



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.023
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.023
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(7):1076-1080.

· 简要论著 ·

AFP、GP73、SOD 联合检测在原发性肝癌患者诊断中应用价值

陆兴热¹, 骆葱², 陈凤羽¹, 刘孝文¹, 资云菊¹

(云南省文山州人民医院 1. 检验科 2. 普通外科, 云南 文山 663000)

摘要

目的: 探讨甲胎蛋白 (AFP)、高尔基体糖蛋白 73 (GP73)、超氧化物歧化酶 (SOD) 联合检测对原发性肝癌的诊断价值。

方法: 选取收治的原发性肝癌和肝硬化患者各 100 例 (分别为肝癌组和肝硬化组), 抽取患者静脉血, 采用电化学发光法检测 AFP、酶联免疫吸附法检测 GP73、黄嘌呤氧化酶法检测 SOD, 并与 100 例同期健康体检者 (对照组) 进行对照, 绘制受试者工作特征曲线 (ROC), 观察 AFP、GP73 及 SOD 联合检测对原发性肝癌的诊断价值。

结果: 肝癌组血清 AFP、GP73 显著高于肝硬化组和对照组 ($P < 0.05$), SOD 水平明显低于肝硬化组和对照组 ($P < 0.05$)。AFP、GP73 及 SOD 单纯检测在原发性肝癌患者诊断中最佳节点分别为 150.29 $\mu\text{g/L}$ 、214.78 $\mu\text{g/L}$ 和 55.61 IU/mL, 联合检测 AUC 高达 0.902, 明显高于单纯检测 AFP、GP73 及 SOD 的 0.726、0.813 及 0.791。

结论: AFP、GP73 及 SOD 联合检测用于原发性肝癌的诊断, 可显著提高检出率。

关键词

肝肿瘤 / 诊断; 甲胎蛋白; 高尔基体糖蛋白 73; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R735.7

原发性肝癌分为胆管细胞型肝癌和肝细胞癌, 是世界范围内发病率、致死率均较高的恶性肿瘤疾病, 且发病机制复杂, 严重影响患者的生活质量。长期临床实践表明, 早期诊断对于原发性肝癌患者的预后意义重大^[1]。目前常用的诊断方法有影像学 and 血清学诊断, 与血清学诊断相比, 计算机及超声等检测人为因素影响较大, 费用相对较高, 所以临床诊断原发性肝癌均倾向于血清学诊断。甲胎蛋白 (AFP) 是目前临床应用最广泛的肝癌诊断标志物, 但是它对于肝硬化活动期、慢性活动性肝炎及急性病毒性肝炎等疾病均有较高的敏感度, 所以用于原发性肝癌诊断并不很理

想^[2]。研究发现多种肿瘤标志物中, 高尔基体糖蛋白 73 (GP73) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 在肝癌早期诊断中有较高的特异性和敏感度^[3]。本研究将 AFP、GP73 及 SOD 联合检测用于原发性肝癌的诊断, 并对三者联合的诊断价值进行讨论, 以期原发性肝癌的早期诊断寻找出新的可靠的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 3 月—2016 年 3 月在我院接受治疗的原发性肝癌 (肝癌组) 和肝硬化 (肝硬化组) 患者各 100 例, 另选取同期健康体检者 100 例 (对照组)。纳入标准: (1) 肝癌组均符合《原发性肝癌规范化诊治专家共识》^[4] 中肝癌的诊断, 且均为初诊者; (2) 肝硬化组符合《内科学》中肝硬化的诊断, 排除肝占位性病变; (3) 入组前 1 周无钙抗结剂、维生素 C 及维生素 E 服用史; (4) 所有研究对象均自愿签署研究知情书。排除标准: (1) 合

