

miR-181a/b 靶向抑制多种抗凋亡蛋白表达对肺癌细胞顺铂耐药的影响

房 栋¹, 徐 静², 朱 伟², 周 鑫², 张红光³, 束永前^{2*}

(¹ 镇江市第二人民医院血液肿瘤科, 江苏 镇江 212000; ² 南京医科大学第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029; ³ 镇江市第三人民医院肿瘤科, 江苏 镇江 212000)

[摘要] 目的: 研究 miR-181a/b 在肺癌细胞顺铂耐药形成中的作用。方法: 运用 miRNA 实时定量 PCR 方法检测 miR-181a/b 在肺癌顺铂耐药细胞 A549/CDDP 与母代 A549 细胞中的表达差异, 运用 Western blot 检测 A549/CDDP 细胞与母代细胞抗凋亡蛋白 BCL2、MCL1 和 XIAP 的表达差异, 分别构建 BCL2、MCL1 和 XIAP 的 3'UTR 荧光素酶报告质粒验证 miR-181a/b 的靶基因, 在耐药细胞中瞬时转染 miR-181a/b 模拟物以检测上调 miR-181a/b 对 A549/CDDP 细胞中 BCL2、MCL1 和 XIAP 蛋白表达及耐药性的影响, 并运用流式细胞术检测转染后耐药细胞对 CDDP(Cisplatin, 顺铂)诱导凋亡的影响。结果: 在 A549/CDDP 细胞中 miR-181a/b 均呈低表达, 而抗凋亡蛋白 BCL2、MCL1 和 XIAP 则呈高表达, 荧光素酶报告实验证实 BCL2、MCL1 和 XIAP 是直接受 miR-181a/b 调控的靶基因, 在耐药细胞中上调 miR-181a/b 显著抑制 BCL2、MCL1 和 XIAP 蛋白表达水平, 显著增加耐药细胞对顺铂的敏感性, 并显著增加耐药细胞对顺铂诱导的凋亡。结论: miR-181a/b 靶向抑制多种抗凋亡蛋白表达可显著增加 A549/CDDP 细胞对顺铂的敏感性。

[关键词] miR-181a/b; 顺铂耐药; BCL2; MCL1; XIAP

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1690-06

miR-181a/b modulates cisplatin resistance of human lung cancer cell by targeting multiple anti-apoptosis genes

FANG Dong¹, XU Jing², ZHU Wei², ZHUO Xin², ZHANG Hong-guang³, SHU Yong-qian^{2*}

(¹Department of Hematology and Oncology, Zhengjiang 2nd People's Hospital, Zhengjiang 212000; ²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Oncology, Zhengjiang 3rd People's Hospital, Zhengjiang 212000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible role of miR-181a/b in the development of cisplatin resistance in human lung cancer cell line A549/CDDP. **Methods:** Using quantitative real-time PCR analysis for miRNA and Western blot to detect the expression of miR-181a/b and anti-apoptotic protein BCL2, MCL1 and XIAP in cisplatin resistant human lung cancer cell line A549/cisplatin (CDDP) and its parental A549 cell, respectively. The luciferase reporter plasmids carried 3'-untranslated region of BCL2, MCL1 and XIAP were constructed to testify the target genes of miR-181a/b, respectively. Using transient transfection of miR-181a/b to mimic the up-regulation of miR-181a/b in A549/CDDP cells and observe the effect of miR-181a/b on the expression level of BCL2, MCL1, XIAP and cisplatin resistance phenotype. Using flow cytometry to detect CDDP-induced apoptosis of the A549/CDDP cells after the transfection. **Results:** miR-181a/b was down-regulated in cisplatin-resistant human lung cancer cell line A549/CDDP, the down-regulation of miR-181a/b was concurrent with the over-expression of its targeted anti-apoptotic genes BCL2, MCL1 and XIAP in A549/CDDP cells, compared to the parental A549 cell line. The luciferase activity of BCL2, MCL1 and XIAP 3'-untranslated region-based reporters construct in A549/CDDP cells suggested that BCL2, MCL1 and XIAP were the common target genes of the miR-181a/b. Over-expression of miR-181a/b sensitized A549/CDDP cells to CDDP. Overexpression of miR-181a/b also inhibited the expression of BCL2, MCL1 and XIAP and sensitized A549/CDDP cells to CDDP-induced apoptosis. **Conclusion:** miR-181a/b could enhance the sensitivity of cisplatin in human lung cancer cell line A549/CDDP, at least in part, by modulation of apoptosis via targeting multiple anti-apoptosis genes.

