

骨髓间充质干细胞膜片和脐静脉内皮细胞共培养模型的构建及鉴定

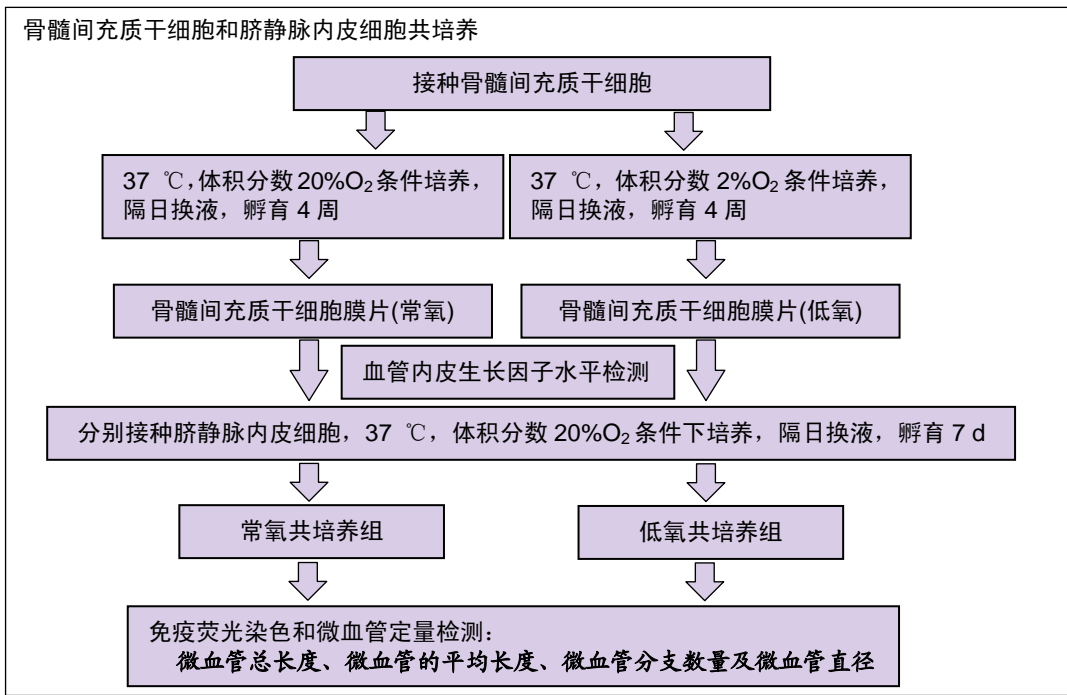
· 研究原著 ·

周震, 王亚敏, 任飞, 张兆强, 曾曙光, 杨熙(南方医科大学口腔医院, 广东省广州市 510280)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1773

ORCID: 0000-0002-0987-1211(周震)

文章快速阅读:



周震, 男, 1983 年生, 汉族, 贵州省人, 主治医师, 2010 年贵州医科大学毕业, 硕士。

通讯作者: 王亚敏, 主治医师, 硕士, 南方医科大学口腔医院, 广东省广州市 510280

并列通讯作者: 任飞, 主任医师, 南方医科大学口腔医院, 广东省广州市 510280

文献标识码:A

稿件接受: 2019-04-02



文题释义:

细胞膜片技术: 是通过物理的方法将扩增融合的细胞从培养皿底壁分离, 获得膜片状细胞结构的一种技术方法。一方面不用对细胞进行胰蛋白酶消化, 既保持了细胞的活性又提高了细胞接种浓度, 含有丰富的细胞外基质; 另一方面保留了体外培养过程中细胞自身分泌的细胞外基质, 细胞自身作为种子细胞, 更接近人的正常组织。

间充质干细胞: 属于中胚层的一类多能干细胞, 具有来源广泛、强大的增殖能力、多向分化潜能及免疫排斥反应低等特性, 作为种子细胞构建细胞膜片具有广阔的应用前景。

摘要

背景: 细胞膜片技术是近年来热门的组织工程学技术, 但是膜片中间部位的营养供给和移植后血供问题易导致失败, 所以预血管化是提高组织工程材料移植后存活率的关键。

目的: 比较在不同氧含量下, 人骨髓间充质干细胞和脐静脉内皮细胞共培养形成预血管化骨髓间充质干细胞膜片的生物学性能。

方法: 实验分 2 组: 常氧共培养组即常氧(体积分数 20% O₂)条件下形成人骨髓间充质干细胞膜片, 常氧条件下加入人脐静脉内皮细胞共培养; 低氧共培养组, 即低氧(体积分数 2% O₂)条件下形成人骨髓间充质干细胞膜片, 常氧条件下加入人脐静脉内皮细胞共培养。采用免疫荧光染色技术观察并比较共培养 7 d 两组的微血管生成情况, 并通过 ELISA 法比较不同氧含量下骨髓间充质干细胞膜片内血管内皮生长因子的水平。