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2014AA02304)。

收稿日期: 2016-05-15; **修订日期:** 2016-06-16。

作者简介: 陆兴热, 云南省文山州人民医院副主任检验师, 主要从事实验室诊断方面的研究。

通信作者: 陆兴热, Email: luxingre@139.com

并神经性疾病或言语交流障碍者；(2) 妊娠或哺乳期妇女；(3) 有其它恶性肿瘤疾病者；(4) 试验组发生肝脏转移者；(5) 有自身免疫性疾病者；(6) 药物性肝病或病毒性肝炎等疾病；(7) 临床资料不全或依从性差者。其中肝癌组男61例，女39例；年龄33~65岁，平均(49.42 ± 11.35)岁。肝硬化组男54例，女46例；年龄32~64岁，平均(48.73 ± 11.67)岁。对照组男50例，女50例；年龄30~65岁，平均(47.98 ± 11.85)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有研究对象入组后次日清晨抽取空腹静脉血6 mL，置于无抗凝剂真空管中，室温静置30 min，3 000 r/min离心10 min，取上层血清，分置于3个试管，-30℃低温冰箱保存。

1.2.2 AFP、GP73及SOD检测 本研究所用仪器为Roche P800生化分析仪，试剂盒为配套试剂，购自北京九强生物有限公司。采用电化学发光法检测AFP(正常值0~25 μg/L)、酶联免疫吸附法检测GP73(线性范围0~250 μg/L)，黄嘌呤氧化酶法检测SOD(参考值129~216 U/mL)，具体操作步骤参考《全国临床检验操作规程》^[5]。

1.3 观察指标

(1) 比较三组研究对象血清AFP、GP73及SOD水平；(2) AFP、GP73及SOD单项检测及AFP+GP73+SOD联合检测结果比较。

1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行数据分析，符合正态分布的计量资料采用($\bar{x} \pm s$)描述，*t*或ANOVA检验，计数资料采用百分率描述， χ^2 检验；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。绘制受试者工作特征曲线(ROC)，并以曲线下面积(AUC)评估各检测方法应用价值。

2 结果

2.1 三组血清AFP、GP73及SOD水平比较

三组血清AFP、GP73及SOD水平组间比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$)，且肝癌组和肝硬化组AFP、GP73水平均远远高于对照组($P < 0.05$)，而SOD水平远远低于对照组($P < 0.05$)，肝癌组AFP、GP73水平显著高于肝硬化组($P < 0.05$)，SOD水平显著低于肝硬化组($P < 0.05$) (表1)。

表1 三组血清AFP、GP73及SOD水平比较($n=100$)

组别	AFP (μg/L)	GP73 (μg/L)	SOD (U/mL)
肝癌组	185.66 ± 43.25 ^{1), 2)}	263.14 ± 73.62 ^{1), 2)}	53.46 ± 15.68 ^{1), 2)}
肝硬化组	105.73 ± 38.79 ¹⁾	138.21 ± 45.09 ¹⁾	115.62 ± 37.42 ¹⁾
对照组	8.51 ± 2.72	27.64 ± 9.19	130.55 ± 22.97

注：1) 与对照组比较， $P < 0.05$ ；2) 与肝硬化组比较， $P < 0.05$

2.2 不同检测方法诊断分析

AFP、GP73、SOD及联合检测在原发性肝癌患者中诊断ROC曲线如图1所示；单纯检测方法最佳节点和AUC如下表2所示。联合检测AUC明显高于单纯检测。

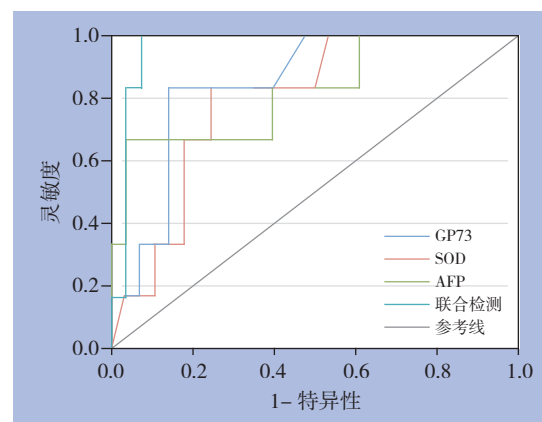


图1 AFP、GP73、SOD及联合检测在原发性肝癌患者诊断中ROC曲线

表2 不同检测方法在原发性肝癌患者诊断中应用价值

检测方法	最佳节点	AUC
AFP	150.29 μg/L	0.726
GP73	214.78 μg/L	0.813
SOD	55.61 U/mL	0.791
联合检测	—	0.902

