

NO/cGMP通路对细胞凋亡机制的影响与抑郁症的关系综述

吴昊, 刘派, 丁鑫, 何磊, 闫萌, 陈晓梅, 钱占红*

内蒙古医科大学中医学院, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2023年12月8日; 录用日期: 2024年1月2日; 发布日期: 2024年1月10日

摘要

抑郁症是危害人类身体健康的主要精神疾病之一, 且发病率逐年上升。现有机制无法完全解释抑郁症的所有方面。细胞凋亡是细胞的一种程序性死亡, 近年大量研究证明细胞凋亡与抑郁症的关系十分密切。而NO/cGMP通路在大量研究中不仅体现了其与抑郁症的联系, 还体现了其与细胞凋亡的联系。在本文中, 主要对抑郁症与细胞凋亡和NO/cGMP通路的关系进行了综述, 包括抑郁症与细胞凋亡的联系、细胞凋亡与NO/cGMP通路的联系、以及通路与抑郁症的联系, 从而为深入了解抑郁症的发病机制以及治疗提供参考。

关键词

抑郁症, 细胞凋亡, NO, cGMP, PKG

A Review of the Effect of the NO/cGMP Pathway on the Mechanism of Apoptosis and Its Relationship with Depression

Hao Wu, Pai Liu, Xin Ding, Lei He, Meng Yan, Xiaomei Chen, Zhanhong Qian*

College of Traditional Chinese Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia

Received: Dec. 8th, 2023; accepted: Jan. 2nd, 2024; published: Jan. 10th, 2024

Abstract

Depression is one of the major mental disorders that jeopardize human health and its incidence is

*通讯作者。

文章引用: 吴昊, 刘派, 丁鑫, 何磊, 闫萌, 陈晓梅, 钱占红. NO/cGMP 通路对细胞凋亡机制的影响与抑郁症的关系综述[J]. 临床医学进展, 2024, 14(1): 326-331. DOI: 10.12677/acm.2024.141048

increasing every year. Existing mechanisms cannot fully explain all aspects of depression. Apoptosis is a kind of programmed cell death, and a large number of studies in recent years have proved that apoptosis is very closely related to depression. And the NO/cGMP pathway has been demonstrated in a large number of studies not only in its connection with depression, but also in its connection with apoptosis. In this paper, the relationship between depression and apoptosis and NO/cGMP pathway is reviewed, including the link between depression and apoptosis, the link between apoptosis and NO/cGMP pathway, and the link between the pathway and depression, so as to provide reference for an in-depth understanding of the pathogenesis as well as the treatment of depression.

Keywords

Depression, Apoptosis, NO, cGMP, PKG

Copyright © 2024 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

抑郁症是一种终生患病率很高的精神系统疾病，主要特点是产生生理、行为、心理的异常，其表现有快感缺失、情绪低落、睡眠障碍、食欲减退、悲观厌世等，严重的抑郁症患者甚至有自杀倾向[1]。2008年，世卫组织将重度抑郁症列为全球第三大疾病负担原因，并预测到2030年该疾病将排名第一[2]。抑郁症发病机制复杂，受心理、遗传、社会、环境等多个因素影响，与神经系统、循环系统、内分泌系统等多个系统相关。目前抑郁症的假说包括单胺假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴假说、炎症假说、神经发生和神经可塑性假说、大脑结构和功能改变假说、基因假说、环境与背景致病假说、表观遗传学假说等[1]。各种假说均在其领域内证明抑郁症却与其相关，病理生理学理解虽然取得了很大进展，但并没有统一的结论能将抑郁症机制具体阐明。