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30840095)

*通讯作者, E-mail: shuyongqian@csc.org.cn

[Key words] miR-181a/b; cisplatin resistance; BCL2; MCL1; XIAP

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1690-1695]

肿瘤耐药的出现是治疗肿瘤的重大障碍,是导致临床治疗失败的主要原因之一,研究肿瘤细胞耐药的产生机制和探索逆转耐药的途径是肿瘤研究领域的一个重要方向^[1]。microRNA(miRNA)作为近年来生命科学领域的重要发现,在调节基因表达中发挥重要作用,它通过不完全互补配对识别特定的目标 mRNA,并使目标 mRNA 降解或抑制其翻译,从而下调目标基因的蛋白表达水平^[2]。近年来,miRNA 介导肿瘤耐药的研究进展迅速,给肿瘤耐药机制的研究和逆转耐药途径的探索提供了新的契机。研究显示在人多种肿瘤细胞中上调或下调某些 miRNA,可部分逆转肿瘤细胞的耐药表型并增加化疗药物诱导的凋亡,提示 miRNA 作为转录后调控的重要因子,可能广泛参与了各种不同组织来源的恶性肿瘤细胞的耐药^[3-4]。顺铂作为肺癌治疗的基本用药,价格低廉,疗效确切,在肺癌化疗中具有较高的地位,本实验通过研究 miR-181a/b 靶向抑制多种抗凋亡蛋白 BCL2、MCL1 和 XIAP 表达对肺癌 A549/CDDP 细胞顺铂耐药性的影响,旨在探索 miR-181a/b 调控肺癌顺铂耐药性的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺癌细胞 A549 和顺铂耐药细胞 A549/CD-DP(上海爱丁堡生物科技发展有限公司)。RPMI1640 培养基、小牛血清(Gibco 公司,美国);MTT、DMSO(Sigma 公司,美国);CDDP(南京先声药业)。miR-181a/b 模拟物(上海吉玛制药技术有限公司)。转染试剂脂质体 2000(Invitrogen 公司,美国)。has-miR-181a/b TaqMan[®] MicroRNA Assays 和 U6 TaqMan[®] MicroRNA Assays 及 TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 和 TaqMan Universal PCR Master Mix(ABI 公司,美国);7300HT 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司,美国)。荧光素酶报告试剂盒(Promega 公司,美国),BCL2、MCL1 和 XIAP 3'UTR 荧光素酶报告质粒(南通百奥迈科生物技术公司构建)。BCL2、MCL1、XIAP、 β -actin、 α -Tubulin 和 GAPDH 抗体分别购自美国 Bioworld、Cell Signal、Santa Cruz 公司。ANNEXIN V-FITC 凋亡检测试剂盒(Millipore 公司,美国)。流式细胞仪(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

A549 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中。A549/CDDP 长期培养于含 4 μ g/ml CDDP 和 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,于 5%CO₂, 37℃ 温箱中常规培养,0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 miR-181a/b 在 A549 和 A549/CDDP 细胞中的差异表达

RIPA 裂解液抽提细胞总 RNA,使用 ABI 公司的 TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 进行反转录,所有操作在冰上完成。总反应体系为 15 μ l: 100 mmol/L dNTPs 0.15 μ l, MultiScribe[™] Reverse Transcriptase 1.00 μ l, 10 \times Reverse Transcription Buffer 1.50 μ l, RNase Inhibitor 0.19 μ l, Nuclease-free water 4.16 μ l, has-miR-181a/b 或 U6 5 \times RT Primer 3 μ l, RNA sample 5 μ l。反应条件为 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min。反转录完成后,取样本 cDNA 1.33 μ l, 加入 has-miR-181a/b 或 U6 20 \times Real Time 1 μ l, TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix 10 μ l, Nuclease-free water 7.67 μ l, 总反应体系为 20 μ l。设置反应条件为 95℃ 10 min, 95℃ 15 s 及 60℃ 1 min, 共 40 个循环。反应结束后分析 PCR 反应曲线,得到 Ct 值,即荧光达到阈值所需的 PCR 循环数。PCR 完成后,在 ABI 7300 System SDS Software 1.3.1.21 软件上分析,查看每个基因的扩增情况,记录相应的 Ct 值。计算方法: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{A549/CDDP} - \Delta Ct_{A549}$, $\Delta Ct = Ct_{miR-181a/b} - Ct_{U6 snRNA}$, miR-181a/b 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算^[5]。

