

综述

锌指蛋白在结直肠癌中的作用

谢文强¹, 周音希², 金剑峰^{2*}, 杜乐^{3*}¹海南医学院药学院, 海口 571101; ²海南医学院生物化学教研室, 海口 571101;³海南医学院生物学教研室, 海口 571101)

摘要: 锌指蛋白(zinc finger protein, ZNF/ZFP)是一类具有手指状结构域的转录因子, 广泛存在于动物、植物及微生物体内。ZNF在多种肿瘤组织中表达, 通过调控下游靶基因的表达参与肿瘤的发生发展过程。ZNF表达异常与结直肠癌临床病理特征和预后密切相关。本文从结直肠癌的增殖、迁移和侵袭、凋亡、癌细胞干性等4种恶性行为角度, 阐述了近年来锌指蛋白家族成员(ZEB1/2、Gli1/3、PLAGL1/2、KLF4、Snail1、ZBTB7A、ZBTB7C、ZBTB16)在结直肠癌中的作用机制, 旨在为临床靶向治疗结直肠癌提供参考依据。

关键词: 结直肠癌; 锌指蛋白; 转录因子

Roles of zinc finger proteins in colorectal cancer

XIE Wenqiang¹, ZHOU Yinxi², JIN Jianfeng^{2*}, DU Le^{3*}¹School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571101, China;²Department of Biochemistry, Hainan Medical University, Haikou 571101, China;³Department of Biology, Hainan Medical University, Haikou 571101, China)

Abstract: Zinc finger protein (ZNF/ZFP) is a class of transcription factors with finger-like domain, which is widely found in animals, plants and microorganisms. ZNF is expressed in a variety of tumor tissues and participates in the development of tumors by regulating the expression of downstream target genes. Abnormal expression of ZNF is closely related to clinicopathological features and prognosis of colorectal cancer. In this review, the mechanisms of zinc finger protein family members (ZEB1/2, Gli1/3, PLAGL1/2, KLF4, Snail1, ZBTB7A, ZBTB7C, ZBTB16) in colorectal cancer were elaborated from the perspective of four malignant behaviors including proliferation, migration and invasion, apoptosis and stem cancer cells characteristics. This review will provide references for clinical targeted treatment of colorectal cancer.

Key Words: colorectal cancer; zinc finger protein; transcription factor

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的恶性消化道肿瘤, 发病率和死亡率在恶性肿瘤中位居第三^[1]。结直肠癌发生发展的机制极其复杂。有研究表明, 锌指蛋白的异常表达与结直肠癌

的发生发展及不良预后密切相关^[2,3]。本文综述了锌指蛋白家族成员在结直肠癌发生发展中的作用机制, 为临床靶向治疗结直肠癌提供参考依据。

收稿日期: 2022-11-10

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目(820RC632, 2019RC203); 海南省教育厅科学研究项目(Hnky2020-34); 海南医学院大学生创新创业训练计划项目(X202011810128, 202011810005)

第一作者: E-mail: 1778620237@qq.com

*通信作者: 金剑峰, E-mail: einfachjff@aliyun.com; 杜乐, E-mail: cgdule@hainmc.edu.cn

1 锌指蛋白的生物学功能

1.1 锌指蛋白的结构与功能

锌指蛋白是一类具有手指状结构域的转录因子,广泛存在于动、植物及微生物体内^[4]。由一系列重复结构的氨基酸和相隔特定距离的半胱氨酸组成功能结构域,与含有 Zn^{2+} 的锌指结构域结合,识别并结合核酸序列以调控基因表达^[5]。锌指蛋白不仅参与正常细胞增殖、分化、代谢等生物学活动,而且在肿瘤发生发展过程中也发挥重要作用。

