

[19]

Dimatelis J J, Hsieh J H, Sterley T L, *et al.* Impaired energy metabolism and disturbed dopamine and glutamate signalling in the striatum and prefrontal cortex of the spontaneously hypertensive rat model of attention-deficit hyperactivity disorder [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(3): 696-707.

[20]

李 巍, 李亚平, 李 瑞, 等. 益肾填精法对 SHR 大鼠纹状体及前额叶皮层突触超微结构的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(1): 10-13.

[21]

Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, *et al.* ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 963520.

[22]

Leffa D T, Bellaver B, de Oliveira C, *et al.* Increased oxidative parameters and decreased cytokine levels in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42 (11): 3084-3092.

[23]

Comim C M, Gomes K M, Réus G Z, *et al.* Methylphenidate treatment causes oxidative stress and alters energetic metabolism in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder [J]. *Acta Neuropsychiatr*, 2014, 26(2): 96-103.

[24]

Motaghinejad M, Motevalian M, Shabab B. Possible involvements of glutamate and adrenergic receptors on acute toxicity of methylphenidate in isolated hippocampus and cerebral cortex of adult rats [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2017, 31 (2): 208-225.

[25]

Russell V A, Oades R D, Tannock R, *et al.* Response variability in attention-deficit/hyperactivity disorder: a neuronal and glial energetics hypothesis [J]. *Behav Brain Funct*, 2006, 2: 30.

[26]

Lee Y H, Song G G. Genome-wide pathway analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(8): 1189-1196.

四君子颗粒含药血清对棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡的影响

唐保露¹, 郑宇辰², 张叶明³, 袁 萍¹, 戚小宇¹, 张 旭¹, 杨解人¹, 郑书国^{1,4*}
(1. 皖南医学院药理学教研室, 安徽 芜湖 241002; 2. 皖南医学院临床医学院, 安徽 芜湖 241002; 3. 皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241002; 4. 皖南医学院定量药理研究所, 安徽 芜湖 241002)

摘要: **目的** 探讨四君子颗粒含药血清对棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡的影响。**方法** SD 大鼠灌胃给予四君子颗粒 (10.5、5.25 g/kg) 7 d, 制备四君子颗粒含药血清。四君子颗粒含药血清预处理 MIN6 细胞 24 h 后, 加入 0.4 mmol/L 棕榈酸孵育 MIN6 细胞 24 h。CCK-8 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 法检测 GRP78、ATF4、CHOP、p-PERK 蛋白表达。**结果** 四君子颗粒含药血清减轻了棕榈酸诱导的 MIN6 细胞损伤和凋亡 ($P<0.05$, $P<0.01$), 下调内质网应激相关蛋白 GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达, 降低 PERK 蛋白磷酸化 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 四君子颗粒含药血清可有效减轻棕榈酸诱导的 MIN6 细胞损伤和凋亡, 其机制可能与抑制内质网应激相关的信号通路有关。

关键词: 四君子颗粒; 细胞凋亡; 内质网应激; 糖尿病

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)08-2031-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.08.012

Effects of Sijunzi Granules medicated serum on MIN6 cell apoptosis induced by palmitic acid

TANG Bao-lu¹, ZHENG Yu-chen², ZHANG Ye-ming³, YUAN Ping¹, QI Xiao-yu¹, ZHANG Xu¹, YANG Jie-ren¹, ZHENG Shu-guo^{1,4*}
(1. Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 2. College of Clinical Medicine, Wannan Medical College, Wuhu

收稿日期: 2020-01-20

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2015A192); 中国医药教育协会孙思邈中医药科研专项课题 (2016SKT-M033); 皖南医学院重点科研项目培育基金 (WK2018Z05); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201910368012)

作者简介: 唐保露 (1994—), 男, 硕士生, 研究方向为临床药理学。Tel: (0553) 3932464, E-mail: 1171727113@qq.com

***通信作者:** 郑书国 (1967—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为临床药理学。Tel: (0553) 3932464, E-mail: zhengsg2000@163.com

