

· 基础研究 ·

姜黄素通过激活cAMP-PKA-CREB信号通路
促进诱导多功能干细胞神经分化

姚 辉 舒 涛 徐义春 侯 刚 赵慧清 张俊斌

摘要 **目的** 探讨姜黄素促诱导多功能干细胞 (iPSCs) 定向神经分化的作用及机制。**方法** 将分化的神经干细胞 (NSCs) 及神经元细胞分为空白组、姜黄素组及姜黄素 + H89 组, 其中空白组采用维甲酸 (RA) 诱导培养, 姜黄素组在上述基础上加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素, 姜黄素 + H89 组加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素和 $20 \mu\text{mol/L}$ H89 (PKA 抑制剂)。采用免疫荧光染色观察各组 NSCs 及神经元细胞的分化情况, ELISA 法测定各组 cAMP 含量, Western Blot 法测定各组 PKAc、pCREB、CREB、Nestin 及 MAP2 蛋白表达。**结果** 免疫荧光染色显示 iPSCs 经 RA 诱导可分化为 NSCs 并进一步分化为神经元细胞。在分化的 NSCs 及神经元细胞中, 姜黄素组及姜黄素 + H89 组 cAMP 含量较空白组增加 ($P < 0.05$); NSCs 中姜黄素组 Nestin、PKAc、pCREB 表达较空白组均增加 ($P < 0.05$); 姜黄素 + H89 组 Nestin、PKAc、pCREB 表达较空白组及姜黄素组均减少 ($P < 0.05$)。神经元细胞中, 姜黄素组 MAP2、PKAc、pCREB 表达较空白组均增加 ($P < 0.05$); 姜黄素 + H89 组 MAP2、PKAc、pCREB 表达较姜黄素组均减少 ($P < 0.05$)。**结论** 姜黄素可以促进 iPSCs 分化为 NSCs, 并进一步分化为神经元细胞, 而这一促进效应可能是通过激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路实现。

关键词 姜黄素; 诱导多功能干细胞; 神经分化; cAMP-PKA-CREB 信号通路

Curcumin Promotes Neural Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells via CAMP-PKA-CREB Pathway YAO Hui, SHU Tao, XU Yi-chun, HOU Gang, ZHAO Hui-qing, and ZHANG Jun-bin
Department of Orthopaedics, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou (510630)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and mechanism underlying curcumin promotes neural differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSCs). **Methods** iPSC-derived neural stem cells (NSCs) and neurons were divided into three groups, ie, blank group, curcumin group and curcumin + H89 group. The iPSCs were induced by retinoic acid (RA) in the blank group, while by $1 \mu\text{mol/L}$ curcumin added in the curcumin group and $1 \mu\text{mol/L}$ curcumin + $20 \mu\text{mol/L}$ H89 (inhibitor of PKA) added in the curcumin + H89 group. Immunofluorescence staining was used to observe the differentiation of NSCs and neurons in each group. CAMP content in each group was evaluated by ELISA. Protein expression of PKAc, pCREB, CREB, Nestin and MAP2 were assessed by Western Blot. **Results** Immunofluorescence staining showed iPSCs were induced into NSCs and neurons by RA. The cAMP content of the differentiated NSCs and neurons in curcumin group and curcumin + H89 group were both higher than that in blank group ($P < 0.05$). The expressions of Nestin, PKAc, and pCREB in NSCs in curcumin group were higher than those in blank group ($P < 0.05$), and the corresponding expressions in curcumin + H89 group were significantly lower than those in both blank group and curcumin group ($P < 0.05$). The expressions of MAP2, PKAc and pCREB in neurons in curcumin group were higher than those in blank group ($P < 0.05$), and the corresponding expressions in curcumin + H89 group were lower than those in curcumin group ($P < 0.05$). **Conclusion** It is suggested that curcumin promotes neural differentiation of iPSCs through the activation of cAMP-PKA-CREB pathway.