1.2 锌指蛋白的分类

锌指蛋白根据其锌指结构域中半胱氨酸(Cys)和组氨酸(His)的数量和顺序不同可分为 C_2H_2 、 C_8 、 C_6 、 C_3HC_4 、 C_2HC 、 C_2HC_5 、 C_4 、 C_3H 、 C_4HC_3 。其中,以 C_2H_2 型最为常见。根据功能结构域的不同又可分为KRAB、SCAN、BTB/POZ、SNAG、SANT、PLAG六个亚型。其中,KRAB亚型最为常见^[6]。

2 锌指蛋白在结直肠癌中的作用及其分子机制

锌指蛋白家族主要包括锌指E盒结合蛋白(zinc finger E-box binding protein, ZEB)、含BTB结构域的锌指蛋白(zinc finger and BTB domain contains, ZBTB)、胶质瘤相关癌基因蛋白(glioma-associated oncogene, Gli)、Krüppel样转录因子(krüppel-like factors, KLF)、多形性腺瘤基因(pleomorphic adenoma gene, PLAG)、Snail家族、含KRAB结构域的锌指蛋白(KRAB-associated protein, KAP)等^[7]。锌指蛋白通过调节结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡和干细胞特性等恶性行为影响结直肠癌的发生发展。

2.1 锌指蛋白对结直肠癌细胞增殖的影响

肿瘤细胞无限增殖是结直肠癌恶性行为之一。锌指蛋白通过调节癌基因、抑癌基因及其他关键基因的转录水平,从而直接或间接影响结直肠癌细胞的增殖能力。能够调节结直肠癌细胞增殖能力的锌指蛋白包括Krüppel样转录因子4(krüppel-like factors 4, KLF4)、Snail1、含BTB结构域的锌指蛋白16(zinc finger and BTB domain contains 16,

ZBTB16)、ZBTB7C、多形性腺瘤基因L1(pleomorphic adenoma gene like 1, PLAGL1)。KLF4被称为GKLF,其编码基因定位于9q31,编码470个氨基酸,为 C_2H_2 型锌指蛋白。该家族包括KLF1-KLF18共18个成员。在食管癌、胃癌、膀胱癌中,KLF4表达下调,发挥抑癌作用^[8]。在结直肠癌细胞中,KLF4可维持结肠腺瘤样息肉病蛋白(adenomatous polyposis coil, APC)基因稳定性,负调控 β -catenin,拮抗WNT/ β -catenin通路^[9]。在细胞中心体中,KLF4还能稳定p53基因表达水平,抑制细胞发生过度有丝分裂,避免细胞无限增殖^[10]。KLF4能够促进下游肿瘤抑制因子N-myc下游调节基因2(N-myc downstream regulator gene 2, NDRG2)表达,后者促进抑癌基因p21表达,进一步下调周期蛋白Cyclin D1表达,诱导细胞周期阻滞,从而抑制细胞增殖^[11]。锌指蛋白Snail家族包括Snail1、Slug和Smuc,与多种癌症的发生发展密切相关^[12]。Snail1的编码基因定位于20q13.2,属于 C_2H_2 亚型锌指蛋白,该蛋白含有264个氨基酸残基。在结直肠癌细胞中Snail1能够与1,25-二羟维生素D₃受体(vitamin D₃ receptors, VDR)基因启动子区域直接结合,抑制VDR基因转录,后者通过与 β -catenin结合形成复合物阻断WNT/ β -catenin信号通路,从而抑制细胞增殖^[13]。ZBTB16通过结合miR-4319启动子,增强其转录活性,miR-4319上调通过抑制含ANK结构域和BTB结构域基因1(ankyrin repeat and BTB domain 1, ABTB1)表达水平,从而降低结直肠癌细胞增殖能力^[14]。在缺氧条件下,结直肠癌组织中ZBTB7A受NF- κ B抑制,其表达水平下降,进而促进细胞增殖^[15]。在无氧条件下,单羧酸转运体4(monocarboxylate transporter 4, MCT4)将癌细胞代谢产生的乳酸排出胞外,维持胞内中性pH环境。MCT4上含有缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)的结合位点缺氧反应元件(hypoxia-responsive element, HRE)和ZBTB7A的结合位点FBI-1反应元件(FBI-1 responsive element, FRE),当HIF-1与HRE结合时促进MCT4表达,然而,当ZBTB7A一旦结合FRE,可同时占据HRE,导致HIF-1与HRE结合受阻,从而下调MCT4表达,抑制癌细胞增殖。ZBTB7C又被称为Kr-pok,在结直肠癌组织中低表达,其表达水平与患者预后呈正

