



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.009
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.009
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(10):1389-1395.

· 基础研究 ·

自噬相关蛋白 Beclin 1 在胃癌组织中表达意义的 Meta 分析

余招焱, 丁杰, 杨晓飞, 张忠民

(贵州省人民医院 普通外科, 贵州 贵阳 550002)

摘要

目的: 系统评价胃癌组织中自噬相关蛋白 Beclin 1 (BECN1) 的表达及其与胃癌患者临床病理特征之间的相关性。

方法: 检索国内外相关数据库, 收集 2015 年 2 月 1 日前发表的关于胃癌组织中 BECN1 的表达及其临床意义的研究, 提取相关数据, 采用 RevMan 5.3 及 Stata12.0 软件进行 Meta 分析。

结果: 最终纳入了 9 个研究, 其中包含胃癌患者 1 620 例。Meta 分析结果显示, 胃癌组织中 BECN1 的表达阳性率明显低于非胃癌组织 ($OR=0.11$, $95\% CI=0.02\sim0.62$, $P=0.01$); 高分化胃癌组织的 BECN1 表达阳性率明显高于中低分化胃癌组织 ($OR=14.30$, $95\% CI=5.94\sim34.4$, $P=0.000$); 无远处转移患者的胃癌组织中 BECN1 表达阳性率明显高于有远处转移者 ($OR=0.39$, $95\% CI=0.22\sim0.70$, $P=0.001$); BECN1 表达与胃癌患者性别、年龄、肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期等无关 (均 $P>0.05$)。

结论: BECN1 在胃癌的发生和胃癌细胞分化中可能起重要作用, 且 BECN1 可能参与了胃癌细胞转移能力的调控。

关键词

胃肿瘤; 自噬; Beclin 1; Meta 分析
中图分类号: R735.2

Significance of autophagy-related protein beclin 1 expression in gastric cancer: a Meta-analysis

YU Zhaoyan, DING Jie, YANG Xiaofei, ZHANG Zhongmin

(Department of General Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China)

Abstract

Objective: To systematically analyze the expression of autophagy-related protein Beclin 1 (BECN1) in gastric cancer tissue and the correlation between BECN1 expression and clinicopathologic features of gastric cancer patients.

Methods: The studies investigating BECN1 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance published up to February 2015 were collected by searching the national and international databases. After data extraction, a meta-analysis was performed by using RevMan 5.3 and Stata12.0 software.

Results: Nine studies were finally included, involving 1 620 gastric cancer patients. The results of this meta-analysis showed that the positive expression rate of BECN1 in gastric cancer tissues was significantly lower than

基金项目: 贵州省科学技术博士基金资助项目 ([2015]2095); 贵州省科学技术厅联合基金资助项目 ([2014]7011)。

收稿日期: 2015-06-26; 修订日期: 2015-09-19。

作者简介: 余招焱, 贵州省人民医院副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤基础及临床方面的研究。

通信作者: 余招焱, Email: zhaoyan.yu@sohu.com

that in non-gastric cancer tissues ($OR=0.11$, $95\% CI=0.02-0.62$, $P=0.01$), in well differentiated gastric cancer tissues was significantly higher than that in moderately-poorly differentiated gastric cancer tissues ($OR=14.30$, $95\% CI=5.94-34.4$, $P=0.000$), and in gastric cancer tissues without distant metastasis was significantly higher than that in those with distant metastasis ($OR=0.39$, $95\% CI=0.22-0.70$, $P=0.001$), but no significant relationship was noted between BECN1 expression and gender, age, tumor infiltration depth, lymph node metastasis and TNM stage of gastric cancer patients (all $P>0.05$).

Conclusion: BECN1 may play a crucial role in gastric cancer carcinogenesis and differentiation of gastric cancer cells, and may also participate in the regulation of the metastasis ability of gastric cancer cells.

Key words Stomach Neoplasms; Autophagy; Beclin 1; Meta-Analysis

CLC number: R735.2

自噬是真核细胞中一种进化保守的分解代谢过程,越来越多的证据表明自噬在肿瘤细胞的生长、分化和抗肿瘤药物的疗效上扮演着重要的作用^[1-2],因此,自噬与肿瘤的关系也成为了目前肿瘤研究的热点之一^[3]。自噬相关蛋白Beclin 1 (BECN1)是自噬的一个关键调节因子,目前关于BECN1表达与胃癌之间的相关性已有较多的研究报告,但各研究的结果之间存在某些不一致。本研究对BECN1在胃癌中的表达及其与胃癌临床病理特征的关系进行Meta分析,旨在系统评价BECN1表达的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

