

南极假丝酵母脂肪酶 B 在离子液体/ 超临界流体体系中的稳定性模拟

张静晓^{1,2}, 张丽雷^{1,2*}, 刘晓洁¹, 吴小亮¹, 徐璐¹

¹湖北民族学院 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 恩施 445000; ²湖北民族学院化学与环境工程学院, 恩施 445000

摘要:脂肪酶在离子液体/超临界流体体系中的结构稳定性是影响其活性的重要因素。本文采用分子动力学方法分别研究了南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB)在离子液体 CYPHOS IL-201/极性超临界流体 CHF₃ 两相体系和离子液体 CYPHOS IL-201/非极性超临界流体 CO₂ 两相体系中的结构稳定性, 揭示影响 CALB 结构稳定性的因素。研究结果表明, 在超临界 CHF₃ 中, CHF₃ 破坏蛋白维持 α 螺旋结构的氢键是蛋白结构不稳定的主要原因; 在超临界 CO₂ 中, CALB 蛋白的结构紧密性降低, 有序二级结构发生了变化, 导致稳定性下降。离子液体和两种超临界流体均形成了两相体系, 蛋白处于离子液体相中, 离子液体不溶于超临界流体, 但超临界流体部分进入离子液体相, 降低了离子液体相的黏度。其中, 相比于 CYPHOS IL-201/CO₂ 体系, CYPHOS IL-201/CHF₃ 体系的黏度降低多。在离子液体 CYPHOS IL-201 与超临界流体(CHF₃、CO₂)形成的两相体系中, 离子液体 CYPHOS IL-201 具有保护蛋白结构的作用, 使 CALB 蛋白结构更加稳定。

关键词: 南极假丝酵母脂肪酶 B; 离子液体; 超临界流体; 分子模拟

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)5-0902-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.5.025

Stability simulation of candida antarctica lipase B in ionic liquid / supercritical fluid systems

ZHANG Jing-xiao^{1,2}, ZHANG Li-lei^{1,2*}, LIU Xiao-jie¹, WU Xiao-liang¹, XU Lu¹

Chemistry and Environmental Engineering College, Hubei University for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China

Abstract: The stability of lipase in ionic liquid and supercritical fluid system is the most important factor for its activity. In this paper, molecular dynamic simulation method was employed to research the structure and performance of candida antarctica lipase B (CALB) in ionic liquid CYPHOS IL-201/polar supercritical fluid (CHF₃) and CYPHOS IL-201/nonpolar supercritical fluid (CO₂) biphasic systems. The results showed that, in the supercritical fluid CHF₃ system, hydrogen bonds that kept the α -helix structure stable were destroyed, which was the main reason for the unstable structure of protein; in the supercritical fluid CO₂ system, the structural tightness of CALB protein reduced and the secondary structure of protein changed, which resulted in the decreased stability of protein. The ionic liquid and the supercritical fluid formed biphasic systems in which the former (protein dissolved in it) was insoluble in the latter, but part of the supercritical fluid entered the ionic liquid phase, and reduced the viscosity of the ionic liquid phase. The viscosity of CYPHOS IL-201/CHF₃ system decreased more than that of CYPHOS IL-201/CO₂ system. In the CYPHOS IL-201/supercritical fluid (CHF₃ or CO₂) biphasic systems, the ionic liquid CYPHOS IL-201 played a key role in protecting the structure of protein, which resulted in more stability of CALB protein.

Key words: candida antarctica lipase B; ionic liquid; supercritical fluid; molecular simulation

南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB)具有宽泛的底

收稿日期: 2017-12-25 接受日期: 2018-05-30

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究计划(B2017099); 生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金(PKLHBI 705)

*通信作者 Tel: 86-718-8437531; E-mail: zhangilei@outlook.com

物特异性、高活性、高对映选择性、以及在水和非水环境中的稳定性, 是生物技术中非常重要的酶, 在酯交换、动力学拆分和聚合反应中均有广泛应用^[1,2]。目前, 在离子液体(IL)和超临界流体(SCF)组成的两相体系中进行 CALB 催化反应是研究的热点^[3-5]。

