

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-03-035

· 临床交流 ·

· CLINICAL COMMUNICATION ·

## 甲状腺癌中血清 miR-150-5p 表达水平与临床病理特征的关系

吴耿刚

(广州医科大学附属第四医院甲乳外科, 广州 511300)

**摘要** 目的 探讨甲状腺癌组织 miR-150-5p 表达水平及对甲状腺癌鉴别诊断的辅助价值。方法 选取 82 例甲状腺癌患者作为病理组, 选取 82 例体检健康者作为对照组。比较甲状腺癌组织、血清中的 miR-150-5p 表达, 分析组织、血清中的 miR-150-5p 表达与甲状腺癌患者临床特征的关系。结果 甲状腺癌组织中 miR-150-5p 表达水平低于癌旁组织, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。病例组血清中 miR-150-5p 水平低于对照组 ( $P < 0.05$ )。不同临床分期、分化程度、淋巴结转移、肿瘤直径情况的患者组织、血清中的 miR-150-5p 表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。组织中 miR-150-5p 表达与临床分期 ( $r_s = -0.497$ )、淋巴结转移 ( $r_s = -0.315$ )、肿瘤直径 ( $r_s = -0.444$ ) 呈负相关 ( $P < 0.05$ ); miR-150-5p 表达与分化程度 ( $r_s = 0.404$ ) 呈正相关 ( $P < 0.05$ )。血清中 miR-150-5p 表达与临床分期 ( $r_s = -0.455$ )、淋巴结转移 ( $r_s = -0.306$ )、肿瘤直径 ( $r_s = -0.433$ ) 呈负相关 ( $P < 0.05$ ); miR-150-5p 表达与分化程度 ( $r_s = 0.420$ ) 呈正相关 ( $P < 0.05$ )。结论 甲状腺癌患者组织、血清中的 miR-150-5p 均呈低表达, 其与临床分期、分化程度、淋巴结转移、肿瘤直径紧密相关。

**关键词:** 甲状腺癌; miR-150-5p; 表达; 预测

中图分类号: R736.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)03-0221-06

## Expression level of miR-150-5p of thyroid cancer patients and its relationship with clinical pathological characteristics

WU Genggang

(Department of Breast Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511300, China)

**Abstract Objective** To investigate the expression level of miR-150-5p in tissues and serum of thyroid cancer tissues and to explore its auxiliary value for differential diagnosis of thyroid cancer. **Methods** 82 cases of thyroid cancer patients were selected (pathology group), and 82 cases of healthy people with physical examination were selected and set as the control group. The miR-150-5p expressions in the tissue

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(2022102202837356)。

第一作者: 吴耿刚, 本科, 副主任医师, 研究方向为甲状腺、乳腺, zhongtianyi330@163.com。

and serum of thyroid cancer patients were compared, and the relationship between the miR-150-5p expressions in tissue and serum and the clinical characteristics of thyroid cancer patients was analyzed.

**Results** The miR-150-5p expression level in thyroid cancer tissues was lower than that in paraneoplastic tissues, showing a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). Serum miR-150-5p level in the case group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). Comparison of tissue and serum miR-150-5p expression levels in patients with different clinical stages, differentiation degrees, lymph node metastasis, and tumor diameter conditions showed statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). Tissue miR-150-5p expression was significant negative correlation ( $P < 0.05$ ) with clinical stage ( $r_s = -0.497$ ), lymph node metastasis ( $r_s = -0.315$ ), and tumor diameter ( $r_s = -0.444$ ). The miR-150-5p expression was significant positive correlation ( $P < 0.05$ ) with differentiation degree ( $r = 0.404$ ). Serum miR-150-5p expression was significant negative correlation ( $P < 0.05$ ) with clinical stage ( $r_s = -0.455$ ), lymph node metastasis ( $r_s = -0.306$ ), and tumor diameter ( $r_s = -0.433$ ). The miR-150-5p expression was significant positive correlation ( $P < 0.05$ ) with degree of differentiation ( $r_s = 0.420$ ). **Conclusion** The miR-150-5p shows low expression in tissue and serum of thyroid cancer, which is closely correlated with clinical stage, degree of differentiation, lymph node metastasis, and tumor diameter.

