

基于氧化应激探讨参附注射液延缓 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的作用及机制

孙英新, 张 同, 吴旦斌, 孙 淳, 卢 斌, 姜希娟*
(天津中医药大学病理教研室, 天津 300193)

摘要: **目的** 探讨参附注射液对高脂喂养 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的影响, 从氧化应激角度探讨其抗动脉粥样硬化机制。**方法** C57 小鼠作为对照, 高脂喂养 ApoE^{-/-} 小鼠 20 周后随机分为模型组、参附组, 连续给药 4 周。测定小鼠血脂水平, ELISA 法检测 MPO、NOX4 水平, 羟胺法测定 T-SOD 活力, TBA 法检测 MDA 水平; 大体油红 O 及主动脉窦 HE 染色观察斑块形成; real time qPCR 法检测 *Nrf2*、*Keap1* mRNA 表达。**结果** 与对照组比较, 模型组 TG、TC、LDL 升高, HDL 降低; 血清 SOD 活性降低, MPO、NOX4 和 MDA 含量升高; 主动脉 *Nrf2* 和 *Keap1* mRNA 表达下调; 较于与模型组比较, 参附组血脂变化不明显, 斑块面积减小; 参附注射液干预后, 抑制氧化应激水平, 上调 *Nrf2* 和 *Keap1* mRNA 表达。**结论** 参附注射液通过激活 *Nrf2*, 干预相关酶类, 进而抑制氧化应激水平抗动脉粥样硬化。

关键词: 动脉粥样硬化; ApoE 基因敲除小鼠; 氧化应激; 中药; 参附注射液

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1015-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.002

An investigation of oxidative stress based effect and mechanism of Shenfu Injection on atherosclerosis of ApoE^{-/-} mice

SUN Ying-xin, ZHANG Tong, WU Dan-bin, SUN Chun, LU Bin, JIANG Xi-juan*
(Department of Pathology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effect of Shenfu Injection on atherosclerosis (AS) models of high-fat apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice, and to explore its anti-atherosclerosis mechanism through the observation of oxidative stress (OS) variation. **METHODS** C57 mice were used as controls. ApoE^{-/-} mice fed with 20-week high fat diet were randomly divided into model group, Shenfu group for subsequent 4-week continuous corresponding intervention, after which the mice had their blood lipid levels measured, their levels of MPO and NOX4 identified by ELISA, and their T-SOD activity determined by hydroxylamine method, their MDA level detected by TBA, their plaque formation observation achieved by HE staining of aortic gross and red O of all the aorta, and their *Nrf2* mRNA expression detected by real time qPCR method. **RESULTS** Compared with the control group, the model group manifested with increased contents of TG, TC, LDL, decreased HLD; decreased activity of SOD, increased contents of MPO, NOX4 and MDA, and down-regulated expression of aortic *Nrf2* and *Keap1* mRNA. Compared with the model group, Shenfu Injection group was observed with no obvious blood lipid level change, but a reduction of plaque area, and an effective inhibition on OS as revealed by improved levels of *Nrf2* and *Keap1* mRNA. **CONCLUSION** Shenfu Injection can activate *Nrf2* and interfere the relevant enzymes, thus prevents the atherosclerosis progression through OS reduction.

KEY WORDS: atherosclerosis (AS); ApoE knockout mice; oxidative stress (OS); traditional Chinese medicine

收稿日期: 2017-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573733); 天津市科技计划项目 (16ZXMJSY00060); 研究生创新基金 (ZXYCX201605)

作者简介: 孙英新 (1990—), 女, 硕士生, 研究方向为中医药防治心脑血管疾病。Tel: (022) 59596279, E-mail: 957299773@qq.com

* 通信作者: 姜希娟 (1972—), 女, 博士, 教授, 从事中西医结合防治心脑血管疾病的研究。Tel: (022) 59596279, E-mail: xijuan-jiang@foxmail.com

cine; Shenfu Injection

世界卫生组织报告, 2012年动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)所致的心肌梗死、心力衰竭等心血管事件死亡人数为740万, 占总死亡人数的13.2%, 其死亡率较2000年上升23.3%, 成为全球首位死因, 并呈持续上升趋势^[1]。近年来, 从信号传导和基因调控水平的研究揭示, 氧化应激(Oxidative Stress, OS)学说是动脉粥样硬化发病机制的重要组成部分, 是AS发生、发展, 从简单斑块到复杂斑块的重要促进因素, 而抗氧化应激成为治疗AS的重要靶点^[2-3]。

