

lncRNA PCAT14对甲状腺癌细胞侵袭转移的影响

宋焯梅, 华 慧, 李晓琴

山东第一医科大学(山东省医学科学院), 山东省肿瘤防治研究院(山东省肿瘤医院)中心实验室, 山东 济南
Email: 951117465@qq.com

收稿日期: 2021年5月24日; 录用日期: 2021年6月13日; 发布日期: 2021年6月28日

摘 要

目的: 探讨lncRNA PCAT14对甲状腺癌细胞增殖和侵袭的影响及其分子机制。方法: 生物信息学方法预测lncRNA PCAT14表达与肾癌患者临床分期的相关性。选择TPC-1甲状腺癌细胞系转染, 分别将PCAT14质粒(实验组)或空载对照质粒(对照组)转至甲状腺癌细胞中。使用qPCR检测PCAT14质粒转染效率。细胞计数实验及克隆形成实验检测转染后细胞增殖活性, Transwell侵袭实验检测转染后甲状腺细胞的侵袭能力。Western blot检测EMT相关标记物的蛋白表达水平。生物信息学方法预测lncRNA PCAT14可能结合的蛋白。结果: TCGA数据库显示, 甲状腺癌组织lncRNA PCAT14相对表达水平显著低于癌旁正常组织($P < 0.05$)。lncRNA PCAT14在甲状腺癌晚期患者肿瘤组织中相对表达量更低($P < 0.01$)。与对照组比较, 实验组lncRNA PCAT14相对表达水平显著升高($P < 0.05$), 细胞增殖活性($P < 0.05$)和细胞的侵袭能力显著降低($P < 0.01$)。同时, 实验组lncRNA PCAT14过表达抑制了EMT相关蛋白的表达。lncRNA PCAT14可能与DBX2结合发挥生物学功能。结论: lncRNA PCAT14在甲状腺癌组织中低表达, 与肾癌患者临床分期相关。过表达lncRNA PCAT14可明显抑制肾癌细胞增殖和侵袭, 其分子机制可能为lncRNA PCAT14与DBX2结合发挥生物学功能。

关键词

甲状腺癌, lncRNA PCAT14, 侵袭, 转移

Effects of lncRNA PCAT14 on Invasion and Metastasis of Thyroid Cancer Cells

Yemei Song, Hui Hua, Xiaoqin Li

Shandong Provincial Key Laboratory, Shandong Cancer Hospital and Institute, Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan Shandong
Email: 951117465@qq.com

Abstract

Objective: To investigate the effect of lncRNA PCAT14 on the invasion and metastasis of thyroid cancer cells and its molecular mechanism. **Methods:** Bioinformatics methods predict the correlation between the expression of lncRNA PCAT14 and the clinical stage of renal cancer patients. Select TPC-1 thyroid cancer cell line for transfection, and transfer PCAT14 plasmid (experimental group) or empty control plasmid (control group) to thyroid cancer cells respectively. QPCR was used to detect the transfection efficiency of PCAT14 plasmid. Cell counting experiment and clone formation experiment were used to detect cell proliferation activity after transfection, and Transwell invasion experiment was used to detect the invasion ability of thyroid cells after transfection. Western blot was used to detect the protein expression level of EMT-related markers. Bioinformatics methods predict the protein that lncRNA PCAT14 may bind. **Results:** The TCGA database showed that the relative expression level of lncRNA PCAT14 in thyroid cancer tissues was significantly lower than that in normal tissues adjacent to cancer ($P < 0.05$). The relative expression of lncRNA PCAT14 is lower in the cancer tissues of patients with advanced thyroid cancer ($P < 0.01$). Compared with the control group, the relative expression level of lncRNA PCAT14 of the experimental group was significantly increased ($P < 0.05$), and the cell proliferation activity ($P < 0.05$) and cell invasion ability were significantly reduced ($P < 0.01$). At the same time, the lncRNA PCAT14 overexpression in the experimental group inhibited the expression of EMT-related proteins. lncRNA PCAT14 may combine with DBX2 to exert biological functions. **Conclusion:** lncRNA PCAT14 is lowly expressed in thyroid cancer tissues and is related to the clinical stage of renal cancer patients. Overexpression of lncRNA PCAT14 can significantly inhibit the proliferation and invasion of renal cancer cells. The molecular mechanism may be that lncRNA PCAT14 combine with DBX2 to exert biological functions.