**Keywords:** thyroid cancer; miR-150-5p; expression; forecast

甲状腺癌是一种常见的内分泌系统肿瘤,其发病率在全球范围内呈逐年递增的趋势,尤其是女性患者<sup>[1-2]</sup>。甲状腺癌的发病与遗传、环境、激素等多种因素相关,其危害不仅在于疾病本身,还在于手术、放疗等治疗手段对患者生活质量的影响。此外,甲状腺癌发生和发展与癌基因的活化表达密切相关,当癌基因发生突变或异常表达时,会形成癌症<sup>[3-4]</sup>。因此,了解相关基因以及调控机制对于甲状腺癌治疗至关重要,可指导临床治疗方案选择,并为开发新治疗靶点与药物提供了新思路。microRNA (miRNA)是一类长度为20~22个核苷酸的非编码RNA分子,广泛存在于各种生物体中。近年来,研究显示,miRNA在肿瘤的发生、发展、转移等过程中发挥着重要作用<sup>[5-6]</sup>。有研究<sup>[7]</sup>表明,miRNA在基因表达过程中发挥着关键调控作用。miR-150-5p是一种由miR-150基因编码的成熟miRNA分子,其表达水平与癌症的发生和发展密切相关,可通过调节癌症相关信号通路的活性来影响癌症发展<sup>[8-9]</sup>。目前,关于miR-150-5p在肿瘤中的作用机制的研究已经取得了一定的进展,但仍需要进一步深入探讨其在不同类型肿瘤中的具体作用及其与临床病理特征的关系。因此,本研究旨在探讨miR-150-5p在甲状腺癌

患者组织和血清中的表达情况,并分析其与临床病理特征的关联,以期为甲状腺癌的诊断和治疗提供新的研究方向和实验依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2021年4月至2023年4月我院收治且接受手术治疗的甲状腺癌患者82例作为病例组。其中,男15例,女67例;年龄23~79岁,中位年龄50岁。临床分期:I期、II期、III期、IV期分别有35例、26例、15例、6例。分化程度:高、中、低分别有40例、31例、11例,伴淋巴结转移37例。于同期选取82例体检健康者作为对照组。

纳入标准:①符合《甲状腺癌诊疗规范(2018年版)》<sup>[10]</sup>,经病理检测明确诊断;②初次诊断;③接受手术治疗并切除甲状腺。

排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②术前接受放疗、化疗等抗癌治疗;③合并重要脏器严重功能障碍。本研究经广州医科大学附属第四医院医学伦理委员会审核批准。

### 1.2 研究方法

1.2.1 组织中miR-150-5p表达检测 ①标本获取。

术中肿瘤切除后,立即在距病变组织 2 cm 处切取正常甲状腺组织,并留取癌组织样本,二者相同,约 0.6 cm,快速置于 RNase 冷存管液氮中保存。样本获取过程中,需要警惕交叉污染情况发生。②数据库分析。基于癌症基因组图谱(TCGA)数据库,分析甲状腺癌组织以及癌旁组织 miR-150-5p 表达水平。③qRT-PCR 检测。Trizol 提取甲状腺癌组织以及癌旁组织的总 RNA。设计引物,然后使用 PrimeScript RT 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,逆转录体系 10  $\mu$ L,参照说明书进行。取反应液进行荧光定量 PCR,参照 SYBR  $\text{C}^{\circ}$  Premix Ex Taq TM II 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 操作。PCR 反应体系中条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环;95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 1 min,95  $^{\circ}$ C 30 s。U6 为内参基因,其上、下游引物分别为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'、5'-AACGCTTCA CGAATTTGCGT-3';目的基因 miR-150-5p 上、下游引物分别为 5'-ACTGTCTCCCA ACCCTTG TA-3'、5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。目的基因 miR-150-5p 相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示,单样本均重复测量 3 次。