通过检索PubMed、Web of Science、EMBASE、CNKI、CBM、VIP及万方等数据库,获得公开发表的原始文献,会议论文或毕业论文,检索时间为从建库直至2015年2月1日,文种限于中、英文。英文检索词为“Beclin 1”、“Beclin-1”及“BECN1”、“stomach OR gastric”和“neoplasm OR cancer OR tumor OR carcinoma”。中文检索词为“Beclin 1”、“Beclin-1”及“BECN1”和“胃癌”。根据纳入文献所提供的参考文献进行手工检索及文献追溯。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 (1) 原始文献为关于BECN1在胃癌及非胃癌组织中的表达差异或/及BECN1表达与胃癌临床病理特征之间相关性的临床病例对照研究。(2) 研究对象为病理确诊的胃癌患者,具有完整的临床病理资料,且均未行新辅助治疗;对照组为手术标本切缘的正常胃壁组织或非典型增生

的胃粘膜组织等。(3) 采用免疫组化染色法(IHC)进行检测,且最终结果采用半定量方法进行判定。(4) 原始文献中统计学方法使用恰当,数据确切,结果可靠,可计算出比值比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(95% CI)。

1.2.2 排除标准 (1) 重复发表文献;(2) 研究数据信息少或数据描述不详。

1.3 文献筛选、资料提取和方法学质量评价

首先由2位作者阅读文献的标题和摘要,排除明显不符合纳入标准的文献;对于难以判断的文献,再通过阅读全文进行评判。如有分歧,则通过讨论或提请第3位作者进行判断。提取纳入文献中的下列信息:第一作者、发表年份、国别及纳入病例的总体情况;胃癌临床病理特征相关数据,包括性别,年龄,肿瘤是否侵及浆膜层、淋巴结转移与否、有无远处转移、TNM分期及分化程度等。由2位作者独立采用Newcastle-Ottawa Scale (NOS)^[4]文献质量评价量表对每项纳入研究进行质量评估,并给予相应的评分(0~9分),其中0~4分为低质量研究,5~9分为高质量研究。

1.4 统计学处理

采用RevMan 5.3软件进行Meta分析,森林图采用OR及其95% CI作为合并统计量,检验水准 $P=0.05$ 。异质性分析采用 χ^2 检验,若各研究间的异质性无统计学意义($P \geq 0.1$, $I^2 \leq 50\%$),采用固定效应模型(fixed effects model, FEM)进行分析;若存在明显的异质性($P < 0.1$, $I^2 \geq 50\%$),则对其异质性来源进行分析,若无明显临床异质性,采用随机效应模型(random effects models, REM)进行分析。为评价结果的稳健性,采用单项研究的逐一删除法进行敏感性分析。采用Stata 12.0软件进行Egger检验以评价发

表偏倚检验, 计算 t 值及 P 值, $P < 0.05$ 则认为存在发表偏倚。

2 结 果

2.1 检索结果及分析

初步检索获得文献 93 篇, 按照纳入及排除标准逐层筛选, 最终纳入 9 个研究^[5-13], 其中包含了 1 620 例胃癌病例, 包括 4 篇英文及 5 篇中文文献。文献筛选流程见图 1。纳入文献及相关数据指标见表 1, 其中文献质量评分 ≥ 5 分者有 6 篇, 约占 66.67%, 平均质量评分 5.4 分, 证实纳入研究的质量较高。

