

# 慢性心力衰竭患者血清 lncRNA MALAT1 的表达水平及其临床意义

王新庄, 孟建涛 (西安高新医院急诊科, 西安 710077)

**摘要:** **目的** 探究慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 患者血清长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 肺癌转移相关转录本 1 (MALAT1) 的表达水平及其临床意义。 **方法** 选取 2017 年 2 月 ~ 2019 年 5 月西安高新医院急诊科收治的 62 例 CHF 患者为 CHF 组, 另选取同期 70 例体检健康者为对照组。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测血清 lncRNA MALAT1 的表达水平。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清凋亡分子的水平。采用彩色多普勒超声仪检查并测定心力衰竭相关指标。相关性采用 Pearson 相关性分析, 采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线评价 lncRNA MALAT1 对 CHF 的诊断效能。 **结果** CHF 组患者血清 lncRNA MALAT1 和 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的水平均低于对照组, CHF 组患者血清 Bcl-2 相关 x 蛋白 (BCL2-Associated X, Bax) 水平高于对照组, 差异均具有统计学意义 ( $t=16.31, 11.90, 9.57$ , 均  $P=0.00$ )。CHF 组中美国纽约心脏病学会 (New York Heart Disease Association, NYHA) 分级 III 级和 IV 级患者血清 lncRNA MALAT1 和 Bcl-2 的水平低于 NYHA II 级, CHF 组中 NYHA III 级和 IV 级患者血清 Bax 水平高于 NYHA II 级, NYHA IV 级患者血清 lncRNA MALAT1 和 Bcl-2 的水平低于 III 级, 血清 Bax 水平高于 III 级, 差异均具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。CHF 组患者左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 低于对照组, 左室舒张末期径 (left ventricular end diastolic diameter, LVEDD) 和左室收缩末期径 (left ventricular end systolic diameter, LVESD) 高于对照组, 差异均具有统计学意义 ( $t=4.56 \sim 10.85$ , 均  $P=0.00$ )。Pearson 相关性分析显示, CHF 组患者血清 lncRNA MALAT1 和 Bcl-2 水平与 LVEF 呈正相关 ( $r=0.29, 0.32$ , 均  $P < 0.05$ ), 与 LVEDD 和 LVESD 呈负相关 ( $r=-0.25, -0.31, P=0.01$ )。CHF 组患者血清 Bax 与 LVEF 呈负相关 ( $r=-0.33, P=0.01$ ), 与 LVEDD 和 LVESD 呈正相关 ( $r=0.20, 0.32, P=0.00$ )。CHF 组患者血清 lncRNA MALAT1 与 Bcl-2 水平呈正相关 ( $r=0.31, P=0.00$ ), 与血清 Bax 水平呈负相关 ( $r=-0.24, P=0.01$ )。血清 lncRNA MALAT1 诊断 CHF 的曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.791, 敏感度和特异度分别为 75.0% 和 79.5% (95%CI=0.653~0.930,  $P=0.001$ )。 **结论** CHF 患者血清 lncRNA MALAT1 水平降低, 其可作为评价 CHF 病情发展的潜在生物学标志物。

**关键词:** 慢性心力衰竭; 长链非编码 RNA 肺癌转移相关转录本 1; 生物学标志物

中图分类号: R541.6; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 01-141-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.028

## Expression of lncRNA MALAT1 in Peripheral Blood of Patients with Chronic Heart Failure and Its Clinical Significance

WANG Xin-zhuang, MENG Jian-tao

(Department of Emergency, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an 710077, China)