在此两相体系中, IL 提供催化反应的溶剂环境, 能够提高蛋白酶的活性、稳定性和选择性, 并且相较于其它有机溶剂更好地保护了蛋白酶的二级结构^[3,6-8]; 而 SCF 可降低 IL 的黏度, 促进反应底物的运输, 加快反应的进行, 并可同时将反应产物从 IL 相中萃取出来, 解决了反应之后需要使用易挥发性有机物进行萃取而产生的污染问题^[9,10]。然而, 由于 IL 和 SCF 形成的两相体系较复杂, IL 和 SCF 的性质以及两相的平衡关系均会影响到蛋白质的结构稳定性, 从而影响其活性, 因此从原子尺度揭示此两相体系性质对 CALB 结构稳定性的影响可为开发高效的 IL/SCF 两相溶剂体系, 以及两相体系状态的控制提供重要参考。

分子动力学模拟可以获取在实验中难以获得的空间和时间尺度上生物分子系统的行为和性质^[11,12], 是从原子尺度研究溶剂运动对蛋白结构产生影响的有效方法。为了深入理解 IL/SCF 溶剂体系对 CALB 蛋白酶结构稳定性的影响, 本文采用分子动力学方法, 构建了新型离子液体三丁基十四烷基季磷十二烷基苯磺酸盐(CYPHOS IL-201)与无极性的超临界 CO₂ 流体形成的两相体系和 CYPHOS IL-201 与具有较大极性的超临界 CHF₃ 流体形成的两相体系, 研究 CALB 在这两种两相体系中的结构和性质, 揭示这两种溶剂环境性质对 CALB 结构稳定性的影响。

1 分子动力学模拟方法

1.1 分子动力学模型的构建

从 RCSB PDB 数据库中选择 CALB 蛋白晶体结构(PDB ID:5a71)作为 CALB 蛋白的模拟模型, 此结构是迄今为止分辨率最高的 CALB 蛋白晶体模型^[13]。

构建的典型分子动力学初始模型如图 1 所示。CALB 蛋白晶体置于边长约为 11 nm 的立方体 CYPHOS IL-201 离子液体相中, 离子液体相模型包含 880 个三丁基十四烷基季磷阳离子和 880 个十二烷基苯磺酸阴离子, 在立方体离子液体相上下位置扩展出 5 nm 的区域, 并置入 20 000 个超临界流体分子(CO₂ 或者 CHF₃), 体系约含有 20 万个原子。模拟过程中采用周期性边界, 经等温等压系综(NPT 系综)模拟后, 体系密度收缩至约为 CYPHOS IL-201 离子液体密度的实验值。

本文构建了五种溶剂体系, 包括: 超临界 CO₂ 流体(ScCO₂)、超临界 CHF₃ 流体(ScCHF₃)、离子液体 CYPHOS IL-201(IL)、离子液体 CYPHOS IL-201/

超临界 CO₂ 两相体系(IL/ScCO₂)、以及离子液体 CYPHOS IL-201/超临界 CHF₃ 两相体系(IL/ScCHF₃)。分别对比了 CALB 蛋白在这五种溶剂体系中的行为和性质。

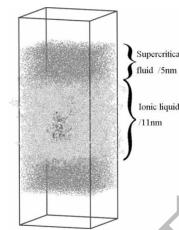


图 1 分子动力学模型

Fig. 1 The model of molecular dynamics

1.2 分子动力学模拟条件

所有模拟均在 GROMACS 程序包(版本 2016.3)中进行, 对 CALB 蛋白质采用 Amber99sb-ildn 力场, 3 点水模型。对离子液体和超临界流体分子采用 GAFF 力场和 AM1-BCC 电荷。在 IL/ScCHF₃ 两相体系中温度为 55 ℃, 压力 30 MPa, 其他体系中温度为 65 ℃, 压力 20 MPa。实验研究表明, CALB 在此条件下催化活性较好^[4]。

