

• 论 著 •

HPV 感染及高级别 CIN 患者阴道微生态研究*

李 晴¹, 汪艳珠¹, 李欢梓², 刘宸好³, 黄卓敏^{1Δ}

(广东省深圳市妇幼保健院:1. 宫颈疾病诊治中心;2. 皮肤科 518048;3. 美国爱默里大学, 佐治亚州亚特兰大, 美国 30322)

摘要:目的 分析人乳头瘤病毒 16、18(HPV16、18)宫颈感染及高级别宫颈上皮内瘤变(CIN)患者阴道微生态特征。方法 以 3 例湿疣样变或 CIN1 级 HPV16 和/或 18 感染患者为低级别 CIN 组,以 5 例高级别 CIN 病变 HPV16 和/或 18 感染患者为高级别 CIN 组,以 3 例 HPV 阴性阴道炎患者为对照组,采用 16S rRNA 基因扩增技术分析各研究组患者阴道微生物菌群组成,采用分层聚类法分析并比较各研究组阴道微生物菌群分布特征。结果 高级别 CIN 组阴道微生物细菌种类多样性及复杂性较低级别 CIN 组、对照组更为明显;从对照组、低级别 CIN 组至高级别 CIN 组,卷曲乳杆菌和穹隆乳杆菌丰度呈下降趋势,嗜性乳杆菌丰度呈增加趋势;定植菌犬布鲁氏菌丰度呈下降趋势,致病菌戴阿李斯特琥珀酸纤毛杆菌、阴道加德纳菌和短普雷沃菌丰度呈上升趋势。结论 高级别 CIN 患者阴道菌种结构复杂性、多样性明显。阴道乳杆菌种类和丰度对阴道健康起重要作用,嗜性乳杆菌则具有相反作用。犬布鲁氏菌、戴阿李斯特琥珀酸纤毛杆菌、阴道加德纳菌和短普雷沃菌长期存在于阴道,与 HPV 持续感染、进展至高级别 CIN 病变密切相关。

关键词:16S rRNA; 基因测序; 人乳头瘤病毒; 阴道; 微生态

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1457-04

Vaginal microbiome characterization in women with HPV16/18 infections and high-grade CIN*

LI Qing¹, WANG Yanzhu¹, LI Huanzi², LIU Chenyu³, HUANG Zhuomin^{1Δ}

(1. Center of Diagnosis and Treatment for Cervical Lesion; 2. Department of Dermatology, Shenzhen

Maternity & Child Healthcare Hospital, Shenzhen, Guangdong 518048, China; 3. Emory University, Atlanta, GA 30322, USA)

Abstract: Objective To investigate the vaginal microbiome characterization in women with human papillomavirus(HPV)16 and 18 infection and high-grade cervical intraepithelial neoplasia(CIN). **Methods** Three groups were set, including control group(without HPV infection and with colpitis), low-grade CIN group(with HPV 16 or/and 18 infection), and high-grade CIN group(with HPV 16 or/and 18 infection). Virginal microbial composition was determined by using 16S rRNA amplication sequencing and hierarchical clustering analysis among three groups was applied. Rank sum test was used to determine statistical significance. **Results** Diversity and complexity of bacteria was significantly elevated in high-grade group. Compared with the control, the growth of *Lactobacillus crispatus*(*L. crispatus*) and *Lactobacillus casei*(*L. casei*) was significantly decreased, while *Lactobacillus iners*(*L. iners*) was significantly increased in low-grade CIN group and high-grade CIN group, and both were proportionally correlated to the grade of the disease. *Brucella canis*(*B. canis*), as colonized bacteria, was significantly decreased in both low-grade and high-grade CIN groups, and the changes were proportional to the grade of disease. The growth of *Dialistersuccinatiphilus*(*D. succinatiphilus*), *Gardnerella vaginalis*(*G. vaginalis*) and *Prevotellabivia*(*P. bivia*) were significantly elevated and proportional to the grade of disease. **Conclusion** The diversity and complexity of virginal microbial composition could be significantly expanded in women with HPV infection and high-grade CIN. In contrast to the important role of lactobacillus in virginal health, *L. iners* could be pathogenic. The colonization of *B. canis*, *D. succinatiphilus*, *G. vaginalis* and *P. bivia* might be highly correlated with HPV chronic infection and further development of CIN.

