

紫草素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展

陈 阳¹, 陈忠坚², 高 赞², 吴永江^{1*}

1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058

2. 浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022

摘 要: 紫草素是从草本植物紫草 *Arnebiae Radix* 中提取的一种具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、促伤口愈合等生物活性的萘醌类化合物。近年来, 紫草素及其衍生物的抗肿瘤作用被广泛研究。从构效关系、抗肿瘤作用机制等方面综述近 5 年紫草素及其衍生物的抗肿瘤作用的研究进展, 以期紫草素类化合物的研究及利用提供参考。

关键词: 紫草素; 萘醌类; 抗肿瘤; 作用机制; 构效关系

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)14-3503-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.034

Research progress on anti-tumor activity of shikonin and its derivatives

CHEN Yang¹, CHEN Zhong-jian², GAO Yun², WU Yong-jiang¹

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Department of Cancer Research Institute, Zhejiang Province Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China

Abstract: Shikonin is a naphthoquinone compound extracted from natural plant *Arnebiae Radix*, which has various biological activities of anti-inflammation, antiviral, anti-tumor and promoting wound healing. The antitumor activity of shikonin and its derivatives have received widely attention in recent years. In this study, we have reviewed the advances in anti-tumor effects of shikonin and its derivatives from the aspects of structure-activity relationship and anti-tumor mechanism to provide reference for the research and utilization of shikonin in the future.

Key words: shikonin; naphthoquinones; antitumor; mechanism; structure-activity relationship

紫草素 (shikonin) 是从紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.、紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 或内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge. 的干燥根中提取分离的一种萘醌类化合物, 具有抗炎^[1]、抗病毒^[2]、抗肿瘤^[3]、免疫调节^[4]、促伤口愈合^[5]、抗多药耐药^[6]等多种生物活性。紫草素类化合物抗肿瘤作用涉及抑制 DNA 拓扑异构酶活性、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡及程序性坏死、细胞毒作用、诱导细胞自噬、抗肿瘤血管生成、增加肿瘤细胞对放化疗的敏感性等。本文从抗肿瘤构效关系、作用机制方面总结了近 5 年紫草素及其衍生物的抗肿瘤作用研究进展, 以期紫草素类化合物的研究及利用提供参考。

1 构效关系及结构改造

紫草素及其衍生物属于萘醌类萘醌, 其结构可

分为 3 部分: 萘茜母核、六元不饱和侧链及侧链羟基部分^[7]。萘茜母核对肿瘤细胞表现出较强的毒性作用。从构效关系上看, 紫草素类衍生物的生物活性主要包括萘茜母核的亲电芳基化作用以及侧链羟基强还原性作用。通过对紫草素萘甲醚环及侧链羟基的结构改造, 可发现选择性更高、溶解性更好的潜在抗肿瘤化合物。

1.1 侧链及侧链羟基的结构改造

具有酰基侧链的天然来源紫草素衍生物 (包括去氧紫草素、乙酰紫草素、异丁酰紫草素、异戊酰紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酰紫草素、 β -羟基异戊酰紫草素等) 生物活性较高^[8]。乙酰紫草素的抗肿瘤活性高于紫草素, 提示侧链羟基酰化能提高紫草素的细胞毒性, 而短链 ($R = C_1-C_6$) 酰基较长链 ($R = C_7-C_{20}$) 酰基的紫草素衍生物对 DNA 拓扑异构酶

收稿日期: 2019-04-14

基金项目: 重大新药创制科技重大专项 (2018ZX09201-010)

作者简介: 陈 阳 (1995—), 女, 博士研究生, 研究方向为药物及临床代谢组学。E-mail: 11719030@zju.edu.cn

*通信作者 吴永江, 博士生导师, 教授, 研究方向为药物质量评价与控制。E-mail: yjwu@zju.edu.cn

I 的抑制作用强^[9]；经修饰天然 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素，制备的环丙基乙酰紫草素提高了对转移性的黑素瘤细胞 WM164 和 MUG-Mel2 生长的抑制作用^[10]。醚取代较其他含氧取代的 β -羟基异戊酰紫草素类似物对多药耐药性前列腺癌 DU-145 细胞活性具有更强的抑制作用^[11]。引入硫醚基团的紫草素衍生物的细胞毒性进一步增强^[12]。乙酰- β -D-硫代糖苷修饰的紫草素衍生物比秋水仙碱抗微管蛋白活性更强，其中多数单、双和三取代的紫草素衍生物对 5 种癌细胞抗增殖活性较强^[13]。