Keywords

Thyroid Cancer, lncRNA PCAT14, Invasion, Metastasis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

甲状腺癌(Thyroid Cancer, THCA)是最常见的内分泌恶性肿瘤, 发病率占所有癌症类型的1%~2% [1] [2] [3]。其中乳头状癌是最常见的病理类型, 占甲状腺肿瘤所有病理类型 80%~85% [4] [5] [6]。目前, 大部分甲状腺癌患者通过手术切除和化疗或放疗后预后良好[7]。然而, 少数乳头状甲状腺癌患者由于原发肿瘤较大、淋巴结转移、远处转移等临床病理特点, 预后较差[8]。因此对甲状腺癌发生发展分子机制研究对其诊断和预后判断具有非常重要的临床价值。

长链非编码 RNA 是一种长度在 200~100,000 核苷酸之间的单链非编码 RNA 分子[9]。长链非编码 RNA 在细胞功能中发挥重要作用, 其调控可使遗传输出多样化, 其对基因网络的微调是必不可少的, 其失调与癌症的发病机制密切相关[10] [11] [12]。已有研究表明 lncRNA PCAT14 在前列腺癌和肝癌中发挥促进肿瘤发展的作用[13] [14], 但尚未见其在甲状腺癌中的报道。本研究旨在探讨 lncRNA PCAT14 在甲状腺乳头状癌中的表达及其对肿瘤生物学行为的影响, 为甲状腺乳头状癌的诊断、预后评估和靶向治疗提供参考。

1.1. 资料和方法

1.1.1. 一般资料

甲状腺癌组织样本的大规模 lncRNA 表达谱数据来源于 TCGA, 基于 RNA 测序结果获得 512 个甲状腺癌组织样本和 337 个正常对照组织样本的转录组数据。

1.1.2. 试剂及细胞

甲状腺癌细胞(BCPAP, TPC-1)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; 1640 培养基和 DMEM 高糖培养基购自美国 Corning 公司; 胎牛血清和胰酶购自 Gibco 公司; PCAT14 质粒和阴性对照质粒购自金唯智; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 引物购自上海吉玛公司; jetPRIME 转染试剂购自法国 Polyplus 公司; 逆转录试剂盒购自 TAKARA 公司; 结晶紫购自中国国药集团公司; 甲醇购自国药集团化学试剂有限公司。TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; RIPA 裂解液、5×蛋白上样缓冲液购自北京索莱宝公司; Tris、SDS、甘氨酸购自上海生工生物工程有限公司; 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2. 方法

1.2.1. 生物信息学方法

采用 TCGA 数据库对甲状腺癌和癌旁正常组织中 lncRNA PCAT14 的差异表达进行分析。采用 RNA-蛋白互作预测网站(RNA-Protein Interaction Prediction (RPISeq) (iastate.edu))预测与 lncRNA PCAT14 结合的蛋白。

1.2.2. 细胞培养和细胞转染

用含 10%FBS 的 1640 培养基培养 BCPAP 和 TPC-1 甲状腺癌细胞, 培养条件为恒温 37°C, 饱和湿度, 5% CO₂ 浓度。细胞每隔 1~2 天进行换液或传代。取对数生长期细胞接种于无菌 12 孔板内, 待细胞融合达 40%~50%左右时使用 jetPRIME 转染试剂进行质粒转染。实验组为 PCAT14 质粒, 阴性对照组为空载质粒, 转染 6 小时后换液。

1.2.3. 提取 RNA 及实时荧光定量 PCR

使用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 将 RNA 逆转录成 cDNA。以 β -actin 引物为内参, 使用 lncRNA PCAT14 引物进行 qPCR 扩增, 检测 PCAT14 在细胞中表达量。实验步骤严格参照实时定量 PCR 试剂说明书操作。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。lncRNA PCAT14 引物 F: 5'-CAAGAATGGGCCATAGTGACG-3', R: 5'-GCACAGCCCTAGATCCCTTA-3'。 β -actinF: 5'-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3', R: 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'。