1.2.3 体外药物敏感性实验

A549/CDDP 细胞以每孔 6×10^5 个细胞数铺板,细胞贴壁 24 h 后,每孔转染 100 nmol/L miR-181a/b 模拟物或 100 nmol/L miRNA 模拟物阴性对照,细胞转染 12 h 后,以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板,12 h 后,参照 CDDP 的血浆高峰浓度(2.0 μ g/ml)的 0.01、0.10、1.00 和 10 倍分别加入不同浓度的药物。培养 48 h 后,每孔加新鲜配制 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μ l 下继续培养 4 h。终止培养,小心吸弃孔内培养上清。每孔加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解;选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值,运用 SPSS 软件计算转染后细

胞对顺铂的 IC₅₀^[5]。

1.2.4 荧光素酶实验

A549/CDDP 细胞以 1.5×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 200 ng BCL2、MCL1 或 XIAP 3'UTR 荧光素酶报告质粒, 80 ng 海肾内参质粒加 60 pmol miR-181a/b 模拟物或 60 pmol miRNA 模拟物阴性对照共转染 A549/CDDP 细胞, 24 h 后检测荧光素酶活性差异^[5]。

1.2.5 Western blot 实验

细胞转染 72 h 后, 蛋白裂解液抽提总蛋白, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 以 β -actin 或 α -Tubulin 为内参, 检测 A549/CDDP 细胞与母代 A549 细胞抗凋亡蛋白 BCL2、MCL1 和 XIAP 的表达差异, 以及转染 miR-181a/b 72 h 后 BCL2、MCL1 和 XIAP 的表达差异。运用 ImageJ 软件对图像进行灰度扫描, 以备统计分析^[5]。

1.2.6 ANNEXIN V-FITC 凋亡检测实验

细胞转染 24 h 后, 加入 CDDP 使其终浓度达 20 μ g/ml, 继续培养 48 h 后, 消化细胞, 加入 ANNEXIN V-FITC 检测试剂, 流式细胞仪检测 Annexin V-FITC-positive-PI-negative 细胞比例, 以备统计分析^[5]。

1.3 统计学方法

每组实验至少重复 3 次, 每次实验至少重复 3 个复孔, 由 SPSS11.0 统计软件处理, 用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 独立样本间比较用 *t* 检验^[5]。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

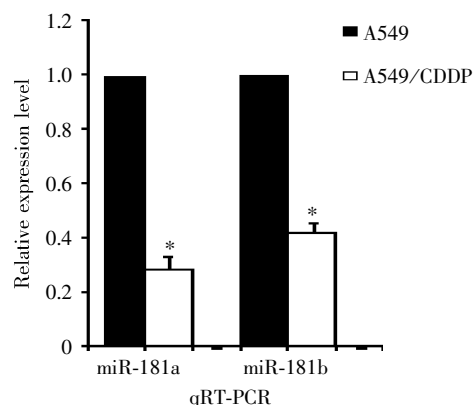
2 结果

2.1 miR-181a/b、BCL2、MCL1 和 XIAP 在 A549/CDDP 细胞中的表达

实时荧光定量 PCR 显示与母代 A549 细胞相比, miR-181a/b 在 A549/CDDP 细胞中呈显著低表达, 下调倍数分别为 (3.5 ± 0.2) 、 (2.4 ± 0.1) 倍 ($P < 0.01$, 图 1), Western blot 显示与母代 A549 细胞相比, 抗凋亡蛋白 BCL2、MCL1 和 XIAP 在 A549/CDDP 细胞中呈显著高表达, 上调倍数分别为 (1.7 ± 0.1) 、 (1.8 ± 0.2) 、 (1.8 ± 0.1) 倍 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.2 上调 miR-181a/b 对耐药细胞顺铂敏感性影响