1.2 萘茜母核的结构改造

萘茜类萘醌在体内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 作用下可发生烷基化，与亲核底物 DNA、谷胱甘肽等结合产生活性氧 (ROS) 杀死肿瘤细胞^[14]。这种广泛非选择性的细胞毒作用在杀死癌细胞的同时对正常细胞具有杀伤作用。为减少对正常细胞的毒性，不少研究对紫草素萘茜母核的酚羟基和羰基进行了系列结构修饰。

脲作为一氧化氮 (NO) 供体之一，具有显著的抗肿瘤作用^[15-16]。紫草素羰基与羟胺盐酸盐缩合产生的同源脲衍生物对肿瘤细胞显示出更高的细胞毒性^[17]。合成的含硫 1,4-萘醌脲衍生物对人结直肠癌 HCT-15、人胃癌 MGC-803 和人肝癌 Bel7402 细胞的细胞毒作用增强，且部分脲衍生物对耐药癌细胞的细胞毒作用表现更为优异^[18]。紫草素的二甲基化衍生物在体外显示出比紫草素更高的选择性，设计合成的二甲基化二乙酰基衍生物在体内具有与紫杉醇类似的肿瘤抑制作用且没有任何毒性，提示新紫草素衍生物作为前药的潜力^[19]。总之，紫草素衍生物具有显著的抗肿瘤活性，有望成为抗癌化合物用于进一步的临床评估。

2 抗肿瘤作用及其机制

早前研究表明紫草素及其衍生物能够单独参与诱导细胞产生 ROS，同时对线粒体和多种信号通路，包括细胞外信号调节激酶 (ERK)、JNK 和 p38 等具有显著影响。随着研究的深入，紫草素及其衍生物抗肿瘤靶点被进一步揭露，与化疗药物联合使用增加肿瘤细胞敏感性的作用机制得到更深入的研究。

2.1 抑制 DNA 拓扑异构酶活性

DNA 拓扑异构酶是作用于 DNA 双链的一种核内酶，可实现 DNA 超螺旋状态与解螺旋状态的相互转换，在肿瘤细胞的增殖分裂中起重要作用。紫草素能够抑制拓扑异构酶 I 活性，发挥抗难治性肿

瘤作用^[20]。Beretta 等^[21]设计合成的系列新紫草素衍生物在高浓度条件下能显著抑制拓扑异构酶 I 的催化活性，抑制多种人源癌细胞增殖。

2.2 影响肿瘤细胞分裂周期及增殖

很多天然化合物通过抑制肿瘤细胞分裂周期及增殖阻滞肿瘤恶化。紫草素其衍生物能够调控 Cyclin A、Cyclin B、Cyclin D、Cyclin E、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1)、CDK2 等周期相关蛋白抑制人结直肠癌^[22]、乳腺癌^[23]、胆囊癌^[24]、子宫内膜癌^[25]、宫颈癌^[26]等肿瘤细胞的增殖，且不同肿瘤细胞系对药物敏感性不同。

紫草素可增加 CDK1 的磷酸化水平，抑制细胞分裂周期蛋白 25s (CDC25s)，影响肿瘤细胞分裂周期^[27]。Tian 等^[28]发现紫草素通过上调 p21 和 p27 以及下调 CDC 和 CDK 的表达阻滞皮肤癌 A431 细胞分裂；通过抑制 Cyclin D1 的表达，紫草素可增强吉非替尼在表皮生长因子受体 (EGFR) 野生型肺癌细胞的抗肿瘤作用^[29]。Baloch 等^[30]设计合成的系列紫草素衍生物通过独立于 p53 的 p21 及 p-CDC2 途径阻滞肿瘤细胞于 G₂/M 期，发挥对 5 种癌细胞的抗增殖活性。综上所述，紫草素可以通过调控肿瘤细胞相关周期蛋白表达，阻滞细胞周期，发挥抗肿瘤作用。

