

بررسی بیان ژن Bcl-xl متعاقب اثر کلستاز و داروی کورکومین در ناحیه هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر

سمیه باغبادرانی^۱، محمد ناصحی^۲، مهرداد هاشمی^۳

^۱ کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۳ استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کلستاز نوعی بیماری کبدی است که در آن ترشح صفرا دچار اختلال شده و منجر به تجمع نمک‌های صفراوی می‌شود، و در صورت درمان نشدن قادر به تاثیرگذاری روی اندام‌های مختلف بدن از جمله قلب، عروق و مغز است. این بیماری در بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز و بیوزنز میتوکندریایی تاثیرگذار است. کورکومین در درمان بیماری‌های مزمنی از جمله اختلالات التهابی، عصبی و بیماری‌های نئوپلاستیک نقش درمانی موثر و کارآمدی دارد. در این پژوهش، اثرات بیماری کلستاز بر تغییرات بیان ژن ضد آپوپتوزی (BCL-XL) در ناحیه هیپوکمپ مغز موش صحرایی نر نژاد ویستار و همچنین تاثیر کورکومین بر بیان این ژن بررسی شد.

روش بررسی: موش‌ها به چهار گروه BDL، BDL - کورکومین، شم - کورکومین و کنترل تقسیم شدند. گروه اول، تحت جراحی BDL (بستن مجرای صفراوی) قرار گرفتند. گروه دوم، علاوه بر جراحی تحت تیمار با کورکومین واقع شدند. گروه سوم، فقط استرس جراحی را دریافت کرده و با دارو نیز تیمار شدند. گروه چهارم، شامل موش‌های سالم بودند. در مرحله بعدی هیپوکمپ موش‌ها جمع‌آوری، RNA استخراج، cDNA سنتز و در نهایت میزان بیان ژن توسط تکنیک Real Time PCR/اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی گروه مبتلا به کلستاز تیمار شده با کورکومین نشان دادند که دارو منجر به افزایش بیان ژن BCL-XL در هیپوکمپ موش صحرایی نر شد.

نتیجه‌گیری: داده‌ها بیانگر این هستند که کورکومین می‌تواند آپوپتوز القا شده توسط کلستاز را در منطقه هیپوکمپ موش صحرایی نر تغییر دهد.

واژگان کلیدی: کلستاز، BCL-XL، آپوپتوز، هیپوکمپ، کورکومین.

مقدمه

کلستاز از لحاظ لغوی به معنی "ایستادگی صفرا" است و هرگونه شرایطی را که موجب حفظ و تجمع اسیدهای بالقوه سمی صفرا در کبد و گردش خون سیستمیک شود را شامل می‌شود. کلستاز با علل مختلفی، از جمله بیماری‌های خود ایمنی، تومورهای پانکراس، کبد یا درخت صفراوی، التهاب،

عفونت‌های ویروسی و سنگ‌های صفراوی، قابل هدف‌گیری است (۱-۳). کلستاز باعث تجمع ترکیبات سمی، از جمله نمک‌های صفراوی در سلول‌های کبد می‌شود (۴)، که به دو نوع خارج کبدی و داخل کبدی تقسیم می‌شود. در نوع خارج کبدی آن انسداد مکانیکی، در مجاری صفراوی خارج کبدی

آدرس نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران پزشکی.

ایران، محمد ناصحی (email: nasehi@iricss.org)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۲/۲۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۶/۱۵

داخلی ترین بخش کورتکس لوب گیجگاهی است که به سمت پایین مغز و سپس به سمت سطح زیرین بطن های طرفی امتداد می یابد. تشکیلات هیپوکامپ (Hippocampal formation) بخشی از لوب گیجگاهی را به خود اختصاص می دهد که خود از چندین بخش به هم مرتبط، شامل جسم هیپوکامپ، شکنج دندانهای (Dentate gurus) و سایبیکولوم (Subiculum) تشکیل شده است. جسم هیپوکامپ و شکنج دندانهای بخشی از آرکتوکورتکس است و سایبیکولوم بخش انتقالی کورتکس را در بر می گیرد، یعنی حد وسط بین آرکتوکورتکس و نئوکورتکس است. هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک است که در مکانیسم بقا حافظه (Memory retention) شرکت می کند. هیپوکامپ از قاعده مغز جلویی و سیتوم، اوران های کولینرژیک دریافت می کند که در اعمال حافظه و یادگیری نقش مهمی دارند (۱۵).