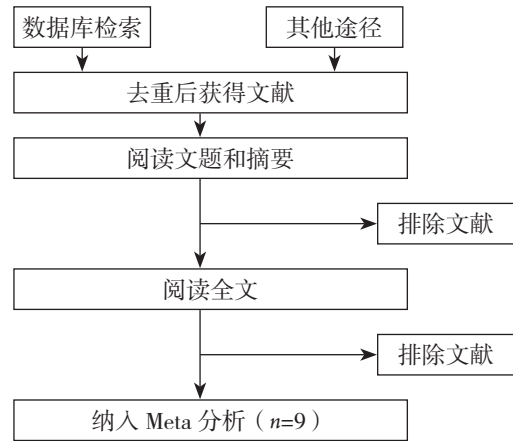


图 1 文献筛选流程

Figure 1 Literature screening processes

表 1 纳入文献的基线特征

Table 1 Baseline characteristics of the included studies

第一作者	胃癌标本数 (n)	非胃癌标本数 (n)	IHC 方法	一抗来源	蛋白表达强度 判断	相关数据指标	质量 评分
Chen, 等 ^[5] 2012	155	—	EnVision 法	Abcam	阳性细胞计数	2), 3), 4), 7), 8)	7
Geng, 等 ^[6] 2012	271	—	SP 法	Novus Biologicals	相加法	2), 3), 5), 8)	6
Yu, 等 ^[7] 2013	565	585	SP 法	Sigma	阳性细胞计数	1), 3), 6), 7), 8)	7
Zhou, 等 ^[8] 2012	153	—	SP 法	Santa Cruz	乘法	3), 8)	6
李捷, 等 ^[9] 2012	199	199	SP 法	Sigma	乘法	1), 2), 3), 4), 6), 7), 8)	4
李良庆, 等 ^[10] 2014	96	—	EnVision 法	Santa Cruz	乘法	2), 3), 4), 5), 6), 8)	6
李霞 ^[11] 2010	60	60	SP 法	USCNLIFE	乘法	1), 4), 5), 6), 8)	4
杨勇明, 等 ^[12] 2013	59	59	EnVision 法	中杉金桥	乘法	1), 2), 3), 4), 5), 6)	4
郭长青, 等 ^[13] 2010	62	36	SABC 法	Santa Cruz	乘法	1), 2), 3), 4), 5), 6)	5

注: 1) 胃癌与非胃癌组织的检测; 2) 年龄; 3) 性别; 4) 肿瘤分化程度; 5) 肿瘤是否侵及胃壁浆膜层; 6) 有无淋巴结转移; 7) 有无远处转移; 8) 肿瘤分期

Note: 1) Gastric cancer tissue vs. non-gastric cancer tissue; 2) Age; 3) Gender; 4) Degree of tumor differentiation; 5) Serosa layer invasion or not; 6) Presence or absence of lymph node metastasis; 7) Presence or absence of distant metastasis; 8) Tumor staging

2.2 Meta 分析结果

2.2.1 胃癌与非胃癌组织 BECN1 的表达 有 5 个研究^[7, 9, 11-13]报道了胃癌与非胃癌组织中 BECN1 的表达情况, 异质性检验提示异质性存在统计学差异 ($I^2=96%$), 故采用 REM 进行 Meta 分析。结果显示: 胃癌组织中 BECN1 的表达阳性率明显

低于非胃癌组织 ($OR=0.11$, $95\% CI=0.02\sim0.62$, $P=0.01$) (图 2) (表 2)。敏感性分析发现在去除权重较低的研究时^[13], 胃癌与非胃癌组织中 BECN1 的表达阳性率无统计学差异 ($OR=0.18$, $95\% CI=0.03\sim1.04$, $P=0.06$)。

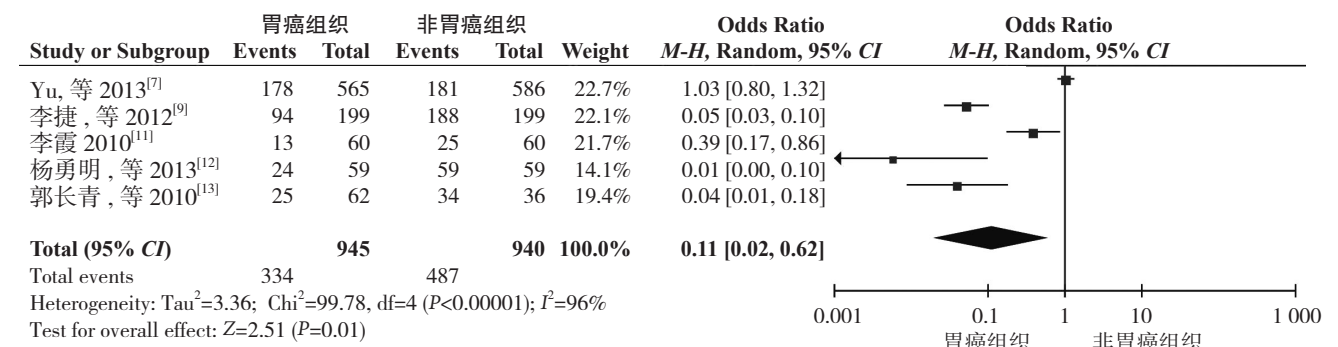


图 2 胃癌组织与非胃癌组织 BECN1 表达比较的森林图

Figure 2 Forest plot for comparison of BECN1 expression between gastric cancer tissue and non-gastric cancer tissue

表 2 BECN1 蛋白表达与胃癌临床病理特征之间相关性的 Meta 分析结果

Table 2 Results of meta-analysis of the correlation between BECN1 protein expression and clinical pathological features of gastric cancer