2. 抑郁症与细胞凋亡

有研究称抑郁症的发病机制涉及到神经进展，神经进展是描述在抑郁症患者的临床表现、生化标志物和脑结构中观察到和证明的几种精神疾病变化的术语。神经进展被定义为神经元变化，包括细胞凋亡、细胞内信号功能障碍、细胞可塑性和神经发生的降低[3]。基于对抑郁症患者大脑的影像学研究，发现数种神经元回路的选择性结构变化，这些变化使细胞的可塑性和弹性恶化，最明显的变化发生在海马体中，患者的海马体体积严重减小，有充分的记录抑郁症患者海马萎缩，许多研究表明抑郁症患者海马尾部等区域体积较小，而在神经影像学的观察下，经过药物治疗会抑制海马萎缩这种情况[3][4]。这与细胞凋亡的关系十分密切，甚至神经元凋亡可能起决定性作用，有研究在死后的抑郁症患者海马组织中观察到凋亡细胞[5]。

细胞凋亡是细胞的一种程序性死亡，从形态学变化描述包括膜起泡、细胞体积减小、核碎裂、染色质凝结、细胞表面磷脂酰丝氨酸暴露和凋亡小体的形成[6][7]。细胞开始凋亡这一过程由半胱天冬酶(caspase)执行，根据其凋亡过程中的激活顺序和结构可以分为两类，启动组和效应组[8]。接收到信号后，启动caspase从半胱天冬酶原(procaspase)激活，继续激活效应caspase，然后由效应caspase启动一系列程序，核酸内切酶活化，核蛋白和细胞骨架被破坏，凋亡小体形成等。细胞凋亡分为两种途径，一种称为

内在(线粒体)凋亡途径, 另一种称为外在(死亡受体)凋亡途径[9]。

线粒体凋亡途径主要是响应细胞内刺激而启动, 线粒体外膜透化(MOMP)可以说是凋亡起始事件, MOMP 使线粒体膜间隙(IMS)促凋亡蛋白的释放导致 caspase 的激活[10]。MOMP 主要受 Bcl-2 家族蛋白调节, 稳态条件下, 抗凋亡成员 Bcl-2/Bcl-XL 与促凋亡成员 Bax/Bak 结合并保持无活性, 而纯 BH3 蛋白成员 Bad 在接收凋亡信号后通过异质化抑制 Bcl-2/Bcl-XL 使 Bax/Bak 激活; Bax/Bak 激活后, 二者发生一系列构象变化能在线粒体外膜(OMM)中插入并寡聚化, 从而形成 OMM 孔隙导致 MOMP [6] [7]。

由于 OMM 孔和 MOMP, 线粒体膜完整性被干扰, 导致线粒体跨膜电位以及 IMS 促凋亡蛋白被释放到胞质[9]。依赖 caspase 途径的蛋白包括细胞色素 c、caspase 的第二线粒体激活剂(Smac)等。细胞色素 c 从 IMS 中被释放到胞质后, 结合凋亡蛋白酶激活因子-1 (Apaf-1) [9]。二者结合后触发 Apaf-1 的广泛构象变化, 使其寡聚化为七层轮状结构, 暴露出 caspase 活化和募集结构域(CARD) [11]。Apaf-1 的 CARD 与 procaspase-9 的 CARD 结合并相互作用形成复合物细胞凋亡体[9] [11]。启动组 caspase-9 被激活, 进而激活执行组 caspase-3 和 caspase-7。二者切割与脱氧核糖核酸酶(CAD)结合的 CAD 抑制剂(ICAD), CAD 发挥其作用使 CAD 负责的核小体间 DNA 片段化, 这就是细胞凋亡的标志现象。因此线粒体凋亡途径主要从 Bcl-2 家族控制的 MOMP 起始, 使细胞色素 c 释放与 Apaf-1 结合, 后募集并激活 caspase-9, 再激活 caspase-3 与 caspase-7, 最后发挥作用使细胞快速凋亡。

