

· 实验研究论著 ·

靶向调控缝隙连接蛋白 43 对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

谢锡洪¹ 张振伟² 林泽金³ 林利忠³

【摘要】 目的 探讨缝隙连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的影响。**方法** 将 Cx43 目的基因克隆后与慢病毒载体 pHBLV-CMVIE-Puro 进行连接,重组载体与包装载体共同转染 293T 细胞后包装生产病毒。获取小鼠 BMSCs,流式细胞术检测细胞表面标志。将慢病毒载体 pHBLV-Cx43-Puro(Cx43 组)、pHBLV-CMVIE-Puro(空载体组)转染 BMSCs,同时设立空白对照组;Western blot 和 qRT-PCR 检测三组细胞中 Cx43 的表达。成骨诱导培养基诱导三组细胞成骨分化,qRT-PCR 检测成骨相关基因 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)、锌指结构转录因子(Osterix/Sp7)、转录活化因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)、骨唾蛋白(bone sialoprotein, BSP)的表达;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒定量分析三组 BMSCs 的成骨分化能力。**结果** 流式细胞术检查示 BMSCs 中 CD29、CD44、CD90 呈阳性表达,而 CD14 和 CD34 呈阴性表达,pHBLV-Cx43-Puro 转染 BMSCs 后 Cx43 蛋白和 mRNA 表达显著增加。成骨诱导后 Cx43 组成骨相关基因 Runx2、Osterix/Sp7、ATF4 和 BSP 的 mRNA 表达显著高于其他两组($P < 0.05$),ALP 活性明显高于其他两组($P < 0.05$)。**结论** Cx43 高表达能够显著促进 BMSCs 向成骨细胞分化,其可能成为骨损伤修复的有效靶点。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;缝隙连接蛋白 43;成骨分化;慢病毒

Effect of Connexin 43 on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. XIE Xi-hong¹, ZHANG Zhen-wei², LIN Ze-jin³, LIN Li-zhong³. ¹Guangzhou Medical University, Guangzhou 511400, China; ²Department of Hand Surgery, Shenzhen Shajing People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Shenzhen 518104, China; ³Department of Traumatic Orthopaedics, Shenzhen Longhua District Center Hospital, Shenzhen 518110, China

Corresponding author: ZHANG Zhen-wei, E-mail: zhangzw666@yeah.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Connexin 43 (Cx43) on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** The Cx43 gene was cloned and connected to the lentiviral expression vector pHBLV-CMVIE-Puro. The recombinant lentiviral vectors and packaging plasmids were mixed and co-transfected into 293T cells for packaging and producing virus. BMSCs were isolated from cultured mice. Flow cytometry was used to identify the surface markers. BMSCs were transfected with the lentiviral vector pHBLV-Cx43-Puro (Cx43 group) and pHBLV-CMVIE-Puro (empty body group), and a blank control group was established. Cx43 mRNA and protein were detected by qRT-PCR and Western blotting in these groups. The expression of osteoblast specific genes in BMSCs, such as runt-related transcription factor 2 (Runx2), Osterix/Sp7, activating transcription factor (ATF4) and bone sialoprotein (BSP) was detected by qRT-PCR after the osteoinductive culture. The expression of ALP enzyme activity was determined by ALP activity assay. **Results** Flow cytometry showed that BMSCs were positive for CD29, CD44, CD90, and negative for CD14, CD34. The Cx43 mRNA and protein expression of BMSCs transfected with pHBLV-Cx43-Puro was significantly higher than other two groups. The expression levels of osteogenic-related genes (Runx2, Osterix/Sp7, ATF4, BSP) and ALP activity in Cx43 lentiviral transfected BMSCs after induction were significantly higher than other two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The osteoblastic differentiation of BMSCs can be

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2020.02.011

基金项目: 龙华区科技计划医疗卫生项目(2030228)

作者单位: 1. 广州医科大学, 广州 511400; 2. 广州医科大学附属深圳沙井人民医院手外科, 广东深圳 518104; 3. 深圳市龙华区中心医院创伤骨科, 广东深圳 518110

通信作者: 张振伟, E-mail: zhangzw666@yeah.com

remarkably promoted by Cx43 high expression. Cx43 may be an effective intervention target for the repair of bone injury.