Key words:16S rRNA; gene sequencing; human papillomavirus; virginal; microbial ecology

人乳头瘤病毒(HPV),特别是 HPV16/18 型持续感染与宫颈高级别病变及宫颈癌的发生密切相关。影响 HPV 持续感染并进展至宫颈高级别病变的因素尚未完全明确。阴道微生物在预防病原体感染方面有重要作用^[1]。阴道乳杆菌通过分泌乳酸、细菌素、拮抗性细菌素样物质和生物表面活性剂形成针对病原体的入侵屏障,以破坏生物膜的方式发挥广谱杀菌作用^[2]。高危性 HPV 感染不是宫颈上皮内瘤变(CIN)发生的充分条件,但却是必要条件。BV 宫颈 HPV 持续感染和细菌性阴道病(BV)相关性阴道微生物“多细菌性失调”相关^[3-7]。

BV 是以阴道中乳杆菌属枯竭、厌氧微生物过度生长、pH 值升高为特征的阴道微生态失调性疾病。BV 可抑制 HPV 的清除,因此与宫颈 HPV 感染密切相关^[3-5]。阴道微生态和 HPV 感染有一定的相关性,但与 CIN 病程进展的关系尚未明确。随着细菌 16S rRNA Sanger 测序、荧光定量聚合酶链反应(qPCR)和新一代高通量测序等技术的应用,阴道微生物研究已进入测序和聚类分析阶段^[6-13]。本研究采用 16S rRNA 基因分析,评估了阴道微生物菌群组成与 HPV 持续感染、宫颈病变的关系。现将研究结果报道如下。

* 基金项目:广东省深圳市科技创新委员会创新计划基础研究项目[深科技创新(2015)170 号]。

作者简介:李晴,女,副主任医师,主要从事子宫颈癌筛查及临床诊疗研究。 Δ 通信作者,E-mail:pyamyhuang@163.com。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2016 年 5—9 月于深圳市妇幼保健院诊治的 HPV16、HPV18 单独或同时阳性女性患者 8 例, 年龄 23~46 岁; 其中, 组织病理学检查结果为湿疣样变或 CIN1 级 3 例(低级别 CIN 组), 高级别 CIN 病变 5 例(高级别 CIN 组)。同期于深圳市妇幼保健院诊治的 HPV16、HPV18 阴性阴道炎患者 3 例纳入对照组。

1.2 方法

1.2.1 标本收集及临床资料采集 以生理盐水 20 mL 灌洗阴道, 保留 2~3 min, 取出后放入无菌标本瓶, 封口后立即于 -20 °C 冷冻保存, 1 周后 -80 °C 冷冻保存。标本采集前 3 天, 研究对象禁止性生活、阴道冲洗放药及任何阴道诊疗操作。采集患者临床资料, 包括 HPV 分型检测结果。

1.2.2 标本检测 标本检测由华大基因检测中心完成。首先提取 DNA, 确定 DNA 提取质量合格后进行 PCR 扩增, 回收目的扩增片段, 用 T4 DNA 聚合酶、Klenow DNA 聚合酶和 T4 多聚核苷酸激酶(PNK)将打断形成的黏性末端修复成平末端, 3'端加入 A 碱基, 使 DNA 片段与 3'端带有 T 碱基的特殊接头连接; 或设计、合成含有测序接头的双索引序列(Index)融合引物, 以基因组 DNA 为模板进行扩增, 磁珠法筛选目的扩增片段, 建立合格的 DNA 文库, 进行 DNA 簇(cluster)制备和测序。