هدف از انجام این پروژه بررسی میزان بیان ژن ضد آپوپتوزی BCL-XL در بیماری کلستانز و همچنین بررسی تاثیر داروی کورکومین بر میزان بیان و یا مهار این ژن در هیپوکامپ موش صحرایی نر بود.

مواد و روشها

بخش حیوانی

در این پژوهش، ۳۲ موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۲۰ تا ۲۴۰ گرم از دانشکده فارماکولوژی دانشگاه تهران تهیه و به چهار گروه زیر تقسیم شدند: الف. گروه کنترل: این گروه تنها دارای رژیم آب و غذا بودند. هدف از مطالعه این گروه سنجش فرایندهای آپوپتوز در حالت پایه بود.

ب. گروه شم-کورکومین: در این گروه علاوه بر رژیم آب و غذا، تداخل استرس ناشی از جراحی به همراه دریافت کورکومین مورد بررسی قرار گرفت.

ج. گروه BDL (bile duct ligation): در این گروه انسداد مجرای صفراوی در موش ها ایجاد شد و حیوانات این گروه هیچ دارویی را دریافت نکردند.

د. گروه BDL-کورکومین: موش های این گروه علاوه بر انسداد مجرای صفراوی، متحمل دریافت داروی کورکومین هم شدند.

مراحل جراحی جهت ایجاد انسداد مجرای صفراوی (BDL)

حیوان ها با تزریق درون صفاقی (Intra peritoneal injection) IP: کتامین (Ketamine) حیوانی ۱۰ درصد و زایلین بیهوش

یا ناف کبد وجود دارد، که این انسداد باعث افزایش فشار صفرا شده و در نهایت نیز موجب کاهش جریان صفرا می شود (۵). نوع دیگر، کلستانز داخل خود کبد است که قسمت های مختلف هپاتوسیت ها و کانالیکول ها را درگیر می کند. دلیل ایجاد این نوع کلستانز مصرف برخی داروها و دوران بارداری است (۵). در مطالعات بافتی مبتلایان به کلستانز، رنگدانه های صفراوی در سلول های کبدی مشاهده می شود. یافته های بالینی، حاکی از تجمع بیلی روبین، اسیدهای صفراوی و کلسترول در خون و بافت های خارج کبدی می باشد که این تجمعات باعث ایجاد لکه های زرد در زیر پوست، خارش، و همچنین زردی غشاهای مخاطی و مایعات بدن می شود. از عوارض دیگر کلستانز می توان به ایجاد اختلال در فعالیت های روزانه و خواب اشاره کرد (۶). در آسیب های کبدی انواع مختلفی از مرگ های سلولی دیده می شود، مانند: آپوپتوز، نکروز، نکروپتوزیس و اتوفاژی. به طور کلی هر دو نوع کلستانز منجر به تجمع اسیدهای صفراوی در کبد می شود که این بالا رفتن می تواند سلول های کبدی را به سمت آپوپتوز و نکروز هدایت کند و سرانجام منجر به ایجاد بیماری های مزمن کبدی شود (۷).

