

甲状腺结节术前基因诊断的研究进展

张余春^{1,2}, 王 昆^{2*}, 马向华^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属江宁医院内分泌科, 江苏 南京 211100

[摘要] 甲状腺结节的检出率和发病率逐年上升, 超声引导下的细针穿刺细胞学检查(fine needle aspiration, FNA)是术前评估甲状腺结节性质的金标准。然而20%~30%的甲状腺结节通过FNA仍无法明确诊断, 此类结节的患者往往接受诊断性手术治疗, 术后病理结果证实为良性结节, 大部分结节都接受了不必要的手术, 而通过基因检测实现术前精确诊断可以避免过度治疗。本文综述甲状腺结节的基因诊断研究进展以及对甲状腺结节的风险评估、疗效预测和预后判断的临床价值。

[关键词] 甲状腺结节; 基因诊断; 甲状腺恶性肿瘤; 肿瘤标志物

[中图分类号] R582

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)10-1472-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20181032

Research progress of preoperative genetic diagnosis in thyroid nodule

Zhang Yuchun^{1,2}, Wang Kun^{2*}, Ma Xianghua^{1*}

¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; ²Department of Endocrinology, Jiangning Hospital Affiliated to NMU, Nanjing 211100, China

[Abstract] The detection rate and incidence of thyroid nodules have increased year by year. Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology(FNA) is the gold standard for preoperative evaluation of the nature of thyroid nodules. However, approximately 20% to 30% of thyroid nodules by FNA are not clearly benign or malignant. Patients with such nodules are often received diagnostic surgery. Most nodules are confirmed benign lesions by postoperative pathological findings. Thus, those nodules have accepted unnecessary surgery. Preoperative accurate diagnoses like genetic tests are used to identify benign or malignant nodules to avoid overtreatment. This article reviews the genetic diagnosis advances and clinical value of risk assessment, efficacy prediction, and prognosis for thyroid nodules.

[Key words] thyroid nodules; genetic diagnosis; thyroid cancers; tumor marker

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(10): 1472-1476]

1 甲状腺结节术前检测及过度治疗的现状

随着颈部超声检测手段在健康体检中的普及, 甲状腺结节的检出率和发病率在过去几十年迅速增加^[1]。流行病学研究表明, 在碘充足人群中颈部触诊甲状腺结节的患病率约为5%。然而, 内科医生在临床工作上遇到的隐匿性甲状腺结节患者比例高达68%^[2]。大约90%的甲状腺结节都是良性的, 并且95%的结节是没有症状的, 需要长期的随

访观察^[3]。超声引导下的细针穿刺细胞学检查(fine needle aspiration, FNA)是当今评估甲状腺结节最可靠的手段^[4]。但是, 目前常规病理形态学的分型方法仍漏检部分甲状腺恶性肿瘤患者。研究显示, 甲状腺恶性肿瘤的术前诊断率仅占32.4%~45.3%, 术前精确诊断比较困难^[5]。

根据Bethesda甲状腺细胞病理学报告系统^[6], 将FNA检查中不能明确诊断的良恶性结节分为3类: 意义不明确的细胞非典型病变或意义不明确的滤泡性病变(Ⅲ类), 滤泡性肿瘤或可疑滤泡性肿瘤(Ⅳ类), 可疑恶性肿瘤(Ⅴ类)。对于此类结节缺乏可靠的诊断手段, 大部分患者接受手术来明确结节的良恶性^[7]。然而, 手术切除后确诊恶性肿瘤比例仅

[基金项目] 国家自然科学基金(81870542); 江苏省科技计划项目(BE2017736)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xianghuama@sina.com; gokdinnanjiang@163.com

介于5%~30%之间,并且即便诊断为甲状腺恶性肿瘤,大部分都为非侵袭性,预后良好。另外,超过90%的侵袭性乳头状癌变异体都在V和VI类结节中,滤泡癌仅存在于约20%的甲状腺恶性肿瘤中^[8]。

因此大部分罹患不确定性甲状腺结节的患者都经历了不必要的手术治疗。如果甲状腺叶切除术标本显示恶性肿瘤灶大于1 cm的则需要二次手术完成甲状腺全切除术^[9],这将对患者造成身心及经济负担。

