

· 基础研究 ·

致病大鼠海马谷氨酸及 γ -氨基丁酸在痫性发作后含量变化规律

曾春梅¹,雷丹青²,孙兰凤¹,韦 雷¹,何 敏¹,吴 原^{1*}

¹广西医科大学第一附属医院神经内科,广西 南宁 530021;²广西医科大学生命科学研究院医学科学实验中心,广西 南宁 530021

[摘要] 目的:通过检测戊四氮(pentrazole, PTZ)致病大鼠海马谷氨酸(glutamic amino acid, Glu)及 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric amino acid, GABA)在痫性发作后30 min内的含量变化,研究癫痫的终止机制。方法:通过PTZ皮下注射建立SD雄性大鼠急性痫性发作模型,当大鼠痫性发作达IV~V级时,分别于发作时(立即)及发作后5、10、15、20、25、30 min处死大鼠,断头取海马,采用高效液相色谱法检测海马组织Glu与GABA含量。生理盐水皮下注射作为正常对照组。结果:痫性发作达到IV~V级时,0、5、10、15、20、25 min组海马组织Glu含量较正常对照组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),之后开始下降,30 min组Glu含量与正常对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);海马组织中GABA含量在5 min时显著增高($P < 0.05$),随后开始下降,10 min时下降至最低,在15 min时再次缓慢升高,持续至25 min时达到高峰($P < 0.05$),之后开始下降。结论:痫性发作后Glu与GABA含量存在随时间变化的规律,Glu与GABA之间达到动态平衡,是癫痫发作终止的原因之一。

[关键词] 痫性发作;谷氨酸; γ -氨基丁酸;海马;高效液相色谱法

[中图分类号] R742.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)11-1571-05

doi:10.7655/NYDXBNS20191104

Changes of glutamic acid and γ -aminobutyric amino acid content in hippocampus of epileptic rats after epileptic seizure

Zeng Chunmei¹, Lei Danqing², Sun Lanfeng¹, Wei Lei¹, He Min¹, Wu Yuan^{1*}

¹Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021;

²Experimental Center of Life Sciences Institutes, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective:** To observe the changes of glutamic amino acid (Glu) and γ -aminobutyric amino acid (GABA) content in the hippocampus of rats in 30 minutes after an epileptic seizure induced by pentrazole (PTZ), and explore the termination mechanism of epilepsy. **Methods:** Acute epileptic seizures model of SD male rats were induced by PTZ kindling. The model rats were killed immediately or 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes later when the epileptic seizures occurred and reached the level of IV~V. The heads of the rats were cut and the hippocampuses were taken out for detections of the Glu and GABA contents in the hippocampus using high performance liquid chromatography. A normal control group was established via normal saline hypodermic injection. **Results:** Compared to the normal control group, the levels of Glu content in the hippocampal tissues were higher ($P < 0.05$) in the model rats 0, 5, 10, 15, 20 or 25 minutes after the epileptic seizure reached the level of IV~V symptoms, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The Glu content in the 25 min group indicated the peak value, followed by a decline. The Glu content has no significantly difference between the 30 min group and the normal control group ($P > 0.05$). The level of GABA content rose significantly in the 5 min group ($P < 0.05$), and subsequently began to decline, it came to the minimum value in the 10 min group, but began to rise slowly and progressively in the 15, 20 and 25 min group, and to reach its peak ($P < 0.05$), then followed by a decline. **Conclusion:** The research reveals the change rules of Glu and GABA contents over the time after epileptic seizure, and a dynamic balance between the Glu and GABA contents is one of the factors that lead to the termination of epilepsy.