相关^[16]。ZBTB7C在淋巴转移或晚期TNM分期结直肠癌组织中下调更明显, 可通过抑制癌细胞谷氨酰胺代谢, 使免疫细胞获得多余的谷氨酰胺, 促进免疫细胞增殖, 进而抑制癌细胞增殖^[17]。此外, PLAGL1抑制细胞周期蛋白Cyclin D₁表达, 阻滞细胞周期于G₁期, 进而抑制细胞增殖^[18,19], 提示其发挥抑癌作用。综上所述, WNT/ β -catenin通路是锌指蛋白参与调节结直肠癌细胞增殖能力的关键通路, 锌指蛋白也能够通过诱导细胞周期阻滞从而抑制结直肠癌细胞增殖。

2.2 锌指蛋白对结直肠癌细胞迁移和侵袭能力的影响

肿瘤细胞发生迁移和侵袭是影响患者预后的关键因素。明确锌指蛋白在结直肠癌迁移和侵袭中的作用对结直肠癌临床靶向治疗具有重要意义。能够影响结直肠癌迁移和侵袭的锌指蛋白包括锌指E盒结合蛋白1/2(zinc finger E-box binding protein 1/2, ZEB1/2)、Snail1、胶质瘤相关致癌基因1/3(glioma-associated oncogene 1/3, Gli1/3)。在结直肠癌中, Snail1与促转移基因PRL-3间相互促进表达, 形成正反馈回路, 促进上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及细胞的迁移和侵袭^[20]。Snail1促转移作用还可能与四核苷酸重复序列(elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats, EMAS)处的微卫星改变有关^[21]。在结直肠癌细胞中, ZEB2可通过诱导活化EMT, 增强肿瘤细胞的迁移、侵袭能力^[22]。ZEB2还能促进血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)表达, 加速结直肠癌组织中血管形成, 为癌细胞的血行转移创造有利条件^[23]。ZEB1可通过招募DNA甲基转移酶结合E-钙黏蛋白(*E-cadherin*)基因启动子, 或与组蛋白去乙酰化酶形成复合物, 结合*E-cadherin*基因启动子共同抑制*E-cadherin*表达^[24]。此外, 在结直肠癌组织中常可见人抗原R蛋白结合PLAGL2的3'非编码区稳定其表达, PLAGL2还可促进下游基因ZEB1表达, 启动EMT发生, 促进癌细胞远端转移与侵袭^[20,25]。Gli1基因定位于12q13.2-13.3, 编码1106个氨基酸。在结直肠癌细胞中, 其表达水平升高, 上调下游靶点叉头框蛋白M1表达, 启动EMT, 促进细胞迁移和侵袭^[26]。

