

miR-301在结肠癌细胞增殖和凋亡中的作用

张忠来 熊欢 张兵 朱培谦

南昌大学第二附属医院胃肠外科, 江西 南昌 330006

[摘要] **背景与目的:** miR-301在多种恶性肿瘤中表达上调, 然而其在结肠癌中的表达及功能尚不清楚。本研究旨在检测微小RNA miR-301在结肠癌组织中的表达, 并在体内外研究miR-301反义寡核苷酸技术(ASO)对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法:** 运用荧光定量PCR定量分析120例结肠癌患者癌组织及对应癌旁组织中miR-301的表达; 通过miR-301ASO降低结肠癌SW620细胞中miR-301的表达, 采用MTT、克隆形成实验、流式细胞技术及体内实验观察miR-301ASO对SW620细胞产生的生物学效应。**结果:** 在120例结肠癌患者中, 63.33%(76/120)的结肠癌组织miR-301表达明显高于对应癌旁组织($P=0.00$); 与对照组miR-301的表达量(0.50 ± 0.07)相比, miR-301ASO组可以显著降低miR-301的表达(0.09 ± 0.01 , $P=0.00$); MTT实验结果显示, 转染miR-301 ASO组24、48、96 h SW620细胞的存活数量均明显低于对照组($P<0.05$); 克隆形成实验结果显示, miR-301ASO组克隆形成率($5.33\pm 0.74\%$)较对照组($33.33\pm 8.38\%$)显著降低($P=0.00$); 体内研究进一步证实miR-301ASO可以抑制肿瘤细胞的增殖, 从而导致肿瘤生长较对照组慢($P=0.01$), 肿瘤的体积较对照组明显减小($P=0.01$); 流式细胞仪检测显示, 转染miR-301ASO组SW620细胞凋亡指数(15.68 ± 1.46)较随机染转染ASO组(3.36 ± 0.88)明显增高($P=0.02$); 另外, 降低miR-301的表达发现Bcl-2的mRNA和Bcl-2蛋白均明显下降($P=0.00$, $P=0.00$)。**结论:** miR-301在结肠癌组织中表达上调, 降低miR-301的表达可有效抑制结肠癌细胞生长、促进细胞凋亡。miR-301有可能成为结肠癌基因表达调控的新靶点。

[关键词] miR-301; 结肠癌; 反义单核苷酸

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.06.006

中图分类号: R735.3⁺5 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)06-0432-07

The role of miR-301 in colon cancer cell proliferation and apoptosis ZHANG Zhong-lai, XIONG Huan, ZHANG Bing, ZHU Pei-qian (Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University Nanchang, Nanchang Jiangxi 330006, China)

Correspondence to: ZHU Pei-qian E-mail: zhupei-qian@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** The miR-224 in a variety of malignant tumors is overexpression, however, its expression and function in colon cancer are not clear. The aim of this study was to investigate the expression of miR-301 in colon cancer tissues and demonstrate the regulative effects of miR-301 ASO on the proliferation and apoptosis of colon cancer cell *in vitro* and *in vitro*. **Methods:** The expression of miR-301 in 120 colon cancer tissues and their adjacent tissues was detected by real-time quantitative PCR method. After transfection with miR-301ASO, the biological effects of miR-301 in SW620 cells were measured by MTT assay, the colony formation experiment, flow cytometry and the *in vivo* experiment. **Results:** The expression level of miR-301 was found to be overexpressed in 63.33% (76/120) of the colon cancer cases ($P<0.05$). miR-301 expression in SW620 cells (transfection with miR-301 ASO, 0.09 ± 0.01) was significantly less than control group (0.50 ± 0.07 , $P=0.00$). MTT assay results showed that SW620 cells survived rate at 24, 48 and 96 h decreased greatly after transfection with miR-301ASO ($P=0.00$). Clone formation assay revealed that miR-301 ASO group colony formation rate ($5.33\pm 0.74\%$) was significantly lower than the control group ($33.33\pm 8.38\%$, $P=0.00$). *In vivo* study further confirmed that miR-301ASO could inhibit the proliferation of SW620 cells ($P<0.05$), and miR-301ASO group grew substantially slow compared with the negative control group ($P=0.00$). Flow cytometry indicated that the apoptotic index in miR-301 ASO group (15.68 ± 1.46) was significantly higher than the control group (3.36 ± 0.88 , $P=0.02$). In addition, the Bcl2 mRNA