2.3 诱导肿瘤细胞凋亡

细胞在遇到外界刺激下会受到相关基因的调控，自主启动 Caspase 家族发生级联反应诱导细胞死亡^[31]。紫草素通过作用于细胞膜上由死亡受体介导的外源性通路及线粒体或内质网介导的内源性通路 2 种途径诱导细胞凋亡，抑制肿瘤细胞增殖。

2.3.1 经死亡受体介导的细胞凋亡途径 死亡受体属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族，通过与其特定的死亡配体结合可激活细胞凋亡的发生。Fas、TNFR1 和 TRAIL 是目前报道较多的凋亡死亡受体信号通路。紫草素可上调胆管癌细胞中死亡受体 5 表达，激活下游蛋白 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9，通过 ROS 介导的 JNK 信号通路增强 TRAIL 处理的胆管癌细胞凋亡，为临床治疗提供新策略^[32]。

2.3.2 线粒体途径 线粒体是细胞生命活动控制中心，也是细胞凋亡的重要调控枢纽^[33]。紫草素及其衍生物通过影响 ROS、p53、Bcl-2、Bax、细胞色素 C、凋亡诱导因子 (AIF) 等调控线粒体膜的通透性及线粒体活性，诱导肿瘤细胞凋亡。

Wang 等^[34]研究表明紫草素通过破坏细胞内 Ca^{2+} 稳态诱导氧化应激, 引发线粒体功能障碍, 诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞发生凋亡。Bcl-2 家族是线粒体的外膜蛋白, 紫草素能够影响线粒体外膜 Bcl-2 家族蛋白的表达, 改变线粒体膜电位及膜通透性, 促使线粒体内细胞色素 C 外渗进而激发 caspase 发生级联反应, 启动肿瘤细胞凋亡^[35-36]。用 p53 的特异性抑制剂处理的肺癌 A549 细胞能够抑制由紫草素诱导的细胞凋亡和过早衰老, 提示紫草素是通过 p53 介导的线粒体途径诱导细胞凋亡^[37]。

2.3.3 经内质网途径介导的细胞凋亡途径 细胞在受到刺激时会通过激活未折叠蛋白反应 (UPR) 来保护由内质网应激 (ERS) 引起的细胞损伤^[38], 如果细胞损伤严重, 内环境在短时间难以恢复稳定, ERS 则会诱导细胞凋亡。

Liu 等^[39]研究表明紫草素通过上调磷酸化的真核细胞翻译起始因子 2α (p-eIF2 α)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 和 cleave caspase-3 的表达触发 ERS 介导的人黑色素瘤 A375 细胞凋亡。p-ERK 是内质网膜上的 I 型跨膜蛋白, 激活 p-ERK 能够减缓蛋白质的合成作用, 降低 ERS 反应的程度。紫草素可促进人结肠癌 SNU-407 细胞凋亡, 其中 p-ERK、eIF2 α 和 CHOP 表达改变, 提示紫草素通过激活促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族成员和 ERS 诱导细胞凋亡^[40]。Shan 等^[41]通过蛋白印迹分析发现紫草素处理的急性粒细胞白血病 NB4 细胞 p-ERK 和 c-Myc 表达减少, p-p38、MAPK 和 p-JNK 表达增加, 提示紫草素可能通过调节 MAPKs 和 c-Myc 抑制肿瘤细胞增殖。综上所述, ERS 介导的凋亡机制是紫草素及其衍生物抗肿瘤作用的重要组成部分。

2.4 诱导细胞程序性坏死

细胞程序性坏死也称坏死性凋亡, 是一个主动、复杂和动态的过程^[42]。受体蛋白激酶 1 (RIP1) 和 RIP3 是调节这一过程的主要蛋白。

紫草素能够通过诱导细胞程序性坏死实现肿瘤细胞抗多药耐药^[43]。研究证实紫草素利用 ROS 作为坏死性凋亡诱导剂, 引起线粒体损伤, 激活 RIP 的相互作用, 最终诱导肿瘤细胞发生坏死性凋亡^[44-45]。Sun 等^[46]利用透射电子显微镜 (TEM) 分析紫草素类化合物诱导的坏死样凋亡的超微结构特征, 发现 RIP1/RIP3 复合物能够触发细胞质中坏死性凋亡的关键介质钙的积累, 并且过程伴随持续 JNK 激活和线粒体 ROS 产生。虽然坏死性凋亡和凋亡发生的相