241002, China; 3. College of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 4. Institute of Quantitative Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Sijunzi Granules (SGs) medicated serum on MIN6 cell apoptosis induced by palmitic acid. **METHODS** SD rats were given 7-day intragastric SGs administration (10.5, 5.25 g/kg) for preparation of SGs medicated serum. MIN6 cells pretreated with 24 h SGs serum were then exposed to 0.4 mmol/L palmitic acid induction for 24 h. The MIN6 cells were subsequently subjected to the detection of cell viability by CCK-8 method, investigation of cell apoptosis by flow cytometry, and detection of GRP78, ATF4, CHOP, and p-PERK protein expression by Western blot. **RESULTS** SGs medicated serum alleviated injury and apoptosis of palmitic acid-induced MIN6 cells ($P<0.05$, $P<0.01$), and down-regulated the expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins GRP78, ATF4, and CHOP expression, and reduced PERK protein phosphorylation as well ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** SGs medicated serum can effectively reduce MIN6 cells injury and apoptosis induced by palmitic acid-induced, and its mechanism may be related to the inhibition of endoplasmic reticulum stress-related signaling pathways.

KEY WORDS: Sijunzi Granules (SGs); cell apoptosis; endoplasmic reticulum stress; diabetes

2 型糖尿病是一种以胰岛素抵抗、高血糖和胰岛 β 细胞功能障碍为特征的代谢性疾病，其病因复杂，其中肥胖是最主要危险因素之一^[1]。大多数肥胖人群血浆游离脂肪酸水平明显升高，高水平脂肪酸对胰岛 β 细胞可产生明显毒性作用，并可诱导机体发生胰岛素抵抗^[2]。短期暴露于高浓度游离脂肪酸，可使胰岛素分泌代偿性增加，而时间过长则导致胰岛 β 细胞功能损伤，甚至发生凋亡^[3]。胰岛 β 细胞数量减少及功能损伤是发生糖尿病的主要机制之一^[4]。因此抑制游离脂肪酸诱导的胰岛功能损伤和 β 细胞凋亡是防治 2 型糖尿病的重要措施之一。

糖尿病属于中医“消渴”范畴，其发生发展与脾胃关系密切，其中脾气亏虚是糖尿病发病的重要病机，“脾虚致消”“健脾愈消”已成为中医治疗糖尿病的重要理论依据之一，临床以益气健脾方治疗 2 型糖尿病也取得较好疗效^[5-6]。四君子汤是益气健脾的经典方剂，由党参、白术、茯苓和甘草组成，临床用于治疗糖尿病取得了良好的效果^[7]，但对其改善 2 型糖尿病的确切机制，目前仍不清楚。前期研究^[8]发现，四君子颗粒可明显改善高糖高脂饮食诱导的大鼠糖尿病前期状态，减少胰岛细胞凋亡。本研究采用体外培养的小鼠胰岛 β 细胞株 (MIN6 细胞)，应用血清药理学方法观察四君子汤对棕榈酸诱导的 MIN6 细胞损伤和凋亡的影响，并从内质网应激角度探究其可能机制。

1 材料

1.1 动物 30 只 SD 大鼠购于浙江省实验动物中心，生产许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。

1.2 药物与试剂 四君子颗粒 (李时珍医药集团有限公司，批号 20180516)；MIN6 细胞株 (上海博古生物科技有限公司)；DMEM 培养基 (批号 AD12854263)、胎牛血清 (批号 MKF0602) 购自美国 HyClone 公司；棕榈酸钠 (批号 SLBQ0242V)、 β -巯基乙醇 (批号 STBJ3747) 购自美国 Sigma 公司；细胞凋亡检测试剂盒 (货号 BB18061)、细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒 (货号 BB18061X) 购自上海贝博生物科技有限公司；葡萄糖调节蛋白-78 (GRP78, 批号 120617180313)、ATF4 抗体 (批号 011018180606) 购自碧云天生物技术有限公司；PERK (批号 66r8853)、p-PERK 抗体 (批号 86w3361) 购自美国 Affinity Biosciences 公司；CHOP 抗体 (批号 57c6807) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司； β -actin 抗体 (批号 20180926) 购自博士德生物工程有限公司；ECL 发光试剂盒 (批号 20180822) 购自上海天能科技有限公司。