and protein were significantly decreased after reduce the expression of miR-301 ($P=0.00$, $P=0.00$). **Conclusion:** MiR-301 was overexpressed in human colon cancer. Reduce the expression of miR-301 can effectively inhibit the growth of colon cancer cells and promote apoptosis. MiR-301 may become a new target for the regulation of gene expression in colon cancer.

[**Key words**] MiR-301; Colon cancer; Antisense oligonucleotides

微小RNA(microRNA, miRNA)是一种内源性的非编码小分子RNA,广泛分布于动植物细胞体内。研究发现,miRNA在恶性肿瘤细胞的发生、发展中发挥重要作用,其中包括调控细胞的增殖、分化和凋亡^[1-2]。Shi等^[3]报道miR-301在乳腺癌中过表达,抑制乳腺癌细胞miR-301的表达后,细胞增殖、侵袭及迁移能力明显减弱,说明miR-301在乳腺癌中发挥重要作用。Lee等^[4]研究报道,胰腺癌细胞系和组织中miR-301高表达,且与胰腺癌的侵袭转移密切相关。另外,Jiang等^[5]研究也发现,miR-301在肝癌组织中呈过表达。本实验采用TagMan MGB探针法检测miR-301在结肠癌组织中的表达情况,同时利用反义寡核苷酸技术(antisense oligonucleotide, ASO)抑制miR-301在结肠癌细胞中的表达,分析miR-301对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

收集2006年1月—2011年1月南昌大学第二附属医院胃肠外科结肠癌及对应癌旁组织手术标本($n=120$)。所有标本均经病理学检查确诊,其中男性106例,女性14例,年龄32~69岁。所有患者术前均未接受放化疗。

1.2 主要试剂和仪器

结肠癌SW620细胞由本实验室保存;TaqMan miRNA分析试剂盒购自美国ABI公司;L-15培养基购自美国Gibco公司、胎牛血清购自美国Hyclone公司、脂质体LipfectamineTM2000购自美国Invitrogen公司;miR-301 ASO购自宝生物工程(大连)有限公司;Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司;总蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;鼠抗人

Bcl-2单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;实时荧光定量PCR分析仪购自美国ABI公司,流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量PCR检测miR-301的表达

采用TRIzol试剂提取结肠癌组织及对应癌旁组织中总RNA,采用紫外分光光度计测定浓度, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,运用miR-301检测试剂盒检测miR-301的表达。首先取 $2\text{ }\mu\text{g}$ 总RNA为反应模板与 $3\text{ }\mu\text{L}$ 逆转录酶相互混合,反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$,反应条件: $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。反应结束后,收集cDNA,将其稀释150倍,然后取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 稀释的cDNA与 $2\text{ }\mu\text{L}$ TaqMan引物相混合, $20\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 40个循环。相对miRNA表达采用ct值精确计算,将U6 snRNA作为内参。

1.3.2 反义miR-301单核苷酸序列设计

MiRBase提供的miRNA基因序列获取人miR-301的序列,并设计其反义寡核苷酸序列,同时运用核酸序列数据库检索程序以排除其他的同源序列。另外,同时设计一条随机对照序列,如下所示:miR-301顺义链: $5'\text{-AGUCACUAGUGGUUCCGUUUA-3}'$,反义miR-301反义链: $5'\text{-TAAACGGAACCACTAGTGACT-3}'$,随机序列顺义链: $5'\text{-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3}'$,反义链: $5'\text{-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3}'$,送Invitrogen公司合成,PAGE纯化,全硫代修饰。

