

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202005012

· 论著 ·

## 3MA 抑制自噬降低头颈鳞癌细胞放疗抵抗性的实验研究

敬前程<sup>1</sup>, 刘勇<sup>2</sup>, 李果<sup>2</sup>, 卢善翊<sup>2</sup>, 刘超<sup>2</sup>, 黄东海<sup>2</sup>, 周芳<sup>1</sup>, 邱元正<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属长沙市中心医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410004; 2. 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科耳鼻咽喉重大疾病研究湖南省重点实验室, 湖南长沙 410008)

**摘要:** **目的** 探讨 6-氨基-3-甲基嘌呤(3MA)对头颈鳞癌细胞放疗抵抗性的影响。**方法** 蛋白印迹法(Western blotting)检测 CNE2、6-10B 及其放疗抵抗细胞 CNE2-Rs、6-10BRs 中 LC3B 蛋白的表达;3MA 作用于 CNE2-Rs 及 TU686 细胞后 LC3B 蛋白的表达;克隆集落形成实验检测 3MA 对头颈鳞癌细胞的放疗抵抗能力及生存分数的改变;细胞免疫荧光法检测 3MA 对放疗致 DNA 双链损伤相关指标  $\gamma$ -H2AX 焦点数量的改变。**结果** LC3B 蛋白在放疗抵抗细胞较亲本细胞中表达增加;3MA 能有效抑制自噬膜蛋白 LC3B 的表达;3MA 抑制自噬后 CNE2-Rs 及 TU686 细胞克隆集落形成能力减弱,生存分数降低;3MA 抑制自噬后 CNE2-Rs 及 TU686 细胞放疗组中  $\gamma$ -H2AX 焦点数量较对照组显著增加。**结论** 3MA 抑制自噬后可能影响放疗后 DNA 双链损伤修复,进而降低头颈鳞癌细胞的放疗抵抗性。

**关键词:** 自噬;头颈鳞癌;放疗抵抗;3MA; $\gamma$ -H2AX

中图分类号:R739.91

## Study on 3MA reduce radioresistance in squamous cell carcinoma of the head and neck via autophagy inhibition

JING Qiancheng<sup>1</sup>, LIU Yong<sup>2</sup>, LI Guo<sup>2</sup>, LU Shanhong<sup>2</sup>, LIU Chao<sup>2</sup>, HUANG Donghai<sup>2</sup>, ZHOU Fang<sup>1</sup>, QIU Yuanzheng<sup>2</sup>  
(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Changsha Central Hospital, University of South China, Changsha, Hunan, 410004, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Key Laboratory of Otolaryngology Major Disease Research of Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To study the function of 3MA on the radioresistance in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Methods** Western blotting was used to detect the LC3B protein in CNE2, 6-10B and its radioresistance cell lines CNE2-Rs, 6-10BRs, in CNE2-Rs and TU686 cells after 3MA treatment. Colony formation assay was applied to check the alteration of radioresistant capacity and survival fraction. Immunofluorescence was done to detect the expression of  $\gamma$ H2AX foci, which was a surrogate marker of DNA doublestrand breaks. **Results** The expression of LC3B protein was increased in radioresistant cell lines and inhibited in 3MA treatment groups. 3MA weakened the colony formation ability and decreased the survival fraction. Also, 3MA significantly increased the  $\gamma$ H2AX foci formation compared with the control group after irradiation. **Conclusion** The inhibition of autophagy by 3MA may affects the repair of DNA double strand damage after radiotherapy, thereby reducing the radioresistance of squamous cell carcinoma of head and neck.