3 讨论

原发性肝癌发病隐匿，从慢性肝炎至肝硬化，到最终发展为肝癌中间大约需要20~50年不等^[6]。加之原发性肝癌恶性程度高、侵袭性强、预后差，严重影响患者的生活质量。据统计全世界每年死于肝癌者约25万例，我国占比最高可达50%^[7-8]。在发病早期得到确诊的情况下，射频、介入栓塞、肝移植及肿瘤切除术等单项或综合治疗肝癌的手段均能收到良好的治疗效果，但是多数患者到医院就诊时，病情往往已经发展至难治阶段，错过了最佳的治疗时期，存活率大大降低，所以

肝癌的早期诊治对于提高患者的生命质量意义重大。在肿瘤发生及发展过程中,肿瘤与宿主相互作用或肿瘤细胞会释放、合成一类物质,常见于体液、组织及细胞中,能够反应肿瘤生长及存在状况^[9]。这一类物质便是肿瘤标志物,临床常将其用于肿瘤诊断,该种诊断方法无创且经济适用,易于为患者接受。

在所用肿瘤标志物中,目前应用最广泛的是AFP,它属于糖原蛋白,主要来源于胚胎干细胞,由卵黄囊细胞和肝脏实质细胞合成,通常在胎儿出生约14 d后血液中AFP逐渐下降,直至完全被白蛋白代替,所以正常人体内AFP含量极低,不超过25 $\mu\text{g/L}$ ^[10]。但是当患者肝细胞发生癌变时,AFP的蛋白质功能便会因此而恢复,还会随着疾病严重程度而急剧增加,所以AFP一度被医学界公认为原发性肝癌诊断的特异性指标。但是大量临床研究发现,部分肝硬化患者体内AFP也会出现上千增长情况,但是观察多年却没有肝癌迹象^[11-12]。另有学者^[13]研究指出,晚期肝癌患者有20%死亡前AFP水平依然低于10 $\mu\text{g/L}$ 。所以AFP用于原发性肝癌的诊断,准确率并不能被完全信任。本研究检测结果发现,AFP单独用于原发性肝癌检测其阳性率仅70%,与王丽丽等^[14]研究结果中敏感度54.05%、特异度78.94%具有相似性。本组AFP检测AUC不高原因可能是肝癌细胞本身有合成和不合成AFP两种情况,当肝细胞处于癌变状态时,合成AFP的肝癌细胞受低甲基化的影响使AFP表达开放化,此时AFP作为肿瘤标志物用于原发性肝癌的诊断准确率会比较高,反之便会呈现为低表达阴性状态,影响诊断。

GP73是存在于高尔基体的跨膜蛋白73,通常表达于正常肝组织的胆管上皮细胞中,在肝细胞中几乎不表达,但是发生病变时如受病毒感染后其表达可显著高于正常肝组织3~5倍^[15-16]。其表达升高可能是为了维护高尔基体结构的完整性。有学者^[17]研究发现,GP73可在弗林蛋白酶作用下水解,并同时裂解细胞外结构域,被释放至细胞体液中,为肿瘤的检测提供依据。赵运胜等^[18]研究发现,原发性肝癌患者血清GP73水平显著高于肝硬化和正常对照组,且其敏感性和特异性高于AFP。另有肝癌土拨鼠模型研究^[19]发现,模型组GP73水平显著高于正常对照组,说明GP73表达异常与肝癌有密切关系。本研究结果中GP73可明显将肝癌患者、肝硬化及正常人区分开,且其AUC