参附注射液由红参、黑附片提取物组成, 其主要有效成分为人参皂苷及乌头碱, 常用于四肢厥冷、大汗、虚脱等阳气脱证, 这些症状类似现代医学“心力衰竭”的表现^[4-5]。AS所致的冠心病是心力衰竭最常见的基础疾病, 因此, 当前参附注射液广泛应用于冠心病的治疗。其可通过扩张冠状动脉、改善心肌能量代谢等, 显示出良好的提高心功能之功效^[6]。鉴于中药多靶点起效及人参、黑附片良好的抗氧化功效, 提示干预氧化应激, 延缓AS斑块发展, 亦是参附注射液治疗冠心病、提高心功能的机制。故本研究通过腹腔注射参附注射液干预ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型, 检测动脉粥样硬化及氧化应激相关指标, 以期阐明参附注射液延缓AS的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用8~10周龄SPF级雄性ApoE^{-/-}小鼠(品系C57BL/6J)作为模型动物, 选用同周龄雄性C57BL/6J野生型小鼠作为对照动物, 体质量21~29g, 实验动物购自北京大学医学部实验动物中心, 动物生产许可证号SCXK(京)2014-003。

1.2 动物饲料 ApoE^{-/-}小鼠饲以21%脂肪和0.15%胆固醇“高脂饲料”, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.3 仪器与试剂 紫外可见分光光度计(756MC, 上海); 荧光定量PCR仪(ABI, 美国); 血脂检测试剂盒、油红O染色液、血清总超氧化物歧化酶(T-SOD)及丙二醛(MDA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 髓过氧化物酶(MPO)和NADPH氧化酶4(NOX4)ELISA试剂盒均购自武汉优尔生(USCN)公司; RT-PCR试剂盒购自北京天根生化科技公司; 引物序列由上海

生工合成; 参附注射液(SFI)购自雅安三九药业有限公司(国药准字Z51020664), 其余均为市售分析纯。

1.4 动物模型的建立及分组 适应性饲养1周后, C57BL/6J野生型小鼠饲以普通饲料, 作为对照组; ApoE^{-/-}小鼠饲以“高脂饲料”, 总周期为24周以复制AS模型。高脂饮食20周后, 将ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组和参附组($n=20$), 参附组, 腹腔注射成人等效剂量的参附注射液(15.6 mL/kg, 其中红参和附片生药量分别为1 mg/mL, 2 mg/mL), 模型组, 腹腔注射等体积的生理盐水, 干预时间4周。本研究动物实验得到天津中医药大学动物管理委员会批准实施。

1.5 指标检测

1.5.1 血清学指标的检测 干预结束后, 内眦取血, 静置30 min, 于4℃ 3 000 r/min离心15 min, 收集血清, -80℃冻存备用。血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平检测, 采用血脂试剂盒; T-SOD水平测定采用羟胺法, MDA水平测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法, MPO和NOX4采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测, 具体步骤参照检测说明书进行。

1.5.2 全主动脉斑块观察 剪开右心耳, 快速以磷酸盐缓冲液从左心室进行灌流, 至右心房流出澄清液体为止。分离、切取主动脉全长, 体视镜下仔细剥离外膜, 剖开、展平、福尔马林固定24 h, 60%异丙醇润洗10 min, 油红O染液浸染10 min, 70%乙醇分化、水洗, 直至动脉粥样硬化斑块呈鲜红色, 其余部分呈白色为止。取出动脉, 置于载玻片上、铺平、拍照后, 用Image-Pro Plus 6.0数据分析软件, 分析红染部分(斑块)面积占全动脉面积的百分比。

1.5.3 主动脉根部斑块病理学观察 分离小鼠心脏, 福尔马林固定, 行常规石蜡连续切片, HE染色。每5张连续切片留取1张用于观察统计。通过Leica Qwin Image Processing and Analysis软件分析切片, 测量AS斑块横截面积(PA)、血管管腔横截面积(LA), 计算校正斑块面积(斑块面积/血管管腔面积, PA/LA), 以百分比(%)表示。

1.5.4 real-time qPCR检测 *Nrf2*和*Keap1* mRNA的表达 采用TRIZOL提取主动脉总RNA, 测定

RNA水平及纯度。以总RNA为模板，按照RT试剂盒步骤反转录成cDNA；以cDNA为模板进行PCR扩增，以GAPDH为内参，目的基因*Nrf2*和*Keap1*引物序列见表1。扩增条件为95℃预变性15 min，95℃变性10 s，60℃退火30 s，72℃延伸1 min，循环40次。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算样品中目的基因相对表达量。