【Key words】 Bone marrow mesenchymal stem cells; Connexin 43; Osteogenic differentiation; Lentiviral

骨外科常常面临由外伤、肿瘤等原因引起的骨缺损问题,骨缺失修复方法成为骨外科关注的重点问题之一。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓中一类具有自我更新和多项分化能力的成骨干细胞,具有多向分化潜能,在不同诱导环境下能够分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等,具有易于获得、增殖能力强、易于体外培养和扩增等特点,因而可作为理想的骨组织工程种子细胞^[1]。一系列的临床试验已经证实BMSCs能够促进体内新骨的形成^[2,3]。因而,如何提高BMSCs成骨分化潜能以及体内移植后骨形成能力,成为骨组织工程应用研究中亟需解决的关键问题。研究发现通过调控一些关键信号分子能够使BMSCs的增殖和分化能力大幅提升^[4]。

缝隙连接(gap junction, GJ)是相邻两个细胞间形成的跨膜通道,其构成的细胞间隙连接通讯能够调节细胞间物质和信号的交换,在细胞的生长发育、分化、免疫应答等各种生理过程中发挥了至关重要的作用^[5]。缝隙连接蛋白(connexon, Cx)是GJ的基本结构和功能蛋白,6个连接蛋白亚基围绕中央孔在相邻细胞膜上排列形成一个六聚体的跨膜通道,称为连接子(Connexon),当两个相邻细胞由连接子对接后形成缝隙连接。目前在哺乳动物体内发现有20多种连接蛋白,其中Cx43数量最为丰富、分布最为广泛,在细胞的物质交换以及电信号的传达过程中发挥了重要作用^[6]。目前关于Cx43在人类肌肉骨骼系统中的生物学功能的研究相对较少,有研究显示Cx43在成骨分化和骨髓塑型中起到重要作用^[7-10],但Cx43对BMSCs定向、增殖和分化等行为的调控机制有待进一步研究^[8]。

材料与方法

一、实验动物和试剂

C57BL/6小鼠购于广东省医学实验动物中心;293T细胞购于中国科学院细胞库;DMEF/F12培养基购于美国Gibco公司;胰蛋白酶和胎牛血清购于杭州四季青公司;间充质干细胞成骨诱导分化培养基购于美国Cyagen公司;Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司;胶回收试剂盒、逆转录试剂盒、qRT-PCR试剂盒、质粒提取试剂盒购于大连TaKaRa

公司;Western blot试剂盒、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒购于上海碧云天公司;PTA2载体购自日本TOYOBO公司;T4 DNA连接酶购于加拿大Fermentas公司;内切酶、普通Taq酶购于天根生化科技公司;嘌呤霉素(puromycin)、聚凝胺(polybrene)、BCA蛋白检测试剂盒购于美国Sigma公司;慢病毒载体pHBLV-CMVIE-Puro购于上海汉恒生物公司;CD29-FITC、CD90-FITC、CD34-FITC、CD44-FITC、CD14-FITC流式细胞抗体、大鼠Cx43单克隆抗体购于美国BD Pharmingen公司。

二、Cx43慢病毒载体的构建

GenBank数据库中查找小鼠Cx43基因序列,设计引物,在引物中引入酶切位点EcoRI和Xba I,上游引物:5'-CGGAATTCATGGGTGACTGGAGCG-3',下游引物:5'-GCTCTAGAAATCTCCAGGTCATCAGGC-3',由上海生工生物技术有限公司合成。以Cx43的cDNA为模板进行PCR扩增,PCR扩增目的基因的反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸3 min,共30个循环,72℃延伸7 min,回收后与克隆载体PTA2连接获得重组载体质粒PTA2-Cx43。将PTA2-Cx43载体和慢病毒表达载体pHBLV-CMVIE-Puro分别用内切酶EcoRI、Xba I进行酶切,产物经琼脂糖凝胶电泳,使用胶回收试剂盒回收目的基因片段和目的载体,然后将Cx43目的片段与线性化pHBLV-CMVIE-Puro载体进行连接,将合成的新载体命名为pHBLV-Cx43-Puro。