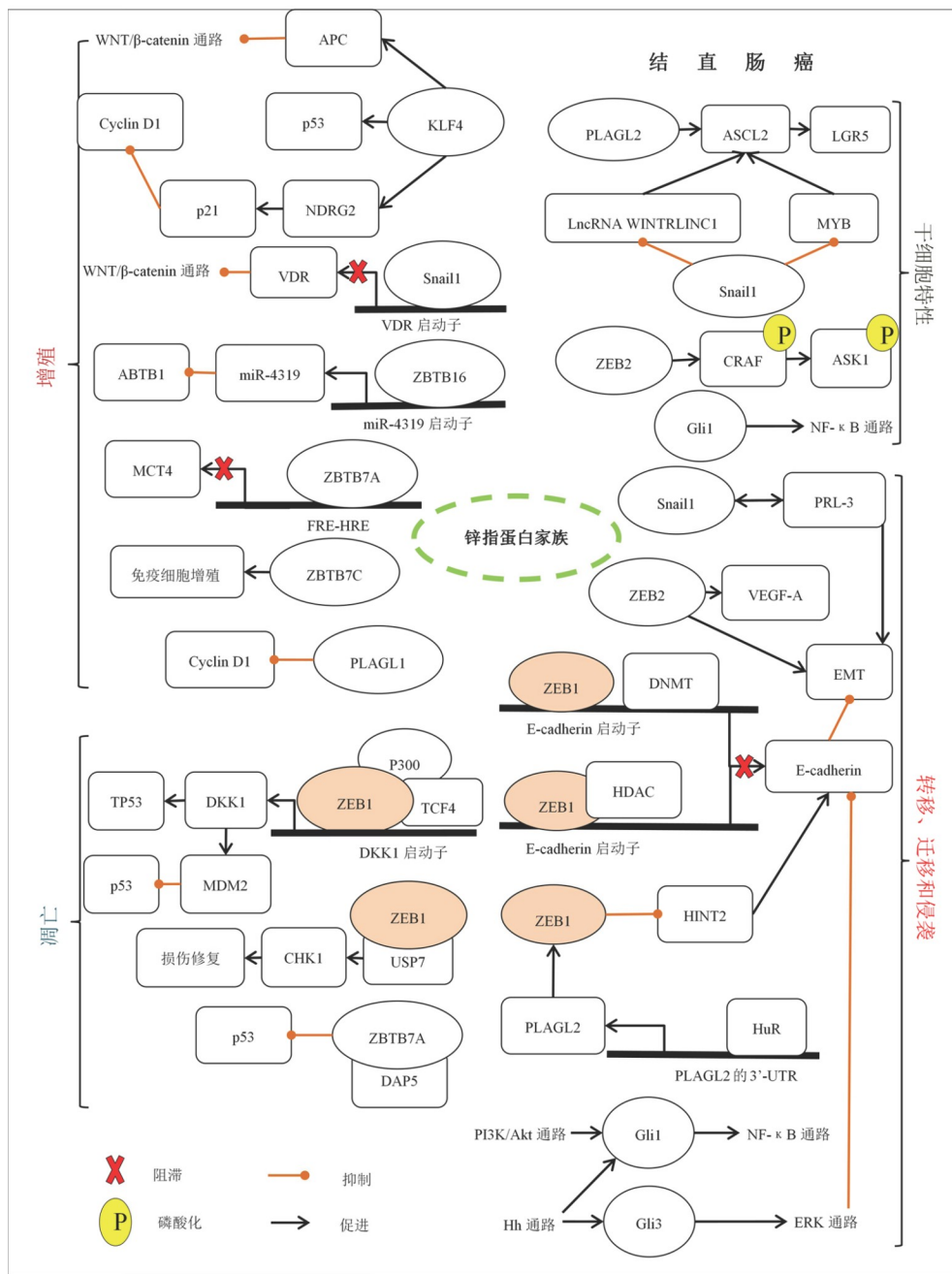
Hh通路与PI3K/Akt通路二者均能够激活Gli1表达, 活化NF- κ B通路, 从而促进细胞迁移、侵袭, 并增强癌细胞干性^[27], 因此Gli1被作为肿瘤干细胞标志物。Gli3基因定位于7p13, 在结直肠癌细胞中, Gli3能够与Hh通路和ERK通路形成Hh通路/Gli3/ERK通路轴, 引起ZEB1、波形蛋白表达升高, 下调*E-cadherin*表达, 促进EMT进程^[8]。综上所述, EMT是调控结直肠癌细胞迁移和侵袭的关键步骤, 锌指蛋白偶联NF- κ B通路、Hh通路、ERK通路等, 影响EMT关键蛋白*E-cadherin*表达, 最终影响结直肠癌细胞迁移和侵袭。