1.3.3 细胞培养和ASO转染

将SW620结肠癌细胞接种于L-15培养基(含10%胎牛血清), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%的条件下培养。严格遵照LipfectamineTM2000转染试剂盒操作程序进行转染,miR-301 ASO终浓度分别为:50、100、150、200 nmol/L,本实验组

前期初步筛选出最佳终干扰浓度为100 nmol/L。转染后培养时间分别为24、48、72 h, 初步筛选出最佳作用时间为48 h。将荧光素(FITC)标记的硫代磷酸ASO转染后放置于倒置荧光显微镜下进行观察, 上述操作重复3次。转染效率(不同视野镜下观察发光的细胞和总的细胞比)为 $88.5\% \pm 6.4\%$ (图1)。

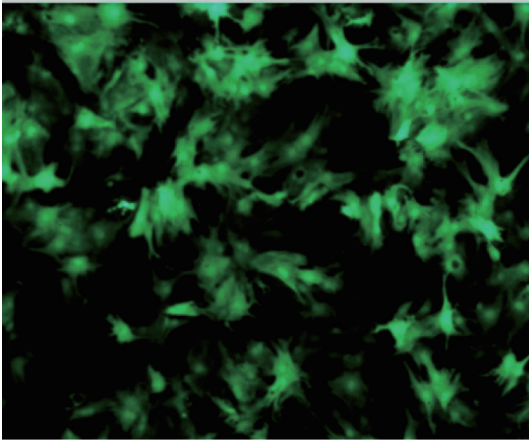


图1 转染荧光素标记的硫代磷酸反义寡核苷酸效果图

Fig. 1 The figure of transfection effect

1.3.4 转染miR-301 ASO后对miR-301表达的影响

转染miR-301 ASO与随机ASO 48 h后, 提取总RNA, 测定浓度, 逆转录为cDNA(反应条件同1.3.1), 测定cDNA浓度。运用miR-301检测试剂盒检测miR-301的表达(反应条件同1.3.1)。上述操作重复3次。

1.3.5 克隆形成实验检测SW620细胞的增殖

结肠癌SW620细胞经转染后, 取对数生长期的细胞, 用3%胰蛋白酶消化细胞。接种于6孔培养皿中, 大约500~600个细胞/孔, 置于37℃、CO₂体积分数为5%、饱和湿度的条件下, 培养2~3周。观察细胞生长情况, 当培养皿中出现肉眼可见的克隆细胞团时, 终止培养。移去上清液, 运用PBS漂洗2次。加4%甲醛溶液固定20 min, 去除固定液, 加适量Giemsa应用染色液染30 min, 用ddH₂O清洗染色液, 经干燥后在显微镜下计数>50个细胞的克隆数, 克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。上述操作重复3次。

1.3.6 MTT检测SW620细胞增殖情况

收集SW620细胞, 将各组细胞悬液在离心管内反复充分打匀, 接种于96孔培养板(6×10³/孔), 24 h后换液。实验分组同1.2.4, 每组设有6个复孔。转染后1~4 d每孔加入MTT试剂(浓度为5 mg/mL)20 μL, 在37℃、CO₂体积分数为5%的条件下继续温育4 h。用移液器吸取各孔上清, 每孔加入DMSO 150 μL, 在室温条件下摇10 min(置水平摇床)以充分完全溶解MTT结晶。测定各孔490 nm处的吸光度(A)值。每组重复3次。按下列公式计算细胞生长抑制率(%): 细胞生长抑制率=(A₄₉₀实验组平均值-A₄₉₀对照组平均值)/A₄₉₀对照组平均值×100%。上述操作重复3次。