对构建的五个体系分别进行三个阶段的模拟, 首先采用最陡下降法将每个系统中的溶剂分子进行能量极小化。第二阶段, 进行限制性动力学模拟, 保持蛋白分子固定, 离子液体和超临界流体的分子自由移动, 并将体系缓慢加热加压至指定温度和压力条件, 使体系密度收缩至约为 CYPHOS IL-201 离子液体的实验密度值, 并达到平衡状态。第三阶段进行平衡状态的模拟, 每个系统均采用 0.2 fs 的时间步长, 分别进行 20 ns 的分子模拟。为了在模拟过程中保持不同组分的恒定温度和压力, 使用 V-rescale 方法控制温度, 使用 Parrinello-rahman 方法控制压力。对于系统的每个组件, 应用 PME 算法估计静电相互作用。

2 结果与讨论

考察了所构建的五个体系在模拟过程中的全体

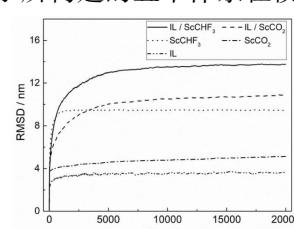


图 2 体系在模拟过程中的 RMSD 值

Fig. 2 RMSD values of systems during simulation

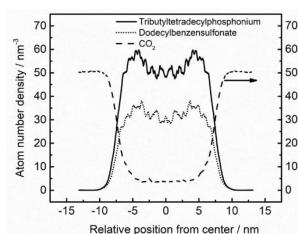


图3 CYPHOS IL-201/ScCO₂ 两相体系中的原子数密度分布

Fig. 3 Atom number density distributions in the CYPHOS IL-201 / ScCO₂ two-phase system

系均方根偏差(RMSD)值,结果如图2所示,从图中可见,经过5ns的模拟后,五个体系均达到了平衡状态。

为了考查所研究的体系中离子液体CYPHOS IL-201和超临界流体(CO₂、CHF₃)形成两相的行为,将5ns至20ns范围内,每隔0.1ns取一帧,统计了IL/ScCO₂和IL/ScCHF₃两个体系中三丁基十四烷基季磷阳离子、十二烷基苯磺酸阴离子、以及超临界流体分子在以CALB蛋白中心为中心,Z轴方向上的原子数量密度分布,并取平均值,结果如图3和图4所示。

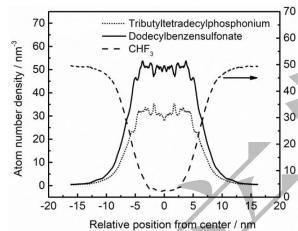


图4 CYPHOS IL-201/ScCHF₃ 两相体系中的原子数密度分布

Fig. 4 Atom number density distributions in the CYPHOS IL-201 / ScCHF₃ two-phase system

从图3和图4中可见,CALB蛋白处于离子液体相中,并且没有向超临界液体相移动的趋势。另外,离子液体CYPHOS IL-201中的三丁基十四烷基季磷阳离子和十二烷基苯磺酸阴离子主要分布在CALB蛋白的周围,只有极少部分分布在超临界流体相中。超临界流体分子有少部分进入了离子液体相中,大部分分布在离子液体的周围,与文献报道离子液体和超临界流体的行为一致^[14]。此结果表明在所研究的温度和压力下,离子液体CYPHOS IL-201可分别与超临界CO₂流体和超临界CHF₃流体形成具有相互作用的两相体系。

对比IL/ScCO₂和IL/ScCHF₃两个溶剂体系的行为可见,离子液体CYPHOS IL-201和ScCO₂形成的两相界面较ScCHF₃更为明显,说明与ScCO₂相比,ScCHF₃更容易进入到CYPHOS IL-201离子液体相中,而CYPHOS IL-201也更易分布于ScCHF₃流体中。由于超临界流体可以降低离子液体的浓度和黏度,提高反应底物在离子液体相中的运输能力,从而提高酶催化反应的效果,而CHF₃具有较CO₂更易溶解于CYPHOS IL-201相的能力,从而通过控制温度和压力可能具有更好地提高酶催化反应的能力。

蛋白质原子位置的均方根偏差(RMSD)和时间的函数是反映蛋白质结构稳定性的重要指标^[15]。RMSD是通过蛋白结构与其参考结构的最小二乘法拟合得到,定义如式(1)所示。