比较的类别	合并效应量		异质性		发表偏倚 ¹⁾	
	OR (95% CI)	P	I ²	P	t	P
胃癌组织 vs. 非胃癌组织	0.11 (0.02~0.62)	0.012	96.0%	0.000	-2.47	0.090
<60 岁 vs. ≥ 60 岁	1.06 (0.78~1.43)	0.723	0%	0.896	0.69	0.527
男性 vs. 女性	1.53 (0.99~2.36)	0.053	63.0%	0.008	-0.04	0.968
高分化 vs. 中低分化	14.3 (5.94~34.4)	0.000	0%	0.322	—	—
中高分化 vs. 低分化	0.58 (0.13~2.63)	0.481	86.4%	0.000	-1.30	0.323
未及浆膜层 vs. 侵及浆膜层以外	0.81 (0.38~1.74)	0.596	63.6%	0.027	0.01	0.994
无淋巴结转移 vs. 有淋巴结转移	1.09 (0.48~2.44)	0.839	83.7%	0.000	0.62	0.566
有远处转移 vs. 无远处转移	0.39 (0.22~0.70)	0.001	0%	0.882	3.97	0.157
I-II 期 vs. III-IV 期	1.41 (0.82~2.43)	0.21	74.8%	0.001	0.00	0.997

注：1) 采用 Egger 检验，在比较高分化与中低分化胃癌中 BECN1 的表达情况时因纳入研究少，难以获得 Egger 检验数据

Note: 1) Using Egger's test, and no data of Egger's test available in comparison of BECN1 expression between well-differentiated and moderately-poorly differentiated gastric cancer due to the small number of included studies

2.2.2 BECN1 在不同年龄及性别患者胃癌组织中的表达 在年龄方面，共有 6 个研究^[5-6, 9-10, 12-13]比较了 <60 岁及 ≥ 60 岁胃癌患者之间 BECN1 的表达情况。这些研究间的异质性无统计学意义 (P=0.896, I²=0%)；年龄 <60 岁及 ≥ 60 岁胃癌患者之间 BECN1 的表达无明显差异 (OR=1.06, 95% CI=0.78~1.43, P=0.723)；而在性别方

面比较的研究^[5-10, 12-13]中，异质性有统计学意义 (P=0.008, I²=63%)，故采用 REM 进行分析。结果提示：男性与女性患者胃癌组织 BECN1 表达强度无统计学差异 (OR=1.53, 95% CI=0.99~2.36, P=0.053) (表 2) (图 3)。敏感性分析提示在去除任何一项研究时此两项结论均保持不变。