1.2.2 血清中 miR-150-5p 表达水平测定 抽取研究对象清晨空腹静脉血 3 mL,置于不含抗凝剂的离心管中,室温下以 2 500 r/min 的速度离心 10 min,分离上层清液至 EP 管中,置于 -80  $^{\circ}$ C 环境中保存待测。采用 Trizol RNA 试剂盒提取标本中总 RNA,逆转录为 cDNA,根据实时荧光定量 PCR 试剂盒说明实施操作。PCR 总反应体系为 15  $\mu$ L,反应条件:16  $^{\circ}$ C 30 min,42  $^{\circ}$ C 30 min,85  $^{\circ}$ C 5 min。扩增条件:10 min 95  $^{\circ}$ C 1 个循环,15 s 95  $^{\circ}$ C,60 s 60  $^{\circ}$ C 45 个循环,重复 3 次。以 U6 为内参照,血清中 miR-150-5p 相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 行统计分析,计数资料以样本量  $n$  和样本量占比(%)表示,采用描述性分析。符合正态分布的计量资料用( $\bar{x}\pm s$ )表示,进行  $t$  检验或者单因素 ANOVA 方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ ,取双侧。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 甲状腺癌组织与癌旁组织中的 miR-150-5p 表达水平比较

甲状腺癌组织中 miR-150-5p 表达区间为 0.68~1.18,平均为(0.96 $\pm$ 0.10);癌旁组织中 miR-150-5p 表达区间为 0.82~1.80,平均为(1.31 $\pm$ 0.19)。两者 miR-150-5p 表达水平比较存在差异,甲状腺癌组织低于癌旁组织( $P<0.05$ ),结果如表 1 所示。

表 1 甲状腺癌组织与癌旁组织 miR-150-5p 表达水平比较

组别	n/例	组织 miR-150-5p 表达	
		区间	平均值
癌组织	82	0.68~1.18	0.96 $\pm$ 0.10
癌旁组织	82	0.82~1.80	1.31 $\pm$ 0.19
$t$		14.890	
$P$		<0.05	

### 2.2 两组血清中 miR-150-5p 水平比较

病例组血清 miR-150-5p 表达区间为 0.71~1.25,平均(1.02 $\pm$ 0.12);对照组血清 miR-150-5p 表达区间为 0.76~2.02,平均(1.35 $\pm$ 0.25)。两组血清 miR-150-5p 表达水平比较存在差异,病理组低于对照组( $P<0.05$ ),结果如表 2 所示。

表 2 两组血清标志物水平比较

组别	n/例	组织中 miR-150-5p 表达水平	
		区间	平均值
病例组	82	0.71~1.25	1.02 $\pm$ 0.12
对照组	82	0.76~2.02	1.35 $\pm$ 0.25
$t$		11.578	
$P$		<0.05	

### 2.3 不同临床特征患者组织、血清中的 miR-150-5p 表达水平

分析组织、血清中的 miR-150-5p 表达与甲状腺癌患者不同临床特征的关系发现,不同年龄、性别、病理类型、肿瘤包膜完整情况的患者组织 miR-150-

5p 表达、血清中的 miR-150-5p 表达水平比较无差异 ( $P>0.05$ )。不同临床分期、分化程度、淋巴结转移、肿瘤直径情况的患者组织中 miR-150-5p 表达、血清