表1 *Nrf2*和*Keap1*引物序列

Tab. 1 *Nrf2*和*Keap1* primer sequences

| 名称 | 引物序列(5'-3') | 扩增片段长度/bp |
|--------------|--------------------------|-----------|
| GAPDH | 正向 GGTGTCTCTCGCAGCTTCA | 183 |
| | 反向 TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC | |
| <i>Nrf2</i> | 正向 CCCCTGGAAGTGTCAAACAG | 120 |
| | 反向 CACATTGGGATTCACGCATA | |
| <i>Keap1</i> | 正向 GCCAAGCAGGAGGAGTTCTT | 121 |
| | 反向 ATTTGACCCAGTCGATGCAC | |

1.5.5 统计学处理及方法 采用SPSS 18.0统计软件包进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组均数间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用LSD-t法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参附注射液对ApoE^{-/-}小鼠血脂水平的影响 高脂喂养ApoE^{-/-}小鼠的血清TC、TG、LDL-C水平，均明显高于对照组，依次为 $P < 0.01$ ， $P < 0.01$ 或 < 0.05 ；与对照组相比，HDL-C变化不明显($P > 0.05$)。给予参附注射液腹腔注射4周，对血清TC、TG、LDL-C和HDL-C无明显影响，与模型组相比，无统计学差异($P > 0.05$)，见表2。

表2 各组血脂变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 2 Levels of blood lipids in various groups($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| 组别 | TG/ (mmol·L ⁻¹) | TC/ (mmol·L ⁻¹) | LDL-C/ (mmol·L ⁻¹) | HDL-C/ (mmol·L ⁻¹) |
|-----|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 对照组 | 3.67 ± 0.49 | 15.22 ± 2.22 | 11.73 ± 2.29 | 2.74 ± 1.19 |
| 模型组 | 7.38 ± 2.41** | 21.54 ± 2.36** | 15.63 ± 4.19* | 2.48 ± 0.31 |
| 参附组 | 5.37 ± 1.31 | 20.08 ± 2.29 | 10.77 ± 3.31 | 2.42 ± 0.54 |

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与对照组比较,* $P < 0.05$

2.2 参附注射液可有效降低主动脉斑块面积百分比 主动脉大体油红O染色结果(图1,表3)显示,对照组主动脉内膜光滑,未见动脉粥样硬化斑块;经24周高脂饮食可明显诱发ApoE^{-/-}小鼠主动脉AS病变形成,主动脉内膜可见散在、大面积较厚的红染斑块,斑块面积达(15.88 ± 4.19)%;高脂饮食的同时,给予参附注射液干预4周,可以有效减小主动脉内膜斑块面积(11.02 ± 2.41)%,与模型动物相比,有统计学意义($P < 0.05$)。



图1 各组主动脉油红O染色结果

Fig. 1 Results of oil red O staining of various groups

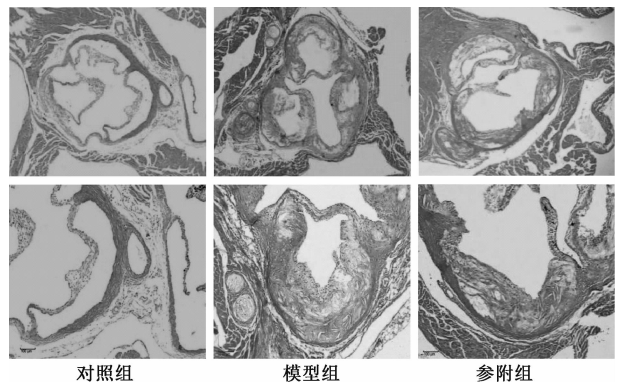
表3 参附注射液对ApoE^{-/-}主动脉内膜动脉粥样硬化病变面积的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 3 Effects of Shenfu Injection on atherosclerotic lesion area($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| 组别 | 主动脉内膜斑块面积百分比/% |
|-----|----------------|
| 对照组 | 5.48 ± 1.51 |
| 模型组 | 15.88 ± 4.19** |
| 参附组 | 11.02 ± 2.41# |