2 甲状腺癌的基因突变

甲状腺癌的基因突变主要发生在调节细胞增殖和扩散的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路和磷酸肌醇-3-激酶(PI3K)/AKT信号通路的蛋白质编码基因中。目前已经确定B-RAF癌基因(BRAF)、RAS癌基因(RAS)、RET/PTC重排基因(RET/PTC)和特异性结合域转录因子/过氧化物酶体增殖物激活受体融合基因(PAX8/PPAR γ)为编码各种受体酪氨酸激酶的癌基因,这4个不同基因的改变与甲状腺癌的诊断和治疗关系密切,其他包括p53、HIF-1 α 、Wnt/ β -catenin、microRNA、NF- κ B、PI3K等相关基因与甲状腺癌的相关性正在研究中^[10]。研究证实约70%的甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)中发现了BRAF、RAS、RET/PTC癌基因,70%的滤泡癌中证实发现了RAS和PAX8/PPAR γ 癌基因^[11]。

2.1 BRAF基因突变

70%的甲状腺乳头状癌证实发现了BRAF、RAS、RET/PTC癌基因;BRAF基因突变(V600E)见于约40%的甲状腺乳头状癌,以及一些低分化癌(33%)和间变癌(45%)中。虽然BRAF突变的流行与地理变异有关,在碘摄入量高的国家,BRAF突变的患病率要高得多,术前FNA标本中进行BRAF突变检测可以更可靠地确定手术范围。FNA中BRAF突变可以预测甲状腺癌腺外扩散、包膜侵犯复发和淋巴结转移^[12]。低风险的PTC患者中出现BRAF V600E突变是患者预后不良的独立预后因素^[13]。一项荟萃分析显示BRAF V600E与PTC预后不良的特征密切相关^[14]。

2.2 RAS突变

RAS基因家族在约13%的甲状腺乳头状癌(通常是有包膜的滤泡变异体),以及40%~50%的滤泡性甲状腺癌、20%~40%良性滤泡膜瘤和30%伴乳头状核特征的非浸润性滤泡型甲状腺肿瘤(NIFTP)中被发现。Nikiforov等^[10]表明了FNA中存在RAS

突变结节的恶性概率有88%,并且RAS突变主要是高度预测低风险滤泡癌。

2.3 RET基因重排

组织学诊断上来讲,RET/PTC1在典型的甲状腺乳头状癌中常见;而RET/PTC3在罕见的实性亚型中常见,从预后方面来讲,RET/PTC1与淋巴结转移相关^[15]。

2.4 PAX8/PPAR基因重排

PAX8/PPAR γ 基因重排见于某些滤泡性甲状腺癌(30%~35%)、甲状腺乳头状癌的滤泡变异(38%)以及一些滤泡性腺瘤中(2%~13%)。伴有PAX8/PPAR γ 重排的肿瘤多好发于青年人,患者的肿瘤通常肿块较小,有固化或嵌入生长的特性,常伴有管侵犯征象^[16]。

2.5 TERT突变

据报道,在<10%的甲状腺乳头状癌以及70%以上的甲状腺未分化癌中出现TERT;在不到1%的甲状腺乳头状癌和超过70%的甲状腺未分化癌中存在TP53突变^[17]。

3 甲状腺结节的基因检测技术

3.1 体细胞突变/融合组

HRAS、RET/PTC1、RET/PTC3和PAX8/PPAR γ 具有较高的诊断特异性和阳性预测值,通常在V类结节中多见,然而因为其敏感度较低而使用受限。如果这些标志物阳性可能导致临床医生采取甲状腺全切除术而非甲状腺部分切除术或随访观察。Nikiforov等^[18]通过513例甲状腺穿刺细胞学组织检测了体细胞点突变组与术后病理结果对照,显示突变组检测甲状腺癌的特异性为96%~99%,敏感性为57%~68%^[19],并首先报告灵敏度从44%增加到80%,准确度从93.3%增加到97.4%。

尽管已经取得了上述进展,但这些标志物灵敏度和阴性预测值较低,未能检测到超过33%的癌症。有报道表明在良性病变的结节中也检测出了体细胞突变阳性^[20],因此,目前可用的分子标记未能以足够的确定性排除癌症,使得在大多数罹患不确定性结节的患者中避免手术。迫切需要能够可靠地识别约40%突变阴性的恶性结节,特别是不确定性结节中的良性结节其他标志物以减少不必要的诊断性手术。