结果与结论: ①与常氧共培养组比较, 低氧共培养组的血管更长、血管密度更高、管间交互连接更多($P < 0.05$); ②低氧共培养组的血管内皮生长因子水平高于常氧共培养组($P < 0.05$); ③结果证实, 低氧共培养组较常氧共培养组膜片更利于血管生长, 对于建立优化的预血管化膜片具有可行性。

关键词:

低氧; 常氧; 细胞膜片; 骨髓间充质干细胞; 免疫荧光染色; 脐静脉内皮细胞; 血管内皮生长因子; 干细胞; 血管化; 组织工程

中图分类号: R453; R364

基金资助:

广东省自筹经费类科技计划项目(2017ZC0124), 项目负责人: 周震; 广东省医学科学技术研究基金项目(C2017061), 项目负责人: 任飞; 广东省自然科学基金项目(2018A030313759), 项目负责人: 张兆强; 广州市科技计划项目(201707010193), 项目负责人: 曾曙光

Zhou Zhen, Master,
Attending physician,
Stomatology Hospital,
Southern Medical University,
Guangzhou 510280,
Guangdong Province, China

Corresponding author:
Wang Yamin, Master,
Attending physician,
Stomatology Hospital,
Southern Medical University,
Guangzhou 510280,
Guangdong Province, China

Corresponding author:
Ren Fei, Chief physician,
Stomatology Hospital,
Southern Medical University,
Guangzhou 510280,
Guangdong Province, China

Co-culture model of bone marrow mesenchymal stem cell sheet and umbilical vein endothelial cells: establishment and identification

Zhou Zhen, Wang Yamin, Ren Fei, Zhang Zhaoqiang, Zeng Shuguang, Yang Xi (Stomatology Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Cell sheet technology is a recent popular technique for tissue engineering. However, a failure is prone to occur because of poor nutrient supply in the middle part of the membrane and post-transplantation blood supply, so pre-vascularization determines the survival rate of tissue engineering materials after transplantation.

OBJECTIVE: To investigate the pre-vascularization of bone marrow mesenchymal stem cell sheets co-cultured with human umbilical vein endothelial cells under different oxygen tensions.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cell sheets were prepared under physiological hypoxia (2% O₂) and normoxia (20% O₂), and then co-cultured with human umbilical vein endothelial cells under normoxia. At 7 days of co-culture the angiogenesis was observed and compared by immunofluorescence staining. The level of vascular endothelial growth factor was compared under different oxygen tensions using ELISA.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the normoxia co-culture group, there were longer microvessels, higher vessel density and more microvessel networks in the hypoxia co-culture group ($P < 0.05$). The expression of vascular endothelial growth factor in the hypoxia co-culture group was higher than that in the normoxia co-culture group ($P < 0.05$). Therefore, the hypoxia co-culture is more beneficial to the growth of microvessels than the normoxia co-culture, and it is feasible to construct an optimized prevascularized cell sheets.

Key words: hypoxia; normoxia; cell sheet; bone marrow mesenchymal stem cells; immunofluorescence staining; umbilical vein endothelial cells; vascular endothelial growth factor; stem cells; vascularization; tissue engineering

Funding: the Self-Financing Science and Technology Research Project of Guangdong Province, No. 2017ZC0124 (to ZZ); Guangdong Medical Science and Technology Research Project, No. C2017061 (to RF); the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2018A030313759 (to ZZQ); Guangzhou Science and Technology Plan Project, No. 201707010193 (to ZSG)

0 引言 Introduction

随着组织工程和再生医学的快速发展, 牙槽骨缺损的修复和牙周组织再生成为当下口腔医学研究的热点^[1-3]。细胞膜片技术是近年来热门的组织工程学技术, 与其他组织工程方法相比, 膜片易控制形状、位置、大小, 低或无免疫原性^[4-5]。但是随着培养时间增长, 细胞膜片中间部位的细胞易因营养供给不足而失去活性甚至凋亡, 移植后也常因无法快速构建有效的血供而导致移植失败^[6-7]。所以, 构建一种低免疫原性、血运良好、同时携带种子细胞的膜片成为实验的目的。