کورکومین (CUR)، عصاره ریزوم زردچوبه است، که در درمان بیماری های مزمنی از جمله اختلالات التهابی، عصبی و بیماری های نئوپلاستیک نقش درمانی موثر و کارآمدی دارد (۸، ۹). کورکومین دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضد ویروسی، ضدالتهاب، ضدتکثیر و آنتی اکسیدانی است و همچنین در درمان بیماری هایی از قبیل پسوریازیس، MS، بیماری های قلبی و عروقی، التهاب روده، ایدز و آلرژی موثر است (۸، ۱۰-۱۲). کورکومین همچنین، باعث کاهش اثرات کلستانز و کاهش سیروز کبدی می شود (۱۳). تحقیقات علمی نشان می دهد که کورکومین مولکولی بسیار پلیوتروپ با اهداف مولکولی متعدد است. فاکتورهای رونویسی متاثر از کورکومین بسته به هدف ممکن است فعال یا مهار شوند. با توجه به نقش موثر کورکومین در مسیر مرگ سلولی آپوپتوز از یک سو، و تاثیر بیماری کلستانز در بروز این نوع مرگ سلولی، در این پژوهش موش های صحرایی نر مبتلا به کلستانز با داروی کورکومین تیمار شدند تا میزان بیان ژن ضد آپوپتوزی BCL-XL بررسی شود. BCL-XL ژنی در موقعیت کروموزومی (16q21.33) است که مولکولی گذرنده از غشای میتوکندری است و خاصیت ضد آپوپتوزی نیز دارد.

ناحیه هیپوکامپ به علت شباهت آن به اسبیک ماهی (Hippicampus)، این گونه نامیده شده است. هیپوکامپ

اسپکتروفتومتر (Nanodrop BioTek Epoch آمریکا) در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ اندازه‌گیری شد.

سننتز cDNA از RNAهای استخراج شده

برای یکسان‌سازی غلظت RNAها، حجم RNA ورودی به کیت cDNA 1500 ng/μl در نظر گرفته شد. ساخت Master برای سننتز cDNA و دیگر مراحل سننتز cDNA نیز طبق پروتکل کیت جدول ۱ انجام گرفت.

جدول ۱. مواد و حجم مورد نیاز برای ساخت Master جهت سننتز cDNA

مواد	حجم (μl)
Oligo d(T)	۱
10X Buffer M-MuLV	۲
RT (Reverse Transcriptase) (M-MuLV)	۰/۵
Rnase Inhibitor	۰/۵
10Mm dNTP Mix	۲
DEPC-treated water	۵

طراحی و BLAST (Basic Local Alignment Search)

پرایمرهای Real Time PCR (Tool)

در این مطالعه میزان بیان ژن هدف BCL-XL در مقایسه با ژن رفرنس GAPDH اندازه‌گیری شد. پرایمر ژن، BCL-XL و GAPDH به استناد به رفرنس (۹) طراحی و تمامی پرایمرها توسط NCBI BLAST مورد آنالیز قرار گرفتند. آنالیزهای انجام شده نشان‌دهنده عدم همولوژی پرایمرها با مناطق ژنومی و رونوشت‌های دیگر و همچنین عدم ایجاد ساختار دوم در این پرایمرها بود (جدول ۲).

مراحل انجام Real Time PCR

cDNAها را به نسبت 1/5 با DDW رقیق کردیم تا به غلظت نهایی 15ng/μl برسد. سپس پرایمرها را نیز رقیق کردیم تا به غلظت نهایی ۰/۲ pmol/μl برسند.

در مرحله بعد طبق پروتکل موجود در کیت Master Mix، cDNA و پرایمرها را با یکدیگر مخلوط کردیم و Real Time

شدند. سپس حیوان به پشت خوابانده شده و با استفاده از تیغ جراحی برشی در ناحیه زیر جناغ ایجاد شد. در مرحله بعد کبد به آرامی بیرون آورده شد و در ناحیه فوقانی بر روی قفسه سینه حیوان قرار گرفت. سپس مجرای صفراوی مشترک بالا آورده شده و رگ خونی متصل به آن نیز جدا شد. با استفاده از نخ بخیه استریل غیرجذبی، دو گره در دو نقطه از مجرا زده شد و حد فاصل بین این دو گره با استفاده از قیچی برش زده شد تا از صحت قطع جریان صفراوی اطمینان حاصل شود (۱۶). سپس اندام‌ها به درون شکم بازگردانده شدند. در انتها با بهره‌گیری از نخ بخیه استریل، سطح شکمی بخیه زده شد.

