

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.01.002

姜黄素对宫颈癌细胞生长与增殖的影响研究*

贺 帅^{1,2} 吴彦萍^{1,2} 蔡湘仪^{1,2} 陈红波² 王丽君² 黄来强^{1,2Δ}

(1 清华大学生命科学院 北京 100084;

2 深圳市基因与抗体治疗重点实验室和生物医药研究中心 清华大学深圳研究生院生命与健康学部 广东 深圳 518055)

摘要 目的:探究姜黄素(Curcumin)对宫颈癌细胞 HeLa 生长与增殖的影响及其作用机制。**方法:**体外培养 HeLa 细胞,以 $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 等不同浓度的姜黄素处理 HeLa 细胞;通过 MTT 和平板克隆实验,研究姜黄素对 HeLa 细胞生长与增殖的影响;通过免疫荧光共聚焦显微镜技术,研究姜黄素与上游结合因子(Upstream binding factor, UBF)在细胞中的定位情况;通过实时定量聚合酶链式反应(Q-PCR)实验,研究姜黄素对 HeLa 细胞核仁 rDNA 转录的影响;利用 Western blot 技术,研究姜黄素对 HeLa 细胞中 UBF 磷酸化的影响。**结果:**姜黄素对 HeLa 细胞有明显的生长抑制作用,并呈现出剂量依赖关系;姜黄素降低 rDNA 的转录水平,下调 UBF 磷酸化的量,且和 UBF 在核仁中存在共定位现象。**结论:**rDNA 转录水平的降低和 p-UBF 的下调可能是姜黄素抑制 HeLa 细胞生长和增殖的作用途径之一。

关键词:姜黄素;上游结合因子;核仁转录;聚合酶链式反应

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)01-7-04

Study on the Effect of Curcumin on Growth and Proliferation of HeLa Cell*

HE Shuai^{1,2}, WU Yan-ping^{1,2}, CAI Xiang-yi^{1,2}, CHEN Hong-bo², WANG Li-jun², HUANG Lai-qiang^{1,2Δ}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China; 2 The Shenzhen Key Laboratory of Gene and Antibody Therapy, Center for Biotechnology and Biomedicine and Division of Life and Health Sciences, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of curcumin on growth and proliferation of human cervical cancer HeLa cell, as well as the mechanism. **Methods:** HeLa cell was treated with different concentrations of curcumin, $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, in vitro. MTT and plate cloning experiments were used to study the effect of curcumin on growth of HeLa cell. Immune fluorescence confocal experiment was used to study the localization of curcumin and UBF in the cell. The real-time polymerase reaction experiment was used to detect the nucleolus transcription of HeLa cell. Western blot was used to study the level of phosphorylation of UBF. **Results:** Curcumin has an inhibitory effect on the growth of HeLa cell in a dose-dependent manner. Moreover, curcumin is co-localized in the nucleolus with UBF and could down-regulate the level of nucleolus transcription and the level of phosphorylation of UBF. **Conclusions:** The inhibitory effect may be achieved through the down-regulation of nucleolus transcription and the level of p-UBF.

Key words: Curcumin; Upstream binding factor (UBF); Nucleolus transcription; Q-PCR

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)01-7-04

前言

姜黄素(Curcumin),又称姜黄色素,分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$, 分子量为 368;是从姜科等一些植物的根茎中提取的一种化学物质,为二酮类化合物,呈橙黄色结晶粉末状,不溶于水。研究表明,姜黄素具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化及抗病毒等广泛的药理作用,具有副作用低、安全等特点;尤其是姜黄素的抗肿瘤作用及其作用机制的研究受到了极大的重视,成为了研究的热点^[1-3]。

上游结合因子(Upstream binding factor, UBF)的磷酸化形式是参与调控真核生物核糖核苷酸聚合酶 I (RNA pol I) 转录核糖体脱氧核糖核酸(rDNA)形成核糖体核糖核苷酸(rRNA)的重要转录因子^[4-8]。核糖体是形成蛋白质的“装配车间”,对细胞的生长和增殖等有着不言而喻的重要性。人源性 UBF 有两种异构体,UBF1 和 UBF2,两者是由同一基因编码,通过选择性剪切产生的两种产物;UBF1 分子量为 97 KDa, UBF2 分子量为 94 KDa, 和 UBF1 相比,UBF2 在 HMG2(High