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

2.3 参附注射液对ApoE^{-/-}小鼠主动脉根部斑块形成的影响 主动脉根部HE染色结果(图2,表4)显示,小鼠高脂喂养24周后,出现明显而典型的粥样斑块,纤维帽、胆固醇结晶、泡沫细胞并存,接近人类斑块形态。高脂饲养20周,同时给予参附注射液干预后,结果显示校正斑块面积(60.1 ± 4.4%)较模型动物(46.5 ± 3.3)%减小, $P < 0.01$ 。



上图HE, 40; 下图HE, 100

图2 各组主动脉根部斑块面积

Fig. 2 Plaque area of the aortic root of various groups

2.4 参附注射液对ApoE^{-/-}小鼠氧化应激的影响 ApoE^{-/-}小鼠“高脂饮食”24周后,血清T-SOD活力下降,而MDA、MPO、NOX4水平升高,

表4 不同组别主动脉根部斑块面积的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Group variations in plaque area of aortic root ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 斑块面积/mm ² | 斑块校正面积/% |
|-----|---|----------------------|--------------|
| 对照组 | 4 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 模型组 | 6 | 0.932 ± 0.103** | 60.1 ± 4.4** |
| 参附组 | 6 | 0.707 ± 0.043## | 46.5 ± 3.3## |

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

与对照组相比,差异有显著性,** $P < 0.01$;给予参附注射液干预后,ApoE^{-/-}小鼠血清 T-SOD 活力增

表5 参附注射液对 ApoE^{-/-}小鼠血清 T-SOD、MDA、MPO 和 NOX4 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 5 Effects of Shenfu Injection on serum T-SOD, MDA, MPO and NOX4 in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | T-SOD/(U·mL ⁻¹) | MDA/(ng·mL ⁻¹) | MPO/(ng·mL ⁻¹) | NOX4/(ng·mL ⁻¹) |
|-----|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 对照组 | 437.8 ± 130.07 | 311.2 ± 80.69 | 2364.4 ± 391.74 | 22.1 ± 6.14 |
| 模型组 | 174.6 ± 48.19** | 550.9 ± 95.64** | 3382.9 ± 210.96** | 45.6 ± 8.89** |
| 参附组 | 296.5 ± 69.88# | 312.5 ± 64.13## | 2535.3 ± 771.02# | 23.3 ± 5.80## |

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

表6 参附注射液对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 Nrf2 和 Keap1 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 6 Effects of Shenfu Injection on the expression of aortic Nrf2 and Keap1 mRNA in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | Nrf2 | Keap1 |
|-----|--------------|--------------|
| 对照组 | 1.01 ± 0.18 | 1.01 ± 0.12 |
| 模型组 | 0.76 ± 0.13* | 0.70 ± 0.20* |
| 参附组 | 0.91 ± 0.07# | 0.90 ± 0.06# |

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

3 讨论

本研究发现高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠出现血脂代谢异常,主动脉全长和主动脉根部有明显粥样硬化斑块形成,血清 SOD 活性降低、MPO、NOX4 和 MDA 含量升高,呈现明显氧化应激状态,主动脉 Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达下调,说明 ApoE^{-/-}小鼠 AS 模型复制成功,并存在氧化应激损伤。参附注射液并不能有效改变高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠的血脂水平,但可减小主动脉斑块面积,减轻氧化应激水平和提高 Nrf2 和 Keap1 mRNA 的表达,提示参附注射液抗高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠 AS 机制可能与抑制高脂所致的氧化应激有关。

ApoE^{-/-}小鼠 AS 模型存在氧化应激损伤。高脂血症是 AS 的物质基础,但 AS 不仅与血脂异常本身有关,亦与血脂异常继发的氧化应激密切相关,有研究甚至认为氧化应激贯穿 AS 的始终,通过直接氧化损伤及信号介导损伤 2 个方面促进 AS 发生发展^[7-8]。高脂血症 ApoE^{-/-}小鼠通过激活多种信号

途径,导致氧化应激发生,使动脉内膜,尤其是内皮细胞发生氧化应激损伤,使胆固醇易于进入动脉内膜,并继发炎症反应,这是氧化应激参与 AS 的重要机制^[9]。在本研究中观察到 AS 经典模型——ApoE^{-/-}小鼠 AS 模型,不但出现类似于人类的 AS 斑块,而且,具有抗氧化功能的 SOD 酶活性降低、促氧化应激的 MPO、NOX4 升高,导致氧化应激产物 MDA 增加。MDA 是膜脂质过氧化最重要的产物之一,是反映细胞受自由基攻击严重程度的可靠指标^[10],提示该模型在高脂血症状态下存在明显氧化应激状态,与临床相关研究相一致,AS 患者亦存在明显氧化应激损伤^[11]。由此可见,抑制氧化应激、降低 ROS 水平,是临床防治 AS 的可行途径^[12-13]。Kelch 样 ECH 联合蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1) /核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2) 抗氧化系统介导抗氧化基因的转录,是迄今为止发现的机体最为重要的内源性抗氧化应激系统^[10]。本模型主动脉 Nrf2 和 Keap1 mRNA 下调,表明 Nrf2 和 Keap1 功能在 ApoE^{-/-}小鼠 AS 模型中受到明显抑制,参与氧化应激发生。