死亡受体(DR)凋亡途径是由肿瘤坏死因子(TNF)家族的 DR 与对应的死亡配体结合引起的[6] [8]。DR 与死亡配体结合后会使得 procaspase-8 被招募到二者结合的胞质结构上的死亡诱导信号复合体(DISC)处, 在此处 procaspase-8 激活形成完全活性的 caspase-8 [6] [8]。而 caspase-8 能通过两种途径诱导细胞凋亡。一种 caspase-8 会激活效应 caspase, 直接启动细胞凋亡。另一种途径, caspase-8 会将纯 BH-3 蛋白 Bid 加工成 tBid, 然后将其运送到线粒体实现与线粒体凋亡途径的串扰[6] [8]。

3. NO/cGMP 通路

一氧化氮(NO)是由三种一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸产生的常见信号分子, 正常生理浓度下 NO 具有神经保护作用, 有助于调节神经元的增值, 存活和分化, 促进神经可塑性和认知, 但 NO 过量产生时会导致神经毒性和细胞死亡[12]。环磷酸鸟苷(cGMP)是一种通用的细胞内第二信使, 分布广泛, NO 产生释放后激活可溶性鸟苷酸环化酶(sGC), 而 sGC 与 NO 结合后发生构象变化激活催化结构域, 从而出发三磷酸鸟苷(GTP)形成 cGMP, cGMP 调节不同下游靶标活性, 主要是 cGMP 依赖性蛋白激酶(PKG)来发挥作用[13]。PKG 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是 cGMP 传导信号的主要介质并发挥作用。PKG 参与许多细胞功能, 如松弛、重塑、凋亡、分化及神经可塑性[14]。在神经系统中研究表明, NO/PKG 通路激活可以增加突触可塑性, 也有相反的研究揭示 PKG 会对神经元有负面影响, 如 PKG 过度表达会抑制海马体中谷氨酸释放来降低突触可塑性, 还会导致记忆缺陷[14]。NO 通过 cGMP 非依赖性途径和由 sGC 激活的 cGMP 依赖性途径发挥其功能, 因此在通路中 NO 主要靠下游效应物 PKG 在细胞中浓度的增加来发挥作用, 这是其多种生物学功能的基础[15]。

4. NO/cGMP 通路与细胞凋亡关系

4.1. NO 与凋亡的联系

过量 NO 会产生神经毒性, 导致细胞损伤导致细胞凋亡和坏死, 特别是中枢和周围神经系统[12]。过量的 NO 会与超氧阴离子发生扩散限制反应而生成过氧亚硝酸盐, 过氧亚硝酸盐是高毒性的而且是各种大分子的有效氧化剂, 它还可以硝化酪氨酸残基上的蛋白质[16]。最初过氧亚硝酸盐的毒性被归于非特异性氧化损伤, 它可以氧化细胞内蛋白质、脂质和 DNA, 破坏细胞功能导致细胞凋亡。但越来越多的证据

表明过氧亚硝酸盐在多种细胞中诱导细胞凋亡是通过硝化酪氨酸导致的, 阻止酪氨酸硝化可以观察到对细胞的保护[16]。另外有研究表明, NO 联合阿司匹林会导致 Bax/Bcl-XL 增加, 抑制 Bcl-2 表达并激活 caspase, 从而诱导细胞凋亡[17]。

4.2. cGMP/PKG 与凋亡的联系

在通路中 NO 和 cGMP 主要靠下游效应物 PKG 在细胞中浓度的增加来发挥作用。PKG 在许多研究中都与细胞凋亡密切相关, 而且极有可能是正相关, 刺激 PKG 的激活会导致细胞凋亡。在神经系统中的研究也表示上调 cGMP/PKG 途径会介导多巴胺神经元退化和死亡; 而采用 PKG 抑制剂降低 PKG 会逆转细胞凋亡的增加[18] [19]。对于 PKG 参与细胞凋亡的具体分子机制则并不明确, 但很有可能通过 Bcl-2 家族蛋白及 caspase 家族的调节来干预细胞凋亡。有研究证明通过 NO/cGMP 途径来增加 PKG 会使细胞中 Bax 上调以及 caspase-3 的表达, 而抑制 PKG 则会降低增加的 Bax、Bcl-2 等促凋亡蛋白和 caspase-3 的水平, 从而达到抑制细胞凋亡的目的[19]。

