

舒尼替尼用于对吉非替尼耐药的非小细胞肺癌的作用研究[△]

郭浩*, 赵科, 郭小彬, 杨宏昕[#] (内蒙古自治区人民医院药学处, 内蒙古呼和浩特 010017)

中图分类号 R979.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)01-0015-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.01.004

摘要 目的:探讨舒尼替尼用于对吉非替尼耐药的非小细胞肺癌的效果及其作用机制。方法:选取2017年1月至2019年1月内蒙古自治区人民医院收治的非小细胞肺癌患者75例,对其肿瘤组织进行切除,提取肿瘤细胞后进行原代培养,提取细胞总RNA并测定其纯度以及浓度。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测舒尼替尼对吉非替尼耐药的非小细胞肺癌细胞的增殖抑制作用;采用Western blot法检测舒尼替尼处理后对吉非替尼耐药细胞中的多药耐药(MDR)、核因子 κ B(NF- κ B)、血管内皮生长因子(VEGF)及血小板衍生生长因子(PDGF)蛋白表达水平。结果:1.5 μ mol/L的舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为(30.57 $\pm$ 1.86) μ mol/L,明显低于0 μ mol/L舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞的IC₅₀[(45.62 $\pm$ 1.79) μ mol/L];舒尼替尼可显著增加耐药细胞对吉非替尼的敏感性,可降低吉非替尼的IC₅₀;此外,舒尼替尼还可明显降低耐药细胞中的MDR、NF- κ B、VEGF及PDGF蛋白表达水平,其中PDGF蛋白表达水平降低44.38%,影响最为显著。结论:吉非替尼与舒尼替尼具有协同作用,舒尼替尼可逆转对吉非替尼耐药的非小细胞肺癌的疗效,为临床应用提供更多理论依据,其机制仍需进一步研究。

关键词 舒尼替尼; 吉非替尼; 非小细胞肺癌; 血小板衍生生长因子

Therapeutic Effects of Sunitinib on Gefitinib Resistant Non-Small Cell Lung Cancer[△]

GUO Hao, ZHAO Ke, GUO Xiaobin, YANG Hongxin (Dept. of Pharmacy, Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Inner Mongolia Hohhot 010017, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the clinical efficacy and mechanism of sunitinib on gefitinib resistant non-small cell lung cancer. **METHODS:** Seventy-five patients with non-small cell lung cancer admitted to Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital from Jan. 2017 to Jan. 2019 were extracted, and the patients' tumor tissues were resected. The cancer cells were extracted for primary culture, and the total cell RNA was extracted and its purity and concentration were determined. The inhibition of sunitinib on proliferation of gefitinib resistant non-small cell lung cancer cells was determined by MTT. Western blot was used to detect the levels of multi-drug resistant protein (MDR), transcription factor κ B (NF- κ B), vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) in gefitinib resistant cells treated with sunitinib. **RESULTS:** The IC₅₀ value of 1.5 μ mol/L sunitinib on gefitinib resistant cells was (30.57 $\pm$ 1.86) μ mol/L, significantly lower than that of IC₅₀ value of 0 μ mol/L sunitinib on gefitinib resistant cells [(45.62 $\pm$ 1.79) μ mol/L]. Sunitinib could significantly increase the sensitivity of resistant cells to gefitinib and reduce the IC₅₀ value of gefitinib. In addition, sunitinib also significantly reduced the expression levels of MDR, NF- κ B, VEGF and PDGF in resistant cells, with the most significant effects of 44.38% reduction in PDGF protein expression. **CONCLUSIONS:** Gefitinib and sunitinib have synergistic effect, which can reverse the efficacy of gefitinib resistant non-small cell lung cancer, and provide more theoretical basis for clinical application, and its mechanism still needs the further study.