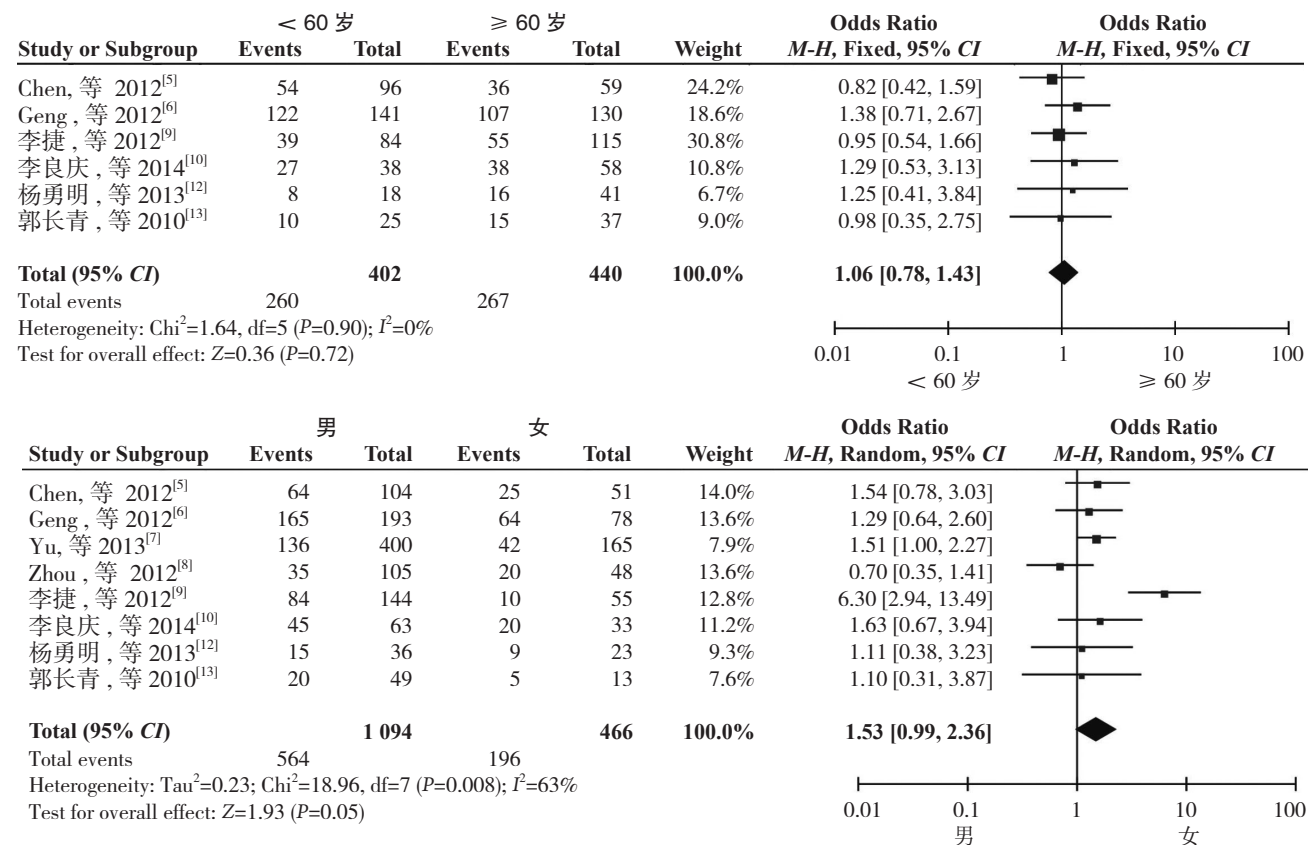


图 3 BECN1 在不同年龄及性别胃癌患者表达比较的森林图

Figure 3 Forest plot for comparison of BECN1 expression in gastric cancer patients with different ages and genders

2.2.3 BECN1 在不同分化程度胃癌组织中的表达 有 6 个研究^[5, 9-13]报道了 BECN1 在不同分化程度胃癌组织中的表达情况。其中 2 个研究^[9, 13]比较的是高分化与中低分化胃癌之间 BECN1 表达阳性率的差异, 两者之间无异质性 ($P=0.322, I^2=0\%$); Meta 分析结果显示高分化组胃癌的 BECN1 表达阳性率明显高于中低分化组

($OR=14.30, 95\% CI=5.94\sim34.4, P<0.00001$); 而其余 4 个研究^[5, 9, 11-12]比较了中高分化胃癌与低分化胃癌之间 BECN1 表达阳性率的差异, 经异质性检验证实存在明显的异质性 ($P<0.00001, I^2=86.4\%$), 分析结果显示中高分化胃癌与低分化胃癌之间无统计学差异 ($OR=0.58, 95\% CI=0.13\sim2.63, P=0.481$) (图 4)。

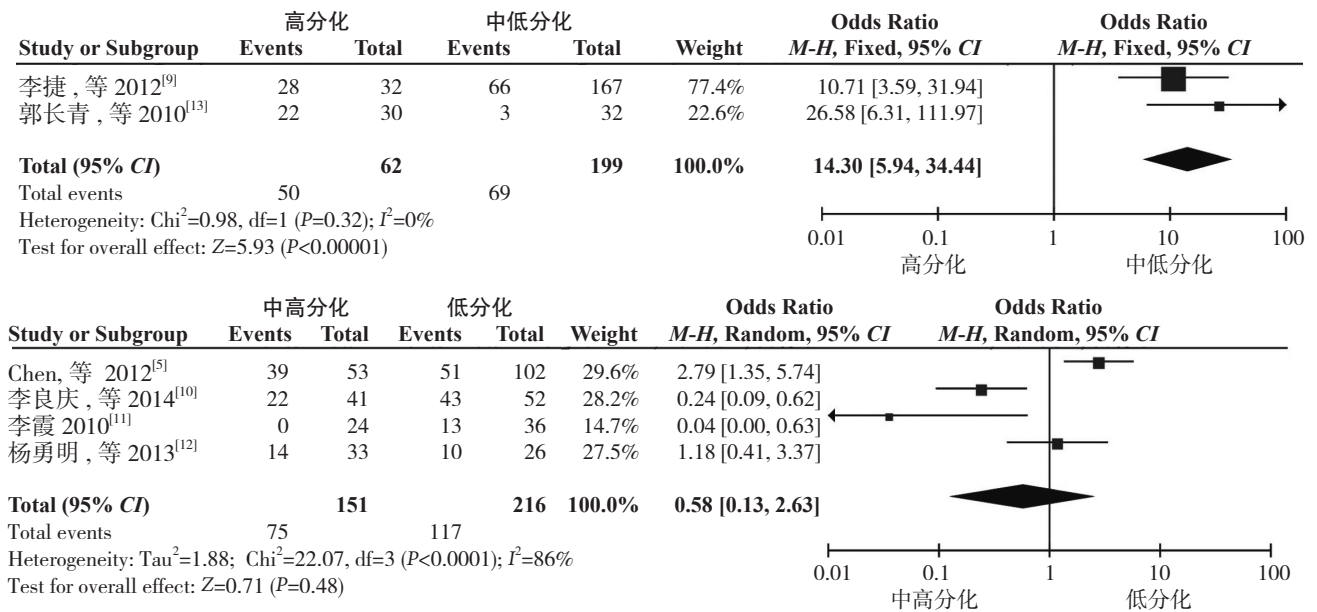


图 4 BECN1 在不同分化程度胃癌组织中的表达比较的森林图

Figure 4 Forest plot for comparison of BECN1 expression in gastric cancer tissues with different differentiation