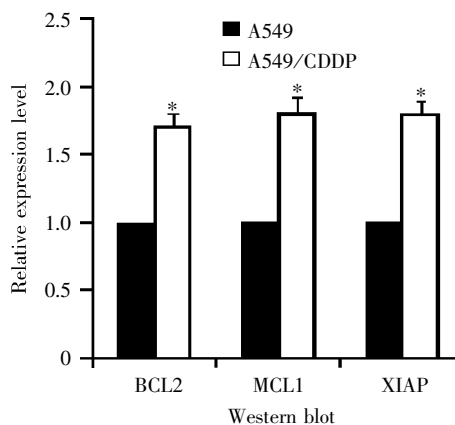
体外药敏试验显示, 转染 miR-181a/b 模拟物的实验组对顺铂的 IC₅₀ 显著低于转染 miRNA 模拟物阴性对照的实验组, 转染 miR-181a/b 模拟物的实验组对顺铂的 IC₅₀ 分别为: (8.1 ± 0.3) μ g/ml、 (7.2 ± 0.6) μ g/ml; 转染 miRNA 模拟物阴性对照的实验组



与 A549 细胞比较, * $P < 0.01$ 。

图 1 miR-181a/b 在 A549/CDDP 细胞中的表达

Figure 1 miR-181a/b was significantly down-regulated in A549/CDDP cell line



与 A549 细胞比较, * $P < 0.01$ 。

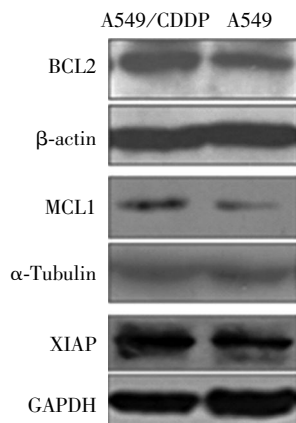


图 2 抗凋亡蛋白 BCL2、MCL1 和 XIAP 在 A549/CDDP 细胞中的表达

Figure 2 The anti-apoptotic protein BCL2, MCL1 and XIAP were significantly up-regulated in A549/CDDP cells

对上述药物的 IC₅₀ 为: (17.5 ± 0.5) μ g/ml ($P < 0.01$, 图 3)。

2.3 BCL2、MCL1 和 XIAP 是 miR-181a/b 调控的靶基因

与转染 miRNA 模拟物阴性对照的实验组相比,转染 miR-181a/b 模拟物的实验组,BCL2、MCL1 或 XIAP 3'UTR 荧光素酶报告质粒活性均呈显著降低,降低倍数分别为:(2.1 ± 0.4)、(2.2 ± 0.3)、(1.9 ± 0.2)倍和(2.6 ± 0.6)、(2.3 ± 0.5)、(2.5 ± 0.6)倍,提示 BCL2、MCL1 和 XIAP 均是直接受 miR-181a/b 调控的靶基因($P < 0.01$,图 4)。

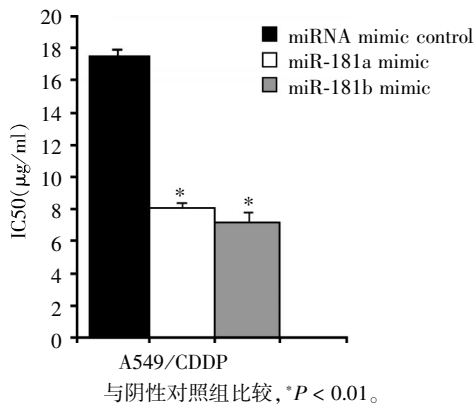


图 3 体外药敏试验检测转染 miR-181a/b 对肺癌 A549/CD-DP 细胞对顺铂的敏感性的影响

Figure 3 *In vitro* drug sensitivity assay showed that miR-181a/b sensitized A549/CDDP cell line to cisplatin