KEYWORDS curcumin; induced pluripotent stem cells; neural differentiation; cAMP-PKA-CREB pathway

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (No. 20191071)

作者单位: 中山大学附属第三医院骨科 (广州 510630)

通讯作者: 姚辉, Tel: 020-82179720, E-mail: yaoww001@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.2020.12.14.199

在特定条件下,诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)可以分化为神经干细胞(neural stem cell, NSCs),并进一步分化为有功能的神经元细胞,但分化时间较长且存活率低下,已经成为限制 iPSCs 进一步应用于脊髓损伤及神经退行性疾病的重要因素^[1,2]。cAMP-PKA-CREB 信号通路参与 NSCs 增殖^[3]与突触生成的调控^[4]。cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding, CREB)对 NSCs 存活和生长过程中的一些关键因子起着重要的调控作用^[5],其基础活性是 NSCs 有丝分裂信号转导所必需的条件^[3]。姜黄素是从植物姜黄根茎中提取的一种二芳基庚烷类化合物,具有抗炎及抗氧化作用,可以改善细胞活性及提高细胞生存的能力,从而发挥其神经保护作用^[6,7]。研究表明姜黄素可以明显提高骨骼肌细胞中环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的表达^[7],并且通过激活 cAMP 反应元件结合蛋白-脑源性神经营养因子(cAMP-response element binding-brain-derived neurotrophic factor, CREB-BDNF)通路发挥其神经保护作用^[8,9]。据此,推测姜黄素可以通过激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路促进 iPSCs 分化为 NSCs 并进一步分化为神经元细胞。

本研究采用维甲酸(retinoic acid, RA)诱导 iPSCs 分化为 NSCs 并进一步分化为神经元细胞,在这一过程中加入姜黄素观察其促 iPSCs 神经分化的效果,并进一步阐明 cAMP-PKA-CREB 信号通路的作用,旨在探讨一种高效稳定的方法促进 iPSCs 定向神经分化,为 iPSCs 的进一步临床应用提供细胞学基础。

材料与方法

1 细胞 小鼠来源的 iPSCs 由中国科学院广州生物医药与健康研究院提供赠送。

2 药物、主要试剂及仪器 姜黄素(北京索莱宝科技有限公司,货号:SC8670-20mg); RA(美国 Sigma 公司,货号:R2625-1G)及 Hoechst 33342(美国 Sigma 公司,货号:H21842); H89(美国 InvivoGen 公司,货号:tlrl-h89); DMEM 培养基(美国 Gibco Invitrogen 公司,货号:12400-024); N2B27 培养基(美国 Gibco Invitrogen 公司,货号:17502-048); 0.1% LIF(美国 Santa Cruz 公司,货号:sc-48577); 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF, 货号:100-18B-500)及表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF, 货号:AF-100-15-100)购于美国 PeproTech 公司; 兔抗

鼠微管相关蛋白 2(microtubule associated protein, 2MAP2)单克隆抗体(货号:AP-20)、兔抗鼠巢蛋白(Nestin)单克隆抗体(货号:Rat 401)及羊抗兔 CY3 标记二抗购于英国 Abcam 公司; cAMP ELISA 试剂盒(货号:SBJ-H0254)购于中国森贝伽生物科技有限公司。荧光显微镜(德国 Leica 公司);电泳仪和转膜仪(美国 BIO-RAD 公司);化学发光成像仪(美国通用公司)。

3 细胞培养及实验分组

3.1 iPSCs 向 NSCs 的分化 采用 DMEM 培养基(含有 15% FBS, 0.1% LIF, 1% β -巯基乙醇, 1%L-谷氨酰胺, 1% 非必需氨基酸)将小鼠 iPSCs 和胚胎成纤维细胞一起培养,分别将这些细胞加入不含 LIF 的拟胚体培养基中进行悬浮培养 2 日,加入 1 μ mol/L RA,继续培养 2 日。转入 N2B27 培养基(含有 1% N2, 2% B27, 1%L-谷氨酰胺, 1%Insulin-Trans-Sel-A, 20 ng/mL bFGF 和 20 ng/mL EGF)继续培养 7 日,直至神经球(iPSCs-NSCs)出现。

实验分 3 组进行,按上述方法培养的细胞为第 1 组(空白组),在空白组基础上加入 1 μ mol/L 姜黄素为第 2 组(姜黄素组),在第 2 组基础上继续加入 20 μ mol/L H89(PKA 抑制剂)为第 3 组(姜黄素 + H89 组)。