2.2.4 BECN1 在不同 TNM 分期胃癌组织中的表达 经异质性检验, 在比较不同浸润深度 (未及浆膜层及侵及浆膜层以外), 淋巴结转移 (N_0 与 N_1) 及 TNM 分期 (I~II 期与 III~IV 期) 的各研究之间异质性均有统计学意义, 而比较有远处转移的胃癌 BECN1 表达的研究之间无异质性 ($I^2=0\%$)。

Meta 分析结果显示, 不同浸润深度, 淋巴结转移及 TNM 分期胃癌组织之间相比较, BECN1 表达阳性率的差异无统计学意义 ($P=0.596, 0.839, 0.21$), 但无远处转移患者的胃癌组织中 BECN1 表达阳性率明显高于有远处转移者 ($OR=0.39, 95\% CI=0.22\sim0.70, P=0.001$) (表 2) (图 5)。

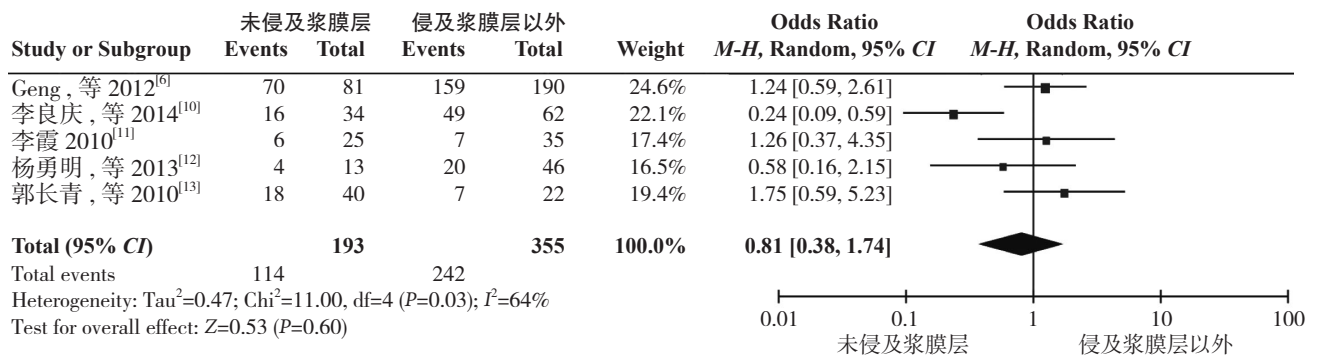


图 5 BECN1 在不同 TNM 分期胃癌组织中表达比较的森林图

Figure 5 Forest plot for comparison of BECN1 expression in gastric cancer tissues with different TNM stages