**Keywords:** Autophagy, Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck, Radioresistance, 3MA,  $\gamma$ -H2AX

头颈鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN),简称头颈鳞癌,是全世界第六大癌症,占头颈所有肿瘤的90%以上<sup>[1]</sup>。放射治疗是头颈鳞癌的重要治疗手段,尤其是对于鼻咽癌、

中晚期及进展期的喉癌、咽喉癌、口腔癌。然而,由于放疗抵抗的存在,严重制约了该类患者的临床预后、生存质量<sup>[2-4]</sup>。因此,阐明放疗抵抗的作用机制,寻找放疗抵抗相关的干预靶点有望提高头颈鳞

基金项目:国家自然科学基金(81602684,81773243)。

第一作者简介:敬前程,男,博士,副主任医师。

通信作者:邱元正,Email:xyqyz@csu.edu.cn

癌患者的放疗效果。自噬即自我吞噬,其将细胞内因受到各种应激包括放疗、饥饿、化疗等产生的有害代谢物质消化再吸收,为自身提供能量<sup>[5-6]</sup>。自噬在细胞保持内环境的稳定中发挥重要作用,适当程度的自噬水平有利于细胞的存活<sup>[7]</sup>。但是,有关将自噬作为干预靶点减少头颈鳞癌放疗抵抗的研究罕见报道,因此,我们在本研究中旨在探讨 6-氨基-3-甲基嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)抑制自噬对头颈鳞癌放疗抵抗性的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验所用细胞 CNE2、6-10B 均为鼻咽部低分化鳞癌细胞,由中南大学湘雅医学院细胞中心提供,两细胞系放疗抵抗细胞株 CNE2-Rs、6-10B-Rs 由课题组前期经梯度射线照射构建并经实验证实<sup>[3]</sup>;人喉癌 TU686 细胞由埃默里大学医学院 Chen 教授馈赠;RPMI-1640 细胞培养基、F12 细胞培养基(Gibco, 美国),小牛血清(Gibco, 美国),含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化液、双抗(Gibco, 美国),鼠抗人  $\gamma$ H2AX 单克隆抗体(Novus, 美国),羊抗鼠 DyLight594 IgG 抗体(联科生物公司, 中国),兔抗人 LC3B 抗体(CST, 美国),山羊抗兔 GAPDH 抗体(CST, 美国);4', 6-二脒基-2-苯基吡啶/DAPI(碧云天公司, 中国);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天公司, 中国),蛋白质印迹法(Western blotting)发光液(北京英格恩生物科技有限公司, 中国);3MA 购自美国 TargetMol 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 根据我们课题组前期介绍的细胞培养方法进行细胞培养<sup>[2, 8]</sup>,简述如下:细胞培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 浓度的细胞培养箱中,根据细胞生长情况更换新鲜培养基及细胞传代冻存,实验所使用细胞均处于对数生长期。

1.2.2 化合物 3MA 的处理 根据预实验结果,我们选择 3MA 的最适有效作用浓度为 0.8 mmol/L。按照实验计划分为对照组及 3MA 处理实验组,对照组加入等体积等浓度的溶媒二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO),3MA 作用实验组后 1 h 进行放疗,24 h 后提取蛋白行后续实验。

1.2.3 Western blotting 蛋白裂解液消化各组细胞,提取各组细胞总蛋白后按 BCA 蛋白定量试剂盒说明方法进行定量,根据浓度计算出上样 20 ~

30 mg 所需体积。配制 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,上样前蛋白质于 100℃ 变性 10 min,以 Marker 为参考标志。60V 分离上层胶后 120V 恒压电泳直至完成;切取目的蛋白所在区域凝胶置于转膜装置,80V 恒压低温转膜约 2 h;5% 脱脂奶粉封闭 1 h;于 4℃ 冰箱孵育一抗过夜,次日室温复温 30 min 后 TPST 洗涤 3 次,室温孵育相应二抗 1 h,TPST 再次洗涤 3 次,行 ECL 化学发光剂显影、照相保存。

1.2.4 放射线照射 待细胞贴壁并按计划予以不同方式处理后,使用 Siemens PRIMUS 直线加速器进行放疗,参数设定为 6MVX、300Gray/min、源皮距 100 cm,细胞培养板全野照射并于其上覆盖一厚 1.5 cm 的补偿胶。照射后立即放回细胞培养箱并按实验设计继续行后续操作。