2.3 锌指蛋白对结直肠癌细胞凋亡的影响

在癌细胞中, 细胞的程序性死亡能力往往受到抑制, 细胞增殖与细胞凋亡之间的动态平衡过程被打破, 影响结直肠癌细胞凋亡能力的锌指蛋白主要有ZEB1和ZBTB7A。在结直肠癌细胞中, ZEB1与转录因子4协同招募p300并结合Wnt拮抗剂*Dickkopf1*基因启动子, 促进*Dickkopf1*转录, 上调TP53 E3泛素连接酶和鼠双微体2(murine double minute 2, MDM2)表达, 靶向降解p53; ZEB1还能抑制p53下游靶点衰老因子H2AFY表达, 最终导致癌细胞衰老、凋亡进程受阻^[28]。ZEB1还能够维持泛素化肽酶7(ubiquitin specific peptidase 7, USP7)、细胞周期检验点激酶1(cell cycle checkpoint kinase 1, CHK1)蛋白稳定性, USP7激活CHK1去泛素化活性, 使其免于被泛素化降解^[29], 进而促进DNA损伤修复。在结直肠癌细胞中, 蛋白酶激活受体2表达活性高, 可诱导ZBTB7A表达上调, 高表达的ZBTB7A与死亡相关蛋白5(death associated protein 5, DAP5)结合形成ZBTB7A-DAP5复合物, 该复合物靶向抑制促凋亡基因p53的转录, 进而抑制细胞凋亡^[17]。敲低ZBTB7A后结果则相反, 提示ZBTB7A具有致癌作用^[14]。综上所述, 凋亡基因p53是锌指蛋白调节结直肠癌细胞凋亡的重要靶基因, ZEB1和ZBTB7A均通过下调p53表达水平发挥抑制凋亡和促癌作用。

2.4 锌指蛋白对结直肠癌细胞干性的影响

结直肠癌细胞干性改变能够影响结直肠癌放、化疗效果, 干性增强的结直肠癌患者治疗后复发的可能性将增加。如前文所述, Snail1促进结直肠



APC: 结肠腺瘤样息肉病蛋白基因(adenomatous polyposis coil); KLF4: Krüppel样因子4(krüppel-like factors 4); ZNF: 锌指蛋白(zinc finger protein); NDRG2: N-myc下游基因2(N-myc downstream regulator gene 2); VDR: 维生素D受体(vitamin D receptor); ZBTB: 含锌指和BTB结构域转录因子(zinc finger and BTB domain contains); MCT4: 单羧酸转运体4(monocarboxylate transporter 4); PLAGL: 多形性腺瘤基因样蛋白(pleomorphic adenoma gene like); ZEB: E-盒结合锌指蛋白(zinc finger E-box binding protein); TCF4: 转录因子4(transcription factor 4); DKK1: Wnt通路抑制因子Dickkopf-1; MDM2: 鼠双微体基因2(murine double minute 2); USP7: 泛素特异性肽酶7(ubiquitin specific peptidase 7); CHK1: 细胞周期检查点激酶1(cell cycle checkpoint kinase 1); DAP5: 死亡相关蛋白5(death associated protein 5); ASCL2: 无刚毛鳞甲复合体样蛋白2(achaete-scute homologue 2); LGR5: 富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5); LncRNA: 长链非编码RNA(long non-coding RNA); ASK1: 凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1); CRAF: C-Raf原癌基因丝苏氨酸蛋白激酶(c-Raf proto-oncogene serine/threonine protein kinase); Gli: 胶质瘤相关癌基因(glioma-associated oncogene); PRL-3: 再生肝脏蛋白磷酸酶-3(phosphatase of regenerating liver-3); VEGF-A: 血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A); EMT: 上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition); DNMT: DNA甲基转移酶(DNA methyl transferase); HDAC: 组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase); HINT2: 组氨酸三联体核苷酸结合蛋白2(histidine triad nucleotide binding protein); HuR: 人抗原R蛋白(human antigen R)