关信号通路有区别, 但坏死性凋亡和凋亡的信号通路有很大可能互相关联并通过特定的抑制剂来进行两者间的转化。Shahsavari 等^[47]采用坏死性凋亡抑制剂 Nec-1 预处理细胞, 发现紫草素诱导细胞中产生了介导细胞凋亡的 caspase-3, 细胞程序性坏死则被抑制, 此时细胞转而启动凋亡进行自我毁灭。提示正常紫草素处理下主要通过激活 RIP1K-RIP3K 介导的坏死性凋亡诱导肿瘤细胞死亡, 但在 Nec-1 存在下, 细胞凋亡反占优势。

2.5 诱导肿瘤细胞自噬

自噬是通过溶酶体途径对蛋白质实现降解及循环再利用, 维持内环境的平衡及稳态的过程^[48]。在肿瘤发展的不同阶段细胞自噬的作用不同。在早期, 细胞可通过自噬抑制肿瘤发生, 而在晚期, 肿瘤细胞则通过自噬进行自身保护, 进一步促进肿瘤的发展。二甲基丙烯酸紫草素处理的黑色素瘤 WM164 细胞全基因谱显示自噬核心参与者 p62 显著增强, 自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3B-II (LC3B-II) 表达增加, 提示二甲基丙烯酸紫草素诱导肿瘤细胞自噬^[49]; Jeong 等^[50]、Hwang 等^[51]和 Kim 等^[52]相继报道了紫草素增加 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) 磷酸化水平及 Beclin1、Atg5 和 LC3 的表达诱导细胞自噬, 自噬抑制剂可增强细胞坏死性凋亡及聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 (PARP) 介导的细胞凋亡, 表明紫草素可通过抑制非小细胞肺癌细胞 (NSCLC) 自噬增强坏死性凋亡。此外, 紫草素通过增加 cleave caspase-3、cleave PARP 和 LC3-II 的表达诱导人甲状腺髓样癌细胞自噬和凋亡^[53]。

2.6 细胞毒作用

紫草素类化合物的萘茜母核具有亲电特性, 能够与生物体内的亲核物质结合, 诱导 ROS 产生, 发挥细胞毒作用。乙酰紫草素和 β,β -二甲基丙烯酸紫草素诱导过量 ROS 的产生, 促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 分泌, 抑制人慢性粒细胞白血病 (CML) 细胞的生长, 发挥抗肿瘤作用^[54]。Lu 等^[55]报道 ROS 是紫草素诱导的胶质瘤细胞坏死的执行者, 这种细胞毒作用能够被 MnTBAP9 (一种线粒体超氧化物的清洁剂) 减轻。此外, 紫草素与化疗药联合使用可以通过促进 ROS 产生增强抗肿瘤活性, 克服临床肿瘤治疗中多药耐药现象^[56]。

2.7 抗肿瘤血管生成作用

肿瘤血管能够为肿瘤发展提供新陈代谢所必需营养和氧气。EGFR 在肿瘤血管新生中发挥重要的

作用。紫草素可通过降低细胞中 EGFR 的表达抑制食管癌^[57]、肺癌^[58-59]、胶质母细胞瘤^[60]等肿瘤细胞的增殖。经紫草素处理后,阿法替尼耐药的 NSCLC 增殖受到明显抑制,作用机制与 EGFR 依赖的磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) /Akt 信号通路抑制有关^[61]。紫草素也可直接作用于内皮细胞,通过抑制其增殖、迁移及管腔形成而发挥其抗血管新生作用。血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,紫草素通过抑制 VEGF-C 和 VEGFR-3 mRNA 表达,干扰核转录因子- κ B (NF- κ B) /低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 途径实现体外抗淋巴管生成作用^[62]。

2.8 抑制细胞黏附、侵袭及转移

肿瘤恶化往往伴随着浸润和远处转移,而肿瘤转移与肿瘤细胞运动及黏附能力密切相关,细胞外基质的降解和基底膜蛋白的水解是肿瘤细胞参与侵袭和转移的关键步骤之一^[63]。细胞基质金属蛋白酶 (MMPs) 家族是这一过程的主要参与者,其中 MMP-9 可以通过水解基质成分,破坏组织屏障,促进肿瘤细胞的侵袭与转移。紫草素通过影响 MMP-2、MMP-7、MMP-9、 β 3 整联蛋白、Slug 和波形蛋白表达抑制胶质瘤^[64-65]、胃癌^[66]及乳腺癌^[67]细胞的迁移和侵袭;Deng 等^[68]通过过表达骨肉瘤细胞中 MMP-13 发现紫草素对细胞侵袭性的抑制作用被完全消除,证实 MMP-13 是紫草素侵袭的直接靶点, TIPE2 是介导紫草素对骨肉瘤细胞 MMP13 抑制作用的主要途径^[69]。