1.2.5  $\gamma$ -H2AX 细胞免疫荧光染色及定量 对数期细胞消化计数后种于覆盖爬片的 12 孔板中,待贴壁 12 h 后按实验设计予以不同方式处理后 4 Gy 射线照射,继续培养 6 h 后予以 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,0.2% Triton 行细胞破膜,山羊血清封闭 30 min。鼠抗人  $\gamma$ -H2AX 单克隆抗体(1:800)于 4℃ 孵育过夜,次日将 12 孔板室温复温 30 min 后加入羊抗鼠二抗,室温避光孵育 50 min,DAPI 核染 1 min 后封片保存。光学显微镜下观察细胞核内出现的红色焦点即为  $\gamma$ -H2AX 焦点,取 200 个以上细胞内平均焦点数为最终结果。

1.2.6 克隆集落形成实验 各处理组细胞消化后计数,每 6 孔板种 300 个细胞,各组设置 3 复孔。贴壁 12 h 后根据设计照射剂量(0、2、4、6Gy)行满野照射。于细胞培养箱中继续培养 12 ~ 14 d,每 3 天更换新鲜培养基。待肉眼可见集落时弃培养基并终止实验,生理盐水小心清洗细胞后甲醇固定 15 min,结晶紫染色 10 min,晾干后将 6 孔板固定于阅片灯前拍照,观察集落大小及数量,取 3 次平均值为最终结果,并计算各组生存分数。

1.2.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用方差分析。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 放疗抵抗细胞较亲本细胞中 LC3B 蛋白表达升高 为了明确反应自噬水平的自噬终末膜蛋白

LC3B 在头颈肿瘤亲本细胞及放疗抵抗细胞中的表达情况,我们用 Western blotting 检测了 CNE2、6-10B 及其放疗抵抗细胞中静态 LC3B 蛋白的表达。结果显示,在两株细胞中,其放疗抵抗细胞中 LC3B 蛋白的表达均高于相应亲本细胞株,如图 1A、B 所示,提示自噬与头颈肿瘤的放疗抵抗密切相关。

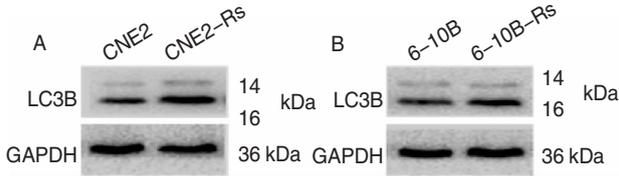


图1 Western blotting 检测亲本细胞 CNE2、6-10B 及其放疗抵抗细胞 CNE2-Rs、6-10B-Rs 中 LC3B 蛋白的表达

## 2.2 3MA 抑制自噬水平

为验证 3MA 对头颈鳞癌细胞 CNE2-Rs 及 TU686 自噬的影响,根据前述 1.2.2 化合物 3MA 的处理方法,对照组使用溶媒 DMSO 处理,实验组使用 0.8mmol/L 的 3MA 处理,作用 24 h 后提取各组蛋白,行 Western blotting 法检测自噬标志物 LC3B 基因蛋白的表达情况。结果如图 2 所示,在两株细胞系中 3MA 处理组 LC3B 蛋白的表达显著低于对照组,提示 3MA 可成功抑制头颈鳞癌细胞的自噬。

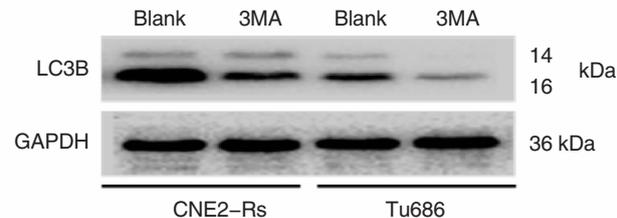


图2 Western blotting 检测头颈鳞癌细胞 CNE2-Rs 及 TU686 经 0.8mmol/L 的 3MA 处理后 LC3B 蛋白的表达情况

## 2.3 3MA 降低头颈鳞癌细胞的放疗抵抗性,降低生存分数

为明确自噬抑制剂 3MA 对头颈鳞癌细胞放疗抵抗性的影响,我们应用平板克隆集落形成实验分别检测了 CNE2-Rs 及 TU686 于 0、2、4、6Gy 时对照组及 3MA 处理组集落形成能力,并计算了生存分数。结果显示,两细胞系中 0.8mmol/L 的 3MA 处理组于 2、4、6Gy 放疗后集落形成数量明显少于对照组,3MA 处理组生存分数明显低于对照组,差异有统计学意义,如图 3 所示,CNE2-Rs: 图 3A、B; TU686: 图 3C、D。上述结果说明,自噬抑制剂 3MA 降低头颈鳞癌细胞的放疗抵抗性。