图1 锌指蛋白在结直肠癌中的调控网络图

癌细胞迁移侵袭, 却抑制结直肠癌干细胞特性^[13]。研究显示, 在结直肠癌组织中, *Snail1*抑制原癌基因MYB和长链非编码RNA WINTRLINC1表达, 后者下调细胞干性标志物无刚毛鳞甲复合体样蛋白2(achaete-scute homologue 2, ASCL2)。ZEB2表达上调可促进原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(c-Raf proto-oncogene serine/threonine protein kinase, CRAF)表达, 而CRAF通过激活MEK/ERK信号通路发挥促癌作用^[30]; ZEB2通过抑制凋亡信号调节激酶(apoptosis signal-regulating kinase, ASK)活性, 维持结直肠癌干细胞特性。前文提及Gli1除了促进癌细胞迁移、侵袭能力以外, 也能够增强癌细胞干性^[27]。综上所述, 对结直肠癌细胞多个恶性行为比如增殖、迁移侵袭、凋亡和干细胞特性均有作用的锌指蛋白, 无疑将成为后续研究者关注的重点分子, 进一步深入挖掘这些锌指蛋白在结直肠癌中的作用机制, 对结直肠癌临床靶向治疗具有重要意义。

3 小结与展望

作为真核生物最大的转录因子家族, 锌指蛋白通过调控下游靶基因调节结直肠癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和干细胞特性等表型(图1)。锌指蛋白KLF4、ZBTB7A、ZBTB7C、ZBTB16、PLAGL1、*Snail1*等主要调节结直肠癌细胞增殖; ZEB1、ZEB2、Gli1、Gli3、KLF4、PLAGL2、*Snail1*等主要影响结直肠癌细胞迁移和侵袭行为; 锌指蛋白ZEB2、PLAGL2、*Snail1*、Gli1等在结直肠癌干细胞特性方面发挥重要作用; ZEB1、ZBTB7A主要通过调控癌细胞凋亡参与结直肠癌的发生发展。由于锌指蛋白家族数量庞大, 还有大量相关锌指蛋白在结直肠癌中的作用机制尚不明确, 需要进一步的探索和研究。深入研究不同锌指蛋白在结直肠癌中的作用机理, 将为开发靶向治疗结直肠癌的药物提供新策略。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD. Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33
- [2] Han JX, Tao ZH, Qian Y, et al. ZFP90 drives the initiation of colitis-associated colorectal cancer via a microbiota-dependent strategy. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-20
- [3] Haibara H, Yamazaki R, Nishiyama Y, et al. YPC-21661 and YPC-22026, novel small molecules, inhibit ZNF143 activity *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci*, 2017, 108(5): 1042-1048
- [4] 艾廉杰, 朴大勋. 结肠癌中相关锌指蛋白的研究进展. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(6): 567-570
- [5] Ye B, Yang G, Li Y, et al. ZNF143 in chromatin looping and gene regulation. *Front Genet*, 2020, 11: 338
- [6] Ecco G, Imbeault M, Trono D. KRAB zinc finger proteins. 2017, 144(15): 2719-2729
- [7] Kim WG, Kim JY, Park DY. Simple classifiers for molecular subtypes of colorectal cancer. *Arab J Gastroenterol*, 2017, 18(4): 191-200
- [8] Shen M, Zhang Z, Wang P. GLI3 promotes invasion and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8889986
- [9] Huang K, Zhang X. Hypoxia tumor microenvironment activates GLI2 through HIF-1 α and TGF- β 2 to promote chemotherapy resistance of colorectal cancer. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 2032895
- [10] Yang VW, Liu Y, Kim J, et al. Increased genetic instability and accelerated progression of colitis-associated colorectal cancer through intestinal epithelium-specific deletion of *Klf4*. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(1): 165-176
- [11] Ma Y, Wu L, Liu X, et al. KLF4 inhibits colorectal cancer cell proliferation dependent on NDRG2 signaling. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 975-984
- [12] Strubberg AM, Veronese Paniagua DA, Zhao T, et al. The zinc finger transcription factor PLAGL2 enhances stem cell fate and activates expression of ASCL2 in intestinal epithelial cells. *Stem Cell Rep*, 2018, 11(2): 410-424
- [13] Brzozowa M, Michalski M, Wyrobiec G, et al. The role of *Snail1* transcription factor in colorectal cancer progression and metastasis. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(4): 265-270
- [14] Huang L, Zhang Y, Li Z, et al. MiR-4319 suppresses colorectal cancer progression by targeting ABTB1. *UEG J*, 2019, 7(4): 517-528
- [15] Choi SH, Kim MY, Yoon YS, et al. Hypoxia-induced RelA/p65 derepresses SLC16A3 (MCT4) by downregulating ZBTB7A. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Regulatory Mech*, 2019, 1862(8): 771-785
- [16] Chen X, Jiang Z, Pu Y, et al. Zinc finger and BTB domain-containing 7C (ZBTB7C) expression as an independent prognostic factor for colorectal cancer and its relevant molecular mechanisms. *Am J Transl Res*, 2020, 12(8): 4141-4159
- [17] Chen X, Jiang Z, Wang Z, et al. The prognostic and immunological effects of ZBTB7C across cancers: friend or foe? *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(9): 12849-12864 d