三、慢病毒包装及滴度测定

用含有10%胎牛血清的DMEM培养基培养293T细胞,当细胞密度在80%~90%时即可进行转染。用质粒提取试剂盒大量提制慢病毒质粒pHBLV-Cx43-Puro和辅助包装载体PSPAX2、PMD2G。采用Lipofectamine 2000转染试剂将慢病毒质粒和辅助包装载体共同转染293T细胞,转染48 h和72 h后收集病毒上清液,经过滤器过滤后离心浓缩病毒。采用稀释计数法将LV-Cx43进行稀释,稀释后的病毒加入293T细胞,24 h后用含有Puromycin(2 μg/ml)的培养基筛选,显微镜下计算病毒滴度。滴度(TU/ml) = 细胞数×百分比×1(multiplicity of infection)×病毒稀释倍数×10³。

四、BMSCs 的分离及培养、鉴定

将 C57BL/6 小鼠(4~6 周)颈椎脱臼处死,用 75% 的酒精浸泡 5 min 消毒,无菌条件下取出股骨、胫骨,剔除肌肉和筋膜组织,将骨骺端剪断后置于 DMEM/F12 培养基(不含血清)中,在一头插入 0.45 mm 规格的注射器,用 DMEM/F12 培养基反复冲洗骨髓腔, PBS 洗涤后离心,用 200 目不锈钢筛网过筛,将获得的细胞 1 500 r/min 离心 5 min;弃上清,用完全培养基(含 10% 胎牛血清、1% 的青链霉素的 DMEM/F12 培养基)将细胞重悬。把骨头剪成 1~3 mm³ 的小片,添加 1 mg/ml 胶原酶后在震荡培养箱中 37 °C 孵化 1~2 h。将分离的细胞接种于培养皿中,同时将消化好的小骨同时种入,置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中静置培养,待细胞融合至 80%~90% 时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,按 1:2 进行传代培养。取第三代细胞,消化后用 PBS 洗涤,加入 FITC 标记的 CD29、CD44、CD90、CD14、CD34,用流式细胞仪检测细胞表面分子表达水平。

五、Cx43 慢病毒转染 BMSCs

取生长状态良好的第二代细胞,消化后接种于 6 孔板(1×10⁵/孔)中,24 h 后更换用新鲜培养基,polybrene 浓度为 6 μg/ml。分别在实验组和对照组加入 10 μl 重组慢病毒载体(滴度为 1×10⁸ TU/ml) pHBLV-CX43-Puro(Cx43 组)和空载体 pHBLV-CMIE-Puro(空载体组),选用未转染的细胞作为空白对照。感染 24 h 后更换为完全培养基,继续培养 48 h 后更换含 puromycin(2 μg/ml)的完全培养基进行筛选,72 h 后消化细胞进行后续试验。

六、qRT-PCR 检测 Cx43 mRNA 的表达

用 RNA 提取试剂盒分别提取空白对照组(BMSCs 细胞)、Cx43 组、空载体组 BMSCs 细胞中的 RNA,鉴定后的 RNA 通过逆转录获得 cDNA,以逆转录好的 cDNA 作为模板,以 GAPDH 为内参基因检测 Cx43 mRNA 的表达,Cx43 mRNA 的表达情况用 2^{-ΔΔCt} 值表示。

七、Western blot 检测 Cx43 蛋白表达

收集细胞,按照总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,蛋白定量后,取三组细胞裂解液,上样 SDS-PAGE 凝胶电泳,继而转膜,使用 5% 脱脂奶粉封闭,1 h 后加入相应一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后加入辣根过氧化氢酶偶联的二抗,孵育 2 h 后 TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 发光剂显色 3 min 后压片显影检测 Cx43 表达,用 GAPDH 作为内参,采用灰度分析比较各条带。