1.3.7 活体内检测miR-301 ASO对SW620细胞增殖的影响

将18只(4~5周龄)裸鼠(上海斯莱克公司)饲养于SPF无菌环境下。在SW620细胞转染miR-301 ASO或随机ASO后, 取对数期生长的细胞(约2×10⁶个)制成150 μL细胞悬液, 运用微量注射器接种于裸鼠左侧大腿背部皮下。成瘤后定期测量肿瘤的体积, 并运用公式 $V=D \times d^2 \times \pi/6$ (D、d分别代表肿瘤的最大直径和最小直径)计算肿瘤的体积^[6], 绘制肿瘤生长曲线。饲养6周后处死裸鼠, 取瘤称重。经4%甲醛溶液固定、石蜡包埋、HE染色后, 在光镜下观察肿瘤组织的病理学特征。

1.3.8 流式细胞术分析细胞早期凋亡

实验分组同1.2.4, 将细胞接种于6孔板中, 转染miR-301 ASO。经48 h后收集细胞并制备为单细胞悬液, 采用PBS漂洗2次, 离心、弃上清液。最后运用Annexin V-FITC早期凋亡试剂盒和流式细胞仪检测各组细胞的早期凋亡情况。上述操作重复3次。

1.3.9 检测各组细胞Bcl-2 mRNA的表达水平

各组培养细胞加入TRIzol裂解液, 提取总RNA, 逆转录为cDNA, 运用SYBR Green Real-time PCR Master Mix通过荧光定量PCR方法检测Bcl-2的mRNA表达。Bcl-2的引物序列为上游: 5'-AACTGGGG GAGGATTGTGGC-3'; 下

游: 5'-GATCCAGGTGTGCAGGTGCC-3'。反应条件: 95 °C变性45 s, 58 °C退火45 s, 72 °C延伸30 s, 40个循环。以GAPDH作为内参。在ABI7500反应平台上进行PCR反应。

1.3.10 检测各组细胞Bcl-2蛋白的表达水平

收集转染miR-301 ASO的SW620细胞, 运用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 经10%SDS-PAGE电泳后转膜, 将膜放在含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中37 °C封闭2 h, 加一抗稀释液1:500稀释鼠抗人Bcl-2单克隆抗体在4 °C温育过夜, 每次用TBST缓冲液洗膜10 min, 共3次, 加辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG(1:1000稀释), 置于37 °C温育2 h, 每次用BST缓冲液洗膜10 min, 共3次, 运用ECL化学发光法检测目的蛋白条带。以 β -actin作为内参。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 癌及癌旁组织采用配对样本 t 检验, 其他两组间均数的比较采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌组织miR-301的表达情况

利用实时荧光定量PCR检测120例结肠癌患者癌及对应癌旁组织miR-301的表达, 结果发现: 63.33%(76/120)例患者结肠癌组织miR-301的表达明显高于对应癌旁组织, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2), 其余36.67%(44/120)例患者结肠癌组织miR-301的表达与对应癌旁组织相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 降低miR-301的表达对SW620细胞存活率的影响

通过荧光定量PCR方法检测发现, 转染miR-301 ASO组, miR-301的相对表达量

(0.09 ± 0.01)较对照组(0.50 ± 0.07)明显降低($P = 0.00$, 图3A)。同时MTT检查结果发现, 转染miR-301 ASO组细胞生长较对照组明显降低, 其24、48、96 h的细胞生长抑制率分别为53.57%、59.13%和70.08%, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图3B)。

2.3 降低miR-301的表达对体外SW620细胞增殖的影响

克隆形成实验结果提示, 转染miR-301 ASO组SW620细胞克隆形成率 $5.33\% \pm 0.74\%$, 较对照组 $33.33\% \pm 8.38\%$ 明显降低($P = 0.00$, 图4)。