3.2 NSCs 进一步分化为神经元 采用 RA 诱导培养的方法,将小鼠 iPSCs 诱导分化为 NSCs。将获得的 NSCs 接种于多聚赖氨酸包被的载玻片小室内进行贴壁培养,加入含有 5% FBS 和 1 μ mol/L RA 的培养基,进行贴壁培养 7 天,将 NSCs 进一步分化为神经元细胞。

实验分 3 组进行,按上述方法培养的细胞为第 1 组(空白组),在空白组基础上加入 1 μ mol/L 姜黄素为第 2 组(姜黄素组),在第 2 组基础上继续加入 20 μ mol/L H89 为第 3 组(姜黄素 + H89 组)。

4 免疫荧光染色观察 各组所得的 NSCs 及神经元细胞,均采用 4% 多聚甲醛在 37 $^{\circ}$ C 固定 15 min。BSA 加入 0.1% Triton X-100 室温封闭 1 h。分别加入一抗兔抗鼠 Nestin 抗体(1:1 000)、兔抗鼠 MAP2 单克隆抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 环境中孵育 12 h,室温下加入羊抗兔 CY3 标记二抗(1:400)孵育 1 h,10 μ g/mL Hoechst 33342 染核 2~3 min,吸除染核试剂,添加少量 PBS 后,采用倒置荧光显微镜观察。

5 ELISA 法测定各组 cAMP 含量 根据 ELISA 试剂盒说明书操作步骤,裂解各组细胞,提取细胞内

蛋白, 在 450 nm 波长读取各孔的 OD 值, 先以标准物的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘出相应的标准曲线, 用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度, 即为样品的实际浓度。

6 Western Blot 法测定 PKAc、pCREB、CREB、Nestin 及 MAP2 蛋白表达 采用 Lysis buffer 从各组 NSCs 及神经元细胞中提取蛋白, 应用 10%SDS-PAGE 凝胶进行电泳, PVDF 膜转膜, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, 分别加入 Nestin 抗体 (1:1 000), MAP2 抗体 (1:1 000), PKAc 抗体 (1:1 000)、CREB 抗体 (1:1 000)、pCREB 抗体 (1:5 000), 4 ℃ 孵育 12 h, 辣根过氧化物酶标记二抗 (1:20 000) 室温孵育 1 h, ECL 显色试剂盒显色 2 min, 曝光后进行显影和定影。将胶片进行扫描, 采用 Image J1.48v 软件对条带进行灰度分析, 用目标蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值, 即可得到相对表达量, 进而绘制误差条图。

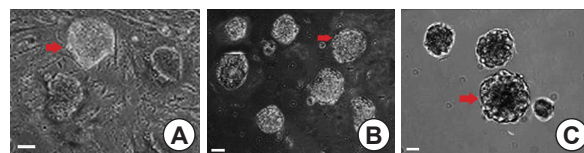
7 统计学方法 各项实验均独立重复 3 次, 所得数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 iPSCs 分化为 NSCs 并进一步分化为神经元 (图 1~3) iPSCs 经过悬浮培养 3~4 天后, 形成拟胚体 (embryoid body, EB)。在原培养基上加入 RA 进一步悬浮培养 5~7 天, 可见圆形或类圆形的细胞聚集体形成, 即为神经球 (图 1)。免疫荧光染色显示神经球细胞表达 Nestin 蛋白 (图 2)。经过进一步贴壁培养 5~7 天后, NSCs 进一步分化形成神经元, 免疫荧光染色显示表达 MAP2 (图 3)。

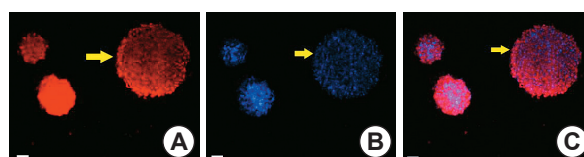
2 各组 cAMP 含量比较 (图 4) 姜黄素组 NSCs 中 cAMP 含量 $[(40.72 \pm 2.94) \text{ pmol/mL}]$ 较空白组 $[(19.80 \pm 1.13) \text{ pmol/mL}]$ 明显增加 ($P < 0.05$); 姜黄素 + H89 组 NSCs 中 cAMP 含量 $[(39.70 \pm 2.10) \text{ pmol/mL}]$ 较空白组亦明显增加 ($P < 0.05$); 姜黄素组与姜黄素 + H89 组 NSCs 中 cAMP 含量相差不大 ($P > 0.05$)。