KEYWORDS Sunitinib; Gefitinib; Non-small cell lung cancer; Platelet-derived growth factor

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)为肺癌常见类型之一,发病率约为80%,主要临床特点为恶性肿瘤细

胞增殖缓慢、转移扩散较晚^[1]。手术是治疗NSCLC的首选方法,但大多数NSCLC患者发现时已错过手术机会,NSCLC虽然对放疗敏感,但放疗后NSCLC的缓解率仅约15%~35%^[2]。近年来,靶向治疗成为肿瘤研究的热点,其中抗血管生成治疗广受关注,并被美国《科学》杂志评为“世界十大科技突破”^[3]。作为新型表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂,吉非替尼被广泛应

[△]基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(No. 2018LH08011)

* 副主任药师,博士。研究方向:临床药学。E-mail: guohao851@163.com

[#] 通信作者:主任药师。研究方向:药事管理。E-mail: ny1882@163.com

用于治疗 EGFR 外显子 19 缺失或外显子 21 点 (L858R) 缺失的患者,包括肺癌、卵巢癌^[4]、乳腺癌^[5]和结肠癌等^[6];约 80% 携带 EGFR 突变阳性的 NSCLC 患者经吉非替尼治疗后无进展生存期显著延长^[7]。随着化疗次数的增加,机体会对化疗药逐渐产生耐药性,降低临床疗效。因此,如何克服耐药性,提高肺癌患者化疗后的缓解率,是目前亟需解决的主要问题。查阅中国知网、万方数据库等发现,国内针对吉非替尼耐药的 NSCLC 患者临床治疗的相关研究较少,本研究针对这一现状探讨了舒尼替尼用于对吉非替尼耐药的 NSCLC 的作用,以期临床治疗 NSCLC 提供更可靠的理论依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源

随机选取 2017 年 1 月至 2019 年 1 月于内蒙古自治区人民医院就诊的 NSCLC 患者 75 例;其中男性 43 例,女性 32 例;平均年龄 (58.62±15.69) 岁;鳞癌 27 例,腺癌 48 例;肿瘤 ≥ 3 cm 的患者 19 例,肿瘤 < 3 cm 的患者 56 例;TNM 分期 I—II 期的患者 15 例,III—IV 期的患者 60 例。所有患者年龄、性别等临床资料比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。纳入标准:(1) 所有患者均经临床与病理检查证实为对吉非替尼耐药的 NSCLC 患者;(2) 所有患者均同意将手术切除的恶性肿瘤组织用于本研究,并签署知情同意书;(3) 所有患者的临床资料完整^[8-9]。排除标准:(1) 具有严重心脏、肝脏等重要脏器衰竭者;(2) 具有严重认知功能障碍,不能配合检查者;(3) 具有乙型肝炎等传染性疾病者。本研究已取得伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:经患者知情并同意后,对其肿瘤组织进行切除,提取恶性肿瘤细胞后进行原代培养。通过胶原酶与分散酶消化 30 min 后,以 1 000 r/min 离心 8 min,去上清液,用 0.25% 胰蛋白酶消化 10 min 后,以 1 000 r/min 离心 10 min,用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的完全培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。提取细胞总 RNA 并测定其纯度以及浓度。

1.2.2 吉非替尼和舒尼替尼以及吉非替尼联合舒尼替尼对细胞增殖率的影响:取对数生长期细胞以每孔 150 μl 接种于 96 孔板,细胞贴壁后,分别加入吉非替尼 (0、1.5、3、6、12 和 24 μmol/L)、舒尼替尼 (0、1.5、3、6、12 和 24 μmol/L) 以及舒尼替尼 (1.5 μmol/L) 联合不同浓度的吉非替尼 (0、1.5、3、6、12 和 24 μmol/L) 进行药物干预,对照组仅含有二甲基亚砜 (DMSO) 的溶剂;继续培养 72 h 后加入四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (5 g/L) 10 μl,37℃ 培养 4 h 后低速离心 10 min 吸弃上清液,再加入 DMSO 150 μl,充分振荡使沉淀充分溶解,用酶联免疫检测仪在波长 570 nm 处测定吸光度 (OD),实验重复 3 次。细胞生长抑制率 (%) = (实验组平均 OD - 空白组平均 OD) / (对照组平均 OD - 空白组平均 OD) × 100%,空白组为含有 0 μmol/L 舒尼替尼。采用直线回归方法计算药物的半数抑制浓度 (IC₅₀),实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 法检测:(1) 细胞总蛋白提取及定量。将不同处理后的细胞用胰酶消化后,以 6 000 r/min 低温离心