1.2.3 生物信息学分析 对测序结果进行生物信息学分析。首先对数据进行过滤, 滤除低质量序列标签(reads), 保留高质量 reads, 通过 reads 间的重叠区(Overlap)关系, 将 reads 拼接成新的标签(Tags); 在给定的相似度下, 将 Tags 聚成生物分类单位(OTU), 与数据库比对, 并对 OTU 进行物种注释; 基于 OTU 和物种注释结果, 分析标本物种复杂度及组间物种差异。OTU 聚类、物种注释等分析过程如下: (1) 采用 USEARCH (版本: 7.0.1090) 软件, 在 UPARSE 为 97% 相似度条件下进行聚类, 得到 OTU 代表序列^[9]。(2) 利用 UCHIME (版本: 4.2.40) 软件, 确定 PCR 扩增产生的嵌合体, 并从 OTU 代表序列中去除^[10]。(3) 采用 usearch_global 方法, 将所有 Tags 比对回 OTU 代表序列, 得到在每个 OTU 中的丰度信息。根据每例标本的 OTU 丰度计算其相对丰度, 利用相对丰度信息进行 OTU 主成分分析(PCA 分析)。采用 R 软件(版本: 3.1.1)中的 ade4 软件包进行统计与作图。样品距离越近, 表示样品组成越相似。不同处理或不同环境条件下的样品可能表现出分散或聚集分布特征, 从而可判断样品组成是否具有相似性。在 97% 相似度条件下得到每例标本的 OTU 数量, 以相似度分析图展示不同标本共有和各自特有 OTU 数量, 进而反映标本间的重叠情况。结合所代表的物种, 明确不同环境中的核心微生物。根据每例标本的 OTU 丰度文件, 计算各标本或各组别具有的 OTU。采用 R 软件(版本 3.1.1)中的 VennDiagram 包绘制相似度分析图(OTU Venn 图), 并给出各标本或各组间共有与特有 OTU ID 文件。采用 RDP classifier(版本: 2.2)软件对 OTU 代表序列进行物种注释, 置信度阈值设为 0.8。(4) 在 16S(包括细菌与古菌)、RDP/Release14(20151026)数据库进行比对, 过滤注释结果, 去除没有注释结果的 OTU 及注释结果不属于分析项目中的物种。(5) 采用 R 软件(版本 3.1.1)对差异进行秩和检验分析, 如果组数为 2, 采用两样品比较的 Wilcoxon Rank-Sum 检验(R 软件中的 wilcox 检验); 如果组数大于 2, 采用多样品比较的 Kruskal-Wallis 检验(R 软件中的 kruskal 检验)。

2 结果

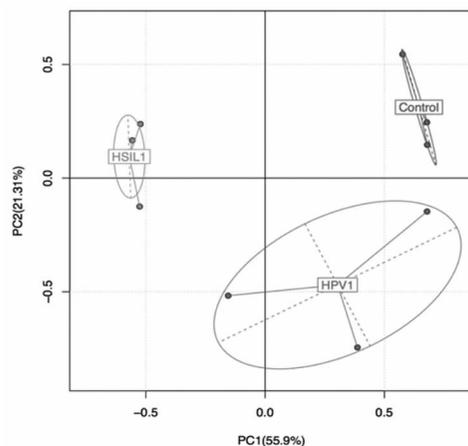
2.1 OTU 丰度分析 拼接的 Tags 经优化后, 在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU, 统计每例标本在每个 OTU 中的丰度信息, 初步明确标本的物种丰富程度。11 例标本共产生 180 个 OTU, OTU 丰度满足归类分析要求。各标本 OTU 丰度信息见表 1。

表 1 各标本 HPV 分型及 OTU 丰度信息

标本	HPV16	HPV18	Tags 数量(n)	OTU 数量(n)
对照组 1	-	-	20 120	59
对照组 2	-	-	35 476	40
对照组 3	-	-	34 969	41
低级别 CIN 组 1	+	-	34 918	88
低级别 CIN 组 2	+	-	35 370	27
低级别 CIN 组 3	+	+	31 483	26
高级别 CIN 组 1	+	-	35 018	49
高级别 CIN 组 2	+	-	34 705	47
高级别 CIN 组 3	-	+	34 735	22
高级别 CIN 组 4	+	-	35 263	48
高级别 CIN 组 5	+	-	35 452	34