**Abstract: Objective** To explore the expression level of long non-coding RNA (lncRNA) MALAT1 in peripheral blood of patients with chronic heart failure (CHF) and its clinical significance. **Methods** 62 CHF patients admitted to the Department of Emergency of Xi'an Gaoxin Hospital from February 2017 to May 2019 were selected as the CHF group, and 70 healthy subjects during the same period were selected as the control group. The expression level of lncRNA MALAT1 in serum was detected by real-time quantitative fluorescence PCR (qRT-PCR). The levels of apoptotic molecules in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Color Doppler ultrasonography was used to examine and determine the related indexes of heart failure. The correlation was analyzed by Pearson correlation, receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic efficacy of lncRNA MALAT1 for CHF. **Results** The serum lncRNA malAT1 and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) levels in CHF group were lower than those in the control group, and the serum Bcl2-associated X protein (Bax) levels in CHF group were higher than those in the control group, the difference were statistically significant ( $t=16.31, 11.90, 9.57$ , all  $P=0.00$ ). Patients with CHF group New York Heart Disease Association (NYHA) III and IV serum lncRNA MALAT1 and Bcl-2 levels below the NYHA II level, in CHF group NYHA III and IV patients serum Bax levels higher than the NYHA level, NYHA IV II

作者简介: 王新庄 (1980-), 男, 主治医师, 研究方向: 急诊常见疾病的临床诊疗, E-mail: 838035758@qq.com。

通讯作者: 孟建涛 (1987-), 男, 主治医师, 研究方向: 急诊常见疾病的临床诊疗, E-mail: 369145939@qq.com。

level in patients with serum lncRNA MALAT1 and Bcl-2 levels below Ⅲ level, the serum Bax level was higher than Ⅲ level, and the difference was statistically significant (all  $P < 0.05$ ). The left ventricular ejection fraction (LVEF) in CHF group were lower than that in control group, the left ventricular end diastolic diameter (LVEDD) and left ventricular end systolic diameter (LVESD) were higher than those in the control group, the difference were statistically significant ( $t = 4.56 \sim 10.85$ , all  $P = 0.00$ ). Pearson correlation analysis showed that serum lncRNA MALAT1 and Bcl-2 levels in CHF group were positively correlated with LVEF ( $r = 0.29, 0.32$ , all  $P < 0.05$ ), while negatively correlated with LVEDD and LVESD ( $r = -0.25, -0.31$ ,  $P = 0.01$ ). Serum Bax in CHF group was negatively correlated with LVEF ( $r = -0.33$ ,  $P = 0.01$ ), while positively correlated with LVEDD and LVESD ( $r = 0.20, 0.32$ , all  $P = 0.00$ ). In CHF group, serum lncRNA MALAT1 was positively correlated with the level of Bcl-2 ( $r = 0.31$ ,  $P = 0.00$ ), and negatively correlated with the level of serum Bax ( $r = -0.24$ ,  $P = 0.01$ ). The area under the curve (AUC) of serum lncRNA MALAT1 in the diagnosis of CHF was 0.791, the sensitivity and the specificity were 75% and 79.5%, respectively (95%CI=0.6533~0.930,  $P = 0.001$ ). **Conclusion** The serum lncRNA MALAT1 level was decreased in CHF patients, which can be used as a potential biomarker to evaluate the disease progression of CHF.