5 min 收集细胞,预冷磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤,重悬,再离心,重复 3 次后弃上清,加入含有 1% 蛋白酶抑制剂细胞裂解液,吹匀后冰上放置 15 min,以 14 000 r/min 低温离心 15 min,上清为总蛋白提取液,通过考马斯亮蓝法测定其浓度。(2) SDS-PAGE 凝胶电泳。取蛋白提取物约 50 μg,加入蛋白上样缓冲液,超纯水补足不足体积,总反应体系 30 μl,煮沸 5 min 后进行电泳。设置恒压 80 V (8 V/cm),当染料前沿进入分离胶 30 min 后,提高电压至 100~120 V (15 V/cm),继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部上方约 1 cm,然后关闭电源。(3) 将电泳产物转移至常规 PVDF 膜,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭液封闭过夜。血管内皮生长因子 (VEGF) (1:1 000)、血小板衍生生长因子 (PDGF) (1:1 000)、多药耐药 (MDR) (1:800) 以及核因子 κB (NF-κB) (1:800) 抗体 4℃ 孵育过夜,1:2 000 稀释的 HRP 标记的 II 抗室温孵育 1 h,用 TBST 洗 3 次,ECL 显色液显色。目的条带用 Image-Pro Plus 分析软件进行灰度值分析,以 β-actin 为内参照校正。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,用单变量分析方差进行数据比较,实验数据运用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, t 检验进行组间比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义,采用直线回归方法计算 IC₅₀。

2 结果

2.1 MTT 法检测舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞的增殖抑制作用

1.5 μmol/L 的舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞的增殖抑制率为 (16.78±1.21)%,细胞毒性较低,因此,后续选择 1.5 μmol/L 的舒尼替尼进行实验,见图 1。

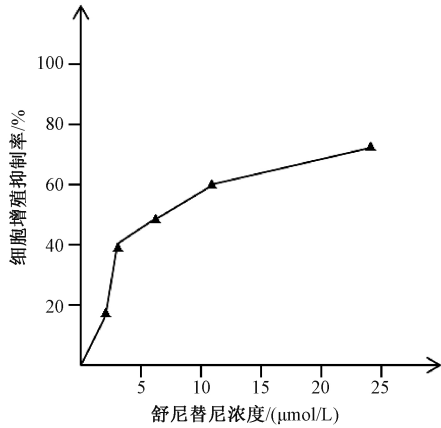


图 1 舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞增殖抑制作用
Fig 1 Inhibition effect of sunitinib on proliferation of gefitinib resistant cells

1.5 μmol/L 的舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞的 IC₅₀ 为 (30.57±1.86) μmol/L,显著低于 0 μmol/L 舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞的 IC₅₀ [(45.62±1.79) μmol/L],提示舒尼替尼可显著增加耐药细胞对吉非替尼的敏感性,降低吉非替尼抑制耐药细胞增殖的 IC₅₀,见图 2。

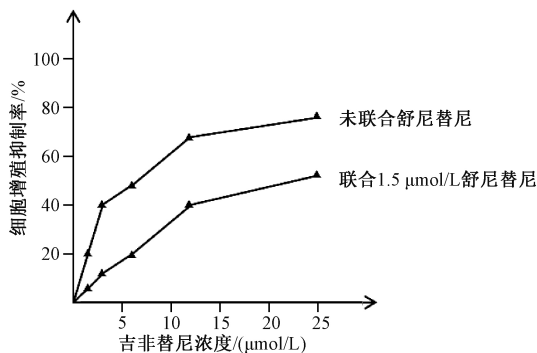


图2 舒尼替尼影响耐药细胞对吉非替尼的敏感性

Fig 2 Sensitivity of drug-resistant cells to gefitinib by sunitinib

2.2 Western blot 法蛋白测定

Western blot 法检测结果显示,1.5 μmol/L 舒尼替尼处理后的 MDR、NF-κB、VEGF 以及 PDGF 蛋白表达水平均有所降低,见图3。通过对灰度值的分析发现,上述4种蛋白中 PDGF 表达量降低 44.38%,影响最为显著,其次为 MDR (降低 32.51%);NF-κB 蛋白表达量受舒尼替尼的影响最小,见表1。