1.3 仪器 二氧化碳细胞培养箱 (美国 SIM 公司)；超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)；高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)；DYY-6C 型电泳仪 (北京六一仪器厂)；Mini PROTEAN 转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)；Fluor chem FC3 化学发光凝胶成像系统 (美国 Protein Simple 公司)；Infinite 200 PRO 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)；手持式细胞计数仪 (美国 Millipore 公司)；流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 30 只 SD 大鼠随机分为正常

对照组及四君子颗粒高、低剂量组（10.5、5.25 g/kg），每组 10 只，除正常对照组，其余 2 组分别灌胃给予高、低剂量四君子颗粒（10.5、5.25 g/kg），连续给药 7 d。末次给药 2 h 后，戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉取血，无菌条件下分离血清，56 ℃ 水浴灭活 30 min，-80 ℃ 冰箱保存备用。

2.2 MIN6 细胞培养 将 MIN6 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中（含 50 μmol/L β-巯基乙醇），置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中，待细胞生长至近融合时，用 0.25% 胰酶消化后传代培养。

2.3 MIN6 细胞活力检测 将 MIN6 细胞用 0.25% 胰酶消化后，制备单细胞悬液，以 2×10⁴/孔接种于 96 孔培养板，24 h 后弃培养液，PBS 洗涤后加入新的培养液，细胞随机分为对照组、模型组、空白血清组及四君子颗粒高、低剂量组。四君子颗粒高、低剂量组分别加入相应的含药血清，空白血清组加入空白对照组血清，使血清终浓度为 10%，孵育 24 h；除对照组外，其余各组更换含 0.4 mmol/L 的棕榈酸培养基，孵育 24 h，CCK-8 法检测细胞活性。

2.4 MIN6 细胞凋亡检测 取生长状态良好的 MIN6 细胞，0.25% 胰酶消化后制备单细胞悬液，接种于 6 孔培养板，24 h 后更换新鲜培养液。按“2.3”项下分组及药物处理。弃培养液，PBS 洗涤后 0.25% 胰酶消化收集细胞，预冷 PBS 洗涤 2 次。用 400 μL Annexin V 结合液悬浮细胞，在细胞悬液中加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液，轻轻混匀后于 4 ℃ 避光孵育 15 min，然后加入 10 μL PI 染色液轻轻混匀，4 ℃ 避光孵育 5 min，流式细胞仪检测细胞凋亡水平（激发波长 488 nm，发射波长 525 nm）。

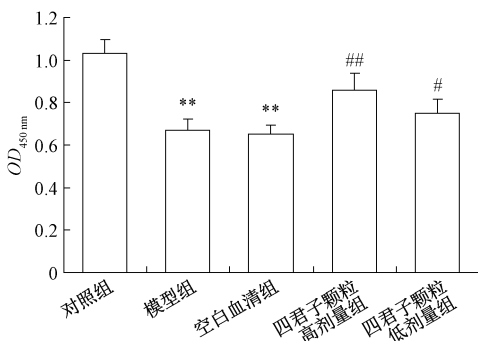
2.5 Western blot 法检测蛋白表达 细胞接种于 6 孔培养板，按“2.3”项下分组及药物处理。弃培养液，PBS 洗涤 2 次，加入 0.25% 胰酶消化收集细胞，PIPA 裂解液（含磷酸酶和蛋白酶抑制剂）冰浴裂解细胞。12 000 g 离心 15 min，收集上清液，BCA 法测定蛋白浓度，聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并转移至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶封闭 2 h。分别加入 β-actin、GRP78、ATF4、CHOP、p-PERK、PERK 抗体，4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育 2 h，滴加 ECL 发光液显色，凝胶图像分析系统拍照并分析条带光密度，结果以 GRP78/β-actin、ATF4/β-actin、

CHOP/β-actin、P-PERK/PERK 表示。

2.6 统计学分析 采用 DAS1.0 统计软件进行分析，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 四君子颗粒对 MIN6 细胞活力的影响 由图 1 可见，0.4 mmol/L 棕榈酸孵育 MIN6 细胞 24 h 后可以诱导 MIN 6 细胞损伤 ($P < 0.01$)；四君子颗粒含药血清预孵 24 h 可减轻棕榈酸诱导的细胞损伤 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与模型组比较，空白血清组 MIN 6 细胞活力差异无统计学意义。提示四君子颗粒可有效改善棕榈酸诱导的细胞损伤。