- [18] Kowalczyk AE, Krazinski BE, Godlewski J, et al. Altered expression of the *PLAGL1* (*ZAC1/LOT1*) gene in colorectal cancer: Correlations to the clinicopathological parameters. *Int J Oncol*, 2015, 47(3): 951-962
- [19] 项振飞, 陆妙珍, 张欢乐, 等. *PLAGL1*在结直肠癌中的表观遗传学改变及其机制. 温州医科大学学报, 2015, 45(6): 430-433, 436
- [20] Su C, Li D, Li N, et al. Studying the mechanism of *PLAGL2* overexpression and its carcinogenic characteristics based on 3'-untranslated region in colorectal cancer. *Int J Oncol*, 2018, 52(5): 1479-1490
- [21] Mohammadpour S, Torshizi Esfahani A, Karimpour R, et al. High expression of *Snail1* is associated with EMAS and poor prognosis in CRC patients. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2019, 12(Suppl1): S30-S36
- [22] Safaee S, Fardi M, Hemmat N, et al. Silencing *ZEB2* induces apoptosis and reduces viability in glioblastoma cell lines. *Molecules*, 2021, 26(4): 901
- [23] Li W, Cai S, Wang L, et al. *HINT2* downregulation promotes colorectal carcinoma migration and metastasis. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 13521-13531
- [24] Lindner P, Paul S, Eckstein M, et al. EMT transcription factor *ZEB1* alters the epigenetic landscape of colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 147
- [25] Wu L, Zhou Z, Han S, et al. *PLAGL2* promotes epithelial-mesenchymal transition and mediates colorectal cancer metastasis via β -catenin-dependent regulation of *ZEB1*. *Br J Cancer*, 2020, 122(4): 578-589
- [26] Wang Q, Wei X, Hu L, et al. Hedgehog-Gli2 signaling promotes chemoresistance in ovarian cancer cells by regulating *MDR1*. *Front Oncol*, 2021, 11: 794959
- [27] Tanigawa S, Fujita M, Moyama C, et al. Inhibition of *Gli2* suppresses tumorigenicity in glioblastoma stem cells derived from a *de novo* murine brain cancer model. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(12): 1339-1352
- [28] Lee JY, Fan CC, Chou NL, et al. *PHRF1* promotes migration and invasion by modulating *ZEB1* expression. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0236876
- [29] de Barrios O, Györfy B, Fernández-Aceñero MJ, et al. *ZEB1*-induced tumorigenesis requires senescence inhibition via activation of *DKK1*/mutant *p53*/*Mdm2*/*CtBP* and repression of *macroH2A1*. *Gut*, 2017, 66(4): 666-682
- [30] Yang LP, Lin Q, Mu XL. *MicroRNA-155* and *FOXP3* jointly inhibit the migration and invasion of colorectal cancer cells by regulating *ZEB2* expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14): 6131-6138