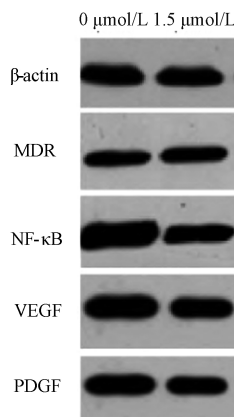


图3 舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞中 MDR、NF-κB、VEGF 及 PDGF 蛋白表达影响

Fig 3 Effects of sunitinib on expression of MDR, NF-κB, VEGF and PDGF in gefitinib resistant cells

表1 1.5 μmol/L 舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞中 MDR、NF-κB、VEGF 及 PDGF 蛋白表达的灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Gray value of sunitinib on MDR, NF-κB, VEGF and PDGF protein expression in gefitinib resistant cells ($\bar{x} \pm s$)

舒尼替尼浓度/ (μmol/L)	MDR 蛋白表 达量/(ng/μl)	NF-κB 蛋白 表达量/(ng/μl)	VEGF 蛋白 表达量/(ng/μl)	PDGF 蛋白 表达量/(ng/μl)
0	23.16±3.48	33.13±4.16	50.27±8.93	22.78±5.56
1.5	15.63±4.86	22.71±6.76	38.23±6.27	12.67±3.87
t	2.817	2.935	2.467	3.337
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

吉非替尼耐药包括原发性耐药和继发性耐药,其耐药机制主要与 EGFR 的二次突变、c-Met 扩增、代偿信号建立与调节因子表达改变和肿瘤微环境改变等相关^[10];其中,发生原发

性耐药的原因包括 K-ras 突变和 PTEN 功能丧失^[11]。有研究表明,NSCLC 发生 K-ras 突变常提示对于吉非替尼天然耐药,此外还可提示肿瘤预后不佳^[12]。对于 K-ras 突变诱发的肿瘤对吉非替尼天然耐药的原因,可能与该突变导致的 Erk 或 Akt 活化有关^[13]。舒尼替尼为一种新型小分子多靶点酪氨酸激酶抑制剂,能够抑制多种酪氨酸激酶,理论上讲,同时阻断 VEGF、PDGF 及其他多种酪氨酸激酶活性比单独阻断 1 种酪氨酸蛋白激酶活性的抗肿瘤效果更强^[14]。舒尼替尼在肾细胞癌和胃肠间质瘤的治疗中已显示出确切的抗肿瘤效应。魏长江等^[15]对比了舒尼替尼与帕尼单抗治疗晚期 NSCLC 的临床疗效,发现舒尼替尼组患者的治疗有效率、病情控制率、生活质量、无进展生存期和总体生存期均优于帕尼单抗组,但舒尼替尼易引发较为严重的不良反应。2007 年,美国临床肿瘤学会年会上发布了一项关于舒尼替尼联合吉非替尼治疗 31 例转移性肾细胞癌患者的 II 期临床研究的初步结果,提示舒尼替尼联合吉非替尼治疗转移性肾细胞癌具有较好的耐受性和临床有效性^[16]。