八、成骨相关基因以及 ALP 活性检测

将各组 BMSCs 细胞以 2×10⁵ 个/ml 的密度分别接种于 6 孔培养板中,培养至贴壁细胞达 60% 后弃原液,加入成骨诱导液进行诱导分化培养,每 2 d 换液 1 次。成骨诱导分化 7 d 后按照试剂盒说明书进行 ALP 活性检测,ALP 活性(U/g prot)=[(测定管吸光度值/标准管吸光度值)×标准管对硝基酚量]/总蛋白克数。成骨诱导分化 7 d、14 d 后提取各组转染 BMSCs 细胞 RNA,逆转录后进行 qRT-PCR 检测。按照 qRT-PCR 试剂盒说明书反应体系条件进行实验,设计 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)、锌指结构转录因子(Osterix/Sp7)、转录活化因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)、骨唾蛋白(bone sialoprotein, BSP)引物序列(表 1),由上海生工生物技术有限公司合成引物,qRT-PCR 检测 Runx2、Osterix/Sp7、ATF4、BSP 的表达情况。以 GAPDH 为内参,成骨相关基因(Runx2、Osterix/Sp7、ATF4、BSP)表达情况用 2^{-ΔΔCt} 值表示。

表 1 成骨相关基因 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
Runx2	上游引物:5'-TCGCACTGGCGGTGCAACA-3'
	下游引物:5'-AGGCATTTCCGAGCTCGCGC-3'
Osterix/Sp7	上游引物:5'-ATGGCGTCTCTCTGCTTG-3'
	下游引物:5'-TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT-3'
ATF4	上游引物:5'-CCTGAACAGCGAAGTGTGG-3'
	下游引物:5'-TGGAGAACCCATGAGGTTTCAA-3'
BSP	上游引物:5'-TGTGGTTGGTTCTTGCTAAATCA-3'
	下游引物:5'-AGTGACCTGAGGTGTAGAGGG-3'
GAPDH	上游引物:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
	下游引物:5'-GGGGTCTGTATGGCAACA-3'

九、统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件(IBM 公司,美国)进行数据分析,计量资料数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析(*F* 检验),*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、Cx43 慢病毒构建以及病毒滴度测定结果

构建的 pHBLV-Cx43-Puro 中目的基因 Cx43 长度为 1 141 bp,经过 PCR 和酶切后电泳鉴定符合目的基因片段大小(图 1),将构建后的慢病毒载体进行测序发现序列与 GenBank 目标序列一致,说明成功构建了 pHBLV-Cx43-Puro 载体。经过包装后得到

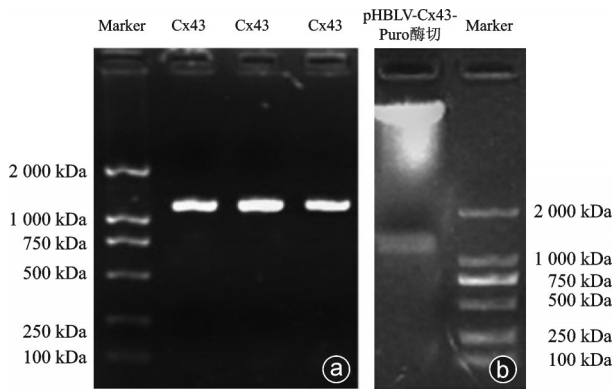


图1 慢病毒 pHBLV-Cx43-Puro 鉴定结果 a: 含 Cx43 基因的 pHBLV-Cx43-Puro 载体 PCR 鉴定结果; b: pHBLV-Cx43-Puro 酶切鉴定结果

病毒滴度为 2×10^8 TU/ml。

二、BMSCs 培养以及表型鉴定

刚获得的骨髓细胞呈现大小不均的圆形或者椭圆形(图 2 a)。5 d 后细胞可达到 90% 的融合, 传代后生长迅速, 细胞呈现梭形或纤维状, 形态均一(图 2 b)。成骨诱导后部分细胞出现形状方面的转变, 变为多角形、立方形等, 可有较多伪足(图 2 c)。