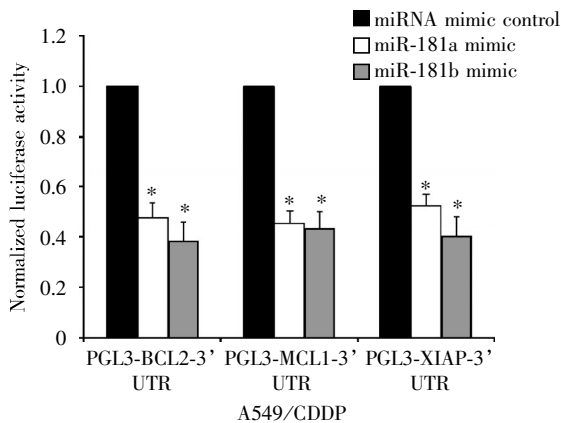
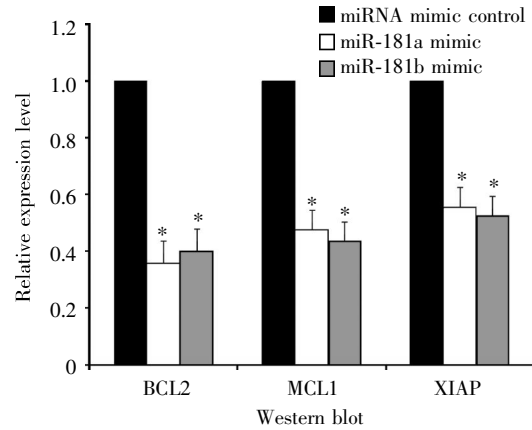


图 4 荧光素酶报告实验检测 BCL2、MCL1 和 XIAP 基因表达
Figure 4 Dual luciferase assay performed in A549/CDDP cells suggested that BCL2、MCL1 and XIAP were the common target genes of the miR-181a/b

2.4 上调 miR-181a/b 对 BCL2、MCL1 和 XIAP 蛋白表达水平的抑制作用

细胞转染 72 h 后,Western blot 显示转染 miR-181a/b 模拟物的实验组 BCL2、MCL1 和 XIAP 蛋白表达水平显著低于转染 miRNA 模拟物阴性对照的

实验组,下调倍数分别为:(2.8 ± 0.2)、(2.1 ± 0.1)、(1.8 ± 0.1)倍和(2.5 ± 0.2)、(2.3 ± 0.1)、(1.9 ± 0.1)倍($P < 0.01$,图 5)。



与阴性对照组比较,* $P < 0.01$ 。

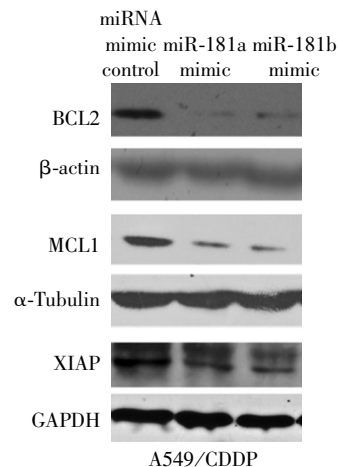


图 5 Western blot 检测转染 miR-181a/b 对 A549/CDDP 细胞中 BCL2、MCL1 和 XIAP 蛋白表达水平的影响

Figure 5 miR-181a/b significantly down-regulated the expression level of BCL2、MCL1 and XIAP in A549/CDDP cells

2.5 上调 miR-181a/b 对耐药细胞顺铂诱导凋亡的影响

流式细胞仪检测显示,转染 miR-181a/b 模拟物的实验组对 CDDP 诱导的凋亡率 [($17.8 \pm 1.0\%$)、($16.1 \pm 1.4\%$)]显著高于于转染 miRNA 模拟物阴性对照的实验组($8.1 \pm 0.8\%$)($P < 0.01$,图 6)。

3 讨论

肿瘤耐药可分为原发性耐药和获得性耐药,临床常见恶性肿瘤对化疗的耐药多属获得性耐药,是长期应用药物诱导的结果。目前有研究显示,肿瘤原发性耐药与基因遗传学水平的变异密切相关,而肿