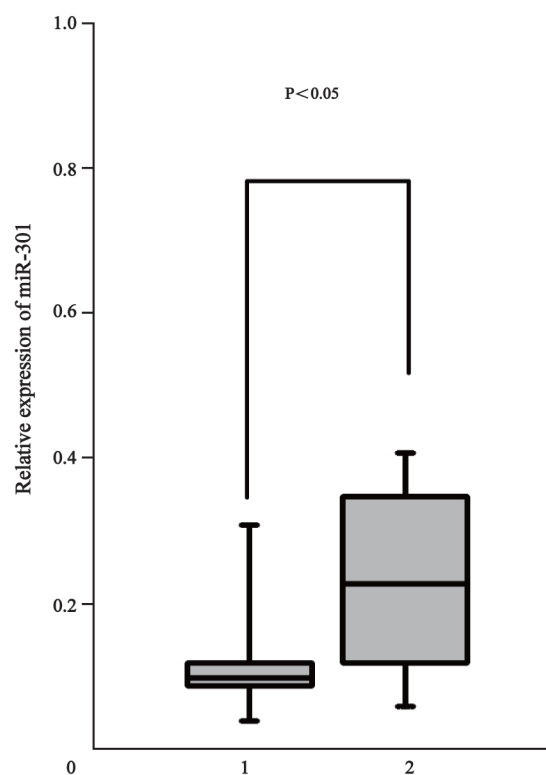


图2 实时荧光定量PCR检测120例结肠癌患者癌及对应癌旁组织miR-301表达的盒须图

Fig. 2 The box-plot of miR-301 expression level in 120 groups of colon cancer and adjacent normal tissues using quantitative PCR

The expression of miR-301 in 63.33% of the lung cancer is significantly higher than the corresponding normal tissues ($P < 0.05$).
1: Normal tissues; 2: Colon cancer.

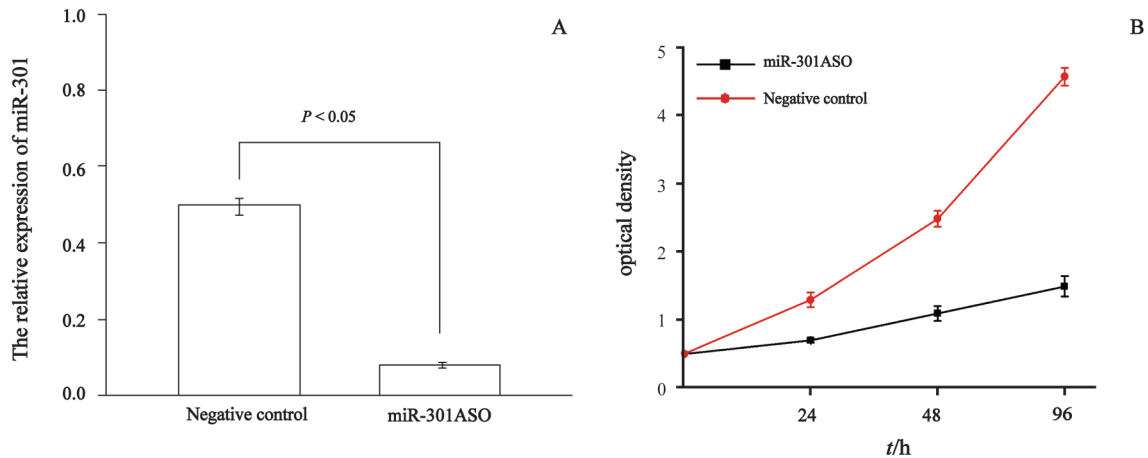


图3 转染miR-301 ASO后SW620细胞miR-301的表达和生长情况变化

Fig. 3 The expression of miR-301 and the growth of SW620 after transfection of miR-301 ASO

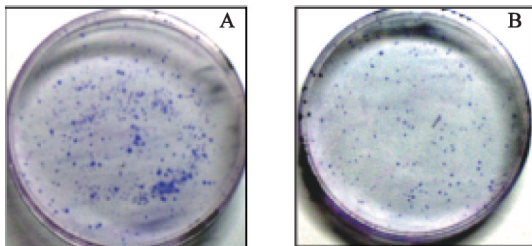


图4 转染miR-301 ASO后SW620细胞克隆形成率明显降低

Fig. 4 The colony formation rate of SW620 cell was significantly reduced after transfection of miR-301 ASO

A: Negative control; B: miR-301 ASO.

