

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.11.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210316.1118.004.html\(2021-03-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210316.1118.004.html(2021-03-16))

## RBP-4 对妊娠期甲状腺功能减退子代肾线粒体功能的影响\*

陈丹燕<sup>1</sup>,甘 华<sup>2</sup>,李 里<sup>1</sup>,卢 松<sup>1</sup>,王红漫<sup>1</sup>,邓华聪<sup>3</sup>,罗利伟<sup>1</sup>

(1. 重庆市人民医院/中科院大学重庆医院内分泌科 401147;2. 重庆医科大学附属

第一医院肾内科 400016;3. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科 400016)

**[摘要]** **目的** 观测血清视黄醇结合蛋白 4(RBP4)对妊娠期甲状腺功能减退子代肾线粒体功能的影响及其机制研究。**方法** 选取 SD 大鼠共 60 只(雌雄比为 2:1),雌鼠与雄鼠合笼交配。妊娠 1 周后将雌鼠随机分为亚临床甲状腺功能减退组(SCH 组)、完全甲状腺功能减退组(OH 组)和正常对照组(CON 组)进行造模。仔鼠分别在出生后第 14 天(P14)和第 35 天(P35),冰上断头,提取肾线粒体。实时荧光定量 PCR 检测 RBP4 mRNA 表达,Western blot 检测 SREBP-1c、Netrin-1 和 RBP4 的蛋白表达水平。**结果** P14 和 P35 时,与同日龄 CON 组相比,SCH 组血清 RBP4 水平差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),而同日龄 OH 组血清 RBP4 水平均增高,其中 P14 时两组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但 P35 时两组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。在妊娠甲状腺功能减退子代中,P35 时 OH 组的 RBP4、SREBP-1c 和 Netrin-1 表达均显著高于 SCH 组。而且 RBP4 的表达分别与 SREBP-1c 和 Netrin-1 呈正相关。**结论** 血清 RBP4 可作为妊娠期甲状腺功能减退子代肾脏线粒体损害的预测因子,SREBP-1c/Netrin-1 通路活化可能是其发病机制之一。

**[关键词]** 妊娠期甲状腺功能减退;子代;视黄醇结合蛋白 4;肾功能损害;SREBP-1c/Netrin-1 通路**[中图分类号]** R714.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)11-1812-05

## Effect of RBP-4 on offspring renal mitochondrial function in hypothyroidism during pregnancy\*

CHEN Danyan<sup>1</sup>,GAN Hua<sup>2</sup>,LI Li<sup>1</sup>,LU Song<sup>1</sup>,WANG Hongman<sup>1</sup>,DENG Huacong<sup>3</sup>,LUO Liwei<sup>1</sup>

(1. Departments of Endocrinology,Chongqing Municipal People's Hospital/Chongqing Hospital,University of Chinese Academy of Sciences,Chongqing 401147,China;

2. Departments of Nephrology,First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,Chongqing 400016,China;3. Departments of Endocrinology,

First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,Chongqing 400016,China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of serum retinol binding protein 4 (RBP4) on the offspring renal mitochondrial function in hypothyroidism during pregnancy and its mechanism. **Methods** Sixty SD rats (ratio of female to male was 2:1) were chosen. Female rats were copulated with male rats in the same cage. After 1 week of pregnancy, the female rats were randomly divided into the subclinical hypothyroidism group (SCH group), overall hypothyroidism group (OH group) and normal control group (CON group) for constructing the models. The offspring rats were beheaded on the ice for extracting the renal mitochondria on postnatal 14 d (P14) and 35 d (P35). The mRNA expression of RBP4 was tested by qRT-PCR. The protein expressions of SREBP-1c, Netrin-1 and RBP4 were tested by Western blot. **Results** On P14 or P35, compared with the CON group with the same day age, the difference of serum RBP4 level in the SCH group had no statistical significance ( $P>0.05$ ), while the level of serum RBP4 in the same day age of the OH group was increased, in which the difference in the comparison on P14 between the two groups had no statistical significance ( $P>0.05$ ), but the comparison between the two groups on P35 had statistical difference ( $P<0.05$ ). The offspring rats with hypothyroidism, the expressions of RBP4, SREBP-1c and Netrin-1 on P35 in the OH group