3.2 Afirma基因表达分类器(gene-expression classifier, GEC)和基因组测序分类器(genomic sequencing classifier, GSC)

Afirma基因表达分类器是通过RNA水平测量

167种基因转录物的表达以鉴别甲状腺结节良恶性的诊断性测试,可以更好地区分恶性甲状腺结节和良性甲状腺疾病。信使RNA表达改变的原因可能包括关键核心基因或相关基因序列、外周基因的变化引起复杂上游相互作用的改变、细胞内外水平如炎症和生活方式或环境变化而发生表观遗传变化,并没有DNA序列改变。

2012年发表在《新英格兰医学杂志》上的一项双盲、前瞻性、多中心试验验证了GEC的灵敏度超过90%,且阴性预测值大于95%,因而GEC成为一种能够有效地排除恶性结节的检测^[21],有望显著降低手术率。然而,GEC最大的缺点在于特异性较低,因此仍有超过半数的GEC可疑结节仍然无法确定良恶性,并且对GEC良性结节是否会发展为恶性结节仍缺乏长期的随访观察^[22]。GEC能否有效降低手术率仍存在争议,Sacks等^[23]研究提出了GEC检测前后手术率和恶性率无明显差异。GEC的另一个缺点在于诊断嗜酸性细胞肿瘤的准确性,一项研究显示GEC将嗜酸性细胞肿瘤归为可疑恶性,这会增加GEC的假阳性^[24]。考虑到最近指南将包裹性滤泡亚型甲状腺乳头状癌重新分类为NIFTP,而GEC将NIFTP结果亦归为阳性,这也将增加GEC假阳性率^[25]。

基因组测序分类器通过改良用于表征基因组信息的技术,包括改进RNA测量方法、核和有丝分裂的转录组表达和测序表现出较高的识别良性结节的敏感性和准确性。Patel等^[26]通过与病理学诊断结果和基因表达分类器诊断结果进行盲法验证,基因组测序分类器诊断不确定性甲状腺结节的灵敏度为91%,特异性为68%,GSC将GEC的特异性提高了36%,有效增加了良性结节患者数量,从而避免不必要的诊断性手术。

3.3 二代测序(next-generation sequencing, NGS)

二代测序是一项兼顾敏感性和准确性的基因测序,通过对极少量的DNA做高通量靶向多基因序列分析^[27],能够有效地识别体细胞基因突变阴性但实际为恶性的结节,特别是在不确定性结节中的许多良性结节。

研究证实有针对性的NGS组可以提高测试灵敏度,其在切除的组织和不确定的结节中检测都能发挥效果,其更高的灵敏度将相应地减少假阴性恶性结节的数量。NGS被用于扩大检测当前由BRAF、NRAS、HRAS和KRAS以及PAX8/PPAR γ 和RET/PTC重排组成的癌基因小组^[28]。有研究表明在

145个恶性甲状腺肿瘤中68%可以检测到这些癌基因的点突变,如果与重排的检测相结合,估计超过80%的甲状腺癌预计至少会发生一次突变事件。

Nikiforova等^[28]将与甲状腺癌发生有关的12个基因(NRAS、CTNNB1、PIK3CA、BRAF、RET、PTEN、HRAS、KRAS、TSHR、AKT1、TP53和GNAS)的284个突变位点制定了更大的基因组,拓展了甲状腺二代测序的内容。

NGS比GEC具有更高的特异性,使得更多的患者避免手术,对于接受分子测试的患者仍需进行长期随访以评估其假阴性率^[29]。

3.4 MicroRNA(miRNA)

MicroRNA是在肿瘤的产生和进展中起调节细胞基础进程的小的、非编码RNA^[30],大量的研究表明特定肿瘤miRNA在最常见的分化型甲状腺癌中表达下调。相比于mRNA,miRNA不易受降解率的影响,并已显示出在甲状腺FNA细胞学检测中比mRNA更优越的诊断性能。