2.9 增加肿瘤细胞对放化疗的敏感性

紫草素及其衍生物除抑制肿瘤细胞增殖之外,还能增加肿瘤细胞对放化疗的敏感性。紫草素作为潜在的增敏剂诱导 ERS,增强厄洛替尼/吉非替尼的抗 NSCLC 活性^[70];与顺铂联合使用发挥抗癌协同作用,实现对癌细胞和正常细胞之间更高的选择性^[71];触发线粒体介导的细胞凋亡,增强 5-氟尿嘧啶和奥沙利铂的化学治疗敏感性^[72];紫草素激活 Caspase 和 JNK 通路,抑制传导及转录激活因子 3 (STAT3) 和 Akt 通路实现对肿瘤联合治疗^[73]。目前,紫草素类化合物对临床化疗药物的增敏作用也是当今研究的热点之一。

3 结语与展望

多项研究肯定了紫草素及其衍生物较强的抗肿瘤作用,且作用机制呈现多靶点、多途径的特点。紫草素类化合物具有调节免疫和逆转肿瘤细胞抗药性等诸多优点,使得该类化合物具有良好的研究及

应用前景。但是,其仍存在选择性低、细胞毒性较大、抗肿瘤机制研究不够深入明确等问题。因此,对紫草素的结构做进一步的改良及官能团修饰,筛选出高活性、高选择性、低细胞毒性的衍生物,进行活性评价及机制研究,将成为今后的研究重点。

参考文献

- [1] He W Y, Ye X Y, Yao X J, *et al.* Characterization of the binding of shikonin to human immunoglobulin using scanning electron microscope, molecular modeling and multi-spectroscopic methods [J]. *Spectrochim Acta A*, 2015, doi: 10.1016/j.saa.2015.04.085.
- [2] Gao H, Liu L, Qu Z Y, *et al.* Anti-adenovirus activities of shikonin, a component of Chinese herbal medicine *in vitro* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(2): 197-202.
- [3] Xu J X, Koizumi K, Liu M X, *et al.* Shikonin induces an anti-tumor effect on murine mammary cancer via p38-dependent apoptosis [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 2020-2026.
- [4] Yin S Y, Yang N S, Lin T J. Phytochemicals approach for developing cancer immunotherapeutics [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00386.
- [5] Xie Y, Fan C, Dong Y, *et al.* Functional and mechanistic investigation of shikonin in scarring [J]. *Chem-Biol Interact*, 2015, doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.037.
- [6] Jin Y D, Ren Y, Wu M W, *et al.* Effect of shikonin on multidrug resistance in HepG2: The role of SIRT1 [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(7): 1016-1021.
- [7] Huang G, Zhao H R, Zhou W, *et al.* 6-Substituted 1,4-naphthoquinone oxime derivatives (I): Synthesis and evaluation of their cytotoxic activity [J]. *Monatsh Chem*, 2017, 148(6): 1011-1023.
- [8] Papageorgiou V P, Assimopoulou A N, Couladouros E A, *et al.* The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products [J]. *Angew Chem Int Edit*, 1999, 38(3): 270-301.
- [9] Ahn B Z, Baik K U, Kweon G R, *et al.* Acylshikonin analogs: Synthesis and inhibition of DNA topoisomerase-I [J]. *J Med Chem*, 1995, 38(6): 1044-1047.
- [10] Durchschein C, Hufner A, Rinner B, *et al.* Synthesis of novel shikonin derivatives and pharmacological effects of cyclopropylacetylshikonin on melanoma cells [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2820-2893.
- [11] Rao Z, Liu X, Zhou W, *et al.* Synthesis and antitumour activity of β -hydroxyisovalerylshikonin analogues [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(9): 3934-3941.
- [12] Huang G, Zhao H R, Meng Q Q, *et al.* Synthesis and