\* 基金项目:重庆市人民医院医学科技创新基金项目(Y2017MSXM02)。 作者简介:陈丹燕(1982-),副主任医师,博士,主要从事妊娠期甲状腺功能减退子代肾损害防治和机制研究。

were significantly higher than those in the SCH group. Moreover, the RBP4 expression was positively correlated with SREBP -1c and Netrin-1 respectively. **Conclusion** Serum RBP4 may be used as the predictive factor of offspring renal mitochondrial lesion in pregnant hypothyroidism. SREBP -1c/Netrin-1 pathway activation may be one of the pathogenesis.

**[Key words]** maternal hypothyroidism; offspring; retinol binding protein4; renal function impairment; SREBP -1c/Netrin-1 pathway

随着社会经济水平的提高和碘盐的普及,全球甲状腺功能减退的发病率较前明显降低,但妊娠期甲状腺功能减退症的发病率仍高<sup>[1]</sup>。0.3%~0.5%的妊娠妇女患有临床甲状腺功能减退,2%~5%妊娠妇女患有亚临床甲状腺功能减退<sup>[2-3]</sup>。在妊娠前期(12~16周)母体甲状腺是胎儿生长发育所需的唯一甲状腺激素来源,即使母体发生轻微的甲状腺激素缺乏亦可导致后代神经发育缺陷、神经智力发生不可逆损伤<sup>[4-6]</sup>。因此,妊娠期甲状腺功能减退对子代影响的研究,主要集中在神经发育、学习记忆障碍和认知损伤方面,而对子代肾脏影响的研究相对较少。视黄醇结合蛋白(RBP)是新近发现的一种脂肪因子,由181个氨基酸残基组成,属于视黄醇结合蛋白家族中分泌型视黄醇结合蛋白。RBP4由肝脏合成并释放入血,通过与视黄醇、甲状腺素转运蛋白及细胞表面受体相互作用,参与代谢综合征、动脉粥样硬化和甲状腺功能减退等疾病的发生、发展<sup>[7-8]</sup>。然而,RBP4是否与妊娠期甲状腺功能减退患者子代肾脏线粒体功能障碍有关,以及对可能发生机制的研究国内外尚少见报道。本研究拟观测 RBP-4对妊娠期甲状腺功能减退子代肾脏线粒体功能的影响,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

选取 SD 大鼠共 60 只(雌雄比为 2:1,体重(200±20)g,购自重庆医学科学院实验动物中心),雌鼠与雄鼠合笼交配饲养。交配后显微镜下观察雌鼠阴道涂片,若发现有精子则认为受孕成功。妊娠 1 周后将雌鼠随机分为 3 组:亚临床甲状腺功能减退组(SCH 组)、完全甲状腺功能减退组(OH 组)和正常对照组(CON 组)进行造模。OH 组:手术完全切除甲状腺,术后 30 d 眶后静脉丛取血测促甲状腺激素(TSH)和游离四碘甲状腺原氨酸(FT4),若 TSH 高于 CON 组、FT4<1.0 μg/dL(检测范围最小值)则提示造模成功;SCH 组:在临床甲状腺功能减退大鼠模型建立成功的基础上,每天持续皮下注射 1.0 μg/100 g 左旋甲状腺素(L-T4,美国 Sigma 公司),当血清 TSH 水平高于 CON 组、但 FT4 水平在正常范围时提示造模成功<sup>[9]</sup>;CON 组:仅手术暴露甲状腺,不切除