注: Tags 数量指能和 OTU 代表序列对上, 并且具有注释结果的 Tags 总数。

2.2 OTU PCA 分析 PCA 分析结果显示, 对照组、高级别 CIN 组、低级别 CIN 组标本有明显的相似度, 可进行组间差异性分析, 见图 1。

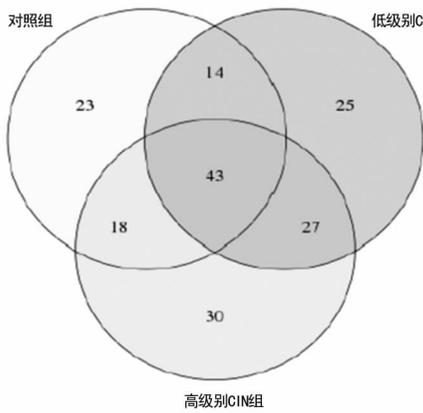


注: 横坐标表示第一主成分, 括号中的百分比表示第一主成分对样品差异的贡献值; 纵坐标表示第二主成分, 括号中的百分比表示第二主成分对样品差异的贡献值。图中各点分别表示对应标本。不同颜色代表标本属于不同分组。

图 1 基于 OTU 丰度的 PCA 分析(按 Description 分组)

2.3 OTU Venn 图分析 OTU Venn 图见图 2。对照组与低级别 CIN 组有 14 个相同的 OTU, 低级别 CIN 组与高级别 CIN 组有 27 个相同的 OTU, 对照组与高级别 CIN 组有 18 个相同的 OTU, 3 组共有 43 个相同的 OTU。对图中显示的每组特有且数量较多的 13 种 OTU 进行聚类分析。对照组特有 OTU 主要分布在拟杆菌门、放线菌门和变形杆菌门; 低级别 CIN 组特有 OTU 主要分布在厚壁杆菌门和放线菌门; 高级别 CIN 组特有 OTU 主要分在厚壁菌门、放线菌门和变形杆菌门。高级别 CIN 组发现软壁菌门和绿弯菌门菌群, 对照组和低级别 CIN 组未发现软壁菌门和绿弯菌门菌群。3 组标本特

有 OTU 聚类分析结果见表 2。



注:不同颜色图形代表不同标本或不同组别,2 个不同颜色图形之间交叠部分的数字为 2 个标本或 2 个组别共有的 OTU 数量,多个颜色图形之间交叠部分的数字为多个标本或多个组别共有的 OTU 数量。

图 2 各组标本共有和特有 OTU 分析

2.4 阴道乳杆菌丰度水平和变化趋势 共发现常见的 6 种阴道乳杆菌,从对照组、低级别 CIN 组,至高级别 CIN 组,卷曲乳杆菌和穹隆乳杆菌丰度呈下降趋势,其中高级别 CIN 组与对照组穹隆乳杆菌丰度比较差异有统计学意义($P < 0.05$);惰性乳杆菌丰度呈增加趋势,高级别 CIN 组与对照组惰性乳杆菌丰度比较差异有统计学意义($P < 0.05$);口乳杆菌、伞状乳杆菌、戊糖乳杆菌丰度组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3 和图 3。

2.5 其他菌种丰度水平和变化趋势 共发现 4 种细菌丰度水平变化明显。从对照组、低级别 CIN 组,至高级别 CIN 组,犬布鲁士菌丰度呈下降趋势($P < 0.05$);戴阿李斯特琥珀酸纤毛杆菌、阴道加德纳菌和短普雷沃菌在低级别 CIN 组的丰度高于对照组($P < 0.05$),在高级别 CIN 组的丰度低于低级别 CIN 组($P < 0.05$),见表 4。

表 2 3 组标本特有 OTU 聚类分析

门	对照组	低级别 CIN 组	高级别 CIN 组
拟杆菌门	16	0	0
放线菌门	4	0	0
变形杆菌门	6	0	0
厚壁杆菌门	0	113	0
厚壁杆菌门	0	99	0
厚壁杆菌门	0	12	0
放线菌门	0	6	0
厚壁杆菌门	0	0	62
放线菌门	0	0	6
变形杆菌门	0	0	4
变形杆菌门	0	0	4
软壁菌门	0	0	3
绿弯菌门	0	0	2