* 基金项目:深圳市重点实验室计划以及深圳市科技项目(JCYJ20130402145002438, ZDSYS20140509172959975, GJHZ20140416153844269, JCYJ20140418112611757)

作者简介:贺帅(1989-),男,硕士,主要研究方向:分子细胞生物学,E-mail: hes13@mails.tsinghua.edu.cn

Δ 通讯作者:黄来强(1958-),男,教授,主要研究方向:分子细胞生物学,E-mail: huanglq@tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2016-04-30 接受日期:2016-05-24)

mobility group)的位置上少了37个氨基酸^[9-11]。研究表明,磷酸化的UBF(p-UBF)在rDNA转录中起着重要作用,其中,388和484位点丝氨酸磷酸化的作用尤为突出^[12-14];姜黄素通过影响UBF磷酸化的水平从而调控HeLa细胞生长和增殖等方面的报道还很少,本课题拟通过研究姜黄素调控p-UBF水平影响HeLa细胞生长和增殖等方面的机制,以期姜黄素在抗肿瘤方面的应用提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HeLa细胞源于实验室保存;激光共聚焦显微镜(FV1000)购买于日本Olympus;鼠源单克隆抗体C23(Nucleolin,NCL)购买于SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY;兔源多克隆抗体p-UBF(Ser 388)购买于SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY;兔源单克隆抗体UBF1购买于Abcam;姜黄素购买于上海阿拉丁公司,用DMSO制备成100 mmol·L⁻¹的母液,储藏在-20℃冰箱;细胞培养箱购买于美国Thermo公司等。

1.2 方法

1.2.1 癌细胞培养 HeLa细胞用含有10%胎牛血清的DMEM(Dulbecco modified eagle medium)培养基于37℃,5%CO₂恒温培养箱中培养;待细胞长满培养皿的80-90%时,用0.25%胰蛋白酶溶液进行细胞消化并离心,取一部分细胞冻存留种,其余的细胞进行传代并放置在37℃,5%CO₂恒温培养箱培养以备使用。

1.2.2 姜黄素对细胞生长影响的测定 取对数生长期的细胞消化后离心,用血球计数板计数,铺96孔板并放在恒温培养箱培养,每孔1×10⁴个细胞。待细胞贴壁后,吸去培养基,加入含有不同浓度姜黄素的培养基;浓度梯度为0 μmol·L⁻¹、5 μmol·L⁻¹、10 μmol·L⁻¹、20 μmol·L⁻¹、40 μmol·L⁻¹、80 μmol·L⁻¹等,每组三个平行。培养24 h,吸去培养基,加入含有MTT的培养基,继续培养4 h;吸去培养基,加入DMSO,震荡10 min左右,放入酶标仪中测490 nm波长处的吸光度(A)值。计算细胞生长抑制率,公式如下:细胞生长抑制率(%)=(1-实验组平均A值/对照组平均A值)×100%。

取对数生长期的细胞消化后离心,用血球计数板计数,铺6孔板,每孔2×10³个细胞。待细胞贴壁后,吸去培养基,加入含有不同浓度姜黄素的培养基培养细胞;浓度梯度为0 μmol·L⁻¹、5 μmol·L⁻¹、10 μmol·L⁻¹、20 μmol·L⁻¹,每组三个平行。培养一周,用PBS清洗3次;4%多聚甲醛固定,GIMSA染液进行细胞染色15 min,双蒸水清洗3次,晾干后观察并拍照。

1.2.3 姜黄素和UBF的定位检测 取对数生长期的细胞,接种到已放有盖玻片的6孔板,每孔1×10⁴个细胞,放置恒温培养箱培养。待细胞贴壁后,吸去培养基,加入含有姜黄素的培养基培养细胞,药物浓度为10 μmol·L⁻¹。培养24 h,取出盖玻片并用PBS清洗3次,用-20℃预冷过的甲醇固定5 min,3%的BSA封闭1 h,分别孵育一抗C23和UBF1,放在4℃冰箱孵育过夜。PBS清洗3次,避光孵育二抗1 h,PBS清洗3次;DAPI染液染色5 min,封片剂处理后放置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.4 荧光定量聚合酶链式反应(Q-PCR)检测rDNA转录的水平 取对数生长期的细胞接种到6孔板,放置恒温培养箱培养。待细胞贴壁后,吸去培养基,加入含有不同浓度姜黄素的培养基培养;浓度梯度为0 μmol·L⁻¹、5 μmol·L⁻¹、10 μmol·L⁻¹和20 μmol·L⁻¹。培养24 h,用Trizol法提取细胞总mRNA,逆转录获得cDNA,用2×SYBR Green qPCR master mix (High ROX;Biotool)试剂盒进行Q-PCR实验;以上具体步骤按照试剂盒说明书进行。Pre-rRNA的上游引物为5'-GAACGGTG-GTGTGTCGTTTC-3',下游引物为5'-GCGTCTCGTCTCGTCT-CACT-3'。以β-actin作为内参,上游引物为5'-ATCGTCCAC-CGCAAATGCTTCTA-3',下游引物5'-AGCCATGCCAATCT-CATCTTGTT-3'。