甲状腺。各组大鼠均于术后 4~6 h 喂食,为防止由于摘除甲状旁腺诱发低钙抽搐,术后饮水中加入 1.5%葡萄糖酸钙。将雌鼠分娩当日定为 P0 天。母鼠于 P1 时眶后静脉丛取血,检测 FT4、TSH,确保整个孕期造模均成功。各组仔鼠分别在出生后第 14 天(P14)、第 35 天(P35)称体重,分别测血肌酐、血清肾素、24 h 尿蛋白水平。

### 1.2 肾脏线粒体的制备

将肾脏组织剪碎成肉糜样,用含有 0.25 mg/mL 胰酶的线粒体分离试剂悬浮碎组织块,加入清蛋白液至终浓度 10 mg/mL 均匀混合,4℃离心机低速离心移去上清液,加入线粒体分离试剂冲洗组织碎片,Downee 匀浆器匀浆,4℃离心机低速离心 5 min。取上清液于另一离心管内,4℃离心机高速离心 10 min,移去上清液,沉淀物即为线粒体,-70℃保存待用。

### 1.3 荧光定量 PCR 检测 RBP4 mRNA 表达

用 TRIzol 试剂盒提取鼠肾线粒体总 RNA。参照逆转录试剂盒说明书,吸取 2 μL RNA 样品在 10 μL 体系中进行反转录反应。取反转录产物 1 μL 进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系为:5 μL 荧光定量染料 2×SYBR 荧光定量试剂、2 μL 引物(上下游各 1 μL)、2 μL Plus 反应液、1 μL cDNA。RBP4 上游引物序列为:5'-TGGTATGCCATCGCCAAA-3',下游引物序列为:5'-TCCCAGTTGCTCAGAAGA-3';内参 β-actin 上游引物序列为:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游引物序列为:5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'。扩增程序:95℃ 1 min 后,进行 95℃ 5 s,58℃ 5 s,72℃ 20 s,共 47 个循环。得到的 Ct 值以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 mRNA 表达水平。

### 1.4 Western blot 检测固醇调节蛋白-1c(SREBP-1c)、Netrin-1 和 RBP4 表达

提取总蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。每孔上样 50 μg 总蛋白,加等体积 2×加样缓冲液,100℃变性 5 min,60 V 电泳至样品进入分离胶,120 V 电泳 2 h,取出凝胶。将蛋白转移至硝酸纤维膜,3%脱脂奶粉稀释后的一抗 4℃孵育过夜,0.05% Tris 缓冲盐-Tween 溶液室温漂

洗后与 3% 脱脂奶粉稀释后的二抗 37 °C 摇动孵育 2 h, 充分洗涤后硝基四唑氮蓝 (NBT/BCIP) 染色试剂盒显示蛋白印迹条带。图像分析 (Quantity One 图像分析系统, BIO-RAD) 检测蛋白表达水平。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS23.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验。非参数相关采用 Spearman 相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 发育期各组仔鼠的肾功能指标比较

发育期同一时间点各组间比较, 同日龄的 CON 组与 SCH 组仔鼠血清肾素、血肌酐和 24 h 尿蛋白定量水平差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与同日龄 CON 组仔鼠比较, OH 组仔鼠血清肾素、血肌酐和 24 h 尿蛋白定量水平均增高, 其中 P14 时两组组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但 P35 时两组组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。发育期不同时间点各组组内比较, P14 时仔鼠血清肾素、血肌酐和 24 h 尿蛋白定量水平均显著低于 P35 时仔鼠 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组仔鼠肾功指标结果比较 ( $n = 20, \bar{x} \pm s$ )