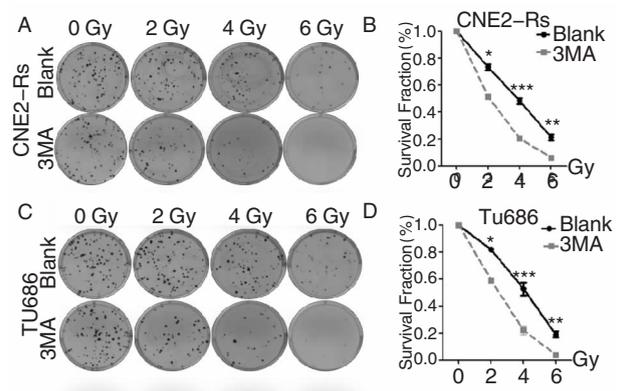


图3 3MA 在头颈鳞癌细胞放疗抵抗中的作用 A、B: CNE2-Rs 细胞 3MA 处理组及对照组克隆集落形成能力的改变及生存分数的改变;C、D: TU686 细胞 3MA 处理组及对照组克隆集落形成能力的改变及生存分数的改变 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )

## 2.4 3MA 影响头颈鳞癌细胞放疗后 DNA 损伤的修复

放疗后 DNA 损伤修复的情况直接影响放疗的效果, $\gamma$ -H2AX 为 DNA 双链损伤的标志物,可间接反映放疗后 DNA 损伤的程度。为证实 3MA 对头颈鳞癌细胞放疗后 DNA 损伤修复的影响,我们行细胞免疫荧光法检测 3MA 处理头颈鳞癌细胞放疗前后  $\gamma$ -H2AX 焦点数量的改变。结果显示,放疗前在 CNE2-Rs 及 TU686 细胞中 3MA 处理组与对照组相比, $\gamma$ -H2AX 焦点数量均极少,无统计学差异。放疗后 3MA 处理组  $\gamma$ -H2AX 焦点数量比对照组明显增多,差异有统计学意义,如图 4 所示,CNE2-Rs: 图 4A、B; TU686: 图 4C、D。上述结果表明,3MA 处理后,头颈鳞癌细胞 DNA 损伤修复减弱,降低了放疗抵抗性。

## 3 讨论

自噬是一种保守的细胞分解代谢过程,使细胞能够快速适应压力或敌对环境。在健康细胞中,自噬处于基础水平,以维持细胞内平衡和清除细胞中受损的细胞器<sup>[9]</sup>。但是,当细胞遇到如放化疗、营养缺乏或缺氧触发自噬时,自噬使细胞能够降解非必需或受损的蛋白质和细胞器,以便重新利用产生的氨基酸,进行更重要的细胞过程<sup>[10]</sup>。在癌症治疗中,这种适应性表现为一把双刃剑。一方面,自噬可以使细胞对放化疗或营养缺乏等应激情况失去敏感性,这在许多肿瘤微环境中都可以看到,这被称为保护性自噬;另一方面,长时间的自噬会导致一种与坏

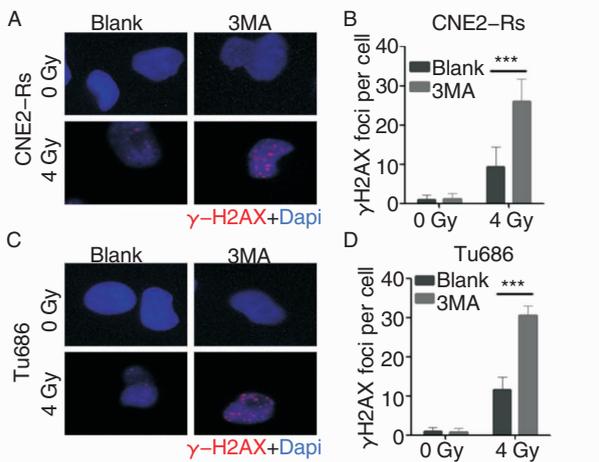


图 4 细胞免疫荧光检测 3MA 处理头颈鳞癌细胞放疗前、后  $\gamma$ -H2AX 焦点数量的改变 A、B:3MA 处理 CNE2-Rs 细胞放疗前、后细胞中  $\gamma$ -H2AX 焦点图及平均每个细胞内焦点数量统计;C、D:3MA 处理 TU686 细胞放疗前、后细胞中  $\gamma$ -H2AX 焦点图及平均每个细胞内焦点数量统计 (\*\*\*  $P < 0.001$ )