因此 PKG 参与细胞凋亡很有可能以直接或间接的方式影响凋亡蛋白以及 caspase。有研究发现 PKG 可以活化核因子 κ B (NF- κ B), 而 NF- κ B 的靶基因之一是 Bcl-2 家族蛋白, 与细胞凋亡相关[20]。PKG 对于 NF- κ B 的活化途径, 有研究提出 PKG 可以磷酸化 I κ B 从而导致其抑制性亚基的降解和 NF- κ B 的活化, 但也有人提出另一可能性, 他们表明 PKG 会直接磷酸化 NF- κ B 增加其转录活性[21]。NF- κ B 是一种氧化还原敏感的转录因子, 被各种神经毒性和凋亡刺激所激活, 而关于它在细胞凋亡中的作用一直有争议, 既抗凋亡又促凋亡, 这可能与细胞类型相关; 一方面 NF- κ B 的激活在肿瘤坏死因子(TNF)、 β -淀粉样蛋白和化疗引起的凋亡中具有细胞保护作用, 另一方面, 许多体内和体外研究表明, NF- κ B 的激活对神经元是有害的, NF- κ B 的激活会促进神经元的死亡[22]。而 NF- κ B 对细胞凋亡的影响是通过调节 Bcl-2 家族蛋白促凋亡和抗凋亡成员的表达来发挥。有研究表明神经元被细胞凋亡过程中, Bcl-XS、Bax 被 NF- κ B 诱导上调, 而阻断 NF- κ B 的激活则抑制了 Bcl-XS 和 Bax 等蛋白质的上调使细胞凋亡的水平降低[22]。所以, PKG 可能通过磷酸化 NF- κ B 来调控 Bcl-2 家族, 从而实现对抗凋亡途径的串扰。

5. NO/cGMP 通路与抑郁症关系

5.1. NOS/NO 与抑郁症的联系

抑郁症的影像学研究发现最明显的变化是海马体体积缩小, 三种 NOS 中主要分布在海马体的是 nNOS, 因此本文着重论述 nNOS 与 NO 同抑郁症的联系。nNOS 在抑郁症中起着重要的作用, 很多研究证明生活压力导致大脑区域 nNOS 表达和活性增强, 包括皮层、海马等, 而 nNOS 抑制剂具有抗抑郁样作用。有研究对小鼠进行靶向破坏 nNOS 基因, 缺乏 nNOS 转基因的小鼠表现出超运动活动, 社交互动增加, 抑郁相关行为减少, 对抑郁小鼠采用 nNOS 抑制剂可以逆转抑郁小鼠的绝望行为和海马神经发生损伤[23]。因此 nNOS 可能是抑郁症发生的重要一环。

NO 也是如此, 有研究指出重症抑郁症患者的 NO 水平很高, 而经抗抑郁治疗后 NO 水平会下降[24]。另外 NO 似乎能够调节脑源性神经营养因子(BDNF), 外源性 NO 会降低 BDNF 水平, 而 BDNF 下调与抑郁症直接相关[25]。

5.2. cGMP/PKG 与抑郁症的联系

通路中 NO 依靠下游分子 cGMP/PKG 对抑郁症发挥作用。有研究指出, 在抑郁大鼠的海马体和血浆中检测出的 cGMP 和 PKG 较正常大鼠明显增加, 而在经过抗抑郁治疗后, cGMP 和 PKG 显著降低[26]。这些研究表明抑郁症确实改变了 cGMP/PKG。对于直接作用通路是否能对抑郁症产生影响, 有实验做了

验证,发现通路抑制剂会增强抗抑郁药的效果,通路激动剂会降低抗抑郁药的作用[27]。因此整条通路与抑郁症有着不可分割的关系,其机制可能与通路影响细胞凋亡相关[26]。