组别	时间	血清肾素 (mmol/L)	血肌酐 ( $\mu\text{mol/L}$ )	24 h 尿蛋白 (mg)
OH 组	P14	5.84 ± 0.42	40.78 ± 3.49	12.05 ± 0.29
	P35	9.06 ± 0.32 <sup>ac</sup>	45.23 ± 2.28 <sup>ac</sup>	70.27 ± 1.64 <sup>ac</sup>
SCH 组	P14	5.48 ± 0.38	37.11 ± 2.52	11.48 ± 0.50
	P35	7.31 ± 0.26 <sup>bc</sup>	41.22 ± 2.64 <sup>bc</sup>	28.62 ± 0.64 <sup>bc</sup>
CON 组	P14	5.52 ± 0.34	37.80 ± 2.26	11.64 ± 0.52
	P35	6.07 ± 0.28 <sup>c</sup>	40.33 ± 2.06 <sup>c</sup>	27.50 ± 1.00 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 CON 组同时间比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 OH 组同时间比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.01$ , 不同时间组内比较。

### 2.2 各组仔鼠 SREBP-1c、Netrin-1 和 RBP4 的表达及相关分析

P14 和 P35 时, CON 组仔鼠 RBP4 的 mRNA 和蛋白表达均显著低于 OH、SCH 组仔鼠 ( $P < 0.05$ )。P14 时 SCH 组仔鼠 SREBP-1c 和 Netrin-1 蛋白表达与 OH 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 P35 时 SCH 组仔鼠 SREBP-1c 和 Netrin-1 蛋白表达显著低于 OH 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 1、2。OH 组 RBP4 表达分别与 SREBP-1c 和 Netrin-1 呈正相关 ( $P < 0.05$ )。

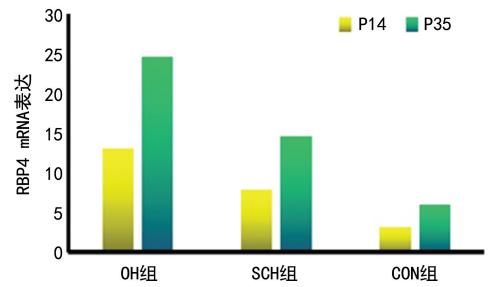


图 1 各组仔鼠 RBP4 mRNA 表达

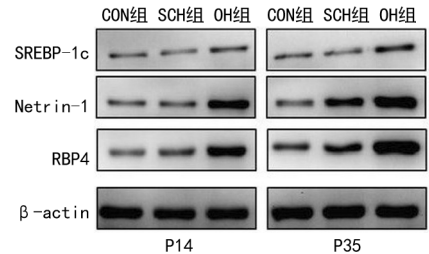


图 2 各组仔鼠 SREBP-1c、Netrin-1 和 RBP4 的表达

## 3 讨 论

妊娠期甲状腺功能减退对后代的影响是近年来妊娠内分泌领域的研究热点。已有研究表明, 妊娠对母体甲状腺功能和体积会产生重大影响, 主要表现为妊娠期间人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 对 TSH 受体的刺激作用导致 T4 和 T3 增加; 另一方面表现为妊娠期间甲状腺体积增大, 且甲状腺素和每天碘的需求量增加<sup>[10-11]</sup>。若孕前已经诊断为完全或亚临床型甲状腺功能减退的患者, 孕期甲状腺激素缺乏必将更严重。国外有学者<sup>[12-14]</sup>研究发现, 妊娠期甲状腺功能减退患者经使用左旋甲状腺素替代治疗后, 母代的血清肌酐水平通常可恢复正常, 但对后代肾脏线粒体功能的影响目前研究尚不明确, 这也是本课题组研究的重点。本研究发现, 无论 P14 还是 P35 时, 与同日龄 CON 组相比, SCH 组仔鼠的血清肾素、血肌酐和 24 h 尿蛋白定量水平差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而同日龄妊娠期 OH 组仔鼠的血清肾素、血肌酐和 24 h 尿蛋白定量水平高于 CON 组, 其中 P14 时两组组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但 P35 时两组组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果提示, 若母代甲状腺功能减退得不到有效控制, 那么随着病情的进行性加重, 子代可能出现肾脏功能损害。