**Keywords:** chronic heart failure; lncRNA MALAT1; biological marker

心力衰竭是多种心脏疾病的终末表现,当心力衰竭呈持续存在状态时则为慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF)<sup>[1-2]</sup>。CHF 患者病理特征主要是呼吸困难、心脏舒缩功能减退和心排量减少等,严重影响患者的日常生活,威胁其生命健康<sup>[3-4]</sup>。目前关于 CHF 的诊疗方法已获得巨大进步,但其远期预后效果却并不乐观<sup>[5]</sup>。如何及早的评估患者的心功能以及发现影响 CHF 发生、发展、预后的危险因素并给予及时的临床干预对改善 CHF 患者的临床治疗效果、转归及其预后具有重要作用。近年来研究表明长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 的异常表达与多种疾病密切相关,但是关于其与心血管疾病的相互作用仍缺乏深入研究。本研究以患者为研究对象,分析了血清 lncRNA MALAT1 及凋亡分子表达水平变化的临床意义,旨在为 CHF 的临床诊疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取 2017 年 2 月~2019 年 5 月西安高新医院急诊科收治的 62 例 CHF 患者为 CHF 组,其中男性 32 例,女性 30 例,平均年龄  $60.88 \pm 12.32$  岁,平均体质指数 (body mass index, BMI) 为  $21.89 \pm 6.32 \text{ kg/m}^2$ ;有吸烟史 28 例,有饮酒史 35 例。另选取同期 70 例体检健康者为对照组,其中男性 33 例,女性 37 例,平均年龄  $56.19 \pm 11.33$  岁,平均 BMI 为  $21.43 \pm 5.74 \text{ kg/m}^2$ ;有吸烟史 25 例,有饮酒史 32 例。两组一般资料比较差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ),具有良好的可比性。本研究经我院伦理委员会审批并通过。

**纳入标准:** ① CHF 组患者均符合《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014》中 CHF 的相关诊断标准;②临床资料完整;③受试者自愿参加且签署知情书。

**排除标准:** ① 美国纽约心脏病学会 (New York Heart Disease Association, NYHA) 分级 I 级者;② 并发肝、肾功能异常者;③ 精神、意识障碍者;④ 并

发心肌梗死、心脏瓣膜病和心源性休克者;⑤ 并发恶性肿瘤、感染者。

**1.2 仪器与试剂** 酶标仪 (Biotek, Elx800); Allegra X-15R 台式冷冻离心机 (Beckman Coulter); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); AMV 逆转录试剂盒和  $2 \times \text{SYBR Green PCR Master Mix}$  [宝生物工程 (大连) 有限公司]; 7900 型定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; B 淋巴细胞瘤 -2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2), Bcl-2 相关 x 蛋白 (BCL2-associated X, Bax) 的酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定试剂盒均购自上海西唐公司; IU22 彩色多普勒超声仪购自荷兰飞利浦公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 lncRNA MALAT1 表达水平的检测:** 分别采集两组空腹肘静脉血 5 ml, 室温下  $3\ 000 \text{ r/min}$  离心 15 min, 分离上清液后, 置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱备用。应用 Trizol 试剂提取血清中的总 RNA, 参照 AMV 逆转录试剂盒的说明书将其逆转录合成 cDNA, 采用  $2 \times \text{SYBR Green PCR Master Mix}$ , 以 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值表示 lncRNA MALAT1 的表达水平。

**1.3.2 血清凋亡分子的检测:** 分别采集两组空腹肘静脉血 5 ml, 室温下  $3\ 000 \text{ r/min}$  离心 15 min, 分离上清液后, 置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱备用。采用 ELISA 测定 Bcl-2 和 Bax 水平, 具体操作按照说明书上进行。

**1.3.3 心力衰竭相关指标的检测:** 采用彩色多普勒超声仪检查, 根据超声心动图计算左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室舒张末期内径 (left ventricular end diastolic diameter, LVEDD) 和左室收缩末期内径 (left ventricular end systolic diameter, LVESD)。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计学软件处理数据, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 三组间比较采用方差分析。计量资料相关性采用 Pearson 相关性分析, 采用受

试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)评价 lncRNA MALAT1 对 CHF 的诊断效能。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组血清 lncRNA MALAT1 和凋亡分子水平的比较 见表1。CHF 组患者血清 lncRNA MALAT1 和 Bcl-2 水平均低于对照组, CHF 组患者血清 Bax 水平高于对照组, 差异具有统计学意义(均  $P=0.00$ )。

表1 两组血清 lncRNA MALAT1 和凋亡分子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	CHF 组 (n=62)	对照组 (n=70)	t 值	P 值
lncRNA MALAT1	0.46 ± 0.03	0.89 ± 0.12	16.31	0.00
Bcl-2 (ng/ml)	4.12 ± 0.79	5.98 ± 0.89	11.90	0.00
Bax (ng/ml)	2.69 ± 0.56	1.80 ± 0.37	9.57	0.00