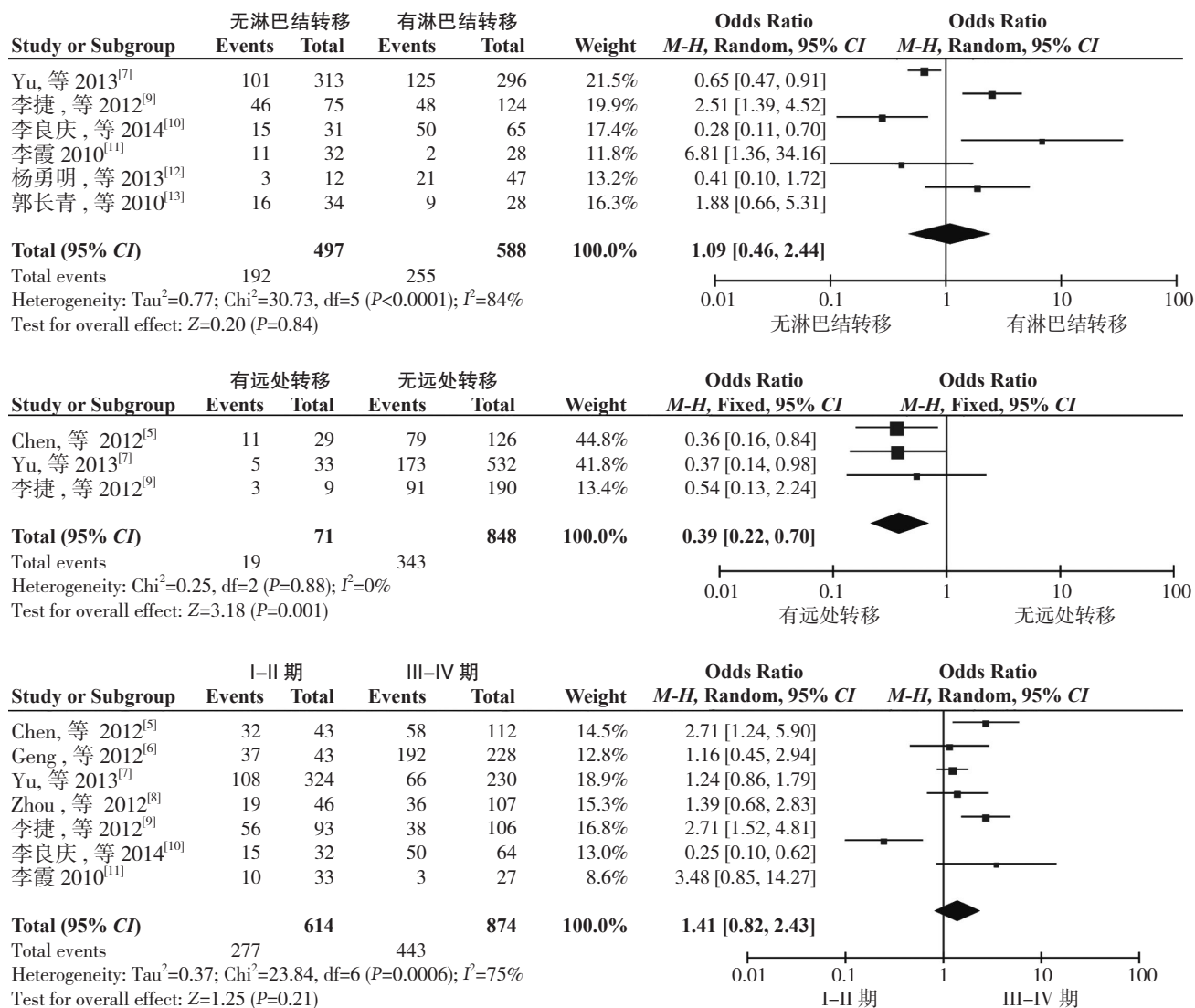


图 5 BECN1 在不同 TNM 分期胃癌组织中表达比较的森林图 (续)

Figure 5 Forest plot for comparison of BECN1 expression in gastric cancer tissues with different TNM stages (continued)

2.2.5 发表偏倚分析 Egger 检验结果显示, 在所有临床病理指标的比较中均未发现有发表偏倚 (表 2)。

3 讨论

自噬是一种肿瘤细胞在承受各种应激反应下的细胞降解过程^[14], 自噬可以由自噬特异基因 (Atg) 所调节, 其中包括 BECN1 基因。BECN1 可以与第三类的磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) 形成复合物, 这是自噬体形成所必需的^[15]。Konishi 等^[16]发现 BECN1 基因敲除的细胞其吞噬功能大多数被废除, 而 BECN1 下调则明显减弱了巨自噬及成纤维细胞系的自噬细胞内化 (internalization) 功能。因此, BECN1 基因在肿瘤细胞自噬的发生发展中具有重要的意义。

本研究对 9 个关于 BECN1 表达与胃癌及其临床病理特征之间相关性的研究进行了系统评价。结果显示, BECN1 基因在胃癌组织中的表达阳性率仅为非胃癌组织的 0.11 倍, 且高分化胃癌组织中 BECN1 表达阳性率约为中低分化胃癌的 15 倍, 两者均有统计学差异。马陆军等^[17]证实了 BECN1 在胃癌组、胃癌前病变和对照组中的表达强度逐渐增强, 与本研究结果一致。此外, BECN1 也是一种单倍不足 (haplo-insufficiency) 的肿瘤抑制基因, BECN1 杂合子小鼠更易于诱发肿瘤, 且在许多类型的肿瘤中均发现了 BECN1 单等位基因的缺失^[18]。采用 BECN1 过表达来过度刺激自噬可以抑制肿瘤的发展^[19]。这说明了 BECN1 在胃癌的发生和胃癌细胞分化过程中可能起重要作用。另外, 本研究提示 BECN1 的表达与胃癌的远处转移

存在明显的负相关, Won等^[20]的研究发现明显提高BECN1和Gli2的表达有助于抑制胃癌肿瘤细胞的生长及转移,且BECN1可以通过调节Gli2蛋白及Hedgehog信号通路来达到肿瘤抑制的作用。沉默干扰BECN1的表达后胃癌细胞血管生成拟态(VM)的管样结构形成受阻,说明BECN1参与了VM的形成^[21]。这些证据提示了BECN1可能参与了胃癌细胞远处转移方面的调控。