综上所述,抑郁症的机理十分复杂,目前对于抑郁症的机制探讨并不是十分明确,但抑郁症与细胞凋亡的联系十分密切。而 NO/cGMP 通路对细胞凋亡有着显著的影响,可能通过对通路的抑制发挥抗凋亡的作用。因此 NO/cGMP 通路对于抑郁症的影响机制极有可能是通过细胞凋亡来影响神经进展和大脑功能。多项研究证明了这点,但仍有许多尚未解决的新问题:通路对于凋亡的影响明确的分子机制是什么?通路除了促进凋亡是否还有别的功能?但随着研究的进展以及对通路不断的深入研究,NO/cGMP 通路肯定会对抑郁症的治疗带来新的进展。

基金项目

内蒙古自然科学基金面上项目(2020MS08123);内蒙古科技计划项目(2020SGG0128);内蒙古自治区卫生健康委医疗卫生科技计划项目(202202142);内蒙古医科大学重点项目(YKD2021ZD005);内蒙古医科大学学科建设项目(YKD2023XK026)。

参考文献

- [1] Herrman, H., Patel, V., Kieling, C., *et al.* (2022) Time for United Action on Depression: A Lancet-World Psychiatric Association Commission. *The Lancet*, **399**, 957-1022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02141-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02141-3)
- [2] Malhi, G.S. and Mann, J.J. (2018) Depression. *The Lancet*, **392**, 2299-2312. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2)
- [3] Ruiz, N.A.L., Del Ángel, D.S., Olguín, H.J. and Silva, M.L. (2018) Neuroprogression: The Hidden Mechanism of Depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **14**, 2837-2845. <https://doi.org/10.2147/NDT.S177973>
- [4] Tai, H.H., Cha, J., Vedaiei, F., *et al.* (2021) Treatment-Specific Hippocampal Subfield Volume Changes with Antidepressant Medication or Cognitive-Behavior Therapy in Treatment-Naive Depression. *Frontiers in Psychiatry*, **12**, Article ID: 718539. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.718539>
- [5] 张明远, 许二平, 陈毅恒, 张楠, 白明. 柴胡治疗抑郁症药理作用研究现状[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(10): 102-108.
- [6] Kaufmann, T. and Simon, H.U. (2023) Pharmacological Induction of Granulocyte Cell Death as Therapeutic Strategy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **63**, 231-247. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051921-115130>
- [7] Dadsena, S., Zollo, C. and García-Sáez, A.J. (2021) Mechanisms of Mitochondrial Cell Death. *Biochemical Society Transactions*, **49**, 663-674. <https://doi.org/10.1042/BST20200522>
- [8] D'Arcy, M.S. (2019) Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*, **43**, 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- [9] Ketelut-Carneiro, N. and Fitzgerald, K.A. (2022) Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis—Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. *Journal of Molecular Biology*, **434**, Article ID: 167378. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167378>
- [10] Winter, J.M., Yadav, T. and Rutter, J. (2022) Stressed to Death: Mitochondrial Stress Responses Connect Respiration and Apoptosis in Cancer. *Molecular Cell*, **82**, 3321-3332. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.07.012>
- [11] Green, D.R. (2022) The Mitochondrial Pathway of Apoptosis: Part I: MOMP and Beyond. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **14**, a041038. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041038>
- [12] 孙悦, 赵艳春, 张婷, 葛文文, 王铁鹏. 一氧化氮对鱼藤酮诱导神经细胞损伤的调节作用[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2021, 39(2): 225-233.
- [13] Mangmool, S., Duangrat, R., Parichatikanond, W. and Kurose, H. (2023) New Therapeutics for Heart Failure: Focusing on cGMP Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article No. 12866. <https://doi.org/10.3390/ijms241612866>
- [14] Shariatpanahi, M., Khodagholi, F., Ashabi, G., *et al.* (2016) The Involvement of Protein Kinase G Inhibitor in Regulation of Apoptosis and Autophagy Markers in Spatial Memory Deficit Induced by A β . *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **30**, 364-375. <https://doi.org/10.1111/fcp.12196>
- [15] 王涛之, 李珍珍, 刘万能, 徐蕾, 李海涛, 席焯, 王菲, 罗层. 小鼠前扣带回皮质 PKG-I 介导吗啡诱导的痛敏和