甲状腺激素在胚胎发育过程中对肾脏起着重要作用。当机体内甲状腺激素水平持续降低时, 细胞膜上  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  泵的合成活性降低, 外周血管阻力增加, 靶器官或靶组织缺血, 当累及肾脏时, 肾血流量减少, 肾小球滤过率降低, 逐渐出现肾脏结构和功能损害, 临床上表现为肾功能异常或蛋白尿, 影响肾脏细胞膜的  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  转运体运转功能, 诱发电解质代谢紊乱。



若肾脏结构和功能发生改变,则反作用于甲状腺组织,甲状腺激素随尿液排出体外,促使甲状腺激素水平降低,诱发甲状腺功能减退。

线粒体是代谢性转化的重要节点,具有调控细胞生长和细胞周期的能力。在哺乳动物中,甲状腺激素是参与线粒体生物发生的最重要因素之一,可促进大多数线粒体蛋白编码基因的表达。另一方面,线粒体功能障碍可导致肾脏固有细胞损伤进而诱发细胞凋亡,同时加重肾脏的氧化应激损伤<sup>[15-16]</sup>。

新近研究发现,RBP4 由肝脏合成并释放入血,可自由经肾小球滤过,几乎全部被近曲小管重吸收,甲状腺功能减退患者血清和尿中 RBP4 水平均增高<sup>[7-8]</sup>,这与本研究结果相一致。本研究进一步观测妊娠期完全和亚临床甲状腺功能减退组仔鼠 RBP4 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果提示,无论 P14 还是 P35 时,CON 组仔鼠 RBP4 的 mRNA 和蛋白表达均显著低于 OH、SCH 组仔鼠。

WANG 等<sup>[17]</sup>研究发现,RBP-4 通过抑制线粒体融合蛋白-1 表达,增强线粒体分裂相关因子 Drp-1、Fis1 的表达,促进线粒体功能障碍的发生、发展。当线粒体功能障碍时,机体内基因编码的固醇调节分子蛋白-1c(SREBP-1c)的 mRNA 和蛋白表达水平增高,参与调节胆固醇合成和降解<sup>[18]</sup>,加重肾损伤。当肾损伤时,应激状态下的近曲小管过度表达 Netrin-1。Netrin-1 属于一种血管生成因子,对血管内皮细胞和血管平滑肌细胞起促进增殖、迁移及黏附作用。Netrin-1 过度表达不仅促进中枢神经系统血管新生,还可促进动脉血管及微血管形成,加速粥样硬化斑块进展<sup>[19]</sup>。

本研究发现,当妊娠期甲状腺功能减退时,子代 SREBP-1c 和 Netrin-1 的表达均明显上调,而且 OH 组 SREBP-1c 和 Netrin-1 的表达水平显著高于 SCH 组。进一步分析结果提示,RBP4 的表达水平分别与 SREBP-1c 和 Netrin-1 呈正相关。推测妊娠期甲状腺功能减退后代肾线粒体损害的可能发病机制是:RBP-4 表达升高预警肾脏线粒体损害,线粒体 SREBP-1c 表达上调,促使 Netrin-1 显著聚集在电势降低的线粒体中自我激活,加速粥样硬化斑块进展,加重肾脏固有细胞损伤,进而诱发细胞凋亡,促使肾脏发生氧化应激损伤。

综上所述,RBP4 可作为预测妊娠期甲状腺功能减退后代早期肾损害的重要因子,RBP4/SREBP-1c/Netrin-1 信号通路活化可能通过参与调节妊娠期甲状腺功能减退仔鼠肾脏脂质代谢和血管生成,调控肾脏线粒体功能代谢,但本研究尚缺乏临床实验数据佐