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_{i,ref})^2} \quad (1)$$

其中,N是体系原子的总数目,r_i和r_{i,ref}是蛋白原子分别在考察结构和参考结构中的位置。

图5为CALB蛋白在所考察的五个溶剂体系中运动轨迹的RMSD计算结果。从图中可见,CALB蛋白在ScCHF₃流体中非常不稳定,RMSD值变化剧烈,这有可能是因为CALB蛋白在ScCHF₃中产生了蛋白质变性^[6]。而CALB蛋白在ScCO₂流体中RMSD值比较平稳,结构相对稳定,表明具有较大极性的CHF₃更容易与CALB蛋白发生相互作用,使其结构发生变化,以致失去催化活性。另外,CALB蛋白在IL、IL/ScCO₂和IL/ScCHF₃三个溶剂体系中的RMSD值在模拟过程中变化很小,最后上下波动在0.05 nm左右,表现出了良好的稳定性。对比CALB蛋白在ScCHF₃和在IL/ScCHF₃两相体系中的结果可见,离子液体CYPHOS IL-201起到了稳定CALB蛋白结构的作用,与文献报道CALB在IL/ScCHF₃两相体系中可表现出良好的催化活性的结果一致^[4]。

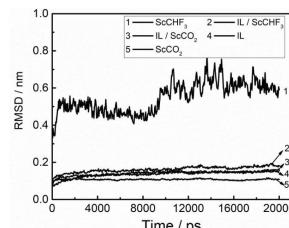


图5 CALB蛋白在模拟过程中的RMSD值

Fig. 5 RMSD values of CALB protein during simulation

蛋白质的均方根波动数值(RMSF)是衡量蛋白质原子在整个轨迹中相对于平均位置波动的程度,计算方法如式(2)所示。

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{N_f} \sum_{i=1}^N (r_{iA} - r_{avg})^2} \quad (2)$$

其中 N_f 为分子动力学模拟过程中考查的帧数, r_A^i 和 r_{avg} 分别为原子在蛋白质结构和平均结构中的位置。

对 CALB 蛋白的各个残基在五个溶剂体系中的 RMSF 值进行了计算,结果如图 6 所示。从图中可见,CALB 在 $ScCHF_3$ 流体中残基波动较大,可能已经发生了蛋白质的变性,与前述 RMSD 的考查结果一致。CALB 蛋白的 RMSF 值在 $ScCO_2$ 和 IL/ $ScCO_2$ 两个体系中最为稳定,表明 CO_2 的存在没有增加 CALB 蛋白残基的柔性。在 IL 体系和 IL/ $ScCHF_3$ 体系中,CALB 蛋白的部分残基表现出了较大的柔性,但是柔性部位并不相同,这是由于 CYPHOS IL-201 和 $ScCHF_3$ 与 CALB 蛋白的残基之间产生了相互作用^[3,16]。另外,CALB 蛋白的催化主要由蛋白中保守的 Ser105-Asp187-His224 三联体负责^[17]。在这四个体系中,这三个残基均未出现明显的波动情况,这也是在这三个体系中 CALB 表现出良好的催化性能的原因^[4]。

另外,对比 IL/ $ScCO_2$ 和 IL/ $ScCHF_3$ 两个体系中蛋白的 RMSF 值发现,残基 140 至 150 区域内,IL/ $ScCHF_3$ 体系中蛋白的 RMSF 值发生较大变化,这是由于 CHF_3 与此区域的 α 融合结构发生氢键相互作用,破坏了维持 α 融合结构的 N-H...O 氢键。 CHF_3 易破坏 α 融合结构从而破坏蛋白结构,设计新型离子液体对 α 融合结构进行保护是提高蛋白稳定性可行方法。

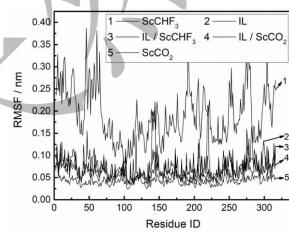


图 6 CALB 蛋白在模拟过程中的 RMSF 值

Fig. 6 RMSF values of CALB protein during simulation

回转半径(R_g)是描述蛋白质结构平衡构型的重要参数,是蛋白质结构紧密性的重要指标,可用式(3)表示。

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i m_i (R_{ix}^2 + R_{iz}^2)}{\sum_i m^2}} \quad (3)$$