2.2 CHF 组中不同 NYHA 分级患者血清 lncRNA MALAT1 和凋亡分子水平的比较 见表2。按照 NYHA 分级, CHF 组患者 II 级 21 例, III 级 26 例, IV 级 15 例。CHF 组中 NYHA III 级和 IV 级患者血清 lncRNA MALAT1 和 Bcl-2 的水平低于 NYHA II 级, CHF 组中 NYHA III 级和 IV 级患者血清 Bax 水平高于 NYHA II 级, NYHA IV 级患者血清 lncRNA MALAT1 和 Bcl-2 的水平低于 III 级, 血清 Bax 水平高于 III 级, 差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

表2 CHF 组中不同 NYHA 分级患者血清 lncRNA MALAT1 和凋亡分子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	NYHA II 级 (n=21)	NYHA III 级 (n=26)	NYHA IV 级 (n=15)	F 值	P 值
lncRNA MALAT1	0.63 ± 0.06	0.42 ± 0.03	0.29 ± 0.01	22.38	0.01
Bcl-2 (ng/ml)	4.96 ± 0.93	3.95 ± 0.77	3.17 ± 0.58	17.14	0.00
Bax (ng/ml)	2.19 ± 0.41	2.72 ± 0.48	3.36 ± 0.84	13.28	0.00

2.3 两组心力衰竭相关指标检测结果比较 见表3。CHF 组患者 LVEF 低于对照组, LVEDD 和 LVESD 高于对照组, 差异具有统计学意义(均  $P=0.00$ )。

表3 两组心力衰竭相关指标检测比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	CHF 组 (n=62)	对照组 (n=70)	t 值	P 值
LVEF (%)	45.07 ± 7.90	64.14 ± 9.87	10.85	0.00
LVEDD (mm)	49.24 ± 7.07	41.77 ± 8.12	4.97	0.00
LVESD (mm)	57.74 ± 10.31	48.62 ± 9.85	4.56	0.00

2.4 CHF 组患者血清 lncRNA MALAT1, 凋亡分子与心力衰竭相关指标的相关性 Pearson 相关性分析显示, CHF 组患者血清 lncRNA MALAT1 和 Bcl-2 水平与 LVEF 呈正相关( $r=0.29, 0.32$ , 均  $P < 0.05$ ), 与 LVEDD 和 LVESD 呈负相关( $r = -0.25, -0.31, P=0.01$ )。CHF 组患者血清 Bax 与 LVEF 呈

负相关( $r = -0.33, P=0.01$ ), 与 LVEDD 和 LVESD 呈正相关( $r=0.20, 0.32, P=0.00$ )。

2.5 CHF 组患者血清 lncRNA MALAT1 与凋亡分子的相关性 Pearson 相关性分析显示, CHF 组患者血清 lncRNA MALAT1 与 Bcl-2 水平呈正相关( $r=0.31, P=0.00$ ), 与血清 Bax 水平呈负相关( $r = -0.24, P=0.01$ )。

2.6 血清 lncRNA MALAT1 诊断 CHF 的 ROC 曲线分析 见图1。血清 lncRNA MALAT1 诊断 CHF 的曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.791, 敏感度和特异度分别为 75.0% 和 79.5% (95%CI=0.653~0.930,  $P=0.001$ )。