طرز تهیه محلول دارویی

کورکومین به صورت پودر از شرکت سیگما تهیه و در DMSO حل شد. دوز نهایی به کار برده شده معادل ۴۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم بود که در DMSO با نسبت ۵ درصد حل شد. موش‌ها در یک دوره زمانی ۲۸ روزه (به صورت یک روز در میان) پس از جراحی با کورکومین تیمار شدند و در نهایت مغز موش‌ها به منظور بررسی میزان بیان ژن BCL-XL استخراج شدند.

بخش ژنتیکی

استخراج RNA از بافت

به منظور استخراج RNA از بافت هیپوکمپ، کیت ترایزول شرکت سینا ژن خریداری شد. استخراج RNA طبق پروتکل کیت انجام شد و سپس OD نمونه‌های مورد نظر با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری و بعد RNAهای استخراج شده برای انجام مراحل بعدی پژوهش در فریزر -۸۰ نگه‌داری شدند.

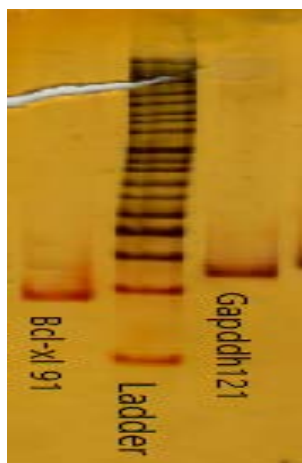
بررسی کمی و کیفی RNAهای استخراج شده به روش

اسپکتروفتومتری

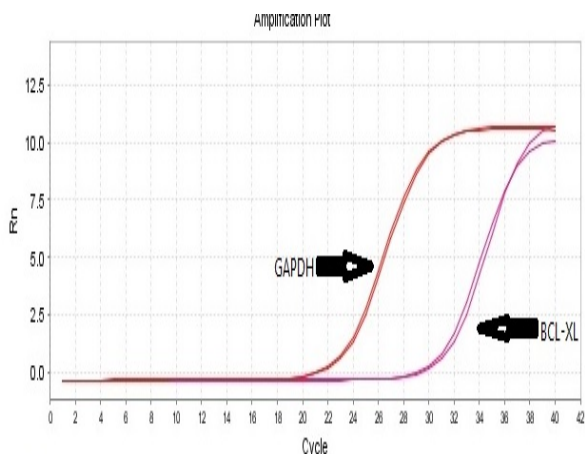
جهت بررسی میزان خلوص و غلظت RNAهای استخراج شده، OD (Optical Density) آن‌ها به وسیله دستگاه

جدول ۲. پرایمرهای ژن‌های مورد نظر

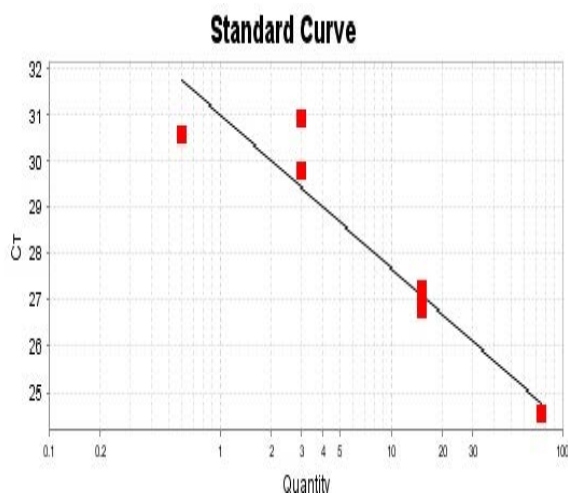
نام ژن	سکانس پرایمر 3'→5'	طول قطعه تکثیر شونده	طول پرایمر
GAPDH	F : AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG R : CATACTCAGCACCAGCATCACC	121	F: 22 R: 22
BCL-XL	F:GCTGGTGGTTGACTTTCTCTCC R:GGCTTCAGTCCTGTCTCTCCG	91	F:22 R:22



شکل ۱. نتیجه PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) برای تکثیر ژن مورد نظر در نمونه کنترل با پرایمرها. اعداد نشان دهنده طول قطعات تکثیر شده بر حسب جفت باز هستند.