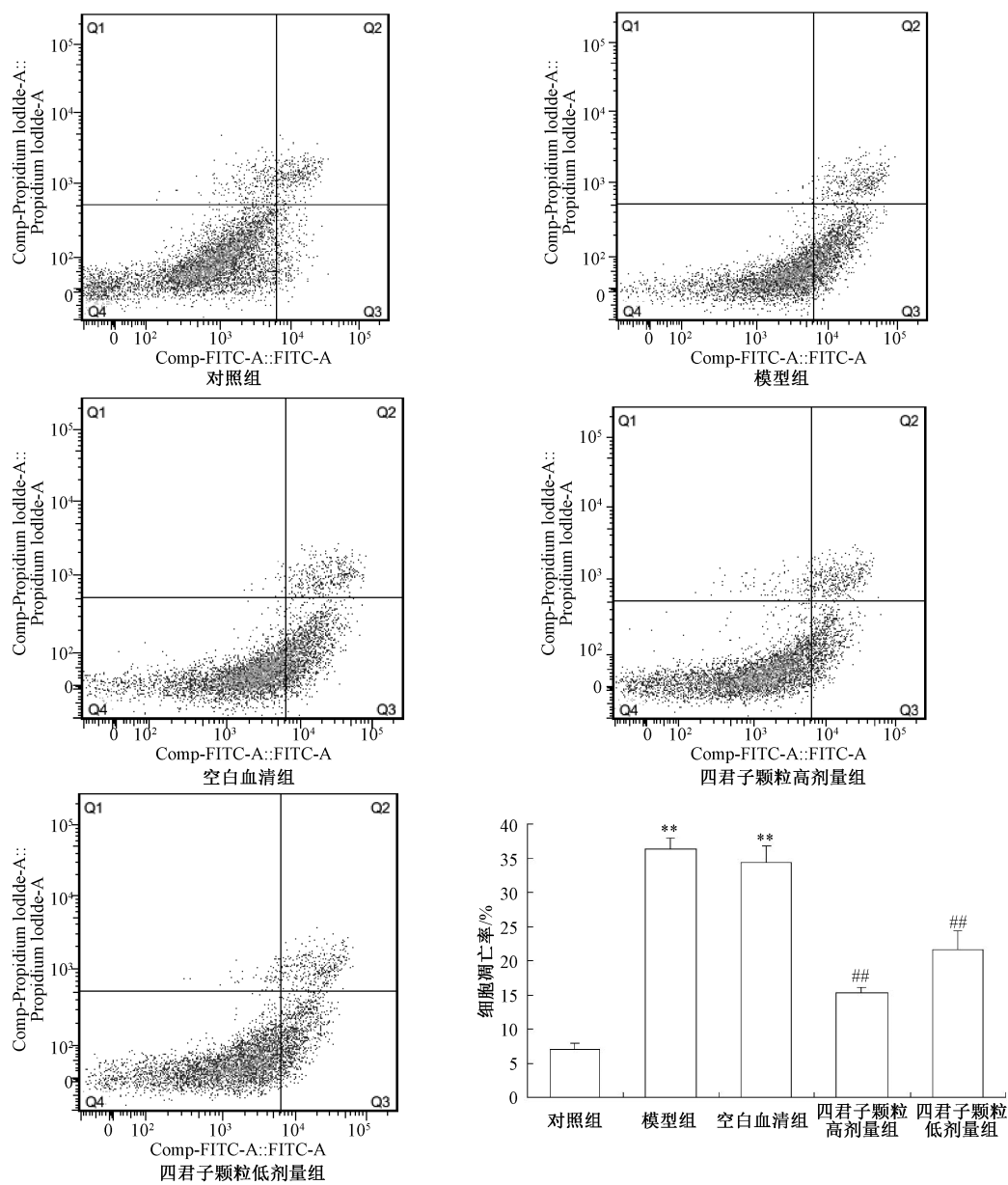
注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 1 四君子颗粒对棕榈酸诱导的 MIN6 细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effects of SGs on the viability of palmitic acid-induced MIN6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.2 四君子颗粒对 MIN6 细胞凋亡的影响 正常培养条件下，MIN6 细胞凋亡率很低，0.4 mmol/L 棕榈酸诱导 24 h 后，MIN6 细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$)，表现为凋亡早期和凋亡晚期的细胞均增加；四君子颗粒含药血清预孵 24 h 可降低棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡 ($P < 0.01$)，而空白对照血清对棕榈酸诱导的细胞凋亡无明显影响，见图 2。提示四君子颗粒可有效抑棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡。