2.4 降低miR-301的表达对活体肿瘤增殖的影响

本实验所有的裸鼠肿瘤成瘤率为100%，实验结果发现，转染miR-301ASO组的肿瘤生长较对照组明显缓慢，差异有统计学意义($P=0.01$ ，图5)。

2.5 降低miR-301的表达对SW620细胞凋亡的影响

结肠癌细胞SW620转染miR-301 ASO后，流式细胞仪检测细胞凋亡的结果显示，转染miR-301 ASO组SW620细胞凋亡指数为 15.68 ± 1.46 ，较随机转染ASO组 3.36 ± 0.88 明显增高($P=0.02$ ，图6)。

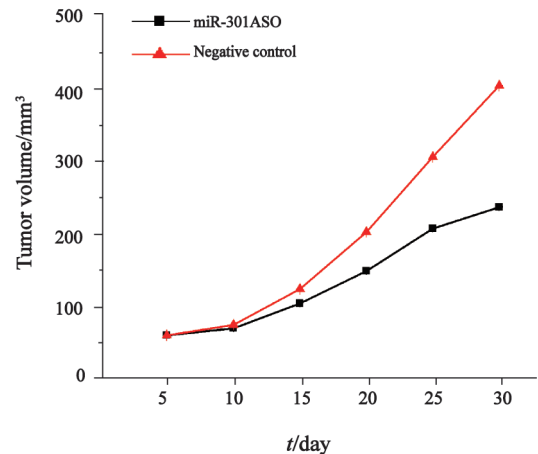


图5 活体内miR-301ASO转染的SW620细胞所形成肿瘤的体积变化

Fig. 5 Tumor growth curves after transfection of miR-301 ASO

2.6 降低miR-301的表达对Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达的影响

miR-301 ASO转染SW620细胞后，利用荧光定量PCR和Western blot检测各组细胞中Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达水平，结果发现转染miR-301 ASO组Bcl-2 mRNA(1.05 ± 0.04)和Bcl-2蛋白(0.21 ± 0.03)的相对表达水平明显低于随机转染ASO组(4.87 ± 0.96 , 0.88 ± 0.09)，差异均有统计学意义($P=0.00$ ，图7)。