中 miR-150-5p 表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 结果如表 3 所示。

表 3 不同特征甲状腺癌患者癌组织中 miR-150-5p 表达水平差异

项目	类别	n/例	组织中 miR-150-5p			血清中 miR-150-5p		
			平均值	t/F	P	平均值	t/F	P
年龄	≤50 岁	49	0.96±0.10	0.448	>0.05	1.02±0.11	0.503	>0.05
	>50 岁	33	0.95±0.09			1.01±0.08		
性别	男	15	0.99±0.09	1.507	>0.05	1.05±0.09	1.454	>0.05
	女	67	0.95±0.10			1.01±0.10		
临床分期	I ~ II	61	0.99±0.09	5.146	<0.05	1.04±0.09	4.733	<0.05
	III ~ IV	21	0.88±0.08			0.94±0.10		
分化程度	高	40	1.00±0.09	10.368	<0.05	1.06±0.09	9.562	<0.05
	中	31	0.92±0.08			0.98±0.08		
	低	11	0.91±0.11			0.96±0.11		
淋巴结转移	无	37	0.99±0.11	2.679	<0.05	1.05±0.11	2.723	<0.05
	有	45	0.93±0.08			0.99±0.09		
肿瘤直径	<1 cm	57	0.99±0.09	4.442	<0.05	1.04±0.09	4.337	<0.05
	≥1 cm	25	0.89±0.09			0.95±0.09		
病理类型	乳头状癌	54	0.97±0.10	1.122	>0.05	1.02±0.11	0.970	>0.05
	滤泡状癌	28	0.94±0.08			1.00±0.08		
肿瘤包膜完整	是	38	0.95±0.10	0.709	>0.05	1.00±0.10	1.009	>0.05
	否	44	0.97±0.10			1.03±0.10		

### 2.4 miR-150-5p 表达水平与甲状腺癌患者临床分期、分化程度、淋巴结转移的关系

Spearman 相关分析显示, 组织中 miR-150-5p 表达水平与临床分期 ( $r_s = -0.497$ )、淋巴结转移 ( $r_s = -0.315$ )、肿瘤直径 ( $r_s = -0.444$ ) 呈负相关 ( $P<0.05$ ); miR-150-5p 表达水平与分化程度 ( $r_s = 0.404$ ) 呈正相关 ( $P<0.05$ )。血清中 miR-150-5p 表达水平与临床分期 ( $r_s = -0.455$ )、淋巴结转移 ( $r_s = -0.306$ )、肿瘤直径 ( $r_s = -0.433$ ) 呈负相关 ( $P<0.05$ ); miR-150-5p 表达水平与分化程度 ( $r_s = 0.420$ ) 呈正相关 ( $P<0.05$ )。结果如表 4 所示。

表 4 miR-150-5p 表达水平与甲状腺癌患者临床分期、分化程度、淋巴结转移的关系

项目	类别	组织中 miR-150-5p 表达水平	血清中 miR-150-5p 表达水平
临床分期	$r_s$	-0.497	-0.455
	P	<0.05	<0.05
分化程度	$r_s$	0.404	0.420
	P	<0.05	<0.05
淋巴结转移	$r_s$	-0.315	-0.306
	P	<0.05	<0.05
肿瘤直径	$r_s$	-0.444	-0.433
	P	<0.05	<0.05

### 3 讨论

甲状腺癌是普外科常见的癌症,仅占所有恶性肿瘤的1%,但其发病率居人类内分泌系统恶性肿瘤之首<sup>[11]</sup>。统计显示<sup>[12]</sup>,甲状腺癌的发病率逐年上升,且患者诊断年龄趋于年轻化。甲状腺癌的发病年龄范围较广,从青少年到老年人都有,平均发病年龄约为40岁。手术切除是甲状腺癌的主要治疗方法,可显著提高患者生存率。由于甲状腺癌早期临床表现不明显,很容易被患者忽视,从而错过最佳治疗时机。由于甲状腺癌的隐匿性,如疾病进展缓慢、与结节性甲状腺肿相似等,临床上也可能发生误诊。甲状腺癌病机制较为复杂,涉及多个基因的异常表达和突变<sup>[13]</sup>。这些异常表达和突变可以导致信号通路的异常激活和甲状腺细胞分化状态的改变,从而促进癌细胞的增殖和转移。深入研究甲状腺癌的发病机制有助于揭示其病理生理过程,为甲状腺癌的预防和治疗提供新的靶点和策略。