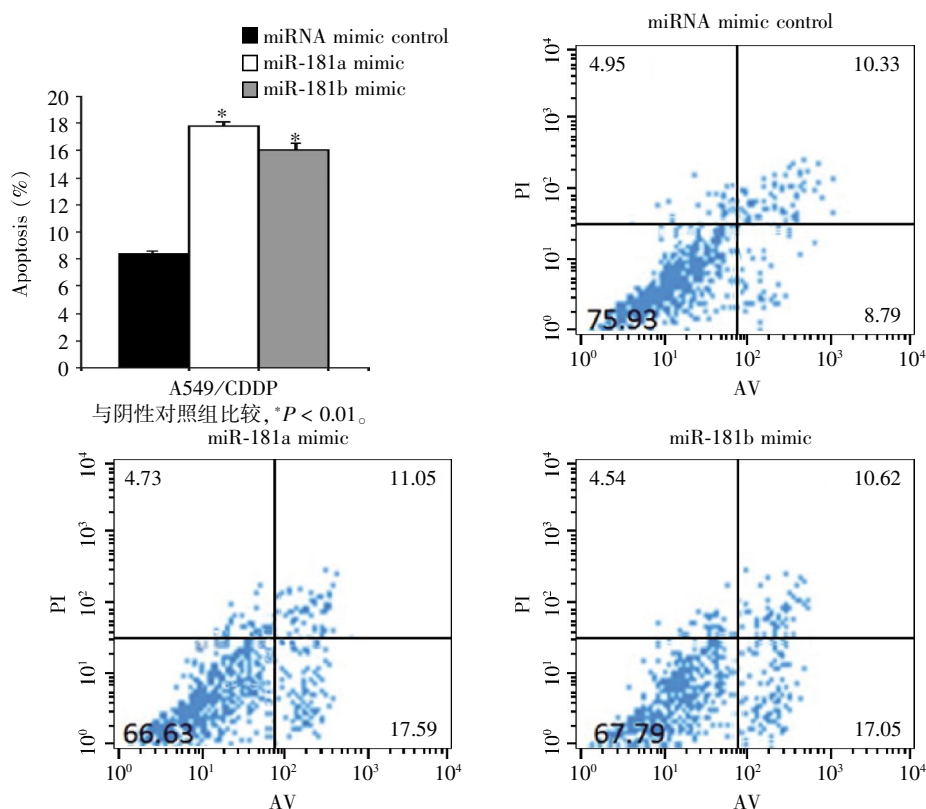


图 6 流式细胞仪检测转染 miR-181a/b 对 A549/CDDP 对 CDDP 诱导凋亡的影响

Figure 6 miR-181a/b sensitized A549/CDDP cells to CDDP-induced apoptosis

瘤获得性耐药与基因表观遗传学水平的变异密切相关^[6]。表观遗传学不涉及 DNA 序列改变,主要通过 DNA 位点甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 调控三个方面调控基因的表达,为肿瘤细胞在药物的选择压力下提供了一种更高效节能的适应模式^[7]。

miRNA 属于非编码 RNA 的重要类型,通过转录后调控机制广泛参与了各种生命活动过程。近年来研究表明,miRNA 表达异常可通过靶向调控药物外排泵分子、细胞周期蛋白或凋亡调节蛋白等不同途径介导肿瘤细胞的耐药,对异常表达的 miRNA 进行干预可部分改变肿瘤细胞的耐药表型,如:在人乳腺癌耐药细胞中,上调 miR-451 靶向调控 P 糖蛋白(一种 ATP 依赖的药物外排泵)进而下调其蛋白水平,可增加人耐阿霉素乳腺癌细胞对阿霉素的敏感性^[8];miR-221/222 的高表达抑制其靶蛋白 p27/Kip1(一种细胞周期抑制因子)表达与人乳腺癌细胞它莫西芬耐药有关^[9];在人胃癌耐药细胞中,miR-15b/16 表达下调,上调上述 miRNAs 靶向调控抗凋亡蛋白 BCL2 进而下调其蛋白水平,可部分逆转胃癌细胞的耐药表型^[10]等。