死类似的细胞死亡,称为自噬性细胞死亡<sup>[11-12]</sup>。因此,是否有必要抑制自噬以减少细胞防御而增加放疗敏感性;或者提高自噬水平,以期在特定癌症中实现大量的自噬细胞死亡,这是一个目前尚存在激烈争论的问题。乏氧和营养缺乏是头颈鳞癌等实体肿瘤中自噬的主要诱因,因为血管系统无法满足实体肿瘤快速生长而需要的足够营养<sup>[13]</sup>。这也提示抑制保护性自噬可能在解决头颈鳞癌放疗抵抗方面发挥重要作用。

3-MA 是一个强有力的自噬抑制剂,它通过抑制由 Beclin1 和 Vps34 组成的复合物即 III 型 PI3K 而抑制双膜泡的形成,并阻止这些自噬体吞噬细胞成分,进而影响微管相关蛋白 1 轻链  $\beta$  (Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain  $\beta$ , MAP1LC3b,简称 LC3b)定位于细胞膜,从而抑制自噬<sup>[14]</sup>。LC3b 是检测自噬活性的一个重要指标,其反应了包括自噬从激活到溶酶体降解的整个过程中的活性<sup>[15]</sup>。因此,我们在本研究中使用 LC3B 这一指标来反应自噬的活性。结果表明,3MA 有效抑制自噬活性,在 CNE2-Rs 及 6-10B-R 两株放疗抵抗细胞中,其保护性基础自噬水平高于相应亲本细胞。进一步克隆集落形成实验证实了 3MA 抑制自噬后头颈鳞癌细胞的放疗抵抗能力下降,生存分数下降。

DNA 是细胞放射治疗的生物学靶点,放射线针对细胞 DNA 产生多种损伤,包括碱基损伤、双链断裂,单链断裂、DNA-DNA 或 DNA-蛋白交联<sup>[16]</sup>。高剂量辐射可诱导 DNA 双链断裂,这被认为是最严重

的 DNA 损伤<sup>[17]</sup>。DNA 修复是产生放疗抵抗性的主要原因<sup>[18]</sup>,最近有研究表明,自噬与 DNA 修复有关,DNA 修复会影响放疗敏感性。Mo 等研究表明,沉默自噬相关基因 Atg5 加重了放射线诱导的鼻咽癌细胞 DNA 损伤和凋亡<sup>[19]</sup>;在另一项研究中,小干扰 RNA 敲除 Beclin 1 或辐照抗性相关基因 (UVRAG)可增加辐射诱导的 DNA 双链断裂,而 Beclin 1 与 UVRAG 相互作用形成核心复合物,诱导自噬<sup>[20]</sup>。He 等人已经证明,通过药物抑制或 Beclin-1 siRNA 阻断自噬,可以削弱 DNA 双链断裂的修复能力,并具有显著的放射增敏作用<sup>[21]</sup>。本研究中,我们亦使用细胞免疫荧光法检测了 DNA 损伤修复指标  $\gamma$ -H2AX<sup>[22-23]</sup>,其焦点数量的改变直接反映头颈鳞癌细胞放疗后 DNA 损伤修复的程度。结果表明,两株头颈鳞癌细胞放疗后,3MA 抑制自噬组  $\gamma$ -H2AX 焦点数量较对照组显著增加,说明 3MA 导致 DNA 损伤增多或抑制了其 DNA 修复的进程,这与前述其他不同方法研究结果一致。但至于 3MA 抑制自噬后通过何种具体机制影响 DNA 损伤或修复是我们下一步深入研究的方向。