流式细胞仪分析细胞表面抗原显示 CD29、CD44、CD90 呈现阳性表达, 而 CD14 和 CD34 呈现阴性表达, 证实为 BMSCs, 结果见图 3。

三、Cx43 慢病毒对 BMSCs 中 Cx43 mRNA 和蛋白表达的影响

将 Cx43 慢病毒转染至 BMSCs 细胞后, 发现

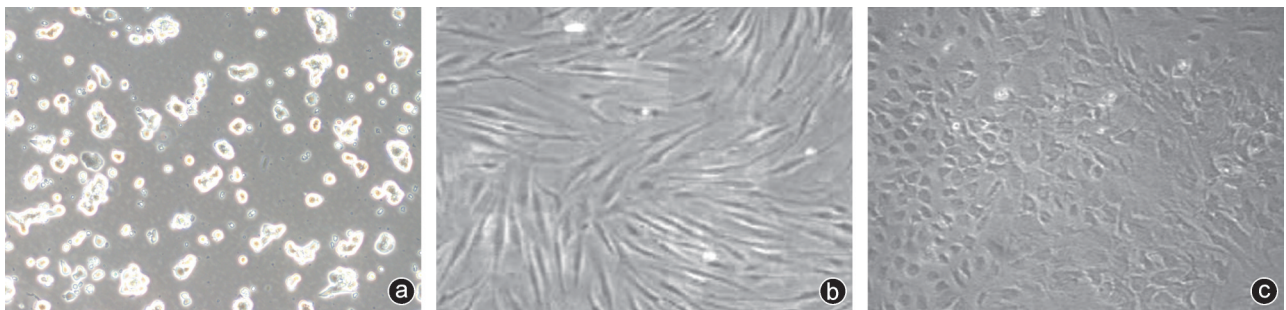


图2 BMSCs 细胞形态观察($\times 100$) a: 原代骨髓细胞; b: 第3代 BMSCs 细胞; c: 成骨诱导后的 BMSCs 细胞

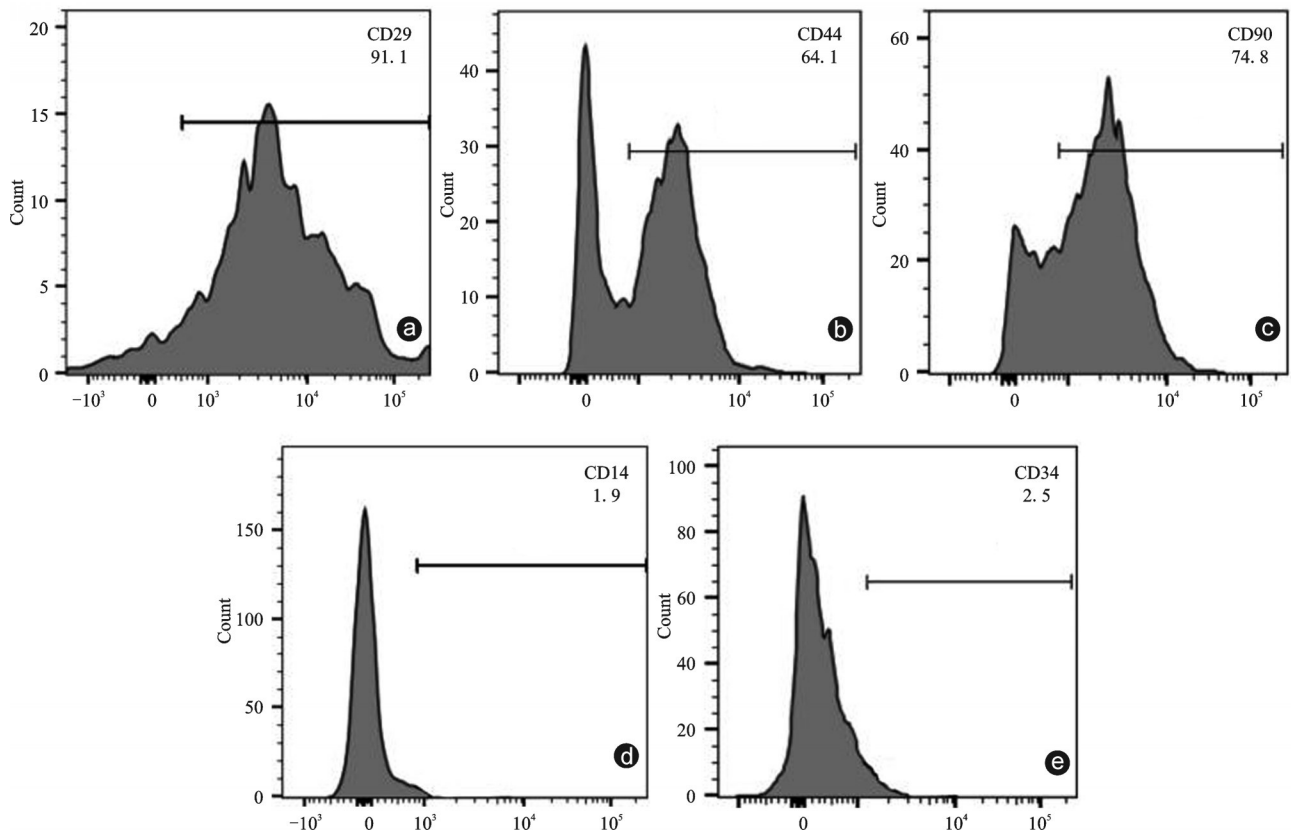


图3 BMSCs 细胞表面标记检测结果

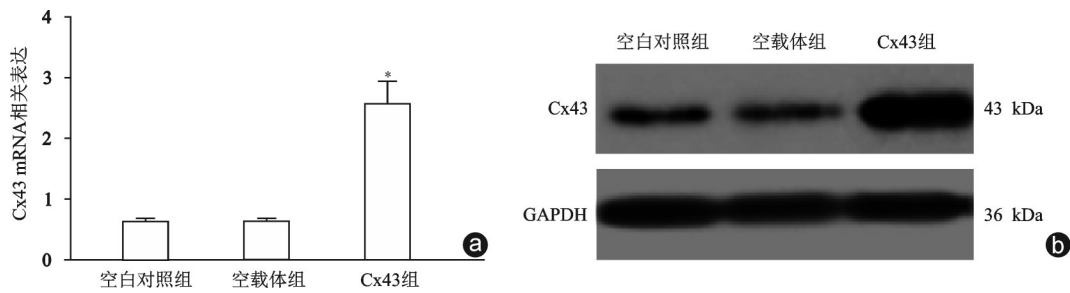


图4 不同组别中Cx43 mRNA和蛋白表达比较(与空白对照组、空载体组比较,* $P < 0.05$)

Cx43组中Cx43 mRNA的含量较空载体组和空白对照组显著升高,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),见图4 a;Western blot结果表明Cx43组中Cx43相对表达量为 1.17 ± 0.17 ,显著高于空载体组 0.54 ± 0.13 和空白对照组 0.57 ± 0.12 ,见图4 b,表明Cx43慢病毒感染后能够显著提高BMSCs细胞中Cx43的表达。

四、qRT-PCR检测成骨相关基因的表达

qRT-PCR检测结果显示细胞培养7 d和14 d后,Cx43组成骨相关基因Runx2、Osterix/Sp7、ATF4和BSP的mRNA表达均明显高于空白对照组和空载体组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05 ,见图5)。

五、ALP活性分析

成骨诱导7 d后,Cx43组ALP活性显著高于空白对照组和空载体组,差异有统计学意义(P 均 $<$

0.05),见图6。

讨论

在骨骼系统中Cx43是表达最为丰富的缝隙连接蛋白,在成骨细胞、破骨细胞、骨细胞中均广泛表达^[11]。研究发现Cx43对成骨细胞的分化及功能具有调节作用。体外研究表明,miR-144-3p和骨形成密切相关,Cx43是miR-144-3p的一个靶基因,miR-144-3p通过对Cx43的调控发挥作用^[7]。动物实验发现整体敲除Cx43后,可引起KO小鼠成骨细胞功能障碍而不能存活,而条件性敲除成骨细胞Cx43的KO小鼠,出现成骨细胞分化障碍,虽然能够存活,但表现出骨渐进性增生^[8]。此外Cx43基因突变能够引起眼齿指发育不良症、颅骨干髓端发育不良症等