其中, m_i 是原子 i 的质量,是原子 i 相对于蛋白质量中心的位置。对所研究的五个体系中的 CALB 蛋白在模拟过程中的回转半径进行了计算,结果如图 7 所示。

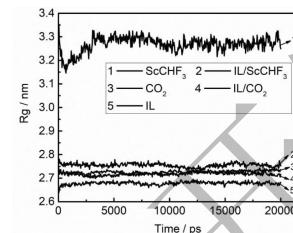


图 7 CALB 蛋白在模拟过程中的回转半径

Fig. 7 Radius of gyration values of CALB protein during simulation

从图 7 中可见,由于 CALB 蛋白在 $ScCHF_3$ 溶剂体系中可能出现了蛋白的变性,导致其回转半径变得较大。在其他四个溶剂体系中,CALB 蛋白的回转半径较小,并且较为接近。其中,CALB 蛋白在 CYPHOS IL-201 离子液体中的回转半径最小,其结构最为紧凑,与前述 CYPHOS IL-201 离子液体有保护蛋白结构作用的结论一致。在 $ScCO_2$ 体系里,CALB 蛋白回转半径有所增大,但并不明显,然而这也有可能会导致蛋白酶催化作用失活。这也可能是文献报道 CALB 蛋白在 $ScCO_2$ 体系中一段时间后,就出现了催化活性降低的原因^[18]。另外,通过对几个体系中蛋白与超临界流体之间的作用力分析发现,蛋白与 CHF_3 之间的静电作用力较 CO_2 的静电作用力大,是影响蛋白稳定性的主要作用力。

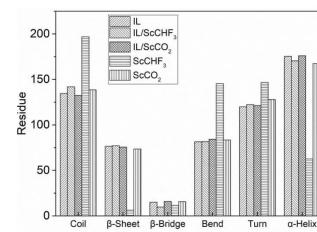


图 8 CALB 蛋白在模拟过程中的二级结构平均含量

Fig. 8 Average contents of secondary structure of CALB during simulation

为了进一步阐明在所研究的溶剂体系中 CALB 蛋白酶的构象变化,考查了 CALB 蛋白酶二级结构在模拟过程中的平均含量,结果如图 8 所示。从图

8 中可见, CALB 蛋白在 ScCHF_3 溶剂体系中, 二级结构出现了明显的改变, 表明 CALB 蛋白可能出现了变性, 与前述研究结果一致。另外, CALB 蛋白在 IL 和 IL/ ScCO_2 体系中二级结构基本没有发生明显的变化, 与文献报道 CALB 蛋白在这两个溶剂体系中的稳定性良好的结果一致^[8,10,12]。

对比 CALB 蛋白在 IL 体系和 ScCO_2 体系中的二级结构可见, 当酶溶解在 ScCO_2 中时, 发生有序二级结构(α -螺旋、 β -折叠和转向)和无序二级结构(卷曲)的显著畸变, 表明 ScCO_2 对 CALB 蛋白酶也具有变性作用。有许多实验研究与上述理论研究结果一致。例如, 通过圆二色性光谱研究, Ishikawa 等人在 35 ℃ 和 25 MPa 条件下的 ScCO_2 中处理脂肪酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶和葡萄糖淀粉酶, 发现酶中的 α -螺旋的含量分别降低 62.9%、31.3%、37.6% 和 12.4%, 并且酶的活性还与剩余的活性 α -螺旋残基之间存在线性关联^[19]。可见蛋白质有序二级结构的减少是蛋白质的活性和稳定性减弱的主要原因, 稳定其二级结构可获得较好的活性和稳定性。文献^[20]的实验研究也获得了类似的研究结果。在本文所研究的体系中, IL、IL/ ScCO_2 和 IL/ ScCHF_3 三个溶剂体系中 CALB 蛋白的有序二级结构的减少最少, 推测其具有最好的活性和稳定性。