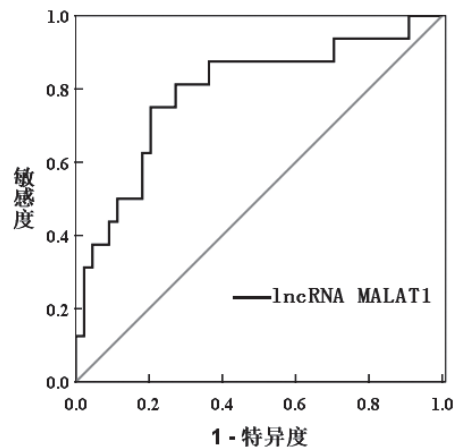


图1 血清 lncRNA MALAT1 诊断 CHF 的 ROC 曲线

## 3 讨论

心力衰竭主要是由心肌病、心肌梗死和炎症等多种原因引起的心肌损伤, 导致心肌结构和功能的异常变化, CHF 是指持续存在的心力衰竭状态。CHF 发病机制较复杂且未被完全阐明。近年来有大量研究指出 lncRNA 的异常表达与心血管系统疾病的发生、发展密切相关。lncRNA MALAT1 定位于染色体 11q13.1, 其与卵巢癌、糖尿病肾病和肝癌等密切相关<sup>[6-7]</sup>, 刘天楠等<sup>[8]</sup>指出 lncRNA MALAT1 在心肌梗死、先天性心脏病等心血管疾病中发挥重要作用。目前关于 lncRNA MALAT1 与 CHF 的关联性报道较少, 本研究以 CHF 患者为研究对象, 分析了血清 lncRNA MALAT1 表达水平变化的临床意义, 旨在为 CHF 的临床诊疗提供新的思路。

研究表明 CHF 患者 lncRNA MALAT1 水平低于健康对照组, 提示血清 lncRNA MALAT1 水平与 CHF 有关, 有可能成为 CHF 的诊断指标。有研究表明, CHF 患者的 LVEF 显著降低, LVEDD 和 LVESD 明显升高<sup>[9]</sup>, 本研究的分析结果与已有研究报道一致, CHF 组患者的 LVEF 低于对照组, LVEDD 和 LVESD 高于对照组。在此基础上进一步分析 lncRNA MALAT1 与 CHF 病情的关系可知:

CHF 组患者的 NYHA 分级越高, lncRNA MALAT1 表达水平越低, 提示血清 lncRNA MALAT1 水平对 CHF 患者心功能评价具有一定的价值。Pearson 相关性分析显示 lncRNA MALAT1 的表达水平与 LVEF 呈正相关, 与 LVEDD 和 LVESD 呈负相关, 说明 lncRNA MALAT1 的水平降低与 CHF 的发生、发展均有关。另外本研究通过绘制 ROC 曲线探究 lncRNA MALAT1 的临床价值, 发现 AUC 为 0.791, 此时敏感度和特异度分别为 75% 和 79.5%, 明确了血清 lncRNA MALAT1 在 CHF 中的诊断价值。

有研究表明 Bcl-2 和 Bax 可调控线粒体凋亡途径, 其中前者能抑制凋亡, 后者能促进凋亡<sup>[10]</sup>。本研究对 CHF 患者血清中凋亡分子的分析结果表明, CHF 组患者血清 Bcl-2 的水平低于对照组, Bax 水平高于对照组, 且患者 NYHA 分级越高, Bcl-2 的水平越低, Bax 水平越高, 说明线粒体凋亡途径参与了 CHF 的发生、发展过程。进一步分析 CHF 患者血清 lncRNA MALAT1 与凋亡分子的相关性, 结果显示 lncRNA MALAT1 与 Bcl-2 水平呈正相关, 与血清 Bax 水平呈负相关, CHF 发生过程中, lncRNA MALAT1 的水平降低可能减弱其靶向抑制细胞凋亡的作用, 继而引起细胞凋亡的过度激活, 加速病情发展。