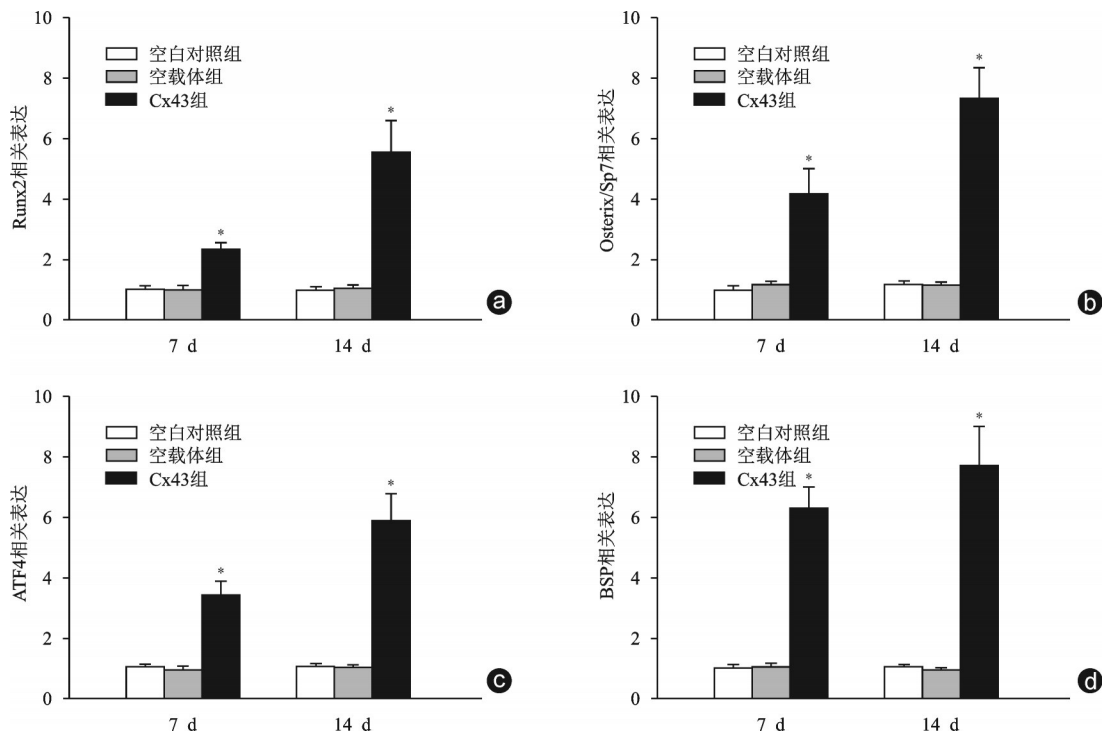


图5 不同组别中成骨相关基因Runx2、Osterix/Sp7、ATF4和BSP的表达比较(与空白对照组、空载体组比较,* P 均 < 0.05)

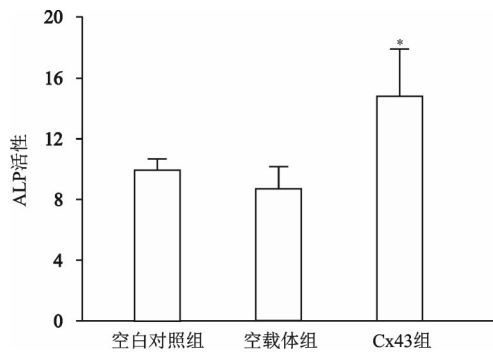


图6 BMSCs培养7 d后各组细胞的ALP活性(与空白对照组、空载体组比较,* $P < 0.05$)

疾病^[9,10]。

本研究中我们分离出小鼠BMSCs,发现细胞呈现纤维状、梭形,通过分析其细胞表型发现CD29、CD44、CD90呈现阳性表达,而CD14和CD34呈现阴性表达,这与许多文献的报道的BMSCs特征一致^[12,13]。本研究构建了Cx43慢病毒,转染BMSCs后发现细胞中Cx43蛋白和mRNA表达显著升高,成功构建了Cx43慢病毒转染BMSCs过表达体系。