1.2.5 Western blot法检测p-UBF蛋白的表达 取对数生长期的细胞接种到6孔板,放置恒温培养箱培养;待细胞贴壁后,吸去培养基,分别加入含有姜黄素浓度为0 μmol·L⁻¹和20 μmol·L⁻¹培养基培养。在0 h、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h等时间点,用裂解液处理细胞获得蛋白样品,用10%的分离胶进行SDS-PAGE电泳,转膜至聚偏二氟乙烯膜(PVDF);5%的脱脂奶粉室温封闭1.5 h左右,PBST清洗3次,一抗在4℃摇床孵育过夜;PBST清洗后孵育二抗1 h,PBST清洗3次,用ECL试剂处理后曝光检测。

1.2.6 实验数据处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,进行t检验,P<0.05为具有显著性差异。

2 结果

2.1 姜黄素对癌细胞生长的抑制作用

24 h的MTT实验数据显示,对照组细胞生长良好,在姜黄素浓度为5 μmol·L⁻¹时,与对照组相比,姜黄素对细胞生长的抑制作用较小,不具有显著性差异。随着药物浓度的增加,从10 μmol·L⁻¹开始,姜黄素对细胞生长的抑制作用增加,具有显著性差异(P<0.05),且呈现一定的剂量效应,见图1A。由MTT实验确定后续实验所需的药物浓度,浓度梯度为0 μmol·L⁻¹、5 μmol·L⁻¹、10 μmol·L⁻¹和20 μmol·L⁻¹等。