探讨舒尼替尼用于对吉非替尼耐药的 NSCLC 的临床疗效研究较少。郁莉等^[17]经研究发现,舒尼替尼可显著增加耐药细胞对吉非替尼的敏感性,降低吉非替尼的 IC₅₀。本研究在上述研究的基础上进一步发现,舒尼替尼对吉非替尼耐药细胞株中 PDGF 蛋白表达水平的影响最为显著,其次为 MDR、VEGF。众所周知,新血管的形成在肿瘤生长中发挥了关键作用,一些促血管形成因子可以促进肿瘤血管的形成。在生理或病理血管形成过程中,VEGF 具有重要的作用^[18]。PDGF 在其受体介导下发挥着强有丝分裂原的作用,还可以调节细胞外基质的合成及分解,是较为重要的血管形成因子。研究结果证实,NSCLC 组织分泌了大量的 PDGF-B、PDGFR-α,两者的阳性表达高达 85% 及以上,与正常的癌旁组织相比差异有统计学意义,说明 PDGF 信息传导通路组成部分有可能参与了 NSCLC 的发生、发展^[19]。本研究结果表明,舒尼替尼可能主要通过下调吉非替尼耐药细胞株中 PDGF 蛋白表达,从而增强细胞对吉非替尼的敏感性,但 PDGF 信号通路与肺癌细胞对吉非替尼耐药机制的关联性需要进一步研究。

本研究结果进一步证实了舒尼替尼与吉非替尼具有协同作用,舒尼替尼可显著增加吉非替尼耐药细胞的敏感性。其机制可能与舒尼替尼可以降低吉非替尼耐药细胞中 PDGF、MDR 以及 VEGF 蛋白表达相关,但需要进一步研究进行验证。本研究主要针对舒尼替尼对吉非替尼原发性耐药细胞进行研究,但在临床中大多数 NSCLC 患者属于继发性耐药,因此,对于舒尼替尼逆转 NSCLC 继发性吉非替尼耐药的研究更具有临床价值。

参考文献

- [1] 杨欣,林冬梅. 2015 版 WHO 肺癌组织学分类变化及其临床意义[J]. 中国肺癌杂志,2016,19(6):332-336.
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA

- Cancer J Clin, 2013, 63(1):11-30.
- [3] 代欣, 张大昕. 非小细胞肺癌抗血管生成治疗研究现状[J]. 实用肿瘤学杂志, 2017, 31(5):472-476.
 - [4] 桂玲, 王静, 祝爱珍, 等. 吉非替尼与紫杉醇联合对卵巢癌细胞凋亡影响的观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(2):106-109.
 - [5] 吴骥, 郑向欣, 顾书成, 等. 吉非替尼联合卡培他滨对复发转移三阴性乳腺癌的疗效分析[J]. 中华内分泌外科杂志, 2017, 11(5):369-372.
 - [6] 黄平, 王振奋, 蔡国豪. 干扰素- α 联合吉非替尼治疗晚期结肠癌的效果观察及预后评价[J]. 现代消化及介入诊疗, 2018, 23(6):750-753.
 - [7] Meng S, Wang G, Lu Y, et al. Functional cooperation between HIF-1 α and c-Jun in mediating primary and acquired resistance to gefitinib in NSCLC cells with activating mutation of EGFR[J]. Lung Cancer, 2018, 121:82-90.
 - [8] 胡茜, 潘博. 潘博运用肺癌方联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌验案1则[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(3):80-81.
 - [9] 吴自芳, 林晓溪, 韩建国. 吉非替尼一线治疗晚期非小细胞肺癌的疗效及不良反应观察[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(8):45-46.
 - [10] 赵佳, 陈建业, 汤建才. 非小细胞肺癌吉非替尼耐药机制及治疗研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(6):923-927.
 - [11] 唐玫艳. 吉非替尼联合培美曲塞和顺铂治疗非小细胞肺癌的临床疗效[J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(36):51-52.
 - [12] 谢阳. 吉非替尼联合放疗治疗非小细胞肺癌脑转移的效果及不良反应率观察[J]. 黑龙江中医药, 2019, 48(6):136-137.
 - [13] Kokubo Y, Gemma A, Noro R, et al. Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib[J]. Br J Cancer, 2005, 92(9):1711-1719.
 - [14] Yang Qj, Sun Xy, Guo M. The current situation of Sunitinib in treating non-small cell lung cancer[J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2012, 11(3):177-180.
 - [15] 魏长江, 茅怡铭, 秦元, 等. 帕尼单抗与舒尼替尼治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效比较[J]. 肿瘤药学, 2016, 6(6):437-441.
 - [16] Motzer RJ, Hudes GR, Ginsberg MS, et al. Phase I/II trial of sunitinib plus gefitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. Am J Clin Oncol, 2010, 33(6):614-618.
 - [17] 郁莉, 于振兰, 贾艳丽. 舒尼替尼对吉非替尼耐药的肺癌细胞的治疗效果及意义[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(3):244-248.
 - [18] Han KS, Raven PA, Frees S, et al. Cellular Adaptation to VEGF-Targeted Antiangiogenic Therapy Induces Evasive Resistance by Overproduction of Alternative Endothelial Cell Growth Factors in Renal Cell Carcinoma[J]. Neoplasia, 2015, 17(11):805-816.
 - [19] 魏东, 薛志芳, 刘博, 等. PDGF-B, PDGFR- α 在pN0期NSCLC癌组织中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2020, 26(1):35-38.