1.2.4. 细胞计数实验

取进行转染处理的细胞, 分别在转染 24 h 后第 0、24、48、72 h 计数。用 10 μ L 枪头吸取已消化悬浮的细胞, 从计数板边缘缓缓滴入, 使之充满计数板和盖玻片之间的空隙中。显微镜下计算计数板四大格细胞总数, 压线细胞只计左侧和上方的。计算公式: 细胞数/mL = (4 大格细胞总数/4) \times 10,000, 重复 6 次, 取平均值。

1.2.5. 克隆形成实验

取转染处理 24 h 后的细胞按照每孔 1000 个细胞均匀铺于 6 孔板中, 37°C 恒温培养箱中孵育 8~10 天后取出, 0.5% 结晶紫甲醇溶液固定染色后计算克隆形成率。

1.2.6. Transwell 侵袭实验

下室中加入 600 μ L 无菌 PBS 放置于培养箱中激活小室, 30 min 后弃之。Transwell 下室中加入 600 μ L

含 1% FBS 的 1640 培养基, 取实验组及对照组转染 24 h 后的细胞, 用无血清培养基重悬后接种到上室, 每个小室 4×10^4 个细胞。36 h 后取出小室, 用 0.5% 结晶紫甲醇溶液固定染色 20 min, 用清水冲洗小室上层, 湿棉棒小心擦去上室膜表面上的细胞, 自然晾干。在显微镜下随机选取 5~7 个视野拍照, image J 统计实验结果。

1.2.7. Western Blot

取转染后 48 h 细胞提取总蛋白。定量后各取 5 ug 蛋白上样电泳及转膜, 室温封闭 2 h 后剪膜, 分别与一抗 4℃ 孵育过夜, 三次洗膜后分别与二抗室温孵育 1 h, 洗膜后用显影液孵育 2 min, 采用凝胶成像分析仪曝光显影。

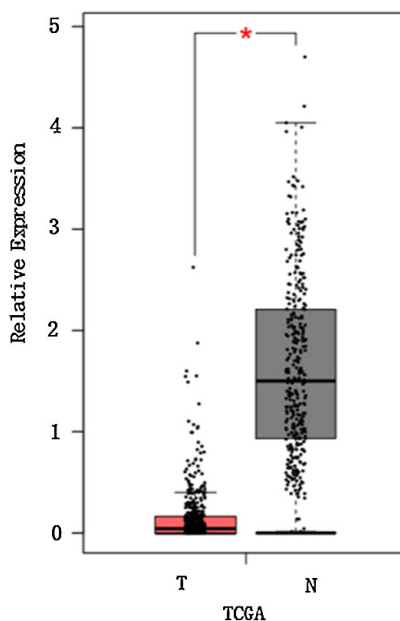
1.3. 统计学分析

所有数据均采用 SPSS19.0 软件进行分析。符合正态分布的数据资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两独立样本比较采用独立样本 t 检验, 组间比较使用单因素方差分析。所有实验均重复 3 次, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1. 甲状腺癌中 lncRNA PCAT14 表达与肿瘤临床分期相关

分析 TCGA 数据库中 512 个甲状腺癌组织样本与 337 个癌旁组织样本 lncRNA PCAT14 的表达量, 结果显示 lncRNA PCAT14 在甲状腺癌组织中表达量低于癌旁正常组织。差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1)。同时, 基于 TCGA 数据库分析显示 lncRNA PCAT14 与肿瘤临床分期相关, 在 III 期和 IV 期甲状腺癌组织中 lncRNA PCAT14 表达量更低($P < 0.01$, 图 2)。



注: T: 肿瘤组织, N: 癌旁组织, *: $P < 0.05$

Figure 1. Expression of lncRNA PCAT14 in thyroid cancer and paracancerous tissues in TCGA database