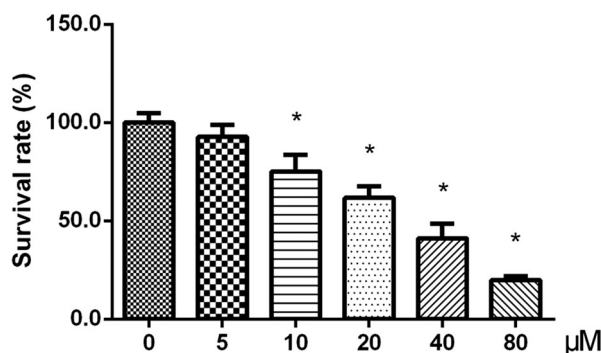


图1A MTT法检测HeLa细胞生长的结果

Fig. 1A Results of MTT in HeLa cell

*: P<0.05 compared with the control

平板克隆形成实验的数据与MTT实验结果相吻合,姜黄素可以抑制细胞的生长,且呈现一定的剂量效应,见图1B。

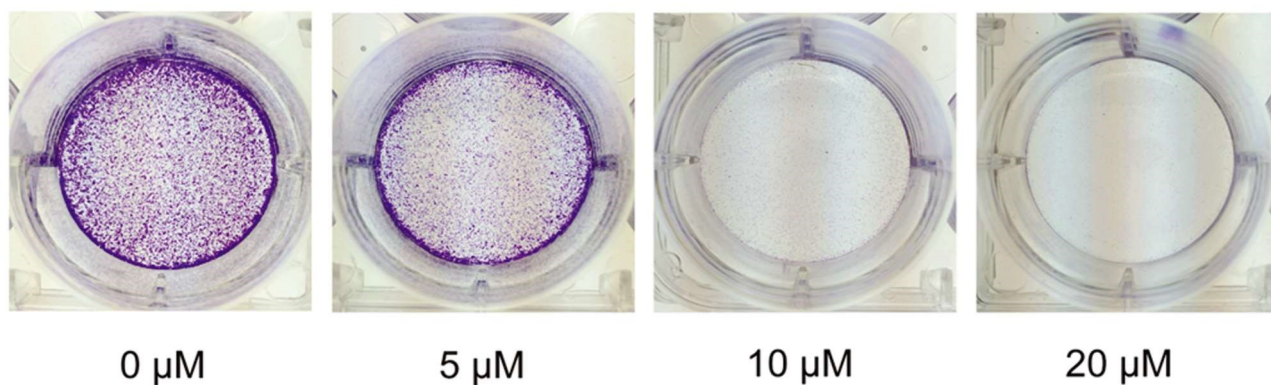


图 1B 平板克隆实验检测 HeLa 细胞生长的结果(1×)

Fig. 1B Results of plate cloning in HeLa cell (1×)

2.2 姜黄素和 UBF 在细胞核中的定位

免疫荧光共聚焦实验显示,姜黄素与核仁蛋白 C23 在核仁有共定位现象,表明姜黄素在核仁中有分布,见图 2A。分布于

核仁中的姜黄素和 UBF 在核仁中有明显的共定位现象,见图 2B;UBF 和姜黄素的共定位可能暗示着姜黄素通过作用于 UBF 进而影响 HeLa 细胞的生长。

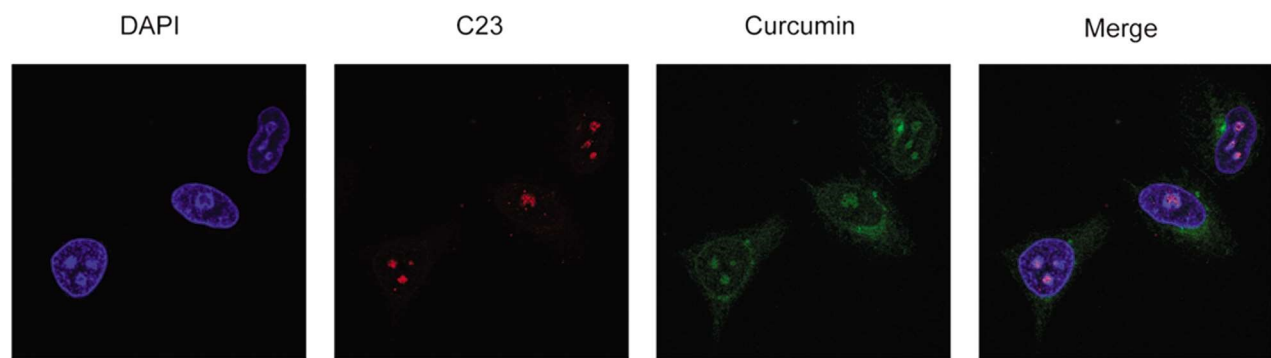


图 2A 姜黄素在细胞核中的定位(100×)

Fig. 2A Localization of curcumin in nucleolus of HeLa cell (100×)

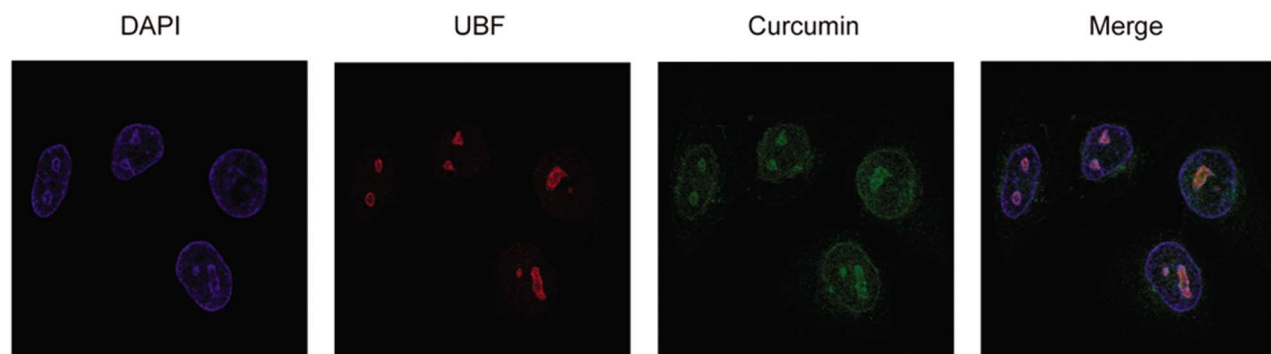


图 2B 姜黄素和 UBF 在细胞核中的共定位(100×)