显著高于AFP,说明GP73可作为重要的肿瘤标志物用于原发性肝癌的诊断。

SOD又名肝蛋白,广泛存在于生物有氧细胞之中,是一类可催化自由基如超氧阴离子进而发生歧化反应的金属酶,是人体内重要的抗氧化活性物质。通常SOD水平下降意味着衰老及死亡。在国外SOD常用于疾病引发的继发性过氧化损伤及相关自由基清除药物疗效的检测,以为临床最佳治疗时间的确定及自由基清除对策提供参考,并用于预后的判断和评估^[20]。黄学文等^[21]研究指出,肝癌患者机体内存在大量具有超氧化作用的活性氧。活性氧又被称为机体垃圾,一旦过剩存在便会引起多种氧化应激反应,进而损伤细胞,甚至造成细胞死亡。另有学者^[22]研究指出,肿瘤细胞的共性是抗氧化应激损伤,通常剩余的氧化应激会通过多种途径攻击蛋白质、脂质及细胞DNA引发肿瘤、衰老、神经退行性疾病及心血管疾病等150多种疾病。在肝细胞中SOD的活性最高,其次是肾上腺和红细胞。SOD可以与氧自由基造成的损害相对抗,并将过剩的氧自由基及其衍生物消除使细胞免受伤害,进而发挥抑制肿瘤生成的作用。本研究结果显示,肝癌组SOD水平显著低于肝硬化组和对照组,且在原发性肝癌的诊断中,AUC为0.791,可见SOD水平检测用于原发性肿瘤诊断具有一定的可行性。

本研究结果显示,AFP、GP73及SOD单一诊断漏诊率较高,容易导致患者失去最佳的治疗时机。而三者联合诊断AUC高达0.902,可见三指标联合可优势互补,达到原发性肝癌早发现、早治疗的目的,从而延长患者的生存期,提高其生活质量。

综上所述,AFP、GP73及SOD联合检测用于原发性肝癌的诊断可显著提高肝癌检出率,为肝癌的早期诊断提供可靠依据。然而本研究样本容量小,观察时间短,AFP、GP73及SOD在原发性肝癌中作用机制及在其它肿瘤中的表达需进一步研究。

参考文献

- [1] 王连新. 原发性肝癌的筛查和早期诊治体会[J]. 江苏医药, 2010, 36(23):2786-2787.
Wang LX. Experience in screening and early treating primary liver cancer[J]. Jiangsu Medical Journal, 2010, 36(23):2786-2787.