图 1. TCGA 数据库中 lncRNA PCAT14 在甲状腺癌和癌旁组织中的表达

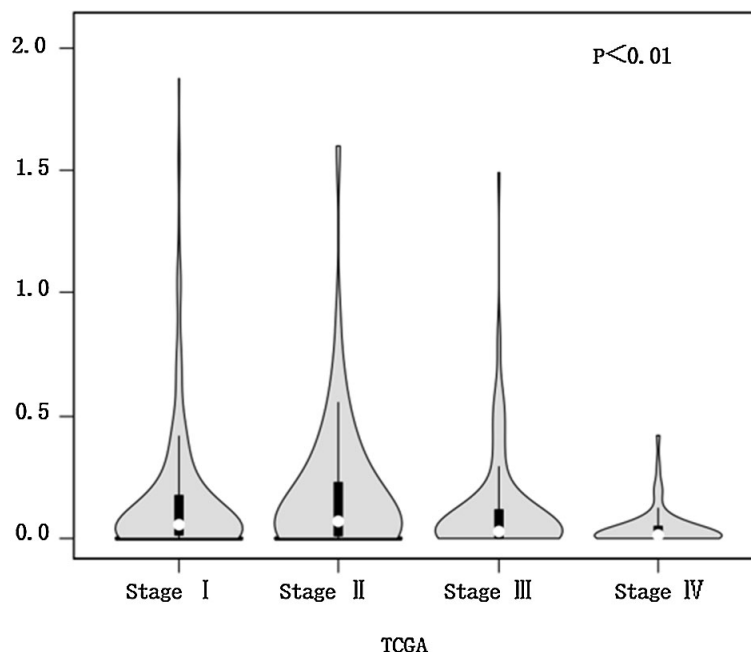
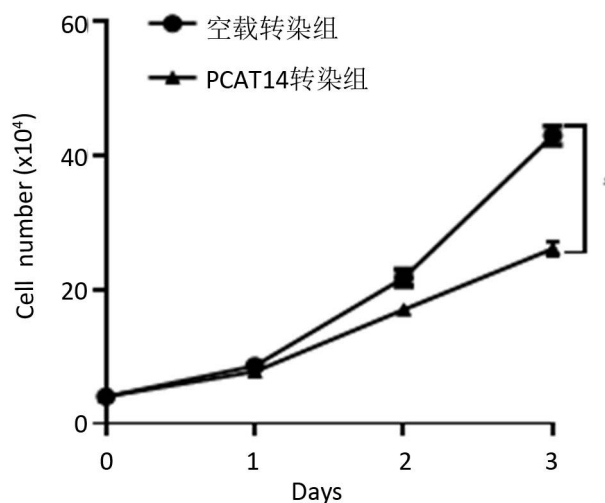


Figure 2. Expression level of lncRNA PCAT14 in tumor tissues of different clinical stages in TCGA database

图 2. TCGA 数据库中不同临床分期肿瘤组织中 lncRNA PCAT14 的表达量

2.2. 过表达 lncRNA PCAT14 对甲状腺癌 BCPAP 细胞增殖能力的影响

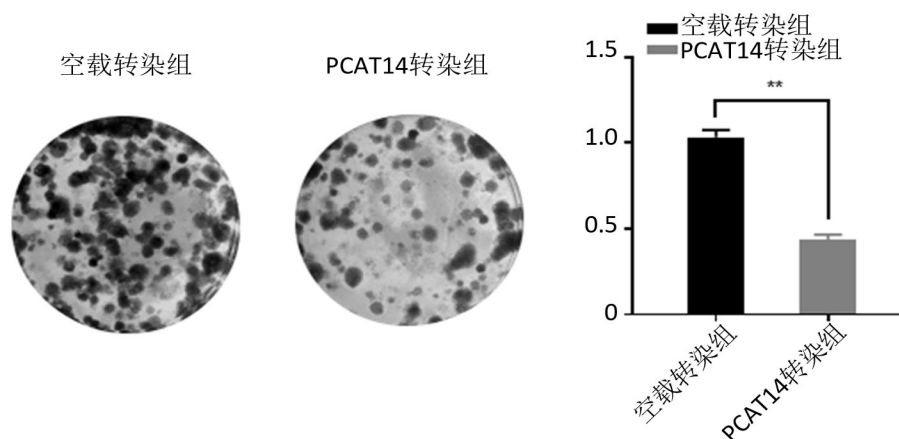
细胞计数结果显示, 转染 PCAT14 质粒实验组的细胞增殖能力第三天时明显低于空载转染组, 分别为 26.125 ± 0.215 、 43 ± 0.364 , 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 3)。克隆形成实验结果显示, 转染 PCAT14 质粒实验组的细胞克隆形成率低于空载转染组, 分别为 0.44 ± 0.030 、 1.03 ± 0.021 , 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 4)。提示过表达 lncRNA PCAT14 后可以抑制 TPC-1 细胞增殖能力。