注:数字表示此门菌种对应的 OTU 被检测到的次数,即此门菌种的丰度。

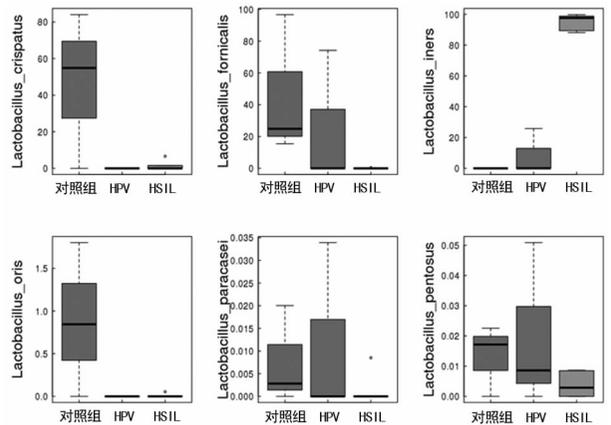


图 3 6 种阴道乳杆菌丰度趋势变化图

表 3 高级别 CIN 组与对照组阴道乳杆菌丰度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	卷曲乳杆菌	穹隆乳杆菌	惰性乳杆菌	口乳杆菌	伞状乳杆菌	戊糖乳杆菌
对照组	46.299±42.660	45.681±44.416	0.015±0.013	0.882±0.901	0.008±0.011	0.013±0.012
高级别 CIN 组	1.644±2.870	0.097±0.192	94.724±5.534	0.011±0.024	0.001±0.004	0.004±0.004
P	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 4 6 种常见菌种丰度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	阴道奇异菌	犬布鲁氏菌	戴阿李斯特琥珀酸纤毛杆菌	阴道加德纳菌	短普雷沃菌	解糖腺普雷沃菌
对照组	0.458±0.791	0.009±0.004	0.007±0.006	4.073±6.041	0.123±0.131	0.000±0.000
低级别 CIN 组	4.312±7.469	0.002±0.003	0.448±0.648	48.328±43.597	0.592±0.343	2.106±3.617
高级别 CIN 组	0.007±0.014	0.000±0.000	0.005±0.009	1.720±3.742	0.010±0.013	0.005±0.010
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

3 结 论

3.1 维护和影响健康的阴道乳杆菌种类和作用是不同的 随着分子技术的发展,对阴道微生态的认识日益深入。采用标准培养基培养法可从阴道标本中鉴定菌种 400 余种,只占 16S rRNA 克隆文库分析法获得的菌种数量的 13%~34%。高通量测序结果显示,阴道微生态以乳杆菌主导,其种类和数量(丰度)对阴道健康起重要作用,是阴道健康的生物标志物。Borgdor 等^[14]认为,阴道微生物菌群以卷曲乳杆菌为主的女性,人

类免疫缺陷病毒(HIV)、II 型单纯疱疹病毒(HSV-2)和 HPV 感染率较低。Mitchell 等^[15]研究证实阴道微生物菌群以卷曲乳杆菌为主,可使 HIV-1 RNA 脱落风险降低 35%。

本研究结果显示,多数阴道乳杆菌有助于保护阴道健康,此类阴道乳杆菌减少提示阴道微生态紊乱,可导致某些定殖菌或条件致病菌感染。惰性乳杆菌的作用则与具有保护作用的阴道乳杆菌相反。健康女性阴道标本惰性乳杆菌呈低丰度,高级别 CIN 患者阴道标本惰性乳杆菌丰度明显增加,说明惰性

乳杆菌增多与宫颈高级别病变的发生有关。

卷曲乳杆菌通过免疫调节机制发挥阴道健康保护作用。体外实验证实,卷曲乳杆菌通过调节上皮细胞 Toll 样受体 (TLR) 2/4、白细胞介素 8(IL-8) 和人 β -防御素 2, 3 表达水平,抑制白色念珠菌增殖^[6]。因此,卷曲乳杆菌是评价阴道微生态健康与否的重要指标。

3.2 高级别 CIN 患者阴道菌群多样性明显 本研究结果显示,健康女性阴道标本检出的拟杆菌、放线菌和变形杆菌可被认为是阴道定殖菌;在低、高级别 CIN 患者阴道标本中检出丰度较高的厚壁杆菌,则与 HPV 感染及宫颈病变密切相关;高级别 CIN 患者阴道标本除检出放线菌、变形杆菌外,还发现其特有的软壁菌和绿弯菌,提示高级别 CIN 患者阴道菌群较健康者及低级别 CIN 患者更加复杂多样,并具有独特性。