间充质干细胞属于中胚层的一类多能干细胞, 具有来源广泛、强大的增殖能力、多向分化潜能及免疫排斥反应低等特性, 作为种子细胞构建细胞膜片具有广阔的应用前景^[8-10]。

内皮细胞与成骨细胞之间的关联可能可调节血管形成以及骨形成细胞的分化从而调节骨代谢^[11-15]。

实验拟将骨髓间充质干细胞和脐静脉内皮细胞共培养形成预血管化骨髓间充质干细胞膜片, 比较不同氧含量对预血管化骨髓间充质干细胞膜片生物学性能的影响, 目的在于建立优化预血管化的共培养模型, 为提高牙槽骨缺损修复效果、牙周组织再生等奠定理论基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2017年11月至2018年4月在南方医科大学口腔医院实验室完成。

1.3 材料 骨髓间充质干细胞和脐静脉内皮细胞均购自

ATCC公司。

1.4 实验方法

1.4.1 不同氧含量下骨髓间充质干细胞膜片的制作 将第3或4代骨髓间充质干细胞以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 均匀接种在铺有20 mg/L的I型胶原的圆形玻片上, 放置于培养皿中, 含体积分数20%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素的人骨髓间充质干细胞完全培养基中培养, 分别置于37 °C恒温箱体积分数20%O₂条件和2%O₂条件中培养^[16], 其他培养环境均一样, 隔日换液, 孵育4周^[17]。

1.4.2 骨髓间充质干细胞膜片和脐静脉内皮细胞的共培养 将脐静脉内皮细胞以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的浓度接种在两组骨髓间充质干细胞膜片上, 在内皮细胞培养基EGM-2中培养, 在37 °C恒温箱体积分数20%O₂条件下培养, 隔日换液, 孵育7 d。

骨髓间充质干细胞膜片和脐静脉内皮细胞的共培养及鉴定

细胞来源:	人, ATCC公司购买
培养方法:	骨髓间充质干细胞膜片和脐静脉内皮细胞的共培养
基础培养基:	骨髓间充质干细胞: 人骨髓干细胞完全培养基CCM; 脐静脉内皮细胞: 内皮细胞培养基EGM-2
添加材料:	体积分数20%胎牛血清, 100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素
共培养时间	接种骨髓间充质干细胞4周后加入脐静脉内皮细胞共培养1周
细胞传代:	骨髓间充质干细胞生长至80%~90%时, 体积分数0.25%胰蛋白酶消化收集细胞以1:2进行传代, 取P4细胞进行实验
细胞鉴定:	免疫荧光染色

实验2组分别标记为: 常氧共培养组, 即常氧下形成骨

髓间充质干细胞膜片,常氧下加入脐静脉内皮细胞共培养;低氧共培养组,即低氧下形成骨髓间充质干细胞膜片,常氧下加入脐静脉内皮细胞共培养。每组12个样本,每组实验重复3次,见图1。

1.4.3 免疫荧光染色和微血管定量检测 将共培养7 d的两组膜片用PBS冲洗,40 g/L多聚甲醛室温固定30 min,PBS冲洗,加入体积分数0.2% Triton X-100裂解5 min,PBS冲洗,牛血清封固。加入一抗鼠抗人CD31IgG(1:500,Abcam,美国),湿盒4 °C孵育过夜,吸除一抗,PBS冲洗,加入二抗Alexa Fluor488标记的马抗鼠IgG(2 mg/L,Abcam,美国),室温孵育1 h,吸除二抗,PBS冲洗后加入DAPI复染细胞核,封固。

采用Leica荧光显微镜观察,同时设阴性对照实验:以抗体稀释液代替一抗,结果镜下不显色,为阴性结果。分别随机取2组中的3个样本检测。荧光显微镜20倍物镜下摄片测量,每组选出3个样本,每个样本分为4个视野摄片,每个视野重复3次,计算微血管总长度、每个微血管的平均长度、微血管分支数量及微血管直径。其中微血管直径测量需在100倍物镜下摄片测量。