人 miR-181a/b 的基因(MIR181A1/B1、MIR181A2/B2)在基因组上存在 2 个定位,分别位于 1 号染

色体(1q32.1)和 9 号染色体(9q33.3),miR-181a/b 最早的功能学研究显示其与小鼠造血系统的发育和分化有关,在造血细胞的成熟过程中,miR-181a/b 的表达呈逐渐升高趋势^[11]。随着研究的深入,发现 miR-181a/b 在多种肿瘤组织中的表达存在异常,既有作为癌基因的报道,也有作为抑癌基因的报道,目前,诸多文献显示 miR-181a/b 对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响存在明显的组织特异性,如:lliopoulos 等^[12]研究认为,STAT3 可激活 miR-181b-1 而非 miR-181b-2 的表达,进而促进并维持多种组织来源上皮细胞的恶性转化;Ji 等^[13]发现,miR-181b 在一种肝癌干细胞中表达显著升高,并可在一定程度上维持其干细胞特性;而 Fanini 和 Shi 等^[14-15]的研究则显示,miR-181a/b 可显著促进白血病和脑胶质瘤细胞的凋亡以及对化疗药物的敏感性。本研究与后者一致,miR-181a/b 在人肺癌顺铂耐药细胞中呈显著低表达,上调 miR-181a/b 可靶向抑制多种抗凋亡蛋白表达,从而显著增加肺癌耐药细胞对顺铂的敏感性。BCL2 和 MCL1 同属于凋亡相关蛋白 BCL2 家族成员,该家族中抗凋亡和促凋亡成员协同作用,参与调节线粒体凋亡途径,抗凋亡蛋白如 BCL2、MCL1 等平时被隔离在线粒体等细胞器内抑制促凋亡因子的释

放,具有抑制细胞凋亡的功能。而 XIAP 属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis, IAP)家族成员,该家族成员亦广泛参与线粒体凋亡途径的调节。凋亡抵抗是肿瘤细胞耐药的重要机制之一,miR-181a/b 正是通过抑制多种线粒体凋亡途径蛋白的表达,从而降低肺癌耐药细胞对药物诱导凋亡的抵抗而部分逆转其耐药表型。然而,miR-181a/b 这种在不同组织来源的恶性肿瘤细胞中的差异功能可能与 miRNA 本身靶基因的多样性有关,其在不同细胞中的功能可能取决于所有不同功能的靶基因的综合表达水平。此外,由于 miR-181a/b 在基因组上存在两个位点,其组织特异性,亦可能与不同位点的上游调控机制存在差异有关,因此,对 miR-181a/b 在肺癌耐药细胞中表达调控的上游机制仍需进一步挖掘和探索。

[参考文献]

- [1] 樊代明. 肿瘤研究前沿(第6卷)[M]. 西安:第四军医大学出版社,2006:15-20
- [2] Lee C, Feinbaum L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5):843-854
- [3] Zheng T, Wang J, Chen X, et al. Role of microRNA in anticancer drug resistance [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(1): 2-10
- [4] Hummel R, Hussey DJ, Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(2):298-311
- [5] Zhu W, Shan X, Wang TS, et al. miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(11):2520-2529
- [6] Lippert TH, Ruoff HJ, Volm M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure [J]. *Arzneimittelforschung*, 2008, 58(6):261-264
- [7] Sharma SV, Lee DY, Li B, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations [J]. *Cell*, 2010, 141(1):69-80
- [8] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7):2152-2159
- [9] Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27 (Kip1) [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(44): 29897-29903
- [10] Xia L, Zhang D, Du R. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(2):372-379
- [11] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. *Science*, 2004, 303(5654):83-86
- [12] Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, et al. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer [J]. *Mol Cell*, 2010, 39(4):493-506
- [13] Ji J, Yamashita T, Budhu A, et al. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells [J]. *Hepatology*, 2009, 50(2):472-480
- [14] Fanini F, Vamini I, Faabri M. MicroRNAs: tiny players with a big role in the pathogenesis of leukemias and lymphomas [J]. *Hematol Rev*, 2009, 1(1):40-45
- [15] Shi L, Cheng Z, Zhang J, et al. Hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells [J]. *Brain Res*, 2008, 1236:185-193

[收稿日期] 2012-04-29