证妊娠期甲状腺功能减退后代肾脏线粒体损害的发病机制。

## 参考文献

- [1] ANDRADE L J, CRUZ T, DALTRO C, et al. Detection of subclinical hypothyroidism in pregnant women with different gestational ages [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2005, 49(6): 923-929.
- [2] NEELAVENI K, HARI K V S, RAKESH S, et al. Postpartum follow-up in women diagnosed with subclinical hypothyroidism during pregnancy [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2017, 21(5): 699-702.
- [3] SHAN Z Y, CHEN Y Y, TENG W P, et al. A study for maternal thyroid hormone deficiency during the first half of pregnancy in China [J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39(1): 37-42.
- [4] PERE B, JOSÉ L M, ASUNCIÓN S, et al. Delayed neurobehavioral development in children born to pregnant women with mild hypothyroxinemia during the first month of gestation: the importance of early iodine supplementation [J]. *Thyroid*, 2009, 19(5): 511-519.
- [5] FUKUSHIMA T, YOSHIHARA H, FURUTA H, et al. Nedd4-induced monoubiquitination of IRS-2 enhances IGF signalling and mitogenic activity [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6780.
- [6] FRANCESCA M, MICHELA S, SARA S, et al. Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 321(1): 113-122.
- [7] KOKKINOS S, PAPAZOGLU D, ZISIMOPOULOS A, et al. Retinol Binding Protein-4 and Adiponectin Levels in Thyroid Overt and Subclinical Dysfunction [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016, 124(2): 87-92.
- [8] SUN H X, JI H H, CHEN X L, et al. Serum retinol-binding protein 4 is associated with the presence and severity of coronary artery disease in patients with subclinical hypothyroidism [J]. *Aging*, 2019, 11(13): 4510-4520.
- [9] ESCOBAR-MORREALE H F, OBREGÓN M

- J, ESCOBAR R F, et al. Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(6):2828-2838.
- [10] ALEX S G, MARCOS A, ERIK A, et al. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum [J]. *Thyroid*, 2011, 21(10):1081-1125.
- [11] ERIK K A, ELIZABETH N P, GREGORY A B, et al. 2017 Guidelines of the American thyroid association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and the postpartum[J]. *Thyroid*, 2017, 27(3):315-389.
- [12] MOHEBBATI R, HOSSEINI M, HAGHSHE-NAS M, et al. The effects of Nigella Sativa extract on renal tissue oxidative damage during neonatal and juvenile growth in propylthiouracil-induced hypothyroid rat[J]. *Endocr Regul*, 2017, 51(2):105-113.
- [13] MAHDI E, MAHMOUD H, FARIMAH B, et al. Vitamin C improves liver and renal functions in hypothyroid rats by reducing tissue oxidative injury[J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 2020, 90(1-2):84-94.
- [14] KUDUGUNTI N, RAKESH S, HARI KUMAR K V S. Levothyroxine dosing after delivery in women diagnosed with hypothyroidism during pregnancy-a retrospective, observational study[J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2019, 23(2):238-241.
- [15] SONG W, GAO L L, ZHEN L L. Whole mitochondrial genome sequence and mutations of the hypertension model inbred rat strain (Murridae; Rattus)[J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2016, 27(2):1245-1246.
- [16] HOU Y J, LI S C, WU M, et al. Mitochondria-targeted peptide SS-31 attenuates renal injury via an antioxidant effect in diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 310(6):F547-559.
- [17] WANG J J, CHEN H G, LIU Y, et al. Retinol binding protein 4 induces mitochondrial dysfunction and vascular oxidative damage [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 240(2):335-344.
- [18] GAIPING W, KLAUS E, ROBERT R, et al. Sterol regulatory element-binding proteins are transcriptional regulators of the thyroglobulin gene in thyroid cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(8):994-1003.
- [19] JALALEDDINNE O B, WANG P, SIU K L, et al. Netrin-1 improves post-injury cardiac function in vivo via DCC/NO-dependent preservation of mitochondrial integrity, while attenuating autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2):277-289.

(收稿日期:2020-09-18 修回日期:2021-03-02)