[Key words] epileptic seizure; glutamic amino acid; γ -aminobutyric acid; hippocampus; high performance liquid chromatography

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(11): 1571-1574, 1588]

[基金项目] 国家自然科学基金(81760242)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wuyuan90@126.com

癫痫是脑神经元过度同步化放电引起的短暂性脑功能障碍,是临床中一种常见的中枢神经系统综合征。癫痫发作与终止,与兴奋性氨基酸类神经递质与抑制性氨基酸类神经递质之间比例失调有关,兴奋性氨基酸类神经递质以谷氨酸(glutamic amino acid, Glu)为代表,抑制性氨基酸类神经递质以 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric amino acid, GABA)为代表。有研究指出,导致癫痫反复发作的直接原因可能是Glu与GABA比例失衡^[1],Glu与GABA含量变化介导了癫痫的发生与终止,因此,观察Glu与GABA含量的具体变化情况及规律,对研究癫痫发生与终止机制具有重要意义。本研究拟通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测戊四氮(pentrazole, PTZ)致痫大鼠海马组织中Glu与GABA含量,研究Glu与GABA在痫性IV~V级发作后30 min内的含量变化规律,探讨癫痫发作的终止机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及建模

健康雄性SD大鼠,体重(152.33±12.69)g,由广西医科大学动物实验中心提供。正常对照组10只,给予等体积生理盐水皮下注射后无癫痫发作,无死亡,全部入组。其余97只大鼠参与造模,给予1%PTZ 80 mg/kg,用生理盐水稀释成10 mg/mL^[2],皮下注射。根据Racine分级标准^[3]:0级为无惊厥;I级为面部阵挛;II级为面部阵挛+节律性点头;III级为面部阵挛+节律性点头+前肢阵挛;IV级为面部阵挛+节律性点头+前肢阵挛+后肢站立;V级为面部阵挛+节律性点头+前肢阵挛+后肢站立+跌倒。根据Racine分级,III级及其以上标准即可认为成功建立癫痫模型^[3],选择IV~V级致痫大鼠作为本研究痫性发作的研究对象。本组共92只大鼠出现癫痫样症状,造模成功率为94.85%,达到癫痫样症状IV~V级发作的大鼠83只,达标率85.57%。本次动物实验符合3R原则。

1.1.2 试剂与仪器

甲醇、乙腈(色谱纯,德国默克);无水乙酸钠、冰醋酸、四氢呋喃及其余试剂均为国产分析纯;L-谷氨酸(L-Glu, 100 mg, HPLC≥99%,上海源叶生物科技有限公司);GABA(20 mg, HPLC≥98%,北京普天同创生物科技有限公司);9-苄甲基氯甲酸酯(分析纯,北京百灵威科技有限公司);实验用水均为去离

子水;PTZ(上海源叶生物科技有限公司),生理盐水配制成10 mg/mL备用。

LC-20AB高效液相色谱仪:配置SPD-20A UV-VIS Detector高灵敏度紫外可见光可变波长检测器;CTO-20AC Column Oven色谱柱恒温箱;SIL-20AC Autosampler自动进样器;LC-20AB Solvent Delivery Unit溶液输送泵,Ver 1.25 Workstation工作站,色谱数据处理器:LC solution分析软件。低温高速离心机,型号Eppendorf 5810R,美国Thermo公司;Sartorius BSA124S电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;超声波清洗器,型号KQ5200E,昆山市超声仪器有限公司;Seven Compact S220 pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;OLABO数显三用恒温水箱,型号HH-W420,济南鑫贝西生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标准品配制

准确称量GABA及L-Glu标准品各5 mg,分别溶于适量水中定容至5 mL,配制成1 000 μ g/mL GABA及L-Glu母液,将母液稀释5倍得到标准工作液^[4]。

1.2.2 色谱条件

RedClassical AQ-C18色谱柱(5 μ m, 250 mm×4.6 mm),柱温30~32 $^{\circ}$ C,检测波长265 nm,进样量20 μ L。流动相A:50 mmol/L乙酸钠溶液(pH4.8)410 mL+去离子水85 mL+四氢呋喃5 mL(体积比为99:1);流动相B:乙腈500 mL。流动相A与流动相B的体积比为3:7,流动相A和流动相B均经超声脱气20 min后使用。流动相梯度洗脱程序:0 min, 20%B; 5 min, 20%B; 20 min, 40%B; 25 min, 60%B; 30 min, 60%B; 30.01 min, 70%B; 35 min, 70%B; 40 min, 20%B; 45 min, 20%B。流动相流速:1.0 mL/min。