注: *: $P < 0.05$

Figure 3. The effect of lncRNA PCAT14 on the proliferation of TPC-1 cells was detected by cell counting assay

图 3. 细胞计数检测 lncRNA PCAT14 对 TPC-1 细胞增殖能力的影响



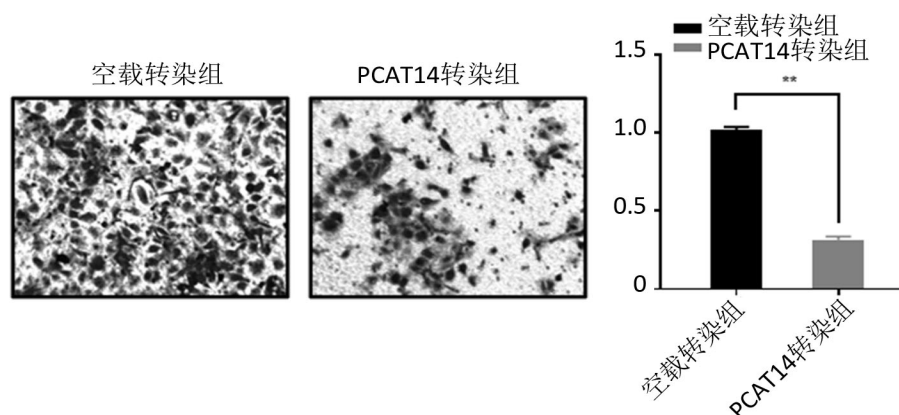
注: **: $P < 0.01$

Figure 4. The effect of lncRNA PCAT14 on the proliferation of TPC-1 cells was detected by clone formation assay

图 4. 克隆形成实验检测 lncRNA PCAT14 对 TPC-1 细胞增殖能力的影响

2.3. 过表达 lncRNA PCAT14 对甲状腺癌 BCPAP 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果显示, PCAT14 转染组每个高倍视野下穿膜细胞数低于空载转染组, 分别为 0.315 ± 0.012 、 1.015 ± 0.031 , 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 5)。提示过表达 lncRNA PCAT14 后可以抑制 TPC-1 细胞侵袭能力。



注: **: $P < 0.01$

Figure 5. The effect of lncRNA PCAT14 on the invasion ability of TPC-1 cells was detected by Transwell

图 5. Transwell 侵袭实验检测 lncRNA PCAT14 对 TPC-1 细胞侵袭能力的影响

2.4. 过表达 lncRNA PCAT14 对 TPC-1 细胞中上皮 - 间质转化 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) 相关蛋白表达的影响

Western blot 实验结果表明, 与空载转染组相比, PCAT14 转染组 N-cadherin、vimentin 和 TAZ 的蛋白表达水平下降(图 6)。提示过表达 lncRNA PCAT14 抑制了 TPC-1 细胞发生上皮-间质转化。

2.5. lncRNA PCAT14 结合蛋白的预测

RNA-蛋白互作预测网站(RNA-Protein Interaction Prediction (RPISeq) (iastate.edu))显示与 lncRNA

PCAT14 互作的蛋白为 DBX2, 结合评分中 RF = 0.7, SVM = 0.92。

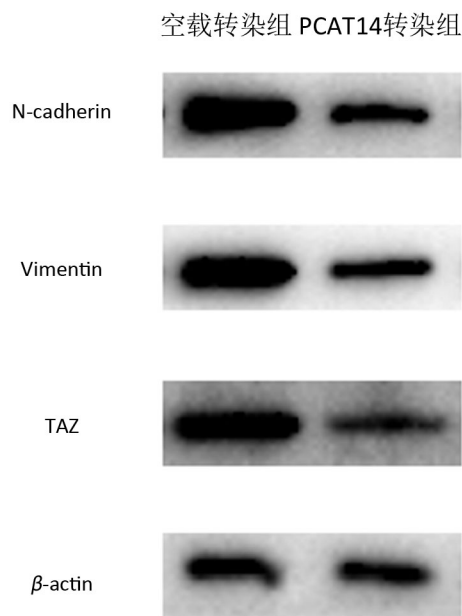


Figure 6. Expression of N-cadherin, Vimentin and TAZ proteins in TPC-1 cells detected by Western blot