- biological evaluation of sulfur-containing shikonin oxime derivatives as potential antineoplastic agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.11.031.
- [13] Lin H Y, Han H W, Bai L F, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of shikonin thio-glycoside derivatives: New anti-tubulin agents [J]. *RSC Adv*, 2014, 4(91): 49796-49805.
- [14] Zhang X, Cui J H, Zhou W, *et al.* Design, synthesis and anticancer activity of shikonin and alkannin derivatives with different substituents on the naphthazarin scaffold [J]. *Chem Res Chin Univ*, 2015, 31(3): 394-400.
- [15] Canário C, Silvestre S, Falcão A, *et al.* Steroidal oximes: Useful compounds with antitumor activities [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 25(6): 660-686.
- [16] Bednarczyk-Cwynar B, Zaprutko L. Recent advances in synthesis and biological activity of triterpenic acylated oximes [J]. *Phytochem Rev*, 2015, 14(2): 203-231.
- [17] Wang R, Zhang X, Song H, *et al.* Synthesis and evaluation of novel alkannin and shikonin oxime derivatives as potent antitumor agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(17): 4304-4307.
- [18] Huang G, Dong J Y, Zhang Q J, *et al.* Discovery and synthesis of sulfur-containing 6-substituted 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone oxime derivatives as new and potential anti-MDR cancer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 16(5): 160-171.
- [19] Wang R B, Zhou W, Meng Q Q, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of shikonin and alkannin derivatives as potential anticancer agents via a prodrug approach [J]. *Chem Med Chem*, 2014, 9(12): 2798-2808.
- [20] Plyta Z F, Li T H, Papageorgiou V P, *et al.* Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8(23): 3385-3390.
- [21] Beretta G L, Ribaud G, Menegazzo L, *et al.* Synthesis and evaluation of new naphthalene and naphthoquinone derivatives as anticancer agents [J]. *Arch Pharm*, 2017, 350(1): 1155-1167.
- [22] Li M Y, Mi C L, Wang K S, *et al.* Shikonin suppresses proliferation and induces cell cycle arrest through the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 alpha signaling [J]. *Chem Biol Inter*, 2017, 27(4): 58-67.
- [23] Vukic M D, Vukovic N L, Obradovic A D, *et al.* Naphthoquinone rich *Onosma visianii* Clem (Boraginaceae) root extracts induce apoptosis and cell cycle arrest in HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(22): 2712-2716.
- [24] Zhai T Y, Hei Z Y, Ma Q, *et al.* Shikonin induces apoptosis and G₀/G₁ phase arrest of gallbladder cancer cells via the JNK signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(6): 3473-3480.
- [25] Huang C M, Hu G H. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in endometrioid endometrial cancer cells via modulating miR-106b/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Biosci Rep*, 2018, doi: 10.1042/BSR20171546.
- [26] Lin H Y, Li Z K, Bai L F, *et al.* Synthesis of aryl dihydrothiazol acyl shikonin ester derivatives as anticancer agents through microtubule stabilization [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 96(2): 93-106.
- [27] Zhang S D, Gao Q, Li W, *et al.* Shikonin inhibits cancer cell cycling by targeting Cdc25s [J]. *BMC Cancer*, 2019, doi: 10.1186/s12885-018-5220-x.
- [28] Tian R, Li Y, Gao M. Shikonin causes cell-cycle arrest and induces apoptosis by regulating the EGFR-NF-kappa B signalling pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells [J]. *Biosci Rep*, 2015, doi: 10.1042/BSR20150002.
- [29] Tang J C, Ren Y G, Zhao J, *et al.* Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/stat3/cyclinD1 signal pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 20(4): 71-77.
- [30] Baloch S K, Ma L, Wang X L, *et al.* Design, synthesis and mechanism of novel shikonin derivatives as potent anticancer agents [J]. *Rsc Adv*, 2015, 5(40): 31759-31767.
- [31] Yang Q, Li S Y, Fu Z Z, *et al.* Shikonin promotes adriamycin-induced apoptosis by upregulating caspase-3 and caspase-8 in osteosarcoma [J]. *Mol Med Report*, 2017, 16(2): 1347-1352.
- [32] Zhou G Y, Yang Z Q, Wang X D, *et al.* TRAIL enhances shikonin induced apoptosis through ROS/JNK signaling in cholangiocarcinoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(3): 1073-1086.
- [33] Shen X J, Wang H B, Ma X Q, *et al.* β , β -Dimethylacrylshikonin induces mitochondria-dependent apoptosis of human lung adenocarcinoma cells *in vitro* via p38 pathway activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(1): 131-138.
- [34] Wang H, Liu Z, Li X C, *et al.* Shikonin causes apoptosis by disrupting intracellular calcium homeostasis and mitochondrial function in human hepatoma cells [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1484-1492.
- [35] Liang W Q, Cui J X, Zhang K C, *et al.* Shikonin induces ROS-based mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(65): 109094-109106.
- [36] Hou Y, Xu J H, Liu X, *et al.* Shikonin induces apoptosis in the human gastric cancer cells HGC-27 through