姜黄素组神经元细胞中 cAMP 含量 $[(38.61 \pm 1.58) \text{ pmol/mL}]$ 较空白组 $[(18.96 \pm 0.93) \text{ pmol/mL}]$ 明显增加 ($P < 0.05$); 姜黄素 + H89 组神经元细胞中 cAMP 含量 $[(38.98 \pm 1.05) \text{ pmol/mL}]$ 较空白组也明显增加 ($P < 0.05$); 姜黄素组与姜黄素 + H89 组神经元



注: A 为 iPSCs; B 为 EB; C 为 NSCs; 红色箭头为各个培养阶段的典型细胞; Bar=100 μm

图 1 iPSCs 分化 NSCs 电镜结果 ($\times 200$)



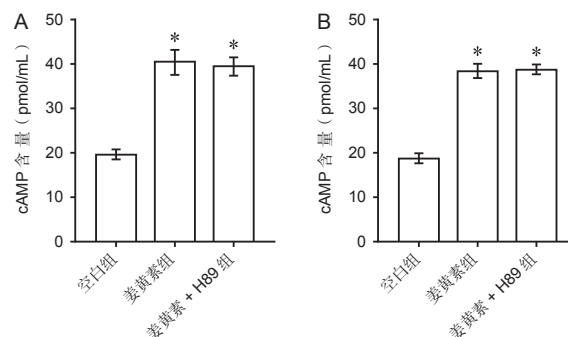
注: A 为神经球细胞 NSCs 的 Nestin 标记染色; B 为 NSCs 的 Hoechst 染色; C 为 A、B 染色的合并图; 黄色箭头为各种染色的典型细胞; Bar=200 μm

图 2 免疫荧光染色显示神经球细胞 NSCs 表达 Nestin ($\times 200$)



注: A 为神经元 MAP2 标记染色; B 为 Hoechst 染色; C 为 A、B 染色合并图; 黄色箭头为各种染色的典型细胞; Bar=100 μm

图 3 免疫荧光染色显示神经元细胞 MAP2 表达 ($\times 200$)



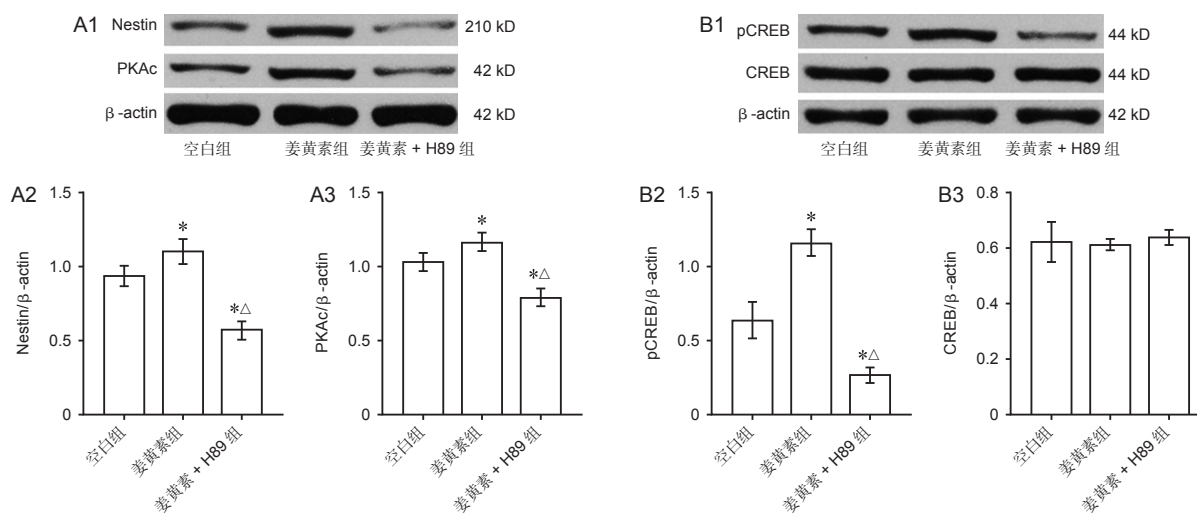
注: A 为各组 NSCs 中 cAMP 含量; B 为各组神经元细胞中 cAMP 含量; 与空白组比较, $*P < 0.05$