图 6. Western blot 检测 TPC-1 细胞 N-cadherin、Vimentin 和 TAZ 蛋白表达

3. 讨论

在过去的几十年里, 甲状腺乳头状癌的发病率一直在快速上升。虽然甲状腺乳头状癌患者预后一般较好, 但肿瘤的侵袭性和转移性是导致预后不良的主要危险因素[15] [16] [17]。癌细胞的迁移和侵袭是异质性和适应性的过程, 包括细胞形态的改变、细胞极性的丧失和最终导致易位的细胞运动性的增加。癌症侵袭也是导致癌症患者死亡的主要原因转移的原因[18] [19]。原发部位的肿瘤细胞可以发生 EMT 来获得运动能力和侵袭能力, EMT 是肿瘤细胞转移的一个关键步骤。EMT 已被证实参与多种生物过程, 如伤口愈合、胚胎发育和癌症进展。已有研究发现, EMT 参与了甲状腺癌的发展和甲状腺癌的局部侵袭转移[20] [21]。既往研究表明 lncRNA PCAT14 在前列腺癌中发挥重要作用, 证明了其可作为前列腺癌的诊断标志物, 且 lncRNA PCAT14 在前列腺癌中表达量明显高于癌旁正常组织[22]。本研究通过 TCGA 数据库分析发现, lncRNA PCAT14 在甲状腺癌组织中低表达, 通过转染上调 TPC-1 细胞中 lncRNA PCAT14 的表达, TPC-1 细胞的增殖及侵袭能力均受到显著抑制, lncRNA PCAT14 表达的上调抑制了 EMT 相关蛋白的表达, 表明甲状腺癌中 lncRNA PCAT14 的异常低表达与甲状腺肿瘤的发生发展密切相关。RNA-蛋白互作预测分析发现 lncRNA PCAT14 可能与 DBX2 结合发挥生物学功能。同时, TCGA 数据库显示在 III 期和 IV 期甲状腺癌患者肿瘤组织内 lncRNA PCAT14 相对表达量更低, 进一步表明 lncRNA PCAT14 与肿瘤进展相关, lncRNA PCAT14 可能成为甲状腺癌治疗靶点和预后标志物。

4. 结论

综上所述, lncRNA PCAT14 在甲状腺癌和癌旁组织中有显著差异性表达且在癌组织中低表达, lncRNA PCAT14 的相对低表达与甲状腺癌患者临床分期具有相关性。上调甲状腺癌细胞中 lncRNA

