J]. BMC Cancer, 2013, 21(13): 249.
- [14] 秦雷, 杨林. 血清胸苷激酶 1 与鼻咽癌临床病理特征相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(2): 113-117.
- [15] Chen Y, Ying MG, Chen YS, et al. Serum thymidine kinase 1 correlates to clinical stages and clinical reactions and monitors the outcome of therapy of 1,247 cancer patients in routine clinical settings[J]. Int J Clin Oncol, 2010, 15: 359-368.
- [16] Li ZS, Wang YH, He J, et al. Serological thymidine kinase 1 is a prognostic factor in oesophageal, cardiac and lung carcinomas[J]. Eur J Cancer Prev, 2010, 19(4): 313-318.
- [17] 秦雷. 初治鼻咽癌患者检测血清胸苷激酶 1 的临床意义[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [18] 许少伟, 杨熙鸿, 林建英, 等. 鼻咽癌放疗后颈淋巴结失败挽救手术的疗效和预后因素[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 12(6): 1297-1300.
- [19] 管燕, 郭其森, 山凤莲, 等. 小细胞肺癌组织胸苷激酶表达临床意义的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(10): 746-748.
- [20] Huang SH, Lin JZ, Guo Na, et al. Elevated serum thymidine kinase 1 predicts risk of pre/early cancerous progression[J]. Asian Pacific J Cancer Prev, 2011, 15(12): 497-505.

VMAT 组平均减少了 48.9%，差异有统计学意义 ($P = 0.017$)。VMAT 组照射时间更短。

3 讨论

脑转移癌常常呈多发、散在分布，有明显的颅内压增高和神经认知功能障碍，病程进展迅速，严重影响患者的生活质量。如果不进行治疗，自然生存期极短，中位生存期 3 个月左右，经过放化疗等干预治疗后中位生存期可提高 3~6 个月，有报道疗效较好者可提高 12 个月^[3]，放射治疗是治疗脑转移癌的有效治疗手段，研究显示多发性脑转移癌的基本治疗为全脑放疗，全脑放疗对减少颅内新病灶的发生有重要意义^[11]，能使脑转移患者中位生存期延长 3~6 个月。但因正常脑组织能够耐受的最大剂量的限制，肿瘤的照射剂量亦受到限制，为 30~40 Gy/2~3 周。脑转移直接致死率高，这成为脑转移患者生存期短的重要原因。因此，全脑放疗后针对转移病灶加量照射可以提高患者生存期，可以结合三维适形放疗 (3DC-RT)、立体定向放射治疗 (SBRT)、IMRT、螺旋断层调强放疗同步加量 (HT) 及 VMAT 进行加量照射。Bayman 等^[12]采用螺旋断层调强放疗对脑转移灶进行同步加量放疗，Lagerwaard 等^[13]采用容积调强放疗对脑转移灶进行同步加量放疗，均取得不错的疗效。

容积旋转调强中的快速旋转调强 (RapidArc) 作为动态旋转调强 (IMAT) 的一种，其优势主要表现在机器跳数的减少和治疗时间的缩短，同时能够完成和传统 IMRT 计划相同或者更优的剂量传输。

本研究发现，两组 PGTV 的 Dmax、Dmean、CI 和 HI 比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；即对于转移灶的治疗来说，VMAT 和 IMRT 的治疗均没有显著差别。

两治疗组患者的眼球、晶体、视神经、视交叉、腮腺、脑干及外耳道的平均受照剂量相似，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但 VMAT 组的眼球、晶体、腮腺及外耳道的热点剂量明显低于 IMRT 组。这是因为 VMAT 为弧形调强照射模式，本科设置弧形调强的角度均在 $90^\circ \sim 270^\circ$ ，这样可以更好的减少平躺患者正面的受照射剂量，从而减少眼球、晶体等重要器官的热点剂量。由此可见，合理采用 VMAT 照射放射能更好地保护患者的正常器官功能。

VMAT 用于颅脑肿瘤单次治疗时间的研究已有明确报道，较 IMRT 同步加量、3DC-RT 局部加量及常规立体定向放射外科治疗有明显优势，更适用于体弱无法耐受长时间治疗的患者。而本研究采取的两种治疗模式中，在病灶接受相似的等效生物剂量的前提下，VMAT 总治疗时间较 IMRT 明显缩短，更适用于高龄、不能耐受长时间平卧的患者的大脑放疗。

参考文献

[1] Norden AD, Wen PY, Kesari S. Brain metastases[J]. Curr

Opin Neurol, 2005, 18(6): 616-654.

- [2] Landis SH, Murray T, Boldec S, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 1999, 49(1): 8-31.
- [3] 殷蔚伯. 肿瘤放射治疗学[M]. 4 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 1200-1201.
- [4] 曾建霜, 肖江洪, 李志平. 静态调强与容积调强技术在胃癌术后放射治疗中的剂量学比较[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2013, 20(5): 426-429, 545.
- [5] 张瑞, 刁勉, 李巧巧, 等. 胸上段食管癌容积旋转调强和静态调强与三维适形放疗计划的剂量学比较[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2012, 33(2): 260-264.
- [6] 杨勇, 柳先锋, 何亚男, 等. 乳腺癌术后胸壁切线野与容积弧形调强技术的剂量学比较[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(19): 1544-1547.
- [7] Verbakel WF, Cuijpers JP, Hoffmans D, et al. Volumetric intensity-modulated arc therapy vs. conventional IMRT in head-and-neck cancer: a comparative planning and dosimetric study[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009, 74(1): 252-259.
- [8] 蒋军, 张利文, 廖珊, 等. 宫颈癌术后旋转拉弧适形放疗和五野调强放疗计划的对比研究[J]. 现代医院, 2012, 12(7): 16-18.
- [9] 陈丽, 袁一帆, 花威, 等. 脑胶质瘤旋转容积调强剂量学研究[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(2): 277-279.
- [10] 张黎, 刁勉, 孙文钊, 等. 肝癌三维适形、静态调强与容积旋转调强放射治疗的剂量学研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2012, 33(3): 402-406.
- [11] Li B, Yu J, Suntharalingam M, et al. Comparison of three treatment options for single brain metastasis from lung cancer[J]. Int J Cancer, 2000, 90(1): 37-45.
- [12] Bauman G, Yartsev S, Fisher B, et al. Simultaneous infield boost with helical tomotherapy for patients with 1 to 3 brain metastases[J]. Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials, 2007, 30(1): 38-44.
- [13] Lagerwaard FJ, Van Der Hoorn EA, Verbakel WF, et al. Whole-brain radiotherapy with simultaneous integrated boost to multiple brain metastases using volumetric modulated arc therapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009, 75(1): 253-259.

(收稿日期: 2015-07-18 修回日期: 2015-09-26)

(上接第 4534 页)

[21] Shen CX, Wen Z, Qian YH, et al. Targeted gene therapy of nasopharyngeal cancer in vitro and in vivo by enhanced thymidine kinase expression driven by human TERT promoter and CMV enhancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 94.

[22] Shen CX, Wen Z, Qian YH, et al. Enhanced thymidine kinase genevector and its killing effect on nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo[J]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2010, 45(5): 414-419.

(收稿日期: 2015-08-18 修回日期: 2015-09-12)