1.2.3 样品制备及测定

通过PTZ皮下注射建立SD雄性大鼠急性痫性发作模型,当大鼠痫性发作达IV~V级时,分别于发作时(0 min)及发作后5、10、15、20、25、30 min处死大鼠,予颈椎脱臼,断头取全脑,冰上小心分离双侧海马组织。所有样本放置于-80 $^{\circ}$ C冰箱内保存备用。采用HPLC测定Glu与GABA含量,大鼠海马组织样本经处理后,进样检测。以峰面积为横坐标,浓度为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程,通过LC solution分析软件计算得到Glu与GABA浓度。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行统计分析,结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用单因素方差分析,组间多重比较方差齐用LSD检验。 $P \leq$

0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型行为表现

皮下注射PTZ 3 min左右,大鼠由开始时的自由活动状态逐渐变为安静,自由活动减少,弓背向上抬起,活动迟缓,活动范围减小,眼神呆滞,伴呼吸加快,胡须震颤和头面部肌肉阵发性颤动,绝大部分大鼠陆续进入发作期,表现为双侧前肢阵挛,极短时间内快速变为双侧前肢阵挛伴后肢站立,点头样动作,四肢强直阵挛,继而跌倒,同时发现大鼠四肢末端青紫,少数伴口吐白沫,首次发作症状持续不足5 min逐渐自行停止,部分大鼠上述症状停止后再次出现IV级及以上级别发作。入组大鼠发作均达到IV级或IV级以上级别发作。正常对照组无痫性症状发作。

2.2 海马内Glu与GABA含量变化

Glu及GABA标准品高效液相色谱图见图1,海马组织Glu及GABA高效液相色谱图见图2。

痫性发作达到IV~V级时,0、5、10、15、20、25 min组海马组织Glu含量较正常对照组明显升高,差异

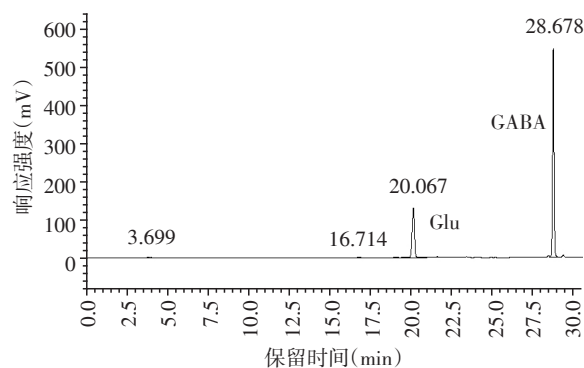


图1 Glu及GABA标准品高效液相色谱图

Figure 1 Chromatogram of Glu and GABA standards

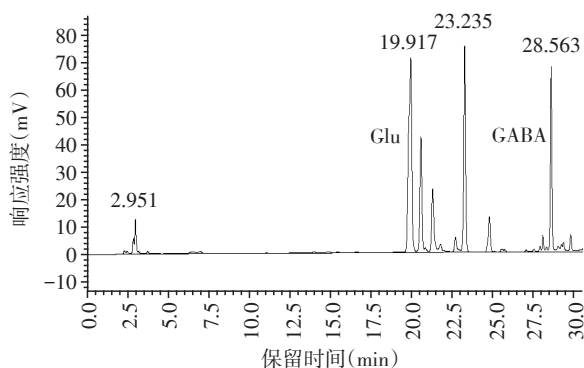


图2 海马组织Glu及GABA高效液相色谱图

Figure 2 Chromatogram of Glu and GABA in hippocampus

具有统计学意义($P < 0.05$,表1),Glu峰值出现在25 min组,5 min组Glu含量较0 min组低,但0、5、10、15、20、25 min组之间Glu含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),30 min组海马组织Glu含量与正常对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。海马组织中GABA含量在5 min组及25 min组均较正常对照组显著升高($P < 0.05$,表1),25 min时达峰值,其余各组海马组织中GABA含量与正常对照组比较无显著差别($P > 0.05$)。此外,10 min组GABA含量最低,5、20、25、30 min组GABA含量均高于10 min组,差异有统计学意义($P < 0.05$),15 min组GABA含量高于10 min组,但差异不显著($P > 0.05$);30 min组GABA含量与20 min组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 痫性发作大鼠海马组织Glu、GABA含量变化情况