图 4 各组 cAMP 含量比较

细胞中 cAMP 含量相差不大 ($P > 0.05$)。

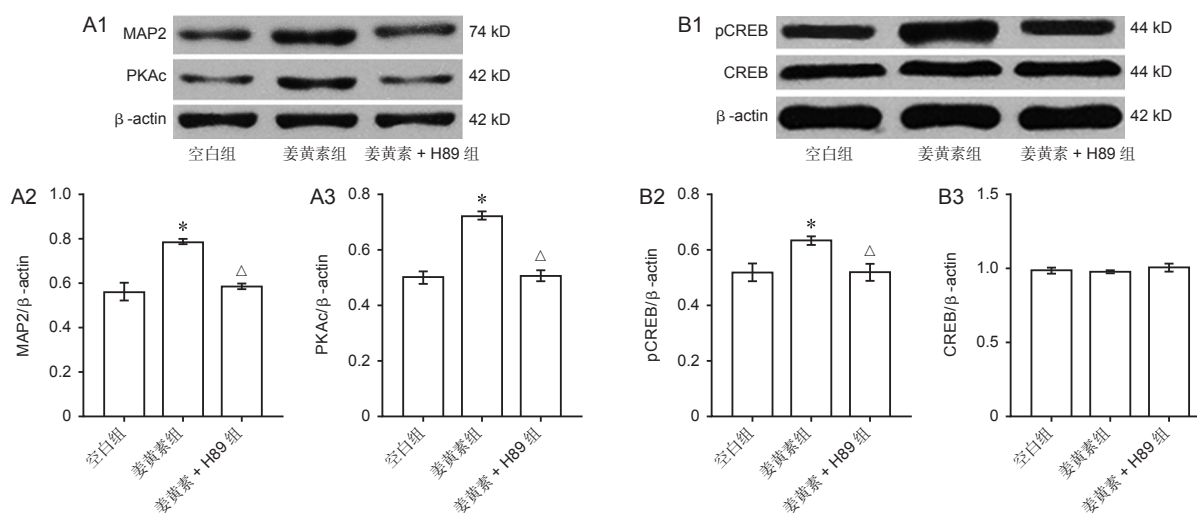
3 各组 NSCs 中 PKAc、pCREB、CREB 及 Nestin 蛋白表达比较 (图 5) 在 iPSCs 向 NSCs 分化的过程中, 与空白组比较, 姜黄素组 PKAc、pCREB 及 Nestin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 姜黄素 + H89 组 PKAc、pCREB 及 Nestin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 且低于姜黄素组 ($P < 0.05$)。

4 各组神经元细胞中 PKAc、pCREB、CREB 及 MAP2 蛋白表达比较 (图 6) 在 NSCs 向神经元



注: A1 为 Nestin 和 PKAc Western Blot 结果; A2 为 Nestin 相对表达量; A3 为 PKAc 相对表达量; B1 为 pCREB 和 CREB Western Blot 结果; B2 为 pCREB 相对表达量; B3 为 CREB 相对表达量; 与空白组比较, * $P<0.05$; 与姜黄素组比较, $\Delta P<0.05$

图 5 各组 NSCs 中 Nestin、PKAc、pCREB 及 CREB 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: A1 为 MAP2 和 PKAc Western Blot 结果; A2 为 MAP2 相对表达量; A3 为 PKAc 相对表达量; B1 为 pCREB 和 CREB Western Blot 结果; B2 为 pCREB 相对表达量; B3 为 CREB 相对表达量; 与空白组比较, * $P<0.05$; 与姜黄素组比较, $\Delta P<0.05$

图 6 各组神经元中 MAP2、PKAc、pCREB 及 CREB 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

细胞分化的过程中,与空白组比较,姜黄素组 PKAc、pCREB 及 MAP2 表达升高 ($P<0.05$)。与姜黄素组比较,姜黄素 + H89 组 PKAc、pCREB 及 MAP2 表达降低 ($P<0.05$)。