Fig. 2B Co-localization of curcumin and UBF in nucleolus of HeLa cell(100×)

2.3 姜黄素对 rDNA 转录的抑制作用

24 h 的 Q-PCR 实验数据显示,姜黄素可以降低 HeLa 细胞 rDNA 的转录水平,且随着药物浓度的增加,抑制效果增加,见图 3。姜黄素浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 rDNA 转录水平与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的转录水平不具有显著性差异,可能是作用时间较短引起的。rDNA 转录水平的降低可能是姜黄素抑制 HeLa 细胞生长的作用途径。

2.4 p-UBF 蛋白的检测

在 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 等不同时间点下,与对照组(不同时间点下,左侧的孔道,即上药浓度为 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比,实验组(不同时间点下,右侧的孔道,即上药浓度为 20

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)在不同时间点下的变化有所不同。在 0 h 和 1 h 时,实验组与对照组中 p-UBF 的表达量基本没有变化;其它时间点下,实验组中 p-UBF 的表达量均有明显下降,见图 4。刚开始时,p-UBF 的表达没有变化,可能是作用时间较短引起的。

3 讨论

宫颈癌是女性恶性肿瘤中最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在发展中国家妇女中占很高比例^[15];现在主要的治疗手段为放射疗法、化学药物疗法和手术疗法等^[16]。研究表明,姜黄素可以作用于多种类型的肿瘤细胞,包括乳腺癌细胞、肝癌细胞、宫颈癌和乳腺癌细胞等;姜黄素可以通过调节相关的转录因子、

细胞因子、蛋白激酶及生长受体等来影响肿瘤细胞的生长,但对不同的肿瘤细胞类型,它的作用方式和途径却不尽相同^[17-19]。

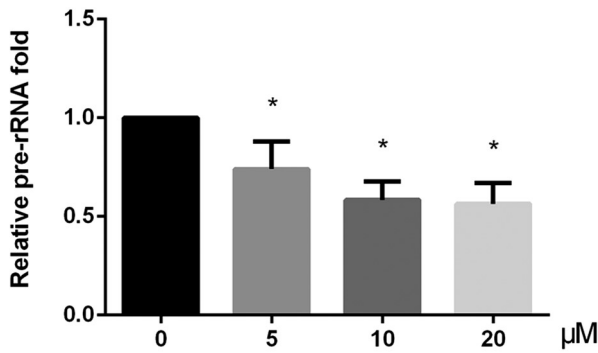


图3 Q-PCR 检测 rDNA 转录水平的结果

Fig. 3 Results of rDNA transcription detected by Q-PCR in HeLa cell
*: P<0.05 compared with the control

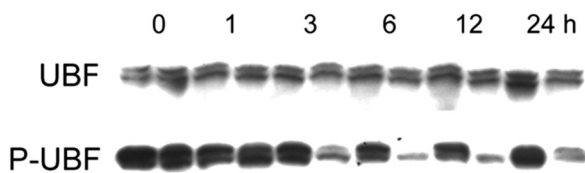


图4 p-UBF 的表达变化

Fig. 4 The expression of p-UBF of HeLa cell treated with curcumin at different time points

蛋白质作为生命物质的体现者,对细胞的生长有重要作用;而核糖体作为蛋白质的装配机器,其重要性不言而喻;UBF 作为一个 rDNA 转录的转录因子,其重要性已是显而易见;p-UBF 参与 rDNA 转录形成 18 s、5.8 s 和 28 s 核糖核苷酸的过程,对核糖体的形成有重要作用^[12,20]。研究表明,UBF 定位于核仁的纤维中心(Fibrillar center; FC)和致密纤维组分(Dense fibrillar component; DFC)^[21], p-UBF 可以通过与 SL1 (Human selectivity factor 1)及 pol I (Polymerase I)等作用形成一个前体转录起始复合物(Pre-initiation complex; PIC)参与 rDNA 的转录,转录周期包括转录的起始、启动子的脱离、转录的延伸和终止;p-UBF 主要参与转录的起始,首先 SL1 结合在 DNA 上,然后 p-UBF 以二聚体形式结合在 DNA 链上;结合 SL1 和 p-UBF 的 rDNA 招募 pol I 到 rDNA 链上,三者共同作用形成转录起始复合物,进行转录的起始^[13]。