Table 1 The contents of Glu and GABA in hippocampus (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	Glu	GABA
正常对照组	150.50 ± 14.70	36.48 ± 4.50
0 min组	180.34 ± 12.69 [*]	35.07 ± 5.33
5 min组	174.54 ± 14.33 [*]	42.35 ± 4.31 [△]
10 min组	173.12 ± 22.06 [*]	34.26 ± 6.08
15 min组	176.91 ± 14.17 [*]	38.07 ± 6.73
20 min组	175.96 ± 11.67 [*]	39.04 ± 5.72 [△]
25 min组	183.26 ± 19.70 [*]	47.64 ± 5.57 [△]
30 min组	153.61 ± 8.29	39.15 ± 3.73 [△]

与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与10 min组比较,[△] $P < 0.05$ 。

3 讨论

正常情况下,脑内存在一定含量的Glu与GABA,Glu含量高于GABA含量,且二者处于平衡状态。Glu对大脑发育有重要作用,它不仅参与神经元迁移及分化,还可影响轴突发生及神经元存活,可以调节正常脑内的学习、记忆、运动和认知功能,是脑内最重要的兴奋性氨基酸类神经递质,维持神经元兴奋性^[5]。而GABA是脑内主要的抑制性氨基酸类神经递质,可通过突触前或突触后抑制,减少兴奋性氨基酸的释放,主要起抑制作用,抑制神经元兴奋性^[6]。本研究结果显示,Glu与GABA在痫性IV~V级发作后30 min内存在规律性变化,即Glu在癫痫单次发作开始时(0 min时)即显著升高,且在0~20 min内变化不大,稳定于较高状态,持续至25 min时Glu含量达到高峰,之后开始下降;相对应的GABA含量在5 min时显著增高,随后开始下降,在10

min时下降至最低,在15 min时再次缓慢升高,持续至25 min时GABA含量达到高峰,在25 min内GABA含量经历了2次显著升高,之后又开始下降。

有研究发现,在癫痫患者海马组织内Glu含量比正常对照组高6倍^[7]。癫痫发作急性期内,突触前膜内出现Glu大量释放伴吸收障碍,导致突触间隙Glu大量堆积,致使脑组织内Glu水平明显增高^[8]。Glu含量增高,其受体被激活,受体活化后引起Glu短时间内摄取抑制并刺激Glu进一步释放,导致神经细胞外液中Glu含量进一步增高。此外,Glu含量在痫性IV~V级发作后0~25 min内处于增高状态,峰值出现在25 min,考虑为25 min内Glu在胞内大量合成及释放^[9],致使脑组织内Glu含量升高,而Glu大量堆积后触发了离子型受体并使其与之结合,造成神经元去极化,促使突触出现过度兴奋,从而导致癫痫发作^[10]。Glu含量在痫性IV~V级发作25 min后下降,考虑为癫痫发作后期机体存在内源性的自我保护机制^[11],反馈性引起GABA增多,而GABA增多抑制了Glu的增加。