讨论

2006 年,有学者选取 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 四种基因,将其导入小鼠成纤维细胞,从而率先成功获得 iPSCs^[10]。iPSCs 与胚胎干细胞具有相似的自我更新和多向分化的潜能,但是直接来源于自体细胞,避免了免疫排斥和伦理学的争议。多项研究已经采用 RA 诱导,成功地将 iPSCs 诱导分化 NSCs,

并进一步分化为有功能的神经元细胞^[11-14],但分化时间较长且存活率低下,并已经成为限制 iPSCs 进一步应用于脊髓损伤及神经退行性疾病的重要因素^[1,2]。因此,寻找一种高效稳定的方法促进 iPSCs 定向神经分化,就显得极为重要。

在各种胞外刺激下,腺苷酸环化酶与 G 蛋白耦联受体结合活化,在质膜内催化 ATP 合成 cAMP, cAMP 与 PKA 的调节亚基 (regulatory subunit of protein kinase A, PKAr) 结合,可促使其催化亚基 PKAc 释放,PKAc 会进一步作用于 CREB,促进其磷酸化为 pCREB。pCREB 可以介导神经元对各种神经营养因子包括脑源性神经营养因子、神经

生长因子的反应^[15-17]。研究表明 cAMP-PKA-CREB 信号通路调控神经元的分化、存活, 调控突触生成并影响长时记忆^[4]。cAMP-PKA-CREB 信号通路的激活参与调控 NSCs 的增殖^[3]。本研究发现, 伴随着 cAMP-PKA-CREB 通路蛋白 PKAc 及 pCREB 表达的上调及下调, NSCs 标志物 Nestin 和神经元细胞标志物 MAP2 的表达也相应上升或下降 ($P<0.05$), 提示 cAMP-PKA-CREB 信号通路对于 iPSCs 的神经分化具有明显的正向调控作用。

姜黄素是从植物姜黄根茎中提取的一种二芳基庚烷类化合物, 其化学结构为两个芳香环通过一个庚烷脂肪链连接。姜黄素既含有酚结构, 又含有 β -二酮结构, 这些都是抗氧化剂的必备结构, 而且姜黄素还含有羟基和甲氧基取代基。其中酚结构是清除自由基的必要组成部分, 并且在甲氧基存在情况下, 这种清除作用还会更强。姜黄素通过对过氧化产物自由基的清除, 发挥其抗氧化作用, 进而对生物膜起到保护作用^[18]。另外, 姜黄素可以通过对 COX-2、LOX、iNOS、NF- κ B 等炎症相关因子的介导作用, 发挥其抗炎功能^[19]。卓越的抗炎、抗氧化作用, 使得姜黄素可以改善细胞活性并提高细胞生存的能力, 发挥神经保护作用, 并广泛应用于神经退行性疾病的预防和治疗^[6,7]。本项目研究发现, 在 RA 诱导 iPSCs 分化为 NSCs 并进一步分化为神经元细胞的过程中, 加入姜黄素后, Nestin 及 MAP2 表达均明显增加, 提示 NSCs 与神经元细胞存活率的提高, 这一改善可能与姜黄素抗炎、抗氧化作用密切相关, 最终的结论尚有待进一步的机制研究。

姜黄素发挥其生物学作用与调控 cAMP-PKA-CREB 通路密切相关。Sahebkar A 等^[7]研究发现姜黄素可以明显提高骨骼肌细胞中 cAMP 的浓度。Motaghinejad M 等^[8,9]研究发现姜黄素通过激活 CREB-BDNF 通路拮抗酒精介导的海马神经退变及尼古丁诱导的神经毒性作用。本研究发现, 在 iPSCs 分化为 NSCs 并进一步分化为神经元细胞的过程中, 姜黄素可以明显提高细胞中 cAMP 含量, 并增加 PKAc 及 pCREB 表达, 进而提高 Nestin 及 MAP2 表达, 与空白组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。在 iPSCs 分化为 NSCs 过程中加入 PKA 拮抗剂 H89 后, PKAc、pCREB 及 Nestin 的下调更加明显, 与姜黄素组及空白组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。而在 NSCs 分化为神经元细胞的过程中, H89 同样下调 PKAc、pCREB 及 MAP2 的表达, 但仅仅与姜黄素组有统计学差异 ($P<0.05$),