3.3 四君子颗粒对 MIN6 细胞 GRP78、ATF4、CHOP、p-PERK 表达的影响 由图 3 可知，正常培养条件下，MIN6 细胞 GRP78、ATF4 及 CHOP 蛋白表达较低，PERK 蛋白磷酸化也较低；0.4 mmol/L 棕榈酸诱导 24 h 后，MIN6 细胞 GRP78、ATF4、CHOP、p-PERK 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；四君子颗粒含药血清预孵 24 h 可降低



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 2 四君子颗粒对棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

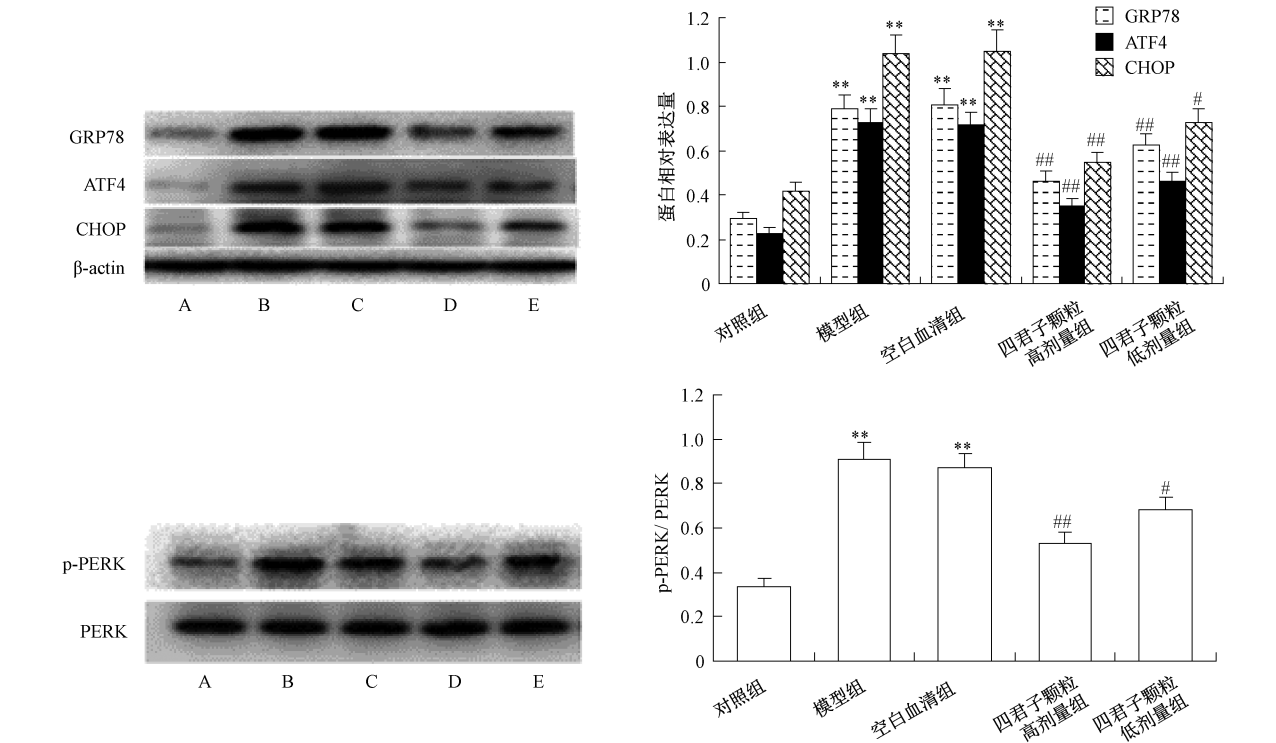
Fig. 2 Effects of SGs on the apoptosis of palmitic acid-induced MIN6 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