多项研究已经鉴定出几种差异表达的miRNA如miR-375、miR-34a、miR-145b、miR-221、miR-222、miR-155、Let-7、miR-181b^[31-32]。通过测定和比较甲状腺患者血清样本中miRNA(miR-375、miR-34a、miR-145b、miR-221、miR-222、miR-155、Let-7、miR-181b)的血清水平,可以诊断和预测甲状腺癌,这些miRNA还可用作预测甲状腺癌复发、侵袭、存活率和癌症分级的生物标志物^[33]。此外还有学者将另外4种miRNA组合(miR-222、miR-328、miR-197、miR-21)做了一个预测模型,并在72例不确定性甲状腺结节中证实其区分良恶性甲状腺结节的敏感性为100%,特异性为86%,排除了嗜酸性细胞病变后,这4个miRNA组合的敏感性为100%,特异性提高至95%^[34]。

miRNA的缺点在于诊断甲状腺癌时不具有特异性,不能有效区分各组织亚型的甲状腺癌,并且不同研究显示的miRNA谱系差别较大。有研究者将10个miRNA组合起来做了一个表达分类器miR-29-b-1-5、miR-31-5p、miR-138-13p、miR-139-5p、miR-146b-5p、miR-155、miR-204-5p、miR-222-3p、miR-375、miR-551b-3p,在基因突变阴性的结节中其特异性为98%^[35]。当这个分类器与ThyGenX组合时,miRNA表达分类器的特异性为89%,敏感性为85%,阴性预测值为94%,阳性预测值为74%^[36]。

miRNA标记和靶向的NGS技术有望识别更多的体细胞突变阴性但实际为恶性的结节,但miRNA

表达谱不均匀的特征使得难以区分不同亚型的甲状腺癌,其检验效能及基因表达谱仍有待更多前瞻性的研究去验证。

4 展 望

分子诊断技术的快速发展为甲状腺癌的早期分子诊断提供了可能,运用特定基因的突变状态有助于深入理解甲状腺癌的发病机制,并更准确识别甲状腺肿瘤的临床表型;提高甲状腺结节良恶性鉴别诊断的准确性,避免不必要的甲状腺手术。除此之外,这些甲状腺癌分子标志物有助于判断甲状腺癌的病理类型和预后^[37-38],为甲状腺肿瘤的危险分级提供参考依据,降低了对患者的有创检测率。对甲状腺癌患者进行个性化精准医疗提供了确实的依据,在临床治疗方面也有了突破性进展,值得更广泛评估。

目前虽已探索了许多分子测试方法,但迄今还没有测试表明完美的准确性。每种基因检测结果的详细比较是困难的,因为不同的研究遵循不同的方法和分类方案。这些分子检测的最大限制是对未进行手术切除的良性分子谱患者进行长期随访。

通过 miRNA 与一些充分表征的致癌突变测试的结合,可以在敏感性和特异性之间寻求更好的平衡点。这一策略的一个关键优势在于它能够诊断缺乏低水平体细胞突变的或临床意义未知的恶性结节,排除良性结节。这种新颖的方法显示出高诊断敏感性和特异性,显著提高诊断的准确性,进一步改善不确定性甲状腺结节的术前风险管理。

[参考文献]

- [1] Russ G, Leboulleux S, Leenhardt L, et al. Thyroid incidentalomas: epidemiology, risk stratification with ultrasound and workup[J]. *Eur Thyroid J*, 2014, 3(3):154-163
- [2] Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2016, 26(1):1-133
- [3] Durante C, Grani G, Lamartina L, et al. The diagnosis and management of thyroid nodules: A review [J]. *JAMA*, 2018, 319(9):914-924
- [4] Guth S, Theune U, Aberle J, et al. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination[J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39(8):699-706
- [5] American Thyroid Association (ATA) Guidelines Task-force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2009, 19(11):1167-1214
- [6] Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology [J]. *Thyroid*, 2017, 27(11):1341-1346
- [7] Evranos B, Polat SB, Baser H, et al. Bethesda classification is a valuable guide for fine needle aspiration reports and highly predictive especially for diagnosing aggressive variants of papillary thyroid carcinoma[J]. *Cytopathology*, 2017, 28(4):259-267
- [8] Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference[J]. *Diagn Cytopathol*, 2008, 36(6):425-437
- [9] Wang CC, Friedman L, Kennedy GC, et al. A large multi-center correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology[J]. *Thyroid*, 2011, 21(3):243-251
- [10] Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135(5):569-577
- [11] Xing M, Clark D, Guan H, et al. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(18):2977-2982
- [12] Elisei R, Viola D, Torregrossa L, et al. The BRAF(V600E) mutation is an independent, poor prognostic factor for the outcome of patients with low-risk intrathyroid papillary thyroid carcinoma: single-institution results from a large cohort study[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(12):4390-4398
- [13] Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, et al. European Thyroid Association Guidelines for ultrasound malignancy risk stratification of thyroid nodules in adults: The EU-TIRADS[J]. *Eur Thyroid J*, 2017, 6(5):225-237
- [14] Li C, Lee KC, Schneider EB, et al. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(12):4559-4570
- [15] Fagin JA, Wells SA Jr. Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(23):2307
- [16] Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(9):4440-4445
- [17] Ferraz C, Eszlinger M, Paschke R. Current state and fu-