- [2] 陈俊, 王利健, 骆剑明, 等. 甲胎蛋白异质体在原发性肝癌中的诊断价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(11):2673-2674.
Chen J, Wang LJ, Luo JM, et al. Diagnosis value of alpha-fetoprotein heterogeneity in primary hepatic carcinoma[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 22(11):2673-2674.
- [3] 赵运胜, 王猛, 崔辰莹, 等. 评价8种血清标志物在原发性肝癌诊断中的临床价值[J]. 重庆医学, 2014, 43(2):214-216.
Zhao YS, Wang M, Cui CY, et al. Assessment of clinical values of 8 serum markers in diagnosis of primary liver cancer[J]. Chongqing Medical Journal, 2014, 43(2):214-216.
- [4] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作委员会, 中华医学会肝病学会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(3):259-269.
Chinese Society of Liver Cancer, Chinese Society of Clinical Oncology, Liver Cancer Group, Chinese Society of Hepatology. Experts consensus on standard diagnosis and treatment of primary liver cancer[J]. Chinese Clinical Oncology, 2009, 14(3):259-269.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 全国临床检验操作规程[M]. 东南大学出版社, 1991:87.
Chinese Ministry of Health. National clinical laboratory manipulating regulation[M]. Nanjing:Southeast University Press, 1991:87.
- [6] 张强. 原发性肝癌组织中HMGB1的表达及其与细胞侵袭力关系的研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2015, 18(6):455-458.
Zhang Q. Expression of HMGB1 in hepatocellular carcinoma and its relationship with cell invasive ability[J]. Chinese Journal of Current Advances in General Surgery, 2015, 18(6):455-458.
- [7] Dayton TL, Gocheva V, Miller KM, et al. Germline loss of PKM2 promotes metabolic distress and hepatocellular carcinoma[J]. Genes Dev, 2016, 30(9):1020-1033.
- [8] 冯众一, 高鹏, 谭文翔, 等. 原发性肝癌TACE介入治疗前后血清VEGF和bFGF水平变化及临床意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2015, 18(2):154-155.
Feng ZY, Gao P, Tan WX, et al. Changes in VEGF and bFGF before and after TACE treatment for primary cancer and their clinical significance[J]. Chinese Journal of Current Advances in General Surgery, 2015, 18(2):154-155.
- [9] 徐楠, 李旭. 原发性肝癌肿瘤标志物研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(4):396-399.
Xu N, Li X. Research progress of tumor markers for primary liver cancer[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2011, 46(4):396-399.
- [10] Shastri A, Msaouel P, Montagna C, et al. Primary Hepatic Small Cell Carcinoma: Two Case Reports, Molecular Characterization and Pooled Analysis of Known Clinical Data[J]. Anticancer Res, 2016, 36(1):271-277.
- [11] 贾保昌, 罗小玲, 梁嵘, 等. 联合检测血清GP73和AFP对原发性肝癌诊断价值的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(11):832-835.
Jia BC, Luo XL, Liang R, et al. Diagnostic value of serum GP73 and AFP detection in primary hepatic carcinoma[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2012, 19(11):832-835.
- [12] 秦继宝, 薄维波. 血清AFP、TK1、DKK1联合检测对原发性肝癌的诊断价值[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(7):545-547.
Qin XB, Bo WB. Combined detection of AFP, TK1 and DKK1 in diagnosis of primary hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2014, 32(7):545-547.
- [13] 孔祥亘, 韩绍磊, 郑昭敏, 等. 高尔基体蛋白73联合甲胎蛋白异质体在原发性肝癌诊断中的价值[J]. 山东大学学报:医学版, 2011, 49(4):110-114.
Kong XG, Han SL, Zheng SM, et al. Values of Golgi protein 73 and Alpha-fetoprotein-L3 in the diagnosis of primary hepatic carcinoma[J]. Journal of Shandong University: Health Sciences, 2011, 49(4):110-114.
- [14] 王丽丽, 王立群, 高歌. 原发性肝癌患者血清中Glypcian-3检测及与AFP联合试验的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(6):1054-1056.
Wang LL, Wang LQ, Gao G. Glypcian-3 in the detection of hepatocellular carcinoma and the diagnostic value of the Joint detection with AFP[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2011, 15(6):1054-1056.
- [15] Bröker ME, Ijzermans JN, Witjes CD, et al. The predictive value of Golgi protein 73 in differentiating benign from malignant liver tumors[J]. PLoS One, 2014, 9(7):e100187. doi: 10.1371/journal.pone.0100187.
- [16] 赵建忠, 李智山, 许东强, 等. 甲胎蛋白异质体3和高尔基体蛋白73检测在原发性肝癌诊断中的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(9):1522-1524.
Zhao JZ, Li ZS, Xu DQ, et al. To Evaluate the Capability of Serum Alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 in Diagnosing Primary Liver Cancer[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2011, 15(9):1522-1524.
- [17] Hann HW, Wang M, Hafner J, et al. Analysis of GP73 in patients with HCC as a function of anti-cancer treatment[J]. Cancer Biomark. 2010;7(6):269-273.
- [18] 赵运胜, 王猛, 李军良, 等. 血清高尔基体蛋白73、异常凝血酶原、磷脂酰乙醇蛋白聚糖-3和甲胎蛋白联合检测对原发性肝癌的早期诊断价值研究[J]. 中国全科医学, 2012, 15(32):3730-3733.
Zhao YS, Wang M, Li JL, et al. Clinical Significance of Serum GP73, DCP, GPC-3 and AFP Tests in Diagnosis of Primary Hepatic Carcinoma[J]. Chinese General Practice, 2012, 15(32):3730-3733.
- [19] Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, et al. Imaging Nuclear-Cytoplasmic Dynamics in Primary and Metastatic Colon Cancer in Nude Mice[J]. Anticancer Res, 2016, 36(5):2113-2117.
- [20] Abogresha NM, Greish SM, Abdelaziz EZ, et al. Remote effect of kidney ischemia-reperfusion injury on pancreas: role of oxidative



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.024
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.024
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(7):1080-1084.