3 结论

南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB)是生物技术中非常重要的酶。采用离子液体和超临界流体形成的两相体系可为其催化反应提供一个绿色高效的溶剂体系。本文通过分子动力学方法研究了 CALB 蛋白酶在新型离子液体 CYPHOS IL-201 分别和具有极性 CHF_3 , 以及无极性的 CO_2 两个超临界流体形成的两相体系中的结构和性质。结果发现, 离子液体 CYPHOS IL-201 和超临界流体 CHF_3 及 CO_2 均能形成两相体系, 具有明显的相界面, CALB 蛋白始终处于离子液体相中, 具有极性的 CHF_3 分子较无极性的 CO_2 分子更易进入离子液体相, 从而降低离子液体相的浓度和黏度。通过对 CALB 在模拟体系中的 RMSD、RMSF、 R_g 、以及二级结构的分析发现, 在超临界 CHF_3 流体中, CALB 蛋白发生变性是其失活的主要原因; 在超临界 CO_2 流体中, CALB 蛋白的结构紧密性降低, 有序二级结构减少是蛋白稳定性下降的主要原因。 CHF_3 易破坏维持 CALB 蛋白 α 融合结构的 N-H \cdots O 氢键是其导致蛋白结构不稳定的主要因素。离子液体 CYPHOS IL-201 起到了保护蛋

白结构的作用, 在离子液体 CYPHOS IL-201 与超临界流体(CHF_3 、 CO_2)形成的两相体系中, CALB 蛋白结构较为稳定是其具有较好催化活性的主要原因。通过调整超临界流体分子的极性, 一方面保证降低离子液体粘度的程度, 另一方面保护蛋白结构的稳定性, 有助于获得更好的催化活性。

参考文献

- 1 Fjerbaek L, Christensen K, Nordahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification[J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 102: 1298-1315.
- 2 Barbosa O, Ariza C, Ortiz C, et al. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphtoxy)-2-propanol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B)[J]. New Biotechnol, 2010, 27: 844-850.
- 3 Monhem H, Housaindokht MR. Chemical modification of biocatalyst for function in supercritical CO_2 : *In silico* redesign of stable lipase[J]. J Supercrit Fluid, 2016, 117: 147-163.
- 4 Primožič M, Kavčič S, Željko K, et al. Enzyme-catalyzed esterification of D, L-lactic acid in different SCF/IL media [J]. J Supercrit Fluid, 2015, 107: 414-421.
- 5 Sheldon RA, Pereira PC. Biocatalysis engineering: the big picture[J]. Chem Soc Rev, 2017, 46: 2678-2691.
- 6 Itoh T. Ionic liquids as tool to improve enzymatic organic synthesis[J]. Chem Rev, 2017, 117: 10567-10607.
- 7 Liu RX, Zhang P, Zhang SJ, et al. Ionic liquids and supercritical carbon dioxide: green and alternative reaction media for chemical processes[J]. Rev Chem Eng, 2016, 32: 587-609.
- 8 Lozano P, Nieto S, Serrano J, et al. Flow biocatalytic processes in ionic liquids and supercritical fluids[J]. Mini-Rev Org Chem, 2017, 14(1): 65-74.
- 9 García-Junceda E. Multi-step enzyme catalysis: biotransformations and chemoenzymatic synthesis[M]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008: 83-107.
- 10 Cheng YY, Wang JH, Liu YL, et al. The preliminary study on the soy protein-based fat mimetic[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014, 26: 105-110.
- 11 Zhang LL, Yang C, Zhang JX, et al. Molecular simulation study on the interaction of active components of Chinese herbal medicine with BCL2[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1177-1181.
- 12 Karplus M, Mccammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules[J]. Nat Struct Mol Biol, 2002, 9: 646-652.
- 13 Stauch B, Fisher SJ, Cianci M. Open and closed states of *candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of

- interfacial activation [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56:2348-2358.
- 14 Dzyuba SV, Bartsch RA. Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO₂ systems [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2003, 42:148-150.
- 15 Lobanov MY, Bogatyreva NS, Galitskaia OV. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness [J]. *Mol Biol*, 2008, 42:623-628.
- 16 Solhtalab M, Karbalaei-Heidari HR, Absalan G. Tuning of hydrophilic ionic liquids concentration: A way to prevent enzyme instability [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2015, 122:125-130.
- 17 Velonia K, Flomenbom O, Loos D, et al. Single-enzyme kinet-