- 焦虑样行为[J]. 神经解剖学杂志, 2023, 39(1): 8-14.
- [16] Ramdial, K., Franco, M.C. and Estevez, A.G. (2017) Cellular Mechanisms of Peroxynitrite-Induced Neuronal Death. *Brain Research Bulletin*, **133**, 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.008>
- [17] 邢一浩, 杨成, 铁妍, 贾雪珂, 徐静蕾, 刘玲. 一氧化氮供体 JS-K 联合阿司匹林促进人肝细胞癌细胞凋亡[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2022, 36(2): 108-114.
- [18] Wu, Y., Yuan, M., Su, W., *et al.* (2018) The Constitutively Active PKG II Mutant Effectively Inhibits Gastric Cancer Development via a Blockade of EGF/EGFR-Associated Signalling Cascades. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, **10**. <https://doi.org/10.1177/1758834017751635>
- [19] Wu, Y., Cai, Q., Li, W., *et al.* (2019) Active PKG II Inhibited the Growth and Migration of Ovarian Cancer Cells through Blocking Raf/MEK and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Bioscience Reports*, **39**, BSR20190405. <https://doi.org/10.1042/BSR20190405>
- [20] Siednienko, J., Nowak, J., Moynagh, P.N. and Gorczyca, W.A. (2011) Nitric Oxide Affects IL-6 Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Involving cGMP-Dependent Modulation of NF- κ B Activity. *Cytokine*, **54**, 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.02.015>
- [21] Gu, M., Zhou, X., Zhu, L., *et al.* (2022) Myostatin Mutation Promotes Glycolysis by Increasing Phosphorylation of Phosphofructokinase via Activation of PDE5A-cGMP-PKG in Cattle Heart. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, Article ID: 774185. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.774185>
- [22] Mao, J., Hu, Y., Ruan, L., Ji, Y. and Lou, Z. (2019) Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Depression (Review). *Molecular Medicine Reports*, **20**, 4774-4780. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10789>
- [23] Zhu, L.J., Li, F. and Zhu, D.Y. (2023) nNOS and Neurological, Neuropsychiatric Disorders: A 20-Year Story. *Neuroscience Bulletin*, **39**, 1439-1453. <https://doi.org/10.1007/s12264-023-01060-7>
- [24] Lu, Y.R., Zhang, Y., Rao, Y.B., *et al.* (2018) The Changes in, and Relationship between, Plasma Nitric Oxide and Corticotropin-Releasing Hormone in Patients with Major Depressive Disorder. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **45**, 10-15. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12826>
- [25] Arévalo, J.C. and Deogracias, R. (2023) Mechanisms Controlling the Expression and Secretion of BDNF. *Biomolecules*, **13**, Article No. 789. <https://doi.org/10.3390/biom13050789>
- [26] Zhang, X.T., Zhang, Y., Zhang, Y.X., *et al.* (2021) Helicid Reverses the Effect of Overexpressing NCALD, Which Blocks the sGC/cGMP/PKG Signaling Pathway in the CUMS-Induced Rat Model. *Journal of Healthcare Engineering*, **2021**, Article ID: 7168397. <https://doi.org/10.1155/2021/7168397>
- [27] Tan, Y.F., Liao, Z.L., Qiu, Y.J., Zhu, J.P. and Yu, E.Y. (2016) Possible Involvement of L-Arginine-Nitric Oxide (NO)-Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP) Signaling Pathway in the Antidepressant-Like Effect of Wuling Mycelia Powder in Rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **78**, 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.016>