· 简要论著 ·

肝细胞癌切除术后复发的 RFA 微创治疗

杨玉兵, 张海洋, 王建锋

(河南省南阳市中心医院 普通外科, 河南 南阳 473000)

摘要

目的: 探讨肝细胞癌切除术后复发患者采用射频消融术(RFA)治疗的临床效果。

方法: 选取2008—2012年收治的97例肝细胞癌切除术后复发患者作为观察对象,其中再次治疗采用射频消融术者58例(射频组)、选择采用无水酒精注射治疗者39例(无水酒精组),比较两组肿瘤复发治疗效果。

结果: 病灶 ≤ 3 cm和 >3 cm者,射频组的治疗次数均低于无水酒精组,差异有统计学意义($P<0.05$);病灶 ≤ 3 cm者,射频组灭活率为90.24%,无水酒精组为80.00%,组间比较无统计学差异($P>0.05$);病灶 >3 cm者,射频组病灶灭活率明显高于无水酒精组(82.61% vs. 50.00%, $P<0.05$)。射频组并发症率低于无水酒精组但无统计学差异(31.03% vs. 41.03%, $P>0.05$);射频组末次治疗后的1、2、3年存活率分别为84.48%、62.07%、43.01%均明显高于无水酒精组的64.10%、42.03%、20.51%,差异均有统计学意义($P<0.05$);射频组总生存中位时间明显长于无水酒精组(18个月 vs. 13个月, Log-rank $\chi^2=5.566$, $P=0.018$)。

结论: 肝细胞癌切除术后复发采用射频消融术治疗临床疗效良好。

关键词

癌, 肝细胞; 复发; 射频消融术

中图分类号: R735.7

肝细胞癌的发生率较高,在各种恶性肿瘤中居于前列,手术是目前临床治疗肝细胞癌的首选

方法,但术后复发率高的问题一直未能得到较好的解决^[1]。有研究^[2]发现,原发性肝细胞癌的术后复发率高达50%以上。一旦发生复发,将缩短患者生存时间,提示患者预后不佳,因此术后复发是影响肝细胞癌患者预后的重要信号,需要立即再次对病灶进行处理,但此时大多数患者的肝功能欠佳,机体各器官、各系统的功能也处于相对低

收稿日期: 2016-04-12; 修订日期: 2016-06-18。

作者简介: 杨玉兵,河南省南阳市中心医院主治医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究。

通信作者: 杨玉兵, Email: yangyubing1001@163.com

stress and mitochondrial apoptosis[J]. Arch Med Sci, 2016, 12(2):252-262.

[21] 黄学文, 赵琪, 陈道桢, 等. 肝癌患者血清及组织中ROS、T-SOD、MnSOD水平的测定[J]. 检验医学, 2004, 19(5):399-402.
Huang XW, Zhao Q, Chen DZ, et al. Determination of reactive oxygen species, total superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in serum and tissue of primary hepatocellular carcinoma patients[J]. Laboratory Medicine, 2004, 19(5):399-402.

[22] 杨丽丽, 王培胜, 滕洪明, 等. 褐藻多糖硫酸酯诱导肝癌细胞凋亡中氧化应激作用[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(4):437-441.
Yang LL, Wang PS, Teng HM, et al. Oxidative Stress in Apoptosis of

Human Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cells Induced by Fucoidan[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2013, 35(4):437-441.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 陆兴热, 骆葱, 陈凤羽, 等. AFP、GP73、SOD联合检测在原发性肝癌患者诊断中应用价值[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(7):1076-1080. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.023

Cite this article as: LU XR, Luo C, Chen FY, et al. The applicable value of combined detection of AFP, GP73 and SOD in diagnosis of primary liver cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(7):1076-1080. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.023