- ics of CALB-catalyzed hydrolysis [J]. *Angew Chem*, 2005, 117:566-570.
- 18 And ST, Jr KMM. The concept of solvent compatibility and its impact on protein stability and activity enhancement in nonaqueous solvents [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 119:9939-9948.
- 19 Ishikawa H, Shimoda M, Akiyoshi Yonekura A, et al. Inactivation of enzymes and decomposition of α -helix structure by supercritical carbon dioxide microbubble method [J]. *J Agr Food Chem*, 1996, 44:2646-2649.
- 20 Fricks AT, Oestreicher EG, Filho LC, et al. Effects of compressed fluids on the activity and structure of horseradish peroxidase [J]. *J Supercrit Fluid*, 2009, 50:162-168.

(上接第 877 页)

- 2 Glynn-Jones R, Tan D, Hughes R, et al. Squamous-cell carcinoma of the anus: Progress in radiotherapy treatment [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13:447-459.
- 3 Haddad R I, Posner M, Hitt R, et al. Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: role, controversy, and future directions [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29:2122-2129.
- 4 Aratanechemuge Y, Yue A, Takashi K, et al. Selective induction of apoptosis by Ar-turmerone isolated from turmeric (*Curcuma longa L*) in two human leukemia cell lines, but not in human stomach cancer cellline [J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9:481-484.
- 5 Cheng SB, Wu LC, Hsieh YC, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of aromatic turmerone from curcuma longa linn, induces apoptosis through reactive oxygen species-triggered intrinsic and extrinsic pathways in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60:9620-9630.
- 6 Rong DY, Tu YH, Zan XJ, et al. Effects of turmeric volatile oil on proliferation and apoptosis of human malignant melanoma cell line A375 [J]. *J Postgrad Med* (医学研究生学报), 2016, 29:1177-1181.
- 7 Xue YC, Zhou Y, Kang YQ, et al. Research progress on turmeric volatile oil [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2016, 31:212-215.
- 8 Zan XJ, Rong DY, Tu YH, et al. Effects of turmeric volatile oil on proliferation and apoptosis of squamous cell carcinoma A431 cells [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41:2883-2887.

- 9 Lyu LN, Zan XJ, Rong DY, et al. Effects of turmeric volatile oil on proliferation, migration and invasion of human skin squamous cell carcinoma SCL-1 cells and its pro-apoptotic mechanism [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 9:379-384.
- 10 Nandagopal N, Santat LA, Lebon L, et al. Dynamic ligand discrimination in the notch signaling pathway [J]. *Cell*, 2018, 172:869-880.
- 11 Lubin DJ, Mick R, Shroff SG, et al. The notch pathway is activated in neoplastic progression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2018, 72(4):66-70.
- 12 Filippovich IV, Sorokina NI, Lisbona A, et al. Radiation-induced apoptosis in human myeloma cell line increases Bcl-2/Bax dimer formation and does not result in Bax/Bax homodimerization [J]. *Int J Cancer*, 2015, 92:651-660.
- 13 Mao QX, Jia WX, Xiao XM, et al. Progress in the study of Notch signaling pathway in skin diseases [J]. *Iin J Derma Tol* (国际皮肤性病学杂志), 2016, 42:102-105.
- 14 Zhao WX, Lin JH. Notch signaling pathway and human placenta [J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9:447-452.
- 15 Zhang X, Tang B, Xu B, et al. Research progress on miRNA, miRNA-regulated signaling pathways and breast cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10:8812-8818.
- 16 Zhang M, Biswas S, Qin X, et al. Does Notch play a tumor suppressor role across diverse squamous cell carcinomas [J]. *Cancer Med*, 2016, 5:2048-2060.
- 17 Kim SJ, Lee HW, Baek JH, et al. Activation of nuclear PTEN by inhibition of Notch signaling induces G2/M cell cycle arrest in gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35:251-260.