نمودار ۱. نمودار تکثیر ژنهای BCL-XL و GAPDH با دوبار تکرار



نمودار ۲. منحنی استاندارد ژن BCL-XL: شیب خط: -۳/۳۱۶ بازده: ۱

PCR انجام شد. لازم به ذکر است به منظور جلوگیری از اختلال در نشر فلور سانس، پلیت‌ها با برچسب مخصوص شرکت ABI پوشانده شدند و از تشکیل حباب در داخل چاهک‌ها نیز جلوگیری شد. پلیت Real Time PCR را در دستگاه ABI Step One Plus Real Time PCR قرار داده و طبق جدول ۳ برنامه زمان‌بندی مورد نظر در دستگاه تنظیم و واکنش شروع شد.

جدول ۳. برنامه دو مرحله ای Real Time PCR

شماره چرخه	زمان هر چرخه	دما (درجه سانتی‌گراد)
۱	۱۵ دقیقه	۹۵
۲-۴۰	۱۵ ثانیه	۹۵
	۶۰ ثانیه	۶۴

جهت رسم منحنی ذوب از جدول زمان‌بندی ۴ استفاده شد، لازم به ذکر است شیب افزایش دما از ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ۹۵ درجه سانتی‌گراد برابر با ۰/۳ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

جدول ۴. برنامه رسم منحنی ذوب توسط دستگاه

دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
۹۵	۱۵
۶۰	۶۰
۹۵	۱۵

محاسبه میزان بیان ژن و آنالیز آماری

برای محاسبه بیان ژن در گروه‌های مختلف از نرم افزار REST 2009 و KIAGENE برای مشخص کردن میزان معناداری نتایج از برنامه SPSS و آزمون t-TEST، و همچنین برای رسم نمودارها نیز از سیگماپلات استفاده کردیم.

یافته‌ها

تایید صحت پرایمرها

شکل ۱ تاییدی بر طول صحیح و تک باند بودن قطعات تکثیر شده با پرایمرها است. لازم به ذکر است به جهت اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر در این بخش از کار از نمونه کنترل استفاده کردیم.

منحنی تکثیر

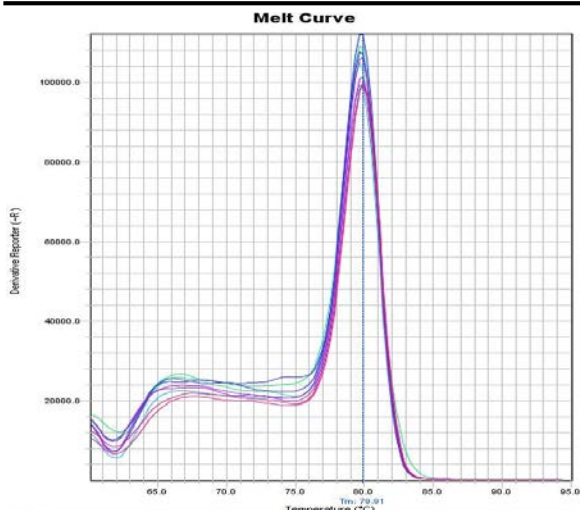
نمودار ۱ نمونه‌ای از منحنی تکثیر ژن BCL-XL و ژن رفرنس (GAPDH) را با دوبار تکرار نشان می‌دهد.

منحنی استاندارد

نمودارهای ۲ و ۳ منحنی‌های استاندارد برای ژنهای BCL-XL و GAPDH هستند.

منحنی ذوب

میزان نشر فلورسانس در دمای ذوب به طور ناگهانی تغییر کرده و در نتیجه در این منحنی هر قله نشان دهنده دمای ذوب یک محصول PCR است که لازم به ذکر است با استفاده از منحنی ذوب می توان به اختصاصیت PCR و عدم تشکیل دایمر پرایمر پی برد، و در صورتی که منحنی ذوب برای هر ژن منحصرآ دارای یک قله باشد، اختصاصیت و عدم تشکیل دایمر پرایمر تأیید می شود.