本研究结果清楚表明,3MA 通过抑制自噬进一步影响了头颈鳞癌细胞的 DNA 损伤修复能力,进而降低了其放疗抵抗性。这些发现将有助于将 3MA 作为头颈鳞癌潜在放疗增敏剂提供理论支持。

参考文献:

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- Li G, Wang Y, Liu Y, et al. miR-185-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by targeting WNT2B in vitro [J]. Cancer Sci, 2014, 105 (12): 1560-1568.
- Li G, Liu Y, Su Z, et al. MicroRNA-324-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by directly targeting WNT2B [J]. Eur J Cancer, 2013, 49 (11): 2596-2607.
- Jing Q, Li G, Chen X, et al. Wnt3a promotes radioresistance via autophagy in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23 (7): 4711-4722.
- Cosway B, Lovat P. The role of autophagy in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Oral Oncol, 2016, 54: 1-6.
- Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, et al. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation [J]. Radiother Oncol, 2011, 99 (3): 287-292.
- Adhauaiya N, Kalappanavar AN, Ali IM, et al. Autophagy: A boon or bane in oral cancer [J]. Oral Oncol, 2016, 61: 120-

- 126.
- [8] Liu C, Li G, Yang N, et al. miR-324-3p suppresses migration and invasion by targeting WNT2B in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 2.
- [9] Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 3-7.
- [10] Huang Z, Zhou L, Chen Z, et al. Stress management by autophagy: Implications for chemoresistance [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(1): 23-32.
- [11] Shimizu S. Autophagic cell death and cancer chemoherapeutics [A]//Nakao K, Minato M, Uemoto S. *Innovative Medicine: Basic Research and Development [M/CD]*. Tokyo: Springer, 2015: 219-226.
- [12] Taylor MA, Das BC, Ray SK. Targeting autophagy for combating chemoresistance and radioresistance in glioblastoma [J]. *Apoptosis*, 2018, 23(11-12): 563-575.
- [13] Jawhari S, Bessette B, Hombourger S, et al. Autophagy and TrkC/NT-3 signaling joined forces boost the hypoxic glioblastoma cell survival [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(6): 592-603.
- [14] Schaaf MB, Jutten B, Keulers TG, et al. Canonical autophagy does not contribute to cellular radioresistance [J]. *Radiother Oncol*, 2015, 114(3): 406-412.
- [15] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 445-544.
- [16] Prise KM, Schettino G, Folkard M, et al. New insights on cell death from radiation exposure [J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(7): 520-528.
- [17] Selzer E, Hebar A. Basic principles of molecular effects of irradiation [J]. *Wien Med Wochenschr*, 2012, 162(3-4): 47-54.
- [18] 邱元正,刘超,李果.鼻咽癌放射治疗的现状与对策[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2015,21(6):435-438.
- [19] Mo N, Lu YK, Xie WM, et al. Inhibition of autophagy enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma by reducing Rad51 expression [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 1905-1912.
- [20] Park JM, Tougeron D, Huang S, et al. Beclin 1 and UVRAG confer protection from radiation-induced DNA damage and maintain centrosome stability in colorectal cancer cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100819.
- [21] He WS, Dai XF, Jin M, et al. Hypoxia-induced autophagy confers resistance of breast cancer cells to ionizing radiation [J]. *Oncol Res*, 2012, 20(5-6): 251-258.
- [22] 周小娟,张叠阔,李果,等. MTDH 促进头颈鳞癌细胞放疗抵抗的实验研究 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(3): 233-237, 242.
- [23] 闵肖丽,黄芳玲,陈主初,等.鼻咽癌细胞6-10B和HNE2放疗敏感性的分析 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2018, 24(3): 208-212.

(收稿日期:2019-12-12;网络首发:2020-08-11)

**本文引用格式:**敬前程,刘勇,李果,等.3MA抑制自噬降低头颈鳞癌细胞放疗抵抗性的实验研究[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2020,26(5):532-536. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202005012

**Cite this article as:**JING Qiancheng, LIU Yong, LI Guo, et al. Study on 3MA reduce radioresistance in squamous cell carcinoma of the head and neck via autophagy inhibition [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2020, 26(5): 532-536. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202005012