细胞内 GRP78、ATF4、CHOP、p-PERK 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 而空白对照血清对 GRP78、ATF4、CHOP 及 p-PERK 蛋白表达均无明显影响, 提示四君子颗粒含药血清可明显减轻棕榈酸诱导的 MIN6 细胞内质网应激, 这一作用与其抑制细胞凋亡作用一致, 四君子颗粒抑制棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡与抑制内质网应激 PERK- ATF4-CHOP 信号通路有关。

4 讨论

流行病学资料显示, 肥胖是 2 型糖尿病最主要

危险因素之一, 糖尿病患者除表现为高血糖外, 还普遍存在脂代谢紊乱, 表现为血浆三酰甘油 (TG)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 和游离脂肪酸等水平显著升高^[9]。大量研究显示, 高水平游离脂肪酸一方面可干扰胰岛素信号转导, 引起胰岛素抵抗, 另一方面可诱导胰岛 β 细胞凋亡, 导致胰岛功能受损, 诱发 2 型糖尿病。因此, 抑制高浓度游离脂肪酸诱导的胰岛 β 细胞损伤和胰岛素抵抗是防治肥胖相关 2 型糖尿病的有效途径之一。本研究采用血清药理学方法, 观察四君子颗粒对 MIN6 小



注：A~E 分别为对照组、模型组、空白血清组、四君子颗粒高剂量组、四君子颗粒低剂量组。与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 3 四君子颗粒对棕榈酸诱导的 MIN6 细胞 GRP78、ATF4、CHOP、p-PERK 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 3 Effects of SGs on GRP78, ATF4, CHOP and p-PERK expression of palmitic acid-induced MIN6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

鼠胰岛 β 细胞的保护作用。结果显示，0.4 mmol/L 棕榈酸孵育 24 h 后，MIN6 细胞活力明显受损，细胞凋亡明显升高，这一结果与文献报道一致^[10]。四君子颗粒含药血清预孵 24 h，棕榈酸诱导的 MIN6 细胞损伤减轻，细胞凋亡也显著下降，而空白对照血清对棕榈酸诱导的细胞损伤和凋亡无明显影响，提示四君子颗粒含药血清可有效改善棕榈酸诱导的 MIN6 细胞损伤和凋亡。

游离脂肪酸可刺激胰岛 β 细胞合成与分泌胰岛素，而长期暴露于高浓度游离脂肪酸则会加重 β 细胞胰岛素分泌负荷^[11]。当胰岛素合成大量增加时，作为细胞内蛋白质合成与翻译后加工重要场所的内质网负担加重，大量未折叠或错误折叠蛋白在内质网腔内积聚，诱发内质网应激（endoplasmic reticulum stress, ERS）^[12]。一旦发生内质网应激，细胞首先启动未折叠蛋白反应（unfolded protein response, UPR）以缓解内质网应激，恢复内质网稳态。GRP78 合成增加是 UPR 标志性事件之一^[13]。本研究结果显示，暴露于棕榈酸 24 h 后，MIN6 细胞 GRP78 蛋白表达显著升高，说明棕榈酸诱发了

明显的内质网应激。四君子颗粒含药血清预孵 24 h 后可明显下调细胞内 GRP78 蛋白表达，而空白对照血清对 GRP78 表达无明显影响，提示四君子颗粒含药血清可有效改善棕榈酸诱导的 MIN6 细胞内质网应激。