与空白组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。这一方面提示姜黄素促 iPSCs 神经分化的作用与激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路密切相关, 另一方面提示在未成熟的 NSCs 中, H89 对 PKA 的拮抗作用较强, 且 cAMP-PKA-CREB 通路是调控 iPSCs 向 NSCs 分化的主要通路。而在成熟的神经元细胞中, H89 对 PKA 的拮抗作用则相对较弱, 并可能存在调控这一过程的其他优势通路。

综上所述, 本研究结果表明姜黄素可以通过激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路促进 iPSCs 分化为 NSCs 并进一步分化为神经元细胞。在采用 RA 诱导 iPSCs 定向神经分化的过程中加入姜黄素, 不失为一种提高分化效率的方法。但本研究采用的姜黄素浓度主要根据既往文献报道, 在下一步工作中, 需要继续探讨不同浓度姜黄素的促分化效率及其机制, 力争使得该方法更加高效, 更加稳定。以期使 iPSCs 可以更高效稳定地分化为有功能的神经细胞, 为其进一步临床应用提供细胞学基础。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Srimasorn S, Kirsch M, Hallmeyer-Ellgner S, et al. Increased neuronal differentiation efficiency in high cell density-derived induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 2018784. doi: 10.1155/2019/2018784.
- [2] Frega M, van Gestel SH, Linda K, et al. Rapid neuronal differentiation of induced pluripotent stem cells for measuring network activity on micro-electrode arrays [J]. *J Vis Exp*, 2017, (119): 54900. doi: 10.3791/54900.
- [3] Iguchi H, Mitsui T, Ishida M, et al. cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice [J]. *Endocr J*, 2011, 58 (9): 747-759.
- [4] Schnaar RL, FLopez PH. Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87 (15): 3267-3276.
- [5] Sebastian D, Jordane M, Frédéric H, et al. cAMP response element binding protein is required for

- mouse neural progenitor cell survival and expansion [J]. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 2009, 27 (6): 1347–1357.
- [6] Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A review of its effects on human health [J]. *Foods*, 2017, 6 (10): 1–11.
- [7] Sahebkar A, Saboni N, Pirro M et al. Curcumin: An effective adjunct in patients with statin-associated muscle symptoms? [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2017, 8 (1): 19–24.
- [8] Motaghinejad M, Motevalian M, Fatima S, et al. Curcumin confers neuroprotection against alcohol-induced hippocampal neurodegeneration via CREB-BDNF pathway in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87: 721–740.
- [9] Motaghinejad M, Motevalian M, Fatima S, et al. The neuroprotective effect of curcumin against nicotine-induced neurotoxicity is mediated by CREB-BDNF signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42 (10): 2921–2932.
- [10] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126 (4): 663–676.
- [11] Yang M, Bao D, Shi A, et al. Zinc promotes patient-derived induced pluripotent stem cell neural differentiation via ERK-STAT signaling [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29 (13): 863–875.
- [12] Chang DF, Zuber SM, Gilliam EA, et al. Induced pluripotent stem cell-derived enteric neural crest cells repopulate human aganglionic tissue-engineered intestine to form key components of the enteric nervous system [J]. *J Tissue Eng*, 2020, 11: 1–12. doi: 10.1177/2041731420905701.
- [13] Shu T, Wu T, Pang M, et al. Effects and mechanisms of melatonin on neural differentiation of induced pluripotent stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474 (3): 566–571.
- [14] Shu T, Liu C, Pang M, et al. Effects and mechanisms of matrix metalloproteinase 2 on neural differentiation of induced pluripotent stem cells [J]. *Brain Res*, 2018, 1678: 407–418.
- [15] Ahn S, Ginty DD, Linden DJ. A late phase of cerebellar long-term depression requires activation of CaMKIV and CREB [J]. *Neuron*, 1999, 23 (3): 559–568.
- [16] Schulz S, Siemer H, Krug M, et al. Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term potentiation in the rat dentate gyrus *in vivo* [J]. *J Neurosci*, 1999, 19 (13): 5683–5692.
- [17] Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, et al. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses [J]. *Neuron*, 1997, 19 (5): 1031–1047.
- [18] Kunwar A, Priyadarsini KI. Curcumin and its role in chronic diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 928: 1–25.
- [19] Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 105–125.
- (收稿: 2020-02-28 在线: 2021-01-20)
责任编辑: 赵芳芳