1.4.4 骨髓间充质干细胞膜片内血管内皮生长因子水平的ELISA检测 将第3或4代骨髓间充质干细胞以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 均匀接种在12孔板,加入人骨髓间充质干细胞完全培养基培养,37 °C恒温箱体积分数20%O₂和2%O₂培养4周,两种培养箱其他环境完全一致,吸除培养液,在4 °C条件下以12 000xg离心30 min,取上清液。

按照试剂盒(R&D Systems,英国)标准操作,酶标仪测紫外线450 nm吸光度值,分别以标准曲线和样品的吸光度值计算血管内皮生长因子水平^[18],每组12个,实验重复3次。

1.5 主要观察指标 各组免疫荧光染色图像、微血管定量检测及血管内皮生长因子水平。

1.6 统计学分析 实验中连续型变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 17.0软件进行数据分析,组间变量采用t检验比较, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 不同氧含量下骨髓间充质干细胞和脐静脉内皮细胞共培养形成预血管化骨髓间充质干细胞膜片的血管生成情况 低氧和常氧共培养组在共培养7 d的微血管形成情况见图2。绿色荧光标记CD31阳性血管,蓝色荧光标记细胞核的DAPI染色。低氧共培养组均较常氧共培养组有更长以及更密的微血管分布。

免疫荧光染色结果可见不同氧含量对骨髓间充质干细胞和脐静脉内皮细胞共培养形成预血管化骨髓间充质干细胞膜片的血管形成产生影响。培养7 d,低氧共培养组、常氧共培养组的微血管总长度及血管网中平均微血管长度、微血管的平均分支数目差异均有显著性意义($P < 0.05$),微

血管直径组间差异无显著意义($P > 0.05$),见表1。

表1 两组单位面积微血管长度、微血管平均长度、微血管分支数、微血管直径及血管内皮生长因子水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Descriptive statistics for total microvessel length, average microvessel length, average number of branches, microvessel diameter and vascular endothelial growth factor level in two groups

指标	低氧共培养组	常氧共培养组
微血管总长度(mm/mm ²)	12.92±0.72	8.52±0.43 ^a
血管网中平均微血管长度(mm)	0.98±0.07	0.62±0.03 ^a
微血管的平均分支数目(n)	2.33±0.24	1.42±0.45 ^a
微血管直径(μm)	11.00±2.36	10.33±4.06
血管内皮生长因子质量浓度(ng/L)	309.25±2.31	232.42±4.37 ^a

表注:与低氧共培养组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.2 不同氧含量下骨髓间充质干细胞膜片本身血管内皮生长因子水平比较 低氧和常氧培养下骨髓间充质干细胞膜片本身的血管内皮生长因子浓度差异有显著性意义($P < 0.05$),见表1。

3 讨论 Discussion

实验通过比较两组骨髓间充质干细胞膜片上接种脐静脉内皮细胞,免疫荧光结果显示两组均有血管样结构的形成和网络形成,而低氧培养的骨髓间充质干细胞接种脐静脉内皮细胞获得的细胞膜片血管样结构更密更长;ELISA结果显示,低氧下培养的骨髓间充质干细胞膜片产生的血管内皮生长因子水平更高,这提示骨髓间充质干细胞膜片和脐静脉内皮细胞共培养在血管化过程中起关键作用,并且低氧培养的骨髓间充质干细胞膜片提供了更优的血管化的微环境促进了脐静脉内皮细胞形成更多微腔。

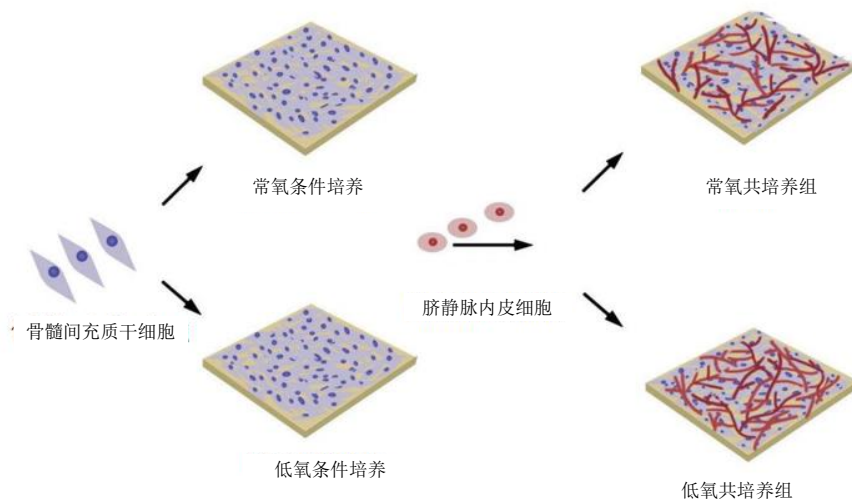
以往研究显示,氧浓度是调节细胞生物功能的重要因素^[19-20],体外模拟细胞生理性低氧环境下培养细胞以更好地保持细胞的生理特性^[21-22]。