2.5 参附注射液对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达的影响 模型组小鼠主动脉 Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达低于对照组,差异均有显著性 ($P < 0.05$)。参附注射液干预后, Nrf2 和 Keap1 mRNA 的表达均上调,较之模型组差异有显著性 ($P < 0.05$),见表 6。

参附注射液抗 AS 的药效与干预氧化应激有关^[14]。参附注射液常用于 AS 所致的心力衰竭的治疗,但本研究发现参附注射液可以有效延缓 AS 进程,然而,其效果独立于降脂之外。有研究显示红参、附片及其有效成分具有良好的抗氧化效果^[15]。因此,从氧化应激入手阐明参附注射液的抗 AS 机制。进一步研究显示,该注射液通过干预相关酶

系,减少氧自由基产生、促进氧自由基清除,从而减少氧化应激产物堆积,显示良好的抗氧化功效,推断其延缓AS的作用与干预氧化应激有关。既然,氧化应激相关酶的表达受 *Nrf2/Keap1* 系统调控,因此,在参附注射液抗氧化疗效确切的基础上,进一步观察 *Nrf2/Keap1* 的表达。结果显示该注射液可提高 *Nrf2* 和 *Keap1* mRNA 的表达,进一步明确了其抗氧化功效。

总之,本研究发现具有抗心衰作用的参附注射液,可以在不改变高脂喂养的 *ApoE*^{-/-} 小鼠血脂代谢的情况下,抑制AS斑块的形成。这一过程与降低NADPH氧化酶、髓过氧化物酶活性,提升超氧化物歧化酶活性,抑制该模型ROS水平有关,且这种作用可能通过上调 *Nrf2/Keap1* 系统活性来实现。

参考文献:

[1] World Health Organization. The 10 leading causes of death. Updated May 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en>.

[2] 徐小惠, 范氏泰和, 韦晓洁, 等. 杨桃根总提取物对糖尿病小鼠肾功能及其抗氧化应激作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 95-100.

[3] Lozhkin A, Vendrov A E, Pan H, et al. NADPH oxidase 4 regulates vascular inflammation in aging and atherosclerosis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 102: 10-21.

[4] 文爱珍, 曾 勇, 田 争. 参附注射液抗休克作用机制的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(14): 1626-1628.

[5] 姚魁武, 陈孟倩, 刘甜甜, 等. 参附注射液辅助治疗对冠

心病慢性心力衰竭患者生活质量及生存情况的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57(24): 2117-2120.

[6] 胡 琴, 张 运. 基因工程小鼠动脉粥样硬化模型的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(8): 725-727.

[7] Wang X M, Pu H W, Ma C, et al. Adiponectin abates atherosclerosis by reducing oxidative Stress[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 1792-1800.

[8] 郝 阳, 郭晓辰, 张军平. 氧化应激和自噬在动脉粥样硬化中的作用研究新进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(4): 404-410.

[9] 吴 彧, 孙 琳, 黄彦生, 等. 氧化应激与炎症在动脉粥样硬化发生发展中的作用及相关治疗药物研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(21): 127-129.

[10] Duryee M J, Klassen L W, Schaffert C S, et al. Malondialdehyde/acetalddehyde adduct (MAA) is the dominant epitope following MDA modification of proteins in atherosclerosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(10): 1480-1486.

[11] 徐芳琴, 郭 超, 卞 涛, 等. 丹红注射液对大鼠脑缺血/再灌注损伤治疗时间窗的影响[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1887-1892.

[12] Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2009, 50(5): 402-409.

[13] 续 丽, 杨桂花, 胡 梅, 等. 高脂血症人群血清超氧化物歧化酶的变化趋势[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(4): 225-228.

[14] 胡流芳, 王 迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(1): 146-152, 166.

[15] Chand K, Rajeshwari, Hiremathad A, et al. A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural and synthetic derivatives[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(2): 281-295.