本研究通过体外细胞培养等试验表明:姜黄素对 HeLa 细胞生长和增殖有抑制作用,且随着药物浓度的增加,呈现一定的剂量效应^[22,23];而且,姜黄素可以下调 p-UBF 蛋白的表达量,还引起 rDNA 转录水平的降低。因此,推断姜黄素可能通过下调 p-UBF 的表达量,进而引起 rDNA 转录水平的降低,最终抑制 HeLa 的生长和增殖。鉴于细胞生长代谢的复杂性和姜黄素广泛的生物学作用,UBF 可能是姜黄素影响 HeLa 细胞生长的作用靶点之一,但其具体的机制和分子机理还有待进一步的研究和探讨。

参考文献(References)

[1] Schaffer M, Schaffer PM, Bar-Sela G. An update on Curcuma as a functional food in the control of cancer and inflammation [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015, 18(6): 605-611

[2] Schaffer M, Schaffer PM, Zidan J, et al. Curcuma as a functional food in the control of cancer and inflammation [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011, 14(6): 588-597

[3] Odot J, Albert P, Carlier A, et al. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells [J]. Int J Cancer, 2004, 111(3): 381-387

[4] Sanij E, Poortinga G, Sharkey K, et al. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals[J]. J Cell Biol, 2008, 183(7): 1259-1274

[5] McStay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008, 24: 131-157

[6] Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T, et al. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(1): 29-49

[7] Wright JE, Mais C, Prieto JL, et al. A role for upstream binding factor in organizing ribosomal gene chromatin [J]. Biochem Soc Symp, 2006, (73): 77-84

[8] Moss T, Stefanovsky VY. At the center of eukaryotic life [J]. Cell, 2002, 109(5): 545-548

[9] Stefanovsky VY, Moss T. The Cruciform DNA Mobility Shift Assay: A Tool to Study Proteins That Recognize Bent DNA[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1334: 195-203

[10] Stefanovsky VY, Moss T. The splice variants of UBF differentially regulate RNA polymerase I transcription elongation in response to ERK phosphorylation[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(15): 5093-5101

[11] McStay B, Sullivan GJ, Cairns C. The Xenopus RNA polymerase I transcription factor, UBF, has a role in transcriptional enhancement distinct from that at the promoter[J]. EMBO J, 1997, 16(2): 396-405

[12] Sanij E, Hannan RD. The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin[J]. Epigenetics, 2009, 4(6): 374-382

[13] Russell J, Zomerdijs JC. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works[J]. Trends Biochem Sci, 2005, 30(2): 87-96

[14] Voit R, Grummt I. Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(24): 13631-13636

[15] 余理强, 张庆华. 姜黄素抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖的机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(8): 899-902

Yu Li-yao, Zhou Qing-hua. Inhibited Mechanisms of Curcumin on Proliferation of Cervical Cancer Cell Line HeLa [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2011, 38(8): 899-902

[16] 王倩, 赵刚. 姜黄素诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的机制[J]. 中国医院药学杂志, 2013, (17): 1385-1389

Wang Qian, Zhao Gang. Study on the mechanism of apoptosis induced by curcumin in cervical cancer HeLa cells[J]. China Journal of Hospital Pharmacy, 2013, (17): 1385-1389

[17] Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, et al. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment [J]. Molecules, 2015, 20(2): 2728-2769

[18] Ramasamy TS, Ayob AZ, Myint HH, et al. Targeting colorectal cancer stem cells using curcumin and curcumin analogues: insights into the mechanism of the therapeutic efficacy [J]. Cancer Cell Int, 2015, 15: 96