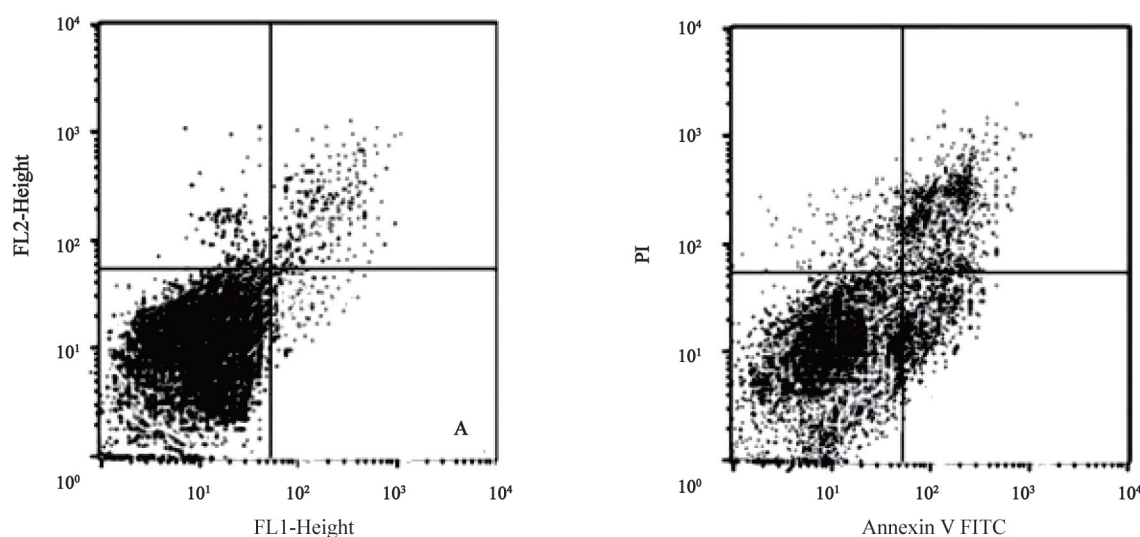


图6 流式细胞仪检测miR-301 ASO转染后的SW620细胞凋亡情况

Fig. 6 Apoptosis in SW620 cells after transfection of miR-301 ASO

A: Negative control; B: miR-301 ASO.

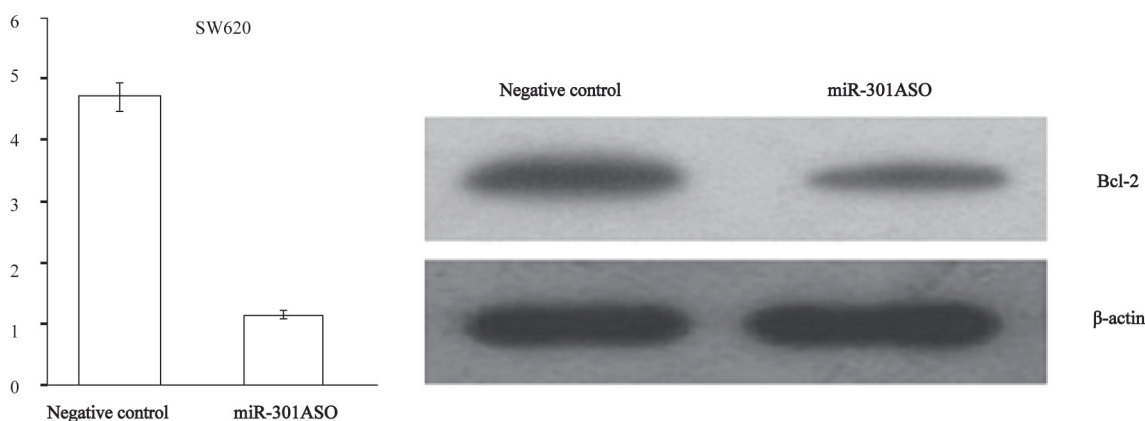


图7 Bcl-2 mRNA和蛋白在转染miR-301 ASO的SW620细胞中的表达情况

Fig. 7 Bcl-2mRNA and protein level in SW620 cell after transfection of miR-301 ASO

3 讨论

结肠癌是全球最常见的恶性肿瘤之一，尤其常见于西方发达国家，在中国结肠癌发病率的增长速度是全球平均增长水平的2倍^[12]。在确诊为结肠癌患者中，约50%以上属于临床晚期，治疗效果不理想。因此，急需寻找新的肿瘤标志物来进一步提高结肠癌的早期诊疗效果。miRNAs是一类新的基因调控因子，在控制细胞的生长、分化、血管形成及凋亡等过程中发挥着非常重要的作用^[7-8]。随着越来越多的miRNA被发现和深入研究，证实miRNAs与恶性

肿瘤密切相关，大约有调控miRNAs编码基因位的52%位于肿瘤相关染色体区域^[9-10]。另外，研究认为miRNA可以作为癌基因或者抑癌基因在肿瘤的发生、发展中起作用。因此，miRNAs可能成为诊断肿瘤新的分子标志和判断肿瘤治疗及预后的分子靶点。miRNAs在转录后水平调节靶基因的表达，更有助于恶性肿瘤的早期发现、早期诊断和早期治疗，其必将具有广阔的临床应用前景^[11]。