miRNA在多种人类疾病中的作用已成为近年来的研究热点,miRNA是一类包含19~22个核苷酸的短非编码RNA分子,它们是高度保守的分子,通过以完全或不完全互补的方式与靶基因的3'非翻译区结合来参与靶基因的调控<sup>[14-15]</sup>。据报道<sup>[16-17]</sup>,多种miRNA与癌症的发生和进展密切相关,常常发挥抑癌基因或促癌基因的作用。miRNA可调节基因表达,miR-150-5p是一种miRNA的亚型,属于miRNA-150家族,是一种进化上保守的miRNA,与多种人类癌症和炎症反应有关。研究<sup>[18-20]</sup>表明,miR-150-5p在结直肠癌、肺癌、胃癌、乳腺癌和肝癌等多种实体瘤中的表达水平显著降低。miR-150-5p的降低表达与癌细胞的增殖、侵袭能力增强和转移潜能提高等现象有关。然而,现阶段,miR-150-5p表达与甲状腺癌发生与发展的相关研究较为鲜见。本研究探讨组织、血清中的miR-150-5p在甲状腺癌中的表达及其应用价值发现,甲状腺癌组织中miR-150-5p水平低于健康体检者,由此提示,组织、血清中的miR-150-5p在甲状腺癌组织中呈低表达。有研究<sup>[21-22]</sup>表明,miR-150-5p可以通过靶向调控下游基因,影响细胞

周期、增殖、凋亡等过程。在甲状腺癌中,miR-150-5p可能通过类似机制影响肿瘤的发生、发展。例如,miR-150-5p可能通过抑制肿瘤抑制基因的表达,从而促进甲状腺癌细胞的增殖和侵袭。此外,miR-150-5p还可能通过影响肿瘤微环境,改变肿瘤细胞的生长和转移<sup>[23-24]</sup>。以上研究表明,miR-150-5p在甲状腺癌发展中的重要且新的作用,并为甲状腺癌中miR-150-5p升高与细胞增殖之间的相关性提供分子线索。因此,本研究为进一步了解甲状腺癌进展中涉及的复杂生物学提供了坚实的基础。

本研究还表明,不同临床分期、分化程度以及淋巴结转移情况患者组织、血清miR-150-5p表达水平比较存在显著差异;进一步采用Spearman相关分析发现,组织中miR-150-5p表达与临床分期、淋巴结转移、肿瘤直径呈显著负相关;miR-150-5p表达与分化程度呈显著正相关。血清中miR-150-5p表达与临床分期、淋巴结转移、肿瘤直径呈显著负相关( $P < 0.05$ );miR-150-5p表达与分化程度呈显著正相关。这说明miR-150-5p表达与甲状腺癌患者Tg、TSH、临床分期、分化程度以及淋巴结转移、肿瘤直径等情况有关,miR-150-5p表达与甲状腺癌发生与发展密切相关。这为进一步研究miR-150-5p在甲状腺癌中的作用机制提供了依据,有助于揭示miR-150-5p在肿瘤发生和发展中的分子调控网络。同时,这一发现也为临床医生提供了评估患者预后的新的生物学指标,有助于提高治疗效果。

### 4 结论

组织、血清中的miR-150-5p在甲状腺癌中均呈地表达,其表达水平与临床分期、分化程度、淋巴结转移、肿瘤直径密切关联。然而,本研究仍存在一定的局限性,例如样本量较小、实验方法有待进一步优化等。未来研究可以通过扩大样本量、采用更多样的实验方法和技术手段,深入探讨miR-150-5p在甲状腺癌中的作用机制及临床应用价值,为患者带来更好的治疗效果。