- [6] Johnson S A, Young C, Olney J W. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of nonhypoglycemic mice [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2008, 20(1): 21-28
- [7] Nie H, Peng Z, Lao N, et al. Effects of sevoflurane on self-renewal capacity and differentiation of cultured neural stem cells [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(8): 1758-1767
- [8] Greg Stratmann, Ran Dai, B.A, et al. Isoflurane Differentially Affects Neurogenesis and Long-term Neurocognitive Function in 60-day-old and 7-day-old Rats [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(6): 834-848
- [9] Androutsellis-Theotokis A, Soldner F, Hoeppner D J, et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo [J]. *Nature*, 2006, 442(7104): 823-826
- [10] Yang Q, Yan W, Li X, et al. Activation of canonical notch signaling pathway is involved in the ischemic tolerance induced by sevoflurane preconditioning in mice [J]. *Anesthesiology*, 2012, 117(5): 996-1005
- [11] Zhai W H, Zhao J, Huo S P, et al. Mechanisms of cytotoxicity induced by the anesthetic isoflurane: the role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 6929-6942
- [12] Jinbo Yin, Zhiyi Zuo, et al. Inhibition of Brain Ischemia-Caused Notch Activation in Microglia May Contribute to Isoflurane Postconditioning-Induced Neuroprotection in Male Rats [J]. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2014, 3: 718-732
- [13] Zhang F, Zhu Z Q, Liu D X, et al. Emulsified isoflurane anesthesia decreases brain-derived neurotrophic factor expression and induces cognitive dysfunction in adult rats [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(2): 471-477
- [14] Mazoit J X, P Roulleau, C Baujard. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the neonatal rhesus macaque brain: isoflurane or ischemia-reperfusion [J]. *Anesthesiology*, 2010, 113(5): 1245-1246
- [15] Culley D J, Boyd J D, Palanisamy A, et al. Isoflurane decreases self-renewal capacity of rat cultured neural stem cells [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(4): 754-763
- [16] Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, et al. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to up-dating and strengthening of spatial memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(14): 5919-5924
- [17] 李莎, 郑洪波, 黄雄, 等. BDNF 或 5HTTLPR 与抑郁症的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 34(12): 6788-6791
- Li Sha, Zheng Hong-bo, Huang Xiong, et al. Research on the Relationship Between BDNF or 5HTTLPR and Depressive Disorder [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 34(12): 6788-6791
- [18] 黎功炳, 雷宁, 龙静, 等. 刺五加胶囊改善抑郁大鼠学习记忆能力及对海马 BDNF 表达的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(6): 1078-1080
- Li Gong-bing, Lei Ning, Long Jing, et al. The Effects of Acanthopanax Senticosus Pill on the Expression of TH and TPH in Hippocampus of Depressed Rats [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(6): 1078-1080
- [19] Sall J W, Stratmann G, Leong J, et al. Isoflurane inhibits growth but does not cause cell death in hippocampal neural precursor cells grown in culture [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 826-833
- [20] Arevalo MA, Ruiz-Palmero I, Scerbo MJ, et al. Molecular mechanisms involved in the regulation of neurogenesis by estradiol: Recent advances [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 131(1-2): 52-56
- [21] Fujimoto M, Takagi Y, Muraki K, et al. RBP-J promotes neuronal differentiation and inhibits oligodendroglial development in adult neurogenesis [J]. *Dev Biol*, 2009, 332(2): 339-350
- [22] Greenberg D A, K Jin. Turning neurogenesis up a Notch [J]. *Nat Med*, 2006, 12(8): 884-885
- [23] Zhang HP, Sun YY, Chen XM, et al. The Neuroprotective Effects of Isoflurane Preconditioning in a Murine Transient Global Cerebral Ischemia-Reperfusion Model: The Role of the Notch Signaling Pathway [J]. *NeuroMolecular Medicine*, 2013, 16(1): 191-204
- [24] Tao J, Chen B, Gao Y, et al. Electroacupuncture enhances hippocampal NSCs proliferation in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via activation of notch signaling pathway [J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(3): 204-212

(上接第 10 页)

- [19] Bose S, Panda AK, Mukherjee S, et al. Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system [J]. *Cell Div*, 2015, 10: 6
- [20] Moore PB, Steitz TA. The involvement of RNA in ribosome function [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 229-235
- [21] Roussel P, Andre C, Masson C, et al. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle [J]. *J Cell Sci*, 1993, 104 (Pt 2): 327-337
- [22] Divya CS, Pillai MR. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis [J]. *Mol Carcinog*, 2006, 45(5): 320-332
- [23] 黄谟婉, 马英. 姜黄素对 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, (12): 1094-1097
- Huang Mo-wan, Ma Ying. Effect of Curcumin on Proliferation and Apoptosis of HeLa Cells [J]. *China Journal of Biologicals*, 2008, (12): 1094-1097