本实验首先在检测发现，miR-301在结肠癌组织中表达上调，与miR-301在乳腺癌及胰腺癌的表达明显上调相符^[3-4]，表明miR-301在结肠癌发生发展中可能发挥重要作用。ASO是一

类经人工合成或构建的反义表达载体表达的寡核苷酸片段, 长度多为15~30个核苷酸, 通过碱基互补原理, 干扰基因的解旋、复制、转录、mRNA的剪接加工乃至输出和翻译等各个环节。为了进一步分析miR-301对结肠癌细胞功能的影响, 本实验通过转染miR-301 ASO降低结肠癌细胞SW620中miR-301的表达, 同时利用MTT方法检测降低miR-301的表达后SW620细胞生长情况, 结果发现转染miR-301 ASO的SW620细胞存活率明显降低。此外我们运用克隆形成实验, 观察到转染miR-301 ASO后, SW620细胞克隆形成率比随机ASO组明显减少。同时本实验在活体内实验进一步证实转染miR-301 ASO组SW620细胞皮下形成肿瘤的体积较随机ASO组显著减小, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明miR-301在结肠癌细胞的生长中起着非常重要的作用。

为了分析降低miR-301表达对结肠癌细胞凋亡情况的影响, 本实验运用流式细胞技术检测SW620细胞凋亡情况, 结果发现转染miR-301 ASO组细胞凋亡指数较随即转染ASO组明显增高(15.68 ± 1.46 vs 3.36 ± 0.88)。众所周知, Bcl-2与细胞凋亡的关系密切。为证实miR-301与Bcl-2有关联, 本实验检测了各组Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达水平, 结果发现, 转染miR-301 ASO组Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达水平明显低于随机转染ASO组。表明miR-301可能通过调节Bcl-2的表达影响细胞的凋亡, 从而进一步达到对肿瘤细胞增殖能力的调控。

综上所述, miR-301在调控结肠癌细胞的增殖和凋亡方面发挥重要作用, 很可能成为诊断结肠癌新的分子标志物, 为结肠癌临床基因治疗提供新的靶点。但其具体的作用机制, 如miR-301如何调控结肠癌细胞的增殖及miR-301如何调控Bcl-2而影响细胞凋亡的问题还有待于

进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] KALA R, PEEK G W, HARDY T M, et al. MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics [J]. *J Clin Bioinforma*, 2013, 3(1): 6.
- [2] GURTAN A M, SHARP P A. The Role of miRNAs in Regulating Gene Expression Networks [J]. *J Mol Biol*, 2013. pii: S0022-2836(13)00154-X. doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.007. [Epub ahead of print].
- [3] SHI W, GERSTER K, ALAJEZ N M, et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 2926-2937.
- [4] LEE E J, GUSEV Y, JIANG J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 1046-1054.
- [5] JIANG J, GUSEV Y, ADERCA I, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 419-427.
- [6] BHATTACHARYA A, TUROWSKI S G, SAN MARTIN I D, et al. Magnetic resonance and fluorescence-protein imaging of the anti-angiogenic and anti-tumor efficacy of selenium in an orthotopic model of human colon cancer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(2): 387-393.
- [7] CROCE C M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(10): 704-714.
- [8] STEFANI G, SLACK F J. Small non-coding RNAs in animal development [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(3): 219-230.
- [9] MANIKANDAN J, AARTHI J J, KUMAR S D, et al. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer [J]. *Bioinformatics*, 2008, 2(8): 330-334.
- [10] NANA-SINKAM S P, CROCE C M. Clinical applications for microRNAs in cancer [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 93(1): 98-104.
- [11] KHALID U, SALEEM T, IMAM A M, et al. Pathogenesis, diagnosis and management of primary melanoma of the colon [J]. *World J Surg Oncol*, 2011, 9(14): 120-127.
- [12] CHEN W Q, ZENG H M, ZHENG R S, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2007 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(1): 1-8.

(收稿日期: 2013-02-25 修回日期: 2013-05-13)