- mitochondria-mediated pathway [J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(42): 250-256.
- [37] Yeh Y C, Liu T J, Lai H C. Shikonin induces apoptosis, necrosis, and premature senescence of human A549 lung cancer cells through upregulation of p53 expression [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2015, doi: 10.1155/2015/620383.
- [38] Huang L, Xie H, Liu H. Endoplasmic reticulum stress, diabetes mellitus, and tissue injury [J]. *Curr Protein Peptide Sci*, 2014, 15(8): 812-818.
- [39] Liu Y K, Kang X, Niu G, *et al.* Shikonin induces apoptosis and prosurvival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways [J]. *Artif Cell Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 626-635.
- [40] Han X, Kang K A, Piao M J, *et al.* Shikonin exerts cytotoxic effects in human colon cancers by inducing apoptotic cell death via the endoplasmic reticulum and mitochondria-mediated pathways [J]. *Biomol Ther*, 2019, 27(1): 41-47.
- [41] Shan Z L, Zhong L, Xiao C L, *et al.* Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and c-Myc [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 3055-3060.
- [42] Liu C L, Zhang K, Shen H T, *et al.* Necroptosis: A novel manner of cell death, associated with stroke [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 624-630.
- [43] Xuan Y, Hu X. Naturally-occurring shikonin analogues-A class of necroptotic inducers that circumvent cancer drug resistance [J]. *Cancer Lett*, 2009, 274(2): 233-242.
- [44] Shahsavari Z, Karami-Tehrani F, Salami S. Targeting cell necroptosis and apoptosis induced by shikonin via receptor interacting protein kinases in estrogen receptor positive breast cancer cell line, MCF-7 [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(2): 245-254.
- [45] Chen C Y, Xiao W Q, Huang L, *et al.* Shikonin induces apoptosis and necroptosis in pancreatic cancer via regulating the expression of RIP1/RIP3 and synergizes the activity of gemcitabine [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5507-5517.
- [46] Sun W, Wu X X, Gao H W, *et al.* Cytosolic calcium mediates RIP1/RIP3 complex-dependent necroptosis through JNK activation and mitochondrial ROS production in human colon cancer cells [J]. *Free Rad Biol Med*, 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.010.
- [47] Shahsavari Z, Karami-Tehrani F, Salami S, *et al.* RIP1K and RIP3K provoked by shikonin induce cell cycle arrest in the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-468: Necroptosis as a desperate programmed suicide pathway [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(4): 4479-4491.
- [48] Yu L, Chen Y, Tooze S A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207-215.
- [49] Kretschmer N, Deutsch A, Durchschein C, *et al.* Comparative gene expression analysis in WM164 melanoma cells revealed that beta-beta-dimethylacrylshikonin leads to ROS generation, loss of mitochondrial membrane potential, and autophagy induction [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2823-2839.
- [50] Jeong E, Hwang K, Kim H. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. *Respirology*, 2015, doi: 10.1186/s12967-017-1223-7.
- [51] Hwang K E, Jeong E T, Kim H R. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. *Eur Respir J*, 2016, doi: 10.1183/13993003.congress-2016.PA2839.
- [52] Kim H J, Hwang K E, Park D S, *et al.* Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2017, doi: 10.1186/s12967-017-1223-7.
- [53] Gu M Z, Li X Y, Tang X X. Effect of autophagy on the shikonin induced apoptosis of human medullary thyroid carcinoma TT cells [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 9(9): 17428-17434.
- [54] Ahmed K B A, Mahapatra S K, Raja M R C, *et al.* Jacalin-capped silver nanoparticles minimize the dosage use of the anticancer drug, shikonin derivatives, against human chronic myeloid leukemia [J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(23): 18980-18989.
- [55] Lu B, Gong X, Wang Z Q, *et al.* Shikonin induces glioma cell necroptosis *in vitro* by ROS overproduction and promoting RIP1/RIP3 necrosome formation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(11): 1543-1553.
- [56] Wang Z, Yin J H, Lin M X, *et al.* Combination of shikonin with paclitaxel overcomes multidrug resistance in human ovarian carcinoma cells in a P-gp-independent manner through enhanced ROS generation [J]. *Chin Med*, 2019, doi: 10.1186/s13020-019-0231-3.
- [57] Tang J C, Zhao J, Long F, *et al.* Efficacy of shikonin against esophageal cancer cells and its possible mechanisms *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Cancer*, 2018, 9(1): 32-40.
- [58] Hsieh Y S, Liao C H, Chen W S, *et al.* Shikonin inhibited migration and invasion of human lung cancer cells via suppression of c-Met-mediated epithelial-to-mesenchymal