PCAT14 的表达显著抑制肿瘤细胞的侵袭转移能力, 其分子机制可能是 lncRNA PCAT14 通过与 DBX2 结合发挥生物学功能。

参考文献

- [1] Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **55**, 74-108. <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74>
- [2] Gharib, H., Papini, E., Paschke, R., Duick, D.S., Valcavi, R., Hegedus, L., *et al.* (2010) American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules. *Journal of Endocrinological Investigation*, **33**, 287-291. <https://doi.org/10.1007/BF03346587>
- [3] Akkas, B.E., Demirel, B.B. and Vural, G.U. (2014) Prognostic Factors Affecting Disease-Specific Survival in Patients with Recurrent and/or Metastatic Differentiated Thyroid Carcinoma Detected by Positron Emission Tomography/Computed Tomography. *Thyroid*, **24**, 287-295. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0195>
- [4] Kitahara, C.M. and Sosa, J.A. (2016) The Changing Incidence of Thyroid Cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, **12**, 646-653. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.110>
- [5] Cabanillas, M.E., McFadden, D.G. and Durante, C. (2016) Thyroid Cancer. *Lancet*, **388**, 2783-2795. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30172-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30172-6)
- [6] Fagin, J.A. and Wells Jr., S.A. (2016) Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **375**, 1054-1067. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1501993>
- [7] Regalbuto, C., Frasca, F., Pellegriti, G., Malandrino, P., Marturano, I., Di Carlo, I., *et al.* (2012) Update on Thyroid Cancer Treatment. *Future Oncology*, **8**, 1331-1348. <https://doi.org/10.2217/fon.12.123>
- [8] Blomberg, M., Feldt-Rasmussen, U., Andersen, K.K. and Kjaer, S.K. (2012) Thyroid Cancer in Denmark 1943-2008, before and after Iodine Supplementation. *International Journal of Cancer*, **131**, 2360-2366. <https://doi.org/10.1002/ijc.27497>
- [9] Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., *et al.* (2009) Chromatin Signature Reveals over a Thousand Highly Conserved Large Non-Coding RNAs in Mammals. *Nature*, **458**, 223-227. <https://doi.org/10.1038/nature07672>
- [10] Gong, J., Li, Y., Liu, C.J., Xiang, Y., Li, C., Ye, Y., *et al.* (2017) A Pan-Cancer Analysis of the Expression and Clinical Relevance of Small Nucleolar RNAs in Human Cancer. *Cell Reports*, **21**, 1968-1981. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.070>
- [11] Rupaimoole, R., Calin, G.A., Lopez-Berestein, G. and Sood, A.K. (2016) miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Discovery*, **6**, 235-246. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0893>
- [12] Esteller, M. (2011) Non-Coding RNAs in Human Disease. *Nature Reviews Genetics*, **12**, 861-874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
- [13] White, N.M., Zhao, S.G., Zhang, J., Rozycki, E.B., Dang, H.X., McFadden, S.D., *et al.* (2017) Multi-Institutional Analysis Shows That Low PCAT-14 Expression Associates with Poor Outcomes in Prostate Cancer. *European Urology*, **71**, 257-266. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.07.012>
- [14] Wang, Y., Hu, Y., Wu, G., Yang, Y., Tang, Y., Zhang, W., *et al.* (2017) Long Noncoding RNA PCAT-14 Induces Proliferation and Invasion by Hepatocellular Carcinoma Cells by Inducing Methylation of miR-372. *Oncotarget*, **8**, 34429-34441. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16260>
- [15] Song, E., Jeon, M.J., Oh, H.S., Han, M., Lee, Y.M., Kim, T.Y., *et al.* (2018) Do Aggressive Variants of Papillary Thyroid Carcinoma Have Worse Clinical Outcome than Classic Papillary Thyroid Carcinoma? *European Journal of Endocrinology*, **179**, 135-142. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0991>
- [16] Jiang, C., Cheng, T., Zheng, X., Hong, S., Liu, S., Liu, J., *et al.* (2018) Clinical Behaviors of Rare Variants of Papillary Thyroid Carcinoma Are Associated with Survival: A Population-Level Analysis. *Cancer Management and Research*, **10**, 465-472. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S157823>
- [17] Vuong, H.G., Long, N.P., Anh, N.H., Nghi, T.D., Hieu, M.V., Hung, L.P., *et al.* (2018) Papillary Thyroid Carcinoma with Tall Cell Features Is as Aggressive as Tall Cell Variant: A Meta-Analysis. *Endocrine Connections*, **7**, R286-R293. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0333>
- [18] Nixon, I.J., Simo, R., Newbold, K., Rinaldo, A., Suarez, C., Kowalski, L.P., *et al.* (2016) Management of Invasive Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, **26**, 1156-1166. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0064>
- [19] Stuelten, C.H., Parent, C.A. and Montell, D.J. (2018) Cell Motility in Cancer Invasion and Metastasis: Insights from Simple Model Organisms. *Nature Reviews Cancer*, **18**, 296-312. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.15>

-
- [20] Richards, E.J., Zhang, G., Li, Z.P., Permuth-Wey, J., Challa, S., Li, Y., *et al.* (2015) Long non-coding RNAs (LncRNA) Regulated by Transforming Growth Factor (TGF) β : LncRNA-Hit-Mediated TGF β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Mammary Epithelia. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 6857-6867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610915>
- [21] Braun, J., Hoang-Vu, C., Dralle, H. and Huttelmaier, S. (2010) Down-Regulation of MicroRNAs Directs the EMT and Invasive Potential of Anaplastic Thyroid Carcinomas. *Oncogene*, **29**, 4237-4244. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.169>
- [22] Shukla, S., Zhang, X., Niknafs, Y.S., Xiao, L., Mehra, R., Cieslik, M., *et al.* (2016) Identification and Validation of PCAT14 as Prognostic Biomarker in Prostate Cancer. *Neoplasia*, **18**, 489-499. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.07.001>