综上所述, CHF 血清 lncRNA MALAT1 表达水平降低, 监测其表达可作为评价 CHF 病情的标志物。

#### 参考文献:

- [1] 苏虹, 李仕林, 王昌育, 等. 成纤维细胞生长因子 23 基因多态性与慢性心力衰竭患者预后的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(1): 35-39.
- SU Hong, LI Shilin, WANG Changyu, et al. Association of fibroblast growth factors 23 gene polymorphism and prognosis in patients with chronic heart failure[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(1): 35-39.
- [2] 崔贞, 刘文. 慢性心力衰竭患者呋塞米治疗对血清 NT-proBNP 水平的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(3): 144-147.
- CUI Zhen, LIU Wen. Effects of furosemide in patients with chronic heart failure on serum NT-proBNP [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(3): 144-147.
- [3] 唐红秀, 王璐, 万楠, 等. 慢性心力衰竭患者外周血 RDW 与 HDL-C 水平的相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(6): 88-90, 94.
- TANG Hongxiu, WANG Lu, WAN Nan, et al. Relationship between high-density lipoprotein cholesterol and the red cell distribution width in patients with chronic heart failure [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(6): 88-90, 94.
- [4] 张学正, 李静, 王琼, 等. 老年慢性心力衰竭患者运动康复的研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(10): 1973-1977.
- ZHANG Xuezheng, LI Jing, WANG Qiong, et al. Research progress in exercise rehabilitation of senile patients with chronic heart failure [J]. Medical Recapitulation, 2020, 26(10): 1973-1977.
- [5] NOBRE T S, ANTUNES-CORREA L M, GROEHS R V, et al. Exercise training improves neurovascular control and calcium cycling gene expression in patients with heart failure with cardiac resynchronization therapy[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2016, 311(5): H1180-H1188.
- [6] 张宝玺, 刁海丹, 李江宁. lncRNA MALAT1 和 miR-200c 在卵巢癌中的表达关系及临床意义[J]. 河北医药, 2019, 41(4): 489-493.
- ZHANG Baoxi, DIAO Haidan, LI Jiangning. Expressions and clinical significance of lncRNA MALAT1 and miR-200c in ovarian cancer [J]. Hebei Medical Journal, 2019, 41(4): 489-493.
- [7] 周连吉, 吴标良, 杨大伟, 等. 长链非编码 lncRNA MALAT1 在糖尿病肾病患者血清中的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(1): 28-31.
- ZHOU Lianji, WU Biaoliang, YANG Dawei, et al. Serum level of lncRNA MALAT1 in diabetic kidney disease patients and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2021, 41(1): 28-31.
- [8] 刘天楠. lncRNA MALAT1 在急性心肌梗死中的作用[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(11): 3006-3009.
- LIU Tiannan. lncRNA MALAT1 in acute myocardial infarction [J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2020, 40(11): 3006-3009.
- [9] TOMINAGA M, KAWAI M, MINAI K, et al. Association between plasma B-type natriuretic peptide and anaemia in heart failure with or without ischaemic heart disease: a retrospective study[J]. BMJ Open, 2019, 9(3): e024194.
- [10] 柴春艳, 王甜, 刘娅萍, 等. WWOX 蛋白及 Bcl-2 蛋白在支气管肺癌中的表达及临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 61-65.
- CHAI Chunyan, WANG Tian, LIU Yaping, et al. Expression and clinical significance of WWOX protein and BCL-2 protein in primary lung cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 61-65.

收稿日期: 2021-03-29 修回日期: 2021-06-09

(上接第 129 页)

- [22] SONG Mengqiu, BODE A M, DONG Zigang, et al. AKT as a therapeutic target for cancer[J]. Cancer Research, 2019, 79(6): 1019-1031.
- [23] CHANDRA GUPTA S, NANDAN TRIPATHI Y. Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets[J]. International

Journal of Cancer, 2017, 140(9): 1955-1967.

- [24] DONG Peixin, XIONG Ying, YUE Junming, et al. Exploring lncRNA-mediated regulatory networks in endometrial cancer cells and the tumor microenvironment: advances and challenges[J]. Cancers, 2019, 11(2): 234.

收稿日期: 2021-04-08 修回日期: 2021-06-08