抑制性神经递质在癫痫发作中也有重要作用,GABA在脑内的含量仅次于Glu,是中枢神经系统中最重要的抑制性氨基酸类神经递质。当GABA含量减少或缺失,痫性发作增加或持续;当GABA含量增加,则可以终止痫性发作。GABA受体的基因突变可导致致病动物出现全面性癫痫发作,证明GABA同时还参与了癫痫的发生^[12]。目前临床上使用的多种抗癫痫药物,可以通过增加脑内GABA含量或促进GABA与其受体结合,有效控制癫痫^[13]。如苯二氮卓类和巴比妥类药物通过延长氯离子通道开放时间增强GABA的抑制作用,起到抗惊厥作用;丙戊酸钠通过对GABA能系统的多重作用抑制神经元兴奋性,抑制与代谢途径相关的酶以及离子通道活动而起到抗癫痫作用^[14]。本研究结果显示,在痫性IV~V级发作后30 min内,GABA含量经历了2次显著升高,第1次升高为发作后5 min时,考虑此次升高与癫痫兴奋性增加而引起GABA能神经元抑制功能代偿性增高有关,即Glu升高后引起GABA反馈性升高;第2次显著升高为发作后25 min时,此次GABA含量升高较5 min发作时更明显,达到峰值。GABA可由Glu经谷氨酸脱羧酶(GAD)脱羧生成,Glu及GAD含量增高,导致GABA含量增加。此外,GABA转氨酶的表达减少、GABA转运的功能性损伤以及GABA转运体含量减少均可导致GABA含量明显增高。另一方面,Glu脱羧形成GABA,导致Glu含量

降低,有助于细胞免受兴奋性毒性损伤,且GABA含量增高,中枢神经抑制作用增强,从而防止癫痫灶神经元过度兴奋,这可能是机体内源性抗癫痫机制增强的一种反应^[15]。癫痫发作后Glu释放量增加,机体自我调节机制发生改变,当Glu含量增多时,神经胶质细胞可通过Glu转运体摄取Glu,然后经谷氨酰胺合成酶转化为谷氨酰胺,而谷氨酰胺是合成Glu与GABA的原料,当Glu含量减少时,机体神经元又可以利用谷氨酰胺为原料转化为Glu,而GABA可通过代偿性释放增多来限制或终止癫痫活动的扩散,起到终止癫痫发作的作用。在痫性IV~V级发作25 min后GABA含量下降,考虑与GABA、Glu之间的动态平衡重新建立有关。推测如果GABA含量显著增高,则GABA抑制作用增强,癫痫发作停止;如果GABA含量过低,则GABA抑制作用减弱,将继续出现癫痫症状发作,且有可能引导癫痫发作向癫痫持续状态(SE)转化^[5,16]。临床中,在癫痫发作的处理上,应关注2个时间点:5 min和25 min。在癫痫首次发作后5 min内,大多数患者的癫痫发作可自行停止;当癫痫发作25 min后,若患者无癫痫症状再发,则癫痫发作向SE转化的可能性小;若癫痫发作25 min后,患者再次出现发作,则需高度警惕癫痫发作向SE转化的可能,此时需密切观察,做好应对处理措施,避免引起长期脑损伤。

本研究发现,痫性发作后Glu与GABA含量存在随时间变化的规律,Glu与GABA之间比例失衡,可能导致癫痫发作不能终止,而持续发展的结果有可能就是SE。Glu与GABA介导了癫痫的发生与终止,充分认识和利用痫性发作后30 min内Glu与GABA含量变化的规律,为临床在急性癫痫发作时及时、合理利用抗癫痫药物,尽快终止癫痫发作,避免癫痫发作演变成SE,减少脑神经细胞损伤,改善癫痫患者的预后提供帮助。

[参考文献]

- [1] Albrecht J, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Zielińska M, et al. Roles of glutamine in neurotransmission [J]. *Neuron Glia Biol*, 2010, 6(4): 263-276
- [2] 廖亚云, 刘夕霞, 黄逸青, 等. Let-7c-1对戊四氮致痫大鼠学习记忆功能的作用[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2017, 43(4): 239-244
- [3] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294

(下转第1588页)