## 参考文献

- [1] 李丹,刘素梅,李晴晴.甲状腺癌病人术后癌症复发恐惧现状及其影响因素分析[J].蚌埠医学院学报,2023,48(7):971-975.
- [2] 殷德涛,薛文秀.甲状腺癌的防治方法与成效[J].国际外科学杂志,2020,47(11):735-738.
- [3] 张冉,杨洁,冯恩梓,等.甲状腺乳头状癌基因突变与其侵袭性相关性研究[J].昆明医科大学学报,2023,44(2):125-132.
- [4] 万福强,张波,彭丽,等.二代测序探究甲状腺癌基因突变及临床意义[J].中国现代普通外科进展,2022,25(7):525-528.
- [5] 张廷华,胡友元.MiRNA在甲状腺癌中的研究进展[J].生命的化学,2022,42(12):2231-2236.
- [6] CAO J, ZHANG M, ZHANG L, et al. Non-coding RNA in thyroid cancer; functions and mechanisms[J]. Cancer Lett, 202,496:117-126.
- [7] LI Z, ZHOU X, HUANG J, et al. miR-150-5p inhibits nasopharyngeal cancer genesis by suppressing PYCR1[J]. Am J Med Sci, 2022,S0002-9629(22)00268-3.
- [8] 王恺彬,郑建军,王艳君.SMIM22、miR-150-5p在子宫内膜癌组织中的表达及与预后的关系[J].中国优生与遗传杂志,2022,30(5):866-869.
- [9] 吴彬,陶娟,佟萌,等.miR-150-5p在甲状腺癌中的表达及其生物学功能研究[J].肿瘤学杂志,2019,25(6):503-509.
- [10] 甲状腺癌诊疗规范(2018年版)[J].中华普通外科学文献(电子版),2019,13(1):1-15.
- [11] FUGAZZOLA L. Medullary thyroid cancer - An update[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2023, 37(1):101655.
- [12] ZHU G, CHAN X, KANG Y, et al. CircRNA: a novel potential strategy to treat thyroid cancer (Review) [J]. Int J Mol Med,2021,48(5):201.
- [13] 张新洲,刘劲松,许娴,等.2005-2016年中国甲状腺癌发病和死亡趋势分析[J].中华肿瘤防治杂志,2022,29(24):1725-1733.
- [14] 余昌敏,张丹,闵明,等.外泌体 miRNA 作为癌症早期诊断标志物的研究进展[J].中国免疫学杂志,2020,36(22):2786-2790.
- [15] 朱岩,樊根涛,曹莉莉,等.MiRNA在肿瘤血管生成中的研究进展[J].肿瘤学杂志,2021,27(6):480-486
- [16] 李芳,姜霞,苏兴凯,等. miRNA-146a在甲状腺癌细胞中的靶基因预测及相关通路分析[J]. 肿瘤学杂志, 2020,26(8):689-694.
- [17] 李勇,郭敏,康英英.MicroRNA在甲状腺癌中的研究进展[J].中华全科医学,2022,20(2):298-301351.
- [18] 李平,任斌,李洪利,等.MiR-150-5p通过靶向调控 Rab1A抑制乳腺癌细胞 MDA-231 的上皮-间质转化[J].中国生物化学与分子生物学报,2018,34(9):997-1003.
- [19] 金俊伊,李木,胡耀元,等.miR-150-5p与 NCAPG 的靶向关系及其对肝细胞肝癌 Huh7 细胞的抑制作用[J].吉林大学学报(医学版),2023,49(1):122-130.
- [20] 董延琥,王艺静.miR-150-5p调控非小细胞肺癌的 A549 细胞凋亡的机制研究[J].实用癌症杂志,2021,36(8):5.
- [21] GUO K, QIAN K, SHI Y, et al. LncRNA-MIAT promotes thyroid cancer progression and function as ceRNA to target EZH2 by sponging miR-150-5p[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(12):1097.
- [22] SHI L, ZHANG Y, XIA Y, et al. MiR-150-5p protects against septic acute kidney injury via repressing the MEKK3/JNK pathway[J]. Cell Signal,2021,86:110101.
- [23] NI T, HUANG X, PAN S, et al. Inhibition of the long non-coding RNA ZFAS1 attenuates ferroptosis by sponging miR-150-5p and activates CCND2 against diabetic cardiomyopathy[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(21):9995-10007.
- [24] WANG X, LI XL, QIN LJ. The lncRNA XIST/miR-150-5p/c-Fos axis regulates sepsis-induced myocardial injury via TXNIP-modulated pyroptosis[J]. Lab Invest, 2021, 101(9):1118-1129.

[收稿日期:2023-11-28]

[责任编辑:杨建香,李佳睿 英文编辑:周寿红]