以往研究证实,不同氧浓度对干细胞存在不同影响,低氧环境下培养的干细胞分泌更多的细胞外基质从而保持良好的干细胞特性^[23-24]。

结合实验结果发现,低氧环境下骨髓间充质干细胞膜片产生细胞外基质增多可能为脐静脉内皮细胞的增殖、迁移和血管网形成提供适当的微环境,从而内皮细胞能到更好的生长,与多个文献报道一致^[25-26]。

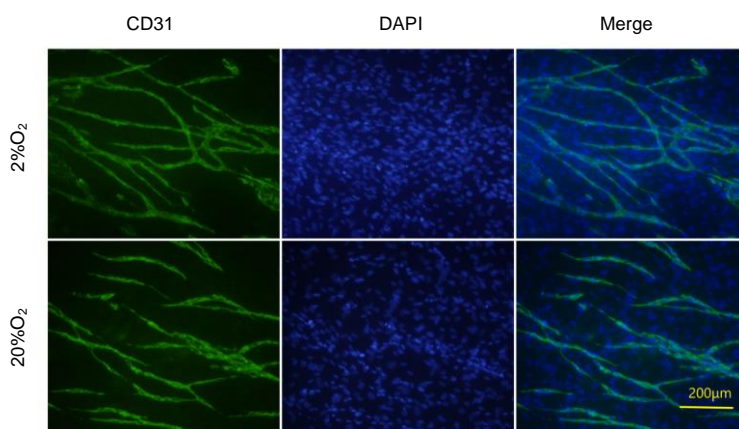
骨髓间充质干细胞膜片会表达多种的生长因子,血管内皮生长因子作为重要的促血管内皮细胞生长因子之一,其增高可促进血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用^[27-29],实验结果也显示低氧培养的骨髓间充质干细胞膜片产生的血管内皮生长因子水平更高,从而影响后续共培养的血管生成。

综上所述,低氧培养的骨髓间充质干细胞膜片不仅具有组织分化潜能,又能促进脐静脉内皮细胞形成血管网络;血管化膜片作为良好的组织工程移植基础,为组织生长



图注: 骨髓间充质干细胞分别在常氧和低氧条件培养形成骨髓间充质干细胞膜片, 脐静脉内皮细胞复种于骨髓间充质干细胞膜片上培养得到常氧共培养组和低氧共培养组预血管化膜片。

图 1 实验细胞培养过程模式图
Figure 1 Cell culture patterns



图注: 脐静脉内皮细胞复种骨髓间充质干细胞膜片上培养 7 d 形成管腔样结构, 绿色荧光示 CD31 阳性血管, 蓝色荧光示细胞核 DAPI 染色。

图 2 常氧下共培养 1 周的细胞形态(免疫荧光染色, 标尺=200 μm)

Figure 2 Immunohistochemical analysis of cells und normoxia co-culture after 1 week (scale bars: 200 μm)

提供必需的干细胞和充分血供从而保证移植的成功率。该研究模型的成功建立为组织工程黏膜植入后与宿主的血管网建立联系打下了基础, 如何与宿主血管功能性吻合、血管再生及血管生成仍需进一步实验研究和探讨。

作者贡献: 实验设计为第一作者和通讯作者。实验实施为第一、二作者。实验评估为第二作者和通讯作者。资料收集为第一、二、三、四作者。

经费支持: 该文章接受了“广东省自筹经费类科技计划项目(2017ZC0124), 广东省医学科学技术研究基金项目(C2017061), 广东省自然科学基金项目(2018A030313759), 广州市科技计划项目(201707010193)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关

协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其他任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 李欣, 金作林, 吴琼, 等. 应用牙周膜干细胞-牙囊干细胞复合细胞膜片同种异体移植修复比格犬牙周组织缺损的研究[J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(4): 204-210.
- [2] Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, et al. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*. 2009;30(14): 2716-2723.
- [3] 文艺, 杨鸿旭, 刘倩, 等. 骨髓间充质干细胞联合血管内皮祖细胞修复骨质疏松性牙槽骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19): 2748-2755.
- [4] Yang J, Yamato M, Kohno C, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(33):6415-6422.
- [5] Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, et al. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. *Nat Protoc*. 2012;7(5):850-858.