- (CLASSIC) : 5 - year follow - up of an open - label, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15 (12) : 1389-1396
- [4] 雍霞, 卢志强, 王彩莲. 辅助放化疗损伤胃癌术后患者胰腺外分泌功能的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(1):92-94
- [5] Cienfuegos JA, Martínez P, Baixauli J, et al. Perineural Invasion is a major prognostic and predictive factor of response to adjuvant chemotherapy in stage I - II colon cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(4):1077-1084
- [6] Suzuki T, Suwa K, Ogawa M, et al. Adjuvant chemotherapy for the perineural invasion of colorectal cancer [J]. *J Surg Res*, 2015, 199(1):84-89
- [7] Anand AK, Agarwal P, Gulia A, et al. Significance of perineural invasion in locally advanced bucco alveolar complex carcinomas treated with surgery and postoperative radiation ± concurrent chemotherapy[J]. *Head Neck*, 2017, 39(7):1446-1453
- [8] Hwang JE, Hong JY, Kim JE, et al. Prognostic significance of the concomitant existence of lymphovascular and perineural invasion in locally advanced gastric cancer patients who underwent curative gastrectomy and adjuvant chemotherapy[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2015, 45(6):541-546
- [9] Li JC, Yang XR, Sun HX, et al. Up-regulation of Krüppel-like factor 8 promotes tumor invasion and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6):2146-2157
- [10] Deng J, You Q, Gao Y, et al. Prognostic value of perineural invasion in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88907
- [11] Liebig C, Ayala G, Wilks JA, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature [J]. *Cancer*, 2009, 115(15):3379-3391
- [12] Bukowska B, Karwowski BT. Actual state of knowledge in the field of diseases related with defective nucleotide excision repair[J]. *Life Sci*, 2018, 195:6-18
- [13] Postel-Vinay S, Soria JC. ERCC1 as predictor of platinum benefit in non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(4):384-386
- [14] Wan J, Chao L, Lee AC, et al. Higher expression of ERCC1 may be associated with resistance to adjuvant platinum-based chemotherapy in gastric cancer[J]. *Cancer Invest*, 2017, 35(2):85-91
- [15] Yamada Y, Boku N, Nishina T, et al. Impact of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1) on the outcomes of patients with advanced gastric cancer: correlative study in Japan Clinical Oncology Group Trial JCOG9912[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(10):2560-2565
- [16] 戴东方, 陈德玉, 李小琴, 等. 胃癌组织DNA拓扑异构酶2 α 等8种分子的蛋白表达与脉管侵犯的关系[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2018, 28(2):149-153
- [收稿日期] 2019-04-15

(上接第1574页)

- [4] 朱广跃, 杨卫, 吴健, 等. HPLC法定量分析微生物法制备液中产物 γ -氨基丁酸和底物L-谷氨酸[J]. *食品科学*, 2015, 36(24):190-194
- [5] Dinuzzo M, Mangia S, Maraviglia B, et al. Physiological bases of the K⁺ and the glutamate/GABA hypotheses of epilepsy[J]. *Epilepsy Res*, 2014, 108(6):995-1012
- [6] Olsen RW, Avoli M. GABA and epileptogenesis[J]. *Epilepsia*, 2010, 38(4):399-407
- [7] Coulter DA, Eid T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy[J]. *Glia*, 2012, 60(8):1215-1226
- [8] Cavus I, Kasoff WS, Cassaday MP, et al. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients[J]. *Ann Neurol*, 2010, 57(2):226-235
- [9] Szczurowska E, Mareš P. NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus[J]. *Physiol Res*, 2013, 62(Suppl 1):S21-S38
- [10] Cho CH. New mechanism for glutamate hypothesis in epilepsy[J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7(7):127
- [11] 吴春风, 黄松明, 郑 帆, 等. 海人酸致痫大鼠海马及脑脊液内氨基酸的变化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(12):1370-1372
- [12] Kang JQ, Barnes G. A common susceptibility factor of both autism and epilepsy: functional deficiency of GABA A receptors[J]. *J Autism Dev Disord*, 2013, 43(1):68-79
- [13] Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(Suppl 3):8-12
- [14] Bosetti F, Bell JM, Manickam P. Microarray analysis of rat brain gene expression after chronic administration of sodium valproate[J]. *Brain Res Bull*, 2005, 65(4):331-338
- [15] Sperk G, Schwarzer C, Heilman J, et al. Expression of plasma membrane GABA transporters but not of the vesicular GABA transporter in dentate granule cells after kainic acid seizures[J]. *Hippocampus*, 2010, 13(7):806-815
- [16] Vezzani A, Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability[J]. *Neuropharmacology*, 2015, 96(Pt A):70-82
- [收稿日期] 2019-04-16