- ture perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(7):2016-2026
- [18] Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(6):2092-2098
- [19] Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(11):3390-3397
- [20] Najafian A, Noureldine S, Azar F, et al. RAS mutations, and RET/PTC and PAX8/PPAR-gamma chromosomal rearrangements are also prevalent in benign thyroid lesions: implications thereof and a systematic review [J]. *Thyroid*, 2017, 27(1):39-48
- [21] Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(8):705-715
- [22] Duh QY, Busaidy NL, Rahilly-Tierney C, et al. A systematic review of the methods of diagnostic accuracy studies of the Afirma gene expression classifier [J]. *Thyroid*, 2017, 27(10):1215-1222
- [23] Sacks WL, Bose S, Zumsteg ZS, et al. Impact of Afirma gene expression classifier on cytopathology diagnosis and rate of thyroidectomy [J]. *Cancer Cytopathol*, 2016, 124(10):722-728
- [24] Hang JF, Westra WH, Cooper DS, et al. The impact of non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features on the performance of the Afirma gene expression classifier [J]. *Cancer Cytopathol*, 2017, 125(9):683-691
- [25] Brauner E, Holmes BJ, Krane JF, et al. Performance of the Afirma gene expression classifier in Hurthle cell thyroid nodules differs from other indeterminate thyroid nodules [J]. *Thyroid*, 2015, 25(7):789-796
- [26] Patel KN, Angell TE, Babiarz J, et al. Performance of a genomic sequencing classifier for the preoperative diagnosis of cytologically indeterminate thyroid nodules [J]. *JAMA Surg*, 2018. doi:10.1001/jamasurg.2018.1153
- [27] Serrati S, De Summa S, Pilato B, et al. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:7355-7365
- [28] Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, et al. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(11):E1852-E1860
- [29] Livhits MJ, Kuo EJ, Leung AM, et al. Gene expression classifier vs targeted next-generation sequencing in the management of indeterminate thyroid nodules [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(6):2261-2268
- [30] Cuellar TL, McManus MT. MicroRNAs and endocrine biology [J]. *J Endocrinol*, 2005, 187(3):327-332
- [31] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043):834-838
- [32] Mahmoudian-Sani MR, Mehri-Ghahfarrokhi A, Asadi-Samani M, et al. Serum miRNAs as biomarkers for the diagnosis and prognosis of thyroid cancer: a comprehensive review of the literature [J]. *Eur Thyroid J*, 2017, 6(4):171-177
- [33] Lee JC, Zhao JT, Clifton-Bligh RJ, et al. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer [J]. *Cancer*, 2013, 119(24):4358-4365
- [34] Keutgen XM, Filicori F, Crowley MJ, et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(7):2032-2038
- [35] Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, et al. Molecular testing for miRNA, mRNA, and DNA on fine-needle aspiration improves the preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytology [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(7):2743-2750
- [36] Wylie D, Beaudenon-Huibregtse S, Haynes BC, et al. Molecular classification of thyroid lesions by combined testing for miRNA gene expression and somatic gene alterations [J]. *J Pathol Clin Res*, 2016, 2(2):93-103
- [37] Sun J, Shi R, Zhao S, et al. E2F8, a direct target of miR-144, promotes papillary thyroid cancer progression via regulating cell cycle [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1):40-53
- [38] Sun J, Shi R, Zhao S, et al. Cell division cycle 45 promotes papillary thyroid cancer progression via regulating cell cycle [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5):1-9

[收稿日期] 2018-07-27