- transition [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(12): 4639-4651.
- [59] Li X, Fan X X, Jiang Z B, *et al.* Shikonin inhibits gefitinib-resistant non-small cell lung cancer by inhibiting TrxR and activating the EGFR proteasomal degradation pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 11(5): 45-55.
- [60] Zhao Q L, Kretschmer N, Bauer R, *et al.* Shikonin and its derivatives inhibit the epidermal growth factor receptor signaling and synergistically kill glioblastoma cells in combination with erlotinib [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(6): 1446-1456.
- [61] Li B Y, Yuan Z G, Jiang J, *et al.* Anti-tumor activity of shikonin against afatinib resistant non-small cell lung cancer via negative regulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biosci Rep*, 2018, doi: 10.1042/BSR20181693.
- [62] Prangsaengtong O, Jantaree P, Lirdprapamongkol K, *et al.* Shikonin suppresses lymphangiogenesis via NF-kappa B/HIF-1 alpha axis inhibition [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(11): 1659-1666.
- [63] Conlonb G A, Murray G I. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis [J]. *J Pathol*, 2019, 247(5): 629-640.
- [64] Matias D, Balca-Silva J, Dubois L G, *et al.* Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition [J]. *Cell Oncol*, 2017, 40(3): 247-261.
- [65] Zhang F Y, Hu Y, Que Z Y, *et al.* Shikonin inhibits the migration and invasion of human glioblastoma cells by targeting phosphorylated beta-catenin and phosphorylated PI3K/Akt: A potential mechanism for the anti-glioma efficacy of a traditional Chinese herbal medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 23823-23848.
- [66] Liu J P, Liu D, Gu J F, *et al.* Shikonin inhibits the cell viability, adhesion, invasion and migration of the human gastric cancer cell line MGC-803 via the Toll-like receptor 2/nuclear factor-kappa B pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(8): 1143-1155.
- [67] Wen X C, Li J P, Cai D F, *et al.* Anticancer efficacy of targeted shikonin liposomes modified with RGD in breast cancer cells [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 268-282.
- [68] Deng B Y, Qiu B. Shikonin inhibits invasiveness of osteosarcoma through MMP13 suppression [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(12): 9311-9317.
- [69] Deng B Y, Feng Y W, Deng B X. TIPE2 mediates the suppressive effects of shikonin on MMP13 in osteosarcoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(6): 2434-2443.
- [70] Li Y L, Hu X, Li Q Y, *et al.* Shikonin sensitizes wild-type EGFR NSCLC cells to erlotinib and gefitinib therapy [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4): 3882-3890.
- [71] He G D, He G L, Zhou R Y, *et al.* Enhancement of cisplatin-induced colon cancer cells apoptosis by shikonin, a natural inducer of ROS *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(4): 1075-1082.
- [72] Liang W Q, Cai A Z, Chen G Z, *et al.* Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity of gastric cancer through reactive oxygen species [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep38267.
- [73] Guo Z L, Li J Z, Ma Y Y, *et al.* Shikonin sensitizes A549 cells to TRAIL-induced apoptosis through the JNK, STAT3 and AKT pathways [J]. *BMC Cell Biol*, 2018, 19(1): 29-36.