نمودار ۵. منحنی ذوب ژن BCL-XL با نقطه ذوب 79/91°C

جدول ۵. میزان بیان ژن BCL-XL در گروه BDL نسبت به گروه کنترل

نام ژن	نسبت بیان ژن بین دو گروه	ارزش P
BCL-XL	۰/۵۹۵	> 0.05

جدول ۶. میزان بیان ژن BCL-XL در گروه BDL - کورکومین نسبت به گروه کنترل

نام ژن	نسبت بیان ژن بین دو گروه	ارزش P
BCL-XL	۱۱/۳۱۴	< 0.001

جدول ۷. میزان بیان ژن BCL-XL در گروه BDL - کورکومین نسبت به گروه BDL

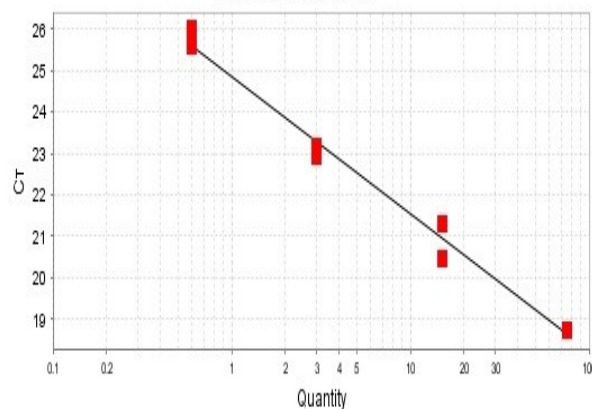
نام ژن	نسبت بیان ژن بین دو گروه	ارزش P
BCL-XL	۳/۳۶۴	< 0.05

جدول ۸. میزان بیان ژن BCL-XL در گروه شم - کورکومین نسبت به گروه کنترل

نام ژن	نسبت بیان ژن بین دو گروه	ارزش P
BCL-XL	۱/۰۰۰	> 0.05

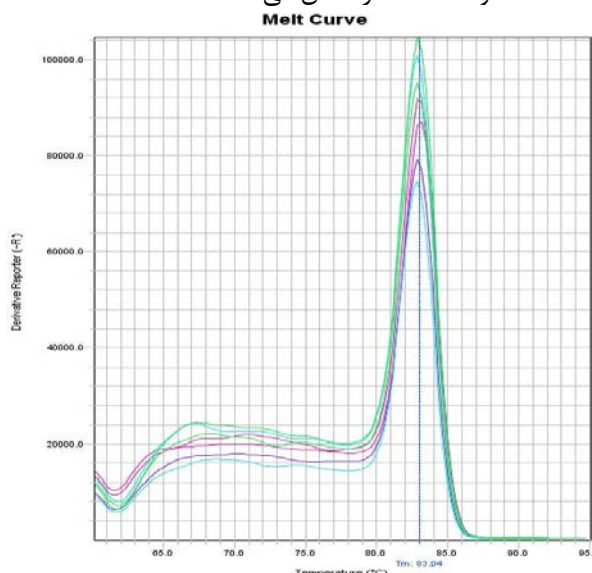
در مقایسه گروه BDL نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری در میزان بیان ژن BCL-XL دیده نشد. در مقایسه گروه BDL - کورکومین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری در میزان بیان ژن BCL-XL دیده شد. در مقایسه گروه BDL - کورکومین نسبت به گروه BDL تفاوت معناداری در میزان بیان ژن BCL-XL دیده شد. در مقایسه گروه شم - کورکومین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری در میزان بیان ژن BCL-XL دیده نشد.

Standard Curve



نمودار ۳. منحنی استاندارد ژن GAPDH شیب خط = -۳/۳۳۹ بازده: ۰/۹۹

نمودارهای ۴ و ۵ زیر تک قله ای بودن منحنی ذوب ژن های BCL-XL و GAPDH را نشان می دهند.