3.3 可能与 HPV 感染和高级别 CIN 病变有关的 4 种阴道菌种 本研究发现,低、高级别 CIN 患者阴道标本存在丰度升高,且具有一致性的 4 种细菌,即阴道奇异菌、戴阿李斯特琥珀酸纤毛杆菌、阴道加德纳菌和短普雷沃菌,除阴道奇异菌外,其他 3 种菌种的丰度与健康者比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此,戴阿李斯特琥珀酸纤毛杆菌、阴道加德纳菌和短普雷沃菌长期存在有可能导致 HPV 持续感染或/和宫颈高级别 CIN 病变的发生。

高通量测序倾向于将阴道菌群分为保护阴道健康的菌群组和有害于阴道健康的菌群组,但实际上二者可以相互转化,很难截然分开^[17]。有害于阴道健康的菌群按丰度由高到低排列如下:双歧杆菌目(加德纳杆菌)、梭菌目(链球菌属、肠球菌属、气球菌属)、厚壁菌目(葡萄球菌),以及定殖菌,如普雷沃菌、嗜酸菌、厌氧球菌、韦荣氏球菌等。

采用高通量测序技术绘制阴道微生物群落图谱,将不同菌群作为阴道健康,或感染、病变等不良后果的预测指标,尚处于起步阶段,对结果的解释需慎之又慎。随着分子技术的应用日益广泛,阴道乳杆菌将成为判断阴道健康的重要生物标志物,是用于 BV 诊断 Nugent 和 Amsel 评分方法的重要补充,并有助于合理制定治疗方案。若证实阴道微生态中的某种细菌对 HPV 感染或清除有关键作用,即可通过合理选择抗菌药物和综合护理,阻断 HPV 持续感染和向宫颈癌前病变的进展。

参考文献

- [1] Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease[J]. *Am J Med Sci*, 2012, 343(1):2-9.
- [2] McMillan A, Dell M, Zellar MP, et al. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli[J]. *Colloids Surf B Biointer*, 2011, 86(1):58-64.
- [3] Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection; a meta-analysis[J/OL]. *BMC Infect Dis*, 2011-01-11 [2016-12-27], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21223574>.
- [4] King CC, Jamieson DJ, Wiener J, et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus[J/OL]. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2011-08-16 [2016-12-27], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21869857>.
- [5] Guo YL, You K, Qiao J, et al. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection[J]. *Internat J of STD AIDS*, 2012, 23(8):581-584.

- [6] Gao W, Weng J, Gao Y, et al. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection; a cross-sectional study[J/OL]. *BMC Infect Dis*, 2013-06-10 [2016-12-27], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/23758857>.
- [7] Lee JE, Lee S, Lee H, et al. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort[J/OL]. *PLoS One*, 2013-05-22 [2016-12-27], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/23717441>.
- [8] Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, et al. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection[J/OL]. *BMC Infect Dis*, 2012-02-08 [2016-12-27], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/22316377>.
- [9] Edgar, RC. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10):996-998.
- [10] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16):2194-2200.
- [11] Jaspers V, Menten J, Smet H, et al. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests[J/OL]. *BMC Microbiol*, 2012-05-30 [2016-12-27], <https://bmc-microbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-83>.
- [12] Forney LJ, Gajer P, Williams CJ, et al. Comparison of self-collected and physician-collected vaginal swabs for microbiome analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(5):1741-1748.
- [13] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women[J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2011, 108(Suppl1):S4680-4687.
- [14] BorgdorH, Tsivtsivadze E, Verhelst R, et al. Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women[J]. *Isme J*, 2014, 8(9):1781-1793.
- [15] Mitchell C, Balkus JE, Fredricks D, et al. Interaction between lactobacilli, bacterial vaginosis-associated bacteria, and HIV Type 1 RNA and DNA genital shedding in U. S. and Kenyan women[J]. *Aids Res Hum Retroviruses*, 2013, 29(1):13-19.
- [16] Rizzo A, Losacco A, Carratelli CR. Lactobacillus crispatus modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human beta-defensins 2 and 3[J]. *Immunol Letters*, 2013, 156(1/2):102-105.
- [17] van de Wijgert JH, BorgdorH, Verhelst R, et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization[J/OL]. *PloS One*, 2014-08-22 [2016-12-27], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/25148517>.