但本研究仍然存在某些方面的不足:首先,纳入研究的病例大多数来自中国,群体性较为单一。其次,纳入研究的实验设计中存在一定的缺陷,其中质量评分 ≥ 5 分者仅占66.67%,因此可能存在一定的选择偏倚,最终导致了敏感性分析时结论的不稳定。再次,文献中的数据提取不完整,难以全面地获得足够详细的数据进行分析;且各个研究的结果判定采用了不同的积分标准,只能采用笼统的高表达和低表达进行归类分析。最后,本研究在分析BECN1表达与各临床病理特征的关系时存在较大的异质性,且其异质性来源尚不明确,仅能采用REM分析进行校正以获得可靠的结论。因此,本研究结论仍然需要更多包含大宗病例且设计严谨的实验研究来进一步证实。

参考文献

- [1] 余招焱,王润华,张忠民. 自噬及其在胃癌中的研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2015, 22(1):121-125.
- [2] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism[J]. *Oncogene*, 2004, 23(16):2891-2906.
- [3] 陈键,刘田雨,俞伟,等. 甘草素对人乳腺癌MCF-7细胞增殖、凋亡及自噬的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(11):1466-1470.
- [4] He Y, Zhao X, Subahan NR, et al. The prognostic value of autophagy-related markers beclin-1 and microtubule-associated protein light chain 3B in cancers: a systematic review and meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014; 35(8):7317-7326.
- [5] Chen YB, Hou JH, Feng XY, et al. Decreased expression of Beclin 1 correlates with a metastatic phenotypic feature and adverse prognosis of gastric carcinomas[J]. *J Surg Oncol*, 2012, 105(6):542-547.
- [6] Geng QR, Xu DZ, He LJ, et al. Beclin-1 expression is a significant predictor of survival in patients with lymph node-positive gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e45968. doi: 10.1371/journal.pone.0045968.
- [7] Yu M, Gou WF, Zhao S, et al. Beclin 1 expression is an independent prognostic factor for gastric carcinomas[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2):1071-1083.
- [8] Zhou WH, Tang F, Xu J, et al. Low expression of Beclin 1, associated with high Bcl-xL, predicts a malignant phenotype and poor prognosis of gastric cancer[J]. *Autophagy*, 2012, 8(3):389-400.
- [9] 李捷,于观贞,王杰军,等. Beclin 1和PTEN蛋白在胃癌中的表达及预后价值[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(3):170-174.
- [10] 李良庆,潘敦,林振孟. 自噬相关基因Beclin 1和微管相关蛋白轻链3在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(3):508-510.
- [11] 李霞. 胃癌组织自噬基因Beclin 1和Survivin的表达及意义[D]. 南宁: 广西医科大学, 2010:21-33.
- [12] 杨勇明,崔健,丁丽君,等. 自噬相关蛋白Beclin1、MAPLC3在胃癌中的表达及临床意义[J]. 浙江医学, 2013; 35(23):2047-2049.
- [13] 郭长青,邵经浩,卢瑞利,等. 胃癌组织中Beclin 1和PTEN蛋白的表达[J]. 郑州大学学报:医学版, 2010, 45(3):463-466.
- [14] 谢杰斌,庞月珊,王崇树,等. 自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤对结直肠腺癌细胞生长与Notch1蛋白表的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24 (4):527-531.
- [15] Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes[J]. *Biochimie*, 2008, 90(2):313-323.
- [16] Konishi A, Arakawa S, Yue Z, et al. Involvement of Beclin 1 in engulfment of apoptotic cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(17):13919-13929.
- [17] 马陆军,林瑶光. S100A11和自噬基因Beclin1在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 世界华人消化杂志 2012, 20(33):3266-3271.
- [18] Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12):1809-1820.
- [19] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. *Nature*, 1999, 402(6762):672-676.
- [20] Won KY, Kim GY, Lim SJ, et al. Autophagy is related to the hedgehog signaling pathway in human gastric adenocarcinoma: prognostic significance of Beclin-1 and Gli2 expression in human gastric adenocarcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(4):308-315.
- [21] 丁云鹏,赵奎,吴勇,等. Beclin-1在胃癌血管生成拟态形成中的表达及意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2014, 17(7):716-719.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 余招焱,丁杰,杨晓飞,等. 自噬相关蛋白Beclin 1 在胃癌组织中表达意义的Meta分析[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(10):1389-1395. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.009
 Cite this article as: YU ZY, DING J, YANG XF, et al. Significance of autophagy-related protein beclin 1 expression in gastric cancer: a Meta-analysis[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(10):1389-1395. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.009