进一步的研究显示,在成骨诱导分化过程中,Cx43过表达的BMSCs细胞中,成骨因子Runx2、Osterix/Sp7、ATF4和BSP的表达显著增强,显著高于对照组和空载体组。Runx2、Osterix/Sp7、ATF4和BSP是成骨分化的重要调控因子,在骨发生和成骨细胞分化过程中发挥了重要作用,其表达升高提示Cx43的过表达能够诱导和促进成骨分化^[14,15]。ALP是BMSCs向成骨细胞分化的早期标志性酶,通常分化过程的第1周表达出现高峰^[16],本研究显示Cx43过表达的BMSCs细胞中ALP活性显著高于空载体组和空白对照组。通过对ALP活性和成骨相关基因的检测分析,说明Cx43过表达有利于BMSCs细胞成骨分化。这些结果表明Cx43在BMSCs向成骨细胞分化过程中具有积极地促进作用。

Cx43作为一个关键的细胞缝隙连接蛋白,其表达调控可能为骨损伤修复提供了新的方式,有着重要的意义。但是Cx43调控在体内是否能够促进成骨分化仍然需要进一步的探索和研究。

参 考 文 献

[1] 弓勋,云升. 间充质干细胞的生物学特性及应用[J]. 中国医学

工程, 2018(12): 40-44.

- [2] 黄思城,李宏宇. 骨髓间充质干细胞治疗股骨头坏死的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(11): 1110-1113.
- [3] Zou Q, Hong W, Zhou Y, et al. Bone marrow stem cell dysfunction in radiation-induced abscopal bone loss [J]. J Orthop Surg Res, 2016, 11: 3.
- [4] Wang Y, Zhang X, Shao J, et al. Adiponectin regulates BMSC osteogenic differentiation and osteogenesis through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3652.
- [5] Zhou JZ, Jiang JX. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions-An update [J]. FEBS Lett, 2014, 588(8): 1186-1192.
- [6] Desplantez T. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: involvement of connexin epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels [J]. BMC Cell Biol, 2017, 18(Suppl 1): 3.
- [7] Sun YX, Zhang JF, Xu J, et al. MicroRNA-144-3p inhibits bone formation in distraction osteogenesis through targeting Connexin 43 [J]. Oncotarget, 2017, 8(52): 89913-89922.
- [8] Moorer MC, Hebert C, Tomlinson RE, et al. Defective signaling, osteoblastogenesis and bone remodeling in a mouse model of connexin 43 C-terminal truncation [J]. J Cell Sci, 2017, 130(3): 531-540.
- [9] Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia [J]. Am J Hum Genet, 2003, 72(2): 408-418.
- [10] Kelly JJ, Esseltine JL, Shao Q, et al. Specific functional pathologies of Cx43 mutations associated with oculodentodigital dysplasia [J]. Mol Biol Cell, 2016, 27(14): 2172-2185.
- [11] Stains JP, Civitelli R. A functional assay to assess Connexin 43-mediated cell-to-cell communication of second messengers in cultured bone cells [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1437: 193-201.
- [12] 崔国宁,刘喜平,曾庆涛. 骨髓间充质干细胞表面标记物研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2018, 19(2): 72-74.
- [13] 曹华,高建华,刘小龙,等. 大鼠骨髓间充质干细胞分离鉴定方法及生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(9): 1357-1361.
- [14] Feng G, Zhang J, Feng X, et al. Runx2 modified dental pulp stem cells (DPSCs) enhance new bone formation during rapid distraction osteogenesis (DO) [J]. Differentiation, 2016, 92(4): 195-203.
- [15] Maeda K, Enomoto A, Hara A, et al. Identification of Mefflin as a potential marker for mesenchymal stromal cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 22288.
- [16] 洪亮,焦根龙. 骨髓间充质干细胞成骨分化过程中碱性磷酸酶基因表达含量的变化[J]. 中国医学物理学杂志, 2017, 34(8): 825-828.

(收稿日期: 2019-05-23)

(本文编辑: 龚哲妮)

本文引用格式

谢锡洪,张振伟,林泽金,等. 靶向调控缝隙连接蛋白43对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 骨科, 2020, 11(2): 149-154.

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2020.02.011.