- [6] Asakawa N, Shimizu T, Tsuda Y, et al. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials*. 2010;31(14):3903-3909.
- [7] Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(4-5):300-311.
- [8] Mascarenhas S, Avalos B, Ardoin SP. An update on stem cell transplantation in autoimmune rheumatologic disorders. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12(6):530-540.
- [9] Yuan X, Tsai AC, Farrance I, et al. Aggregation of culture expanded human mesenchymal stem cells in microcarrier-based bioreactor. *Biochem Eng J*. 2018;131:39-46.
- [10] Liu Y, Ming L, Luo H, et al. Integration of a calcined bovine bone and BMSC-sheet 3D scaffold and the promotion of bone regeneration in large defects. *Biomaterials*. 2013;34(38):9998-10006.
- [11] Stoppato M, Stevens HY, Carletti E, et al. Influence of scaffold properties on the inter-relationship between human bone marrow derived stromal cells and endothelial cells in pro-osteogenic conditions. *Acta Biomater*. 2015;25:16-23.
- [12] Pedersen TO, Blois AL, Xue Y, et al. Mesenchymal stem cells induce endothelial cell quiescence and promote capillary formation. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):23.
- [13] Huang CC, Pan WY, Tseng MT, et al. Enhancement of cell adhesion, retention, and survival of HUVEC/cbMSC aggregates that are transplanted in ischemic tissues by concurrent delivery of an antioxidant for therapeutic angiogenesis. *Biomaterials*. 2016;74:53-63.
- [14] Gurel PG, Torun KG, Hasirci V. Influence of co-culture on osteogenesis and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and aortic endothelial cells. *Microvasc Res*. 2016;108:1-9.
- [15] 梁源,隋珂,尚冯青,等.血管内皮祖细胞/骨髓间充质干细胞复合细胞膜片的构建[J].中国组织工程研究,2014,18(41):6561-6566.
- [16] Zhilai Z, Billing M, Sujun Q, et al. Preconditioning in lowered oxygen enhances the therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury. *Brain Res*. 2016;1642:426-435.
- [17] Kobayashi J, Kikuchi A, Aoyagi T, et al. Cell sheet tissue engineering: Cell sheet preparation, harvesting/manipulation, and transplantation. *J Biomed Mater Res A*. 2019;107(5):955-967.
- [18] 孟文霞,郭薇,李志强,等.血管生成相关因子在口腔扁平苔藓中的表达[J].口腔疾病防治,2017,25(11):712-717.
- [19] Xu R, Sun Y, Chen Z, et al. Hypoxic preconditioning inhibits hypoxia-induced apoptosis of cardiac progenitor cells via the PI3K/Akt-DNMT1-p53 pathway. *Sci Rep*. 2016;6:30922.
- [20] Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7(2):150-161.
- [21] Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, et al. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(3):948-953.
- [22] Basciano L, Nemos C, Foliguet B, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol*. 2011;12:12.
- [23] Teixeira FG, Panchalingam KM, Anjo SI, et al. Do hypoxia/normoxia culturing conditions change the neuroregulatory profile of Wharton Jelly mesenchymal stem cell secretome? *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:133.
- [24] Habib R, Haneef K, Naeem N, et al. Hypoxic stress and IL-7 gene overexpression enhance the fusion potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells with bovine renal epithelial cells. *Mol Cell Biochem*. 2015;403(1-2):125-137.
- [25] Chen J, Zhang D, Li Q, et al. Effect of different cell sheet ECM microenvironment on the formation of vascular network. *Tissue Cell*. 2016;48(5):442-451.
- [26] Amiri F, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments: in vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability. *Cell Stress Chaperones*. 2015;20(2):237-251.
- [27] Qin HH, Filippi C, Sun S, et al. Hypoxic preconditioning potentiates the trophic effects of mesenchymal stem cells on co-cultured human primary hepatocytes. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:237.
- [28] Fan L, Zhang C, Yu Z, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and osteogenesis in rabbit femoral head osteonecrosis. *Bone*. 2015;81:544-553.
- [29] Denu RA, Hematti P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2989076.