生理条件下，GRP78 与内质网应激感受蛋白肌醇需求酶 1 α （inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α ）、活化转录因子 6（activating transcription factor 6, ATF6）和 RNA-依赖的蛋白激酶样内质网激酶（PRK like ER associated kinase, PERK）结合而使后者处于无活性状态。当大量未折叠蛋白在内质网腔内积聚时，一方面细胞代偿性合成 GRP78 增加；另一方面，结合于 3 种膜蛋白上的 GRP78 解离，转而去结合未折叠蛋白，游离出的 IRE-1 α 、PERK、ATF6 进而诱发内质网应激下游信号传递及相关基因表达^[13]。通过上述信号通路，UPR 可改变细胞代谢方式，促使细胞存活。但当内质网应激过于强烈或持续时间过久，UPR 无法使内质网恢复稳态时，则可诱导细胞凋亡。IRE-1 α 、PERK 和 ATF6 通路的活化均可上调 CHOP 蛋白表达，诱

导细胞凋亡，其中 PERK 途径在内质网应激诱导细胞凋亡中发挥主要作用^[14]。本研究结果显示，与棕榈酸孵育 24 h 后，MIN6 细胞内 ATF4 蛋白、磷酸化 PERK 及其下游蛋白 CHOP 表达均显著升高，而与四君子颗粒含药血清预孵可明显抑制上述蛋白表达，这一作用与四君子颗粒含药血清抑制 MIN6 细胞凋亡作用一致，提示四君子颗粒含药血清抑制棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡与抑制细胞内质网应激及 PERK 相关凋亡信号通路有关。

综上所述，四君子颗粒含药血清可有效抑制棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡，其机制与抑制内质网应激 PERK 信号通路有关。该研究结果提示，四君子颗粒防治 2 型糖尿病可能与保护胰岛 β 细胞、改善胰岛功能有关。

参考文献：

[1] Taylor R, Al-Mrabeh A, Sattar N. Understanding the mechanisms of reversal of type 2 diabetes[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(9): 726-736.

[2] Smith U, Kahn B B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids[J]. *J Intern Med*, 2016, 280(5): 465-475.

[3] Xiong X, Sun X, Wang Q, *et al.* SIRT6 protects against palmitate-induced pancreatic β-cell dysfunction and apoptosis[J]. *J Endocrinol*, 2016, 231(2): 159-165.

[4] Chen C, Cohrs C M, Stertmann J, *et al.* Human β cell mass and function in diabetes: recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis[J]. *Mol Metab*, 2017, 6(9): 943-957.

[5] 田 源, 运 锋, 陈依键. 益气健脾汤治疗 2 型糖尿病（脾气亏虚型）的临床疗效观察[J]. *中医药学报*, 2017, 45(4): 129-131.

[6] 张 勇, 张 莉, 陈志敏. 益气健脾汤辅助二甲双胍治疗脾气亏虚型 2 型糖尿病患者临床效果评价[J]. *内科*, 2019, 14(1): 23-26.

[7] 叶惠萍, 俞丽君. 四君子汤辅助治疗妊娠期糖尿病临床观察[J]. *新中医*, 2016, 48(6): 89-91.

[8] 唐保露, 张 旭, 袁 萍, 等. 四君子颗粒对大鼠糖尿病前期的改善作用及其机制研究[J]. *中成药*, 2020, 42(3): 610-615.

[9] Meex R C R, Blaak E E, van Loon L J C. Lipotoxicity plays a key role in the development of both insulin resistance and muscle atrophy in patients with type 2 diabetes[J]. *Obes Rev*, 2019, 20(9): 1205-1217.

[10] Biden T J, Robinson D, Cordery D, *et al.* Chronic effects of fatty acids on pancreatic beta-cell function; new insights from functional genomics [J]. *Diabetes*, 2004, 53 (Suppl 1): S159-165.

[11] 张海啸, 杨叔禹, 曹洪欣, 等. 平糖方药物血清急性抑制软脂酸刺激的 INS-1β 细胞胰岛素分泌[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(9): 780-782.

[12] Riahi Y, Israeli T, Cerasi E, *et al.* Effects of proinsulin misfolding on β-cell dynamics, differentiation and function in diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20 (Suppl 2), 95-103.

[13] Ibrahim I M, Abdelmalek D H, Elfiky A A. GRP78: a cell’ s response to stress[J]. *Life Sci*, 2019, 226: 156-163.

[14] Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, *et al.* The role of the PERK/ eIF2α/ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress[J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(6): 533-544.