(收稿日期:2020-05-09)

(上接第14页)

- [3] 拜芳芳, 李保, 朱利军. 经皮冠状动脉介入术后患者心脏康复的现状和展望[J]. 中国临床保健杂志, 2015, 18(5):548-551.
- [4] 蒋承建, 郭航远, 池菊芳. 早期心脏康复在心血管学科建设中的地位[J]. 中国全科医学, 2017, 20(20):2427-2431.
- [5] 中华医学会心血管病学分会, 中国康复医学会心血管病专业委员会, 中国老年学学会心脑血管病专业委员会. 冠心病康复与二级预防中国专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2013, 41(4):267-275.
- [6] Cao RY, Zheng H, Mi Q, et al. Aerobic exercise-based cardiac rehabilitation in Chinese patients with coronary heart disease: study protocol for a pilot randomized controlled trial[J]. Trials, 2018, 19(1):363.
- [7] 中华中医药学会心血管病分会. 冠心病稳定型心绞痛中医诊疗指南[J]. 中医杂志, 2019, 60(21):1880-1890.
- [8] 何庆勇, 王阶, 朱明军, 等. 基于冠心病心绞痛患者报告的临床结局评价量表的科学性考评[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5):1138-1142.
- [9] 许军, 胡敏燕, 杨云滨, 等. 健康测量量表SF-36[J]. 中国行为医学科学, 1999(2):70-72.
- [10] 方显明. 冠心病介入术后的中医药康复治疗述评[J]. 广西中医学院学报, 2009, 12(3):58-60.
- [11] 李瑞洁, 李宝寅, 秦雷. 心脏康复综合管理对年轻冠心病PCI术后患者运动耐力的影响[J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(5):249-250.
- [12] 梁爱萍. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者经皮冠状动脉介入治疗后心脏康复治疗的效果[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(7):561-563.
- [13] 李海霞, 商秀洋, 李军, 等. 国内外心脏康复发展模式及展望[J]. 中国心血管病研究, 2016, 14(10):865-867.
- [14] 邵利辉, 王艳娟, 李敏, 等. PCI术后早期康复对冠心病患者心脏康复的作用研究[J]. 心血管康复医学杂志, 2019, 28(5):571-575.
- [15] 邓历敏, 阮贵云, 罗飞, 等. 冠心病患者心脏康复研究进展[J]. 心血管病学进展, 2016, 37(5):521-524.
- [16] 聂道芳, 蒋戈利, 刘文红, 等. 试述中医心脏康复的内涵及优势[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(2):36-39.
- [17] 毕颖斐, 毛静远, 郑颖, 等. 中医及中西医结合心脏康复发展现状[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(14):1616-1618.
- [18] 张杰, 郭航远, 池菊芳. 中西医结合在心脏康复中的优势分析[J]. 中国全科医学, 2019, 22(12):1392-1395.
- [19] 徐丹萍. 基于循证的中西医结合心脏康复模式实践[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 36(7):609-612.
- [20] 郝世杰, 毕鸿雁, 刘西花, 等. 中西医结合心脏康复的现状与研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(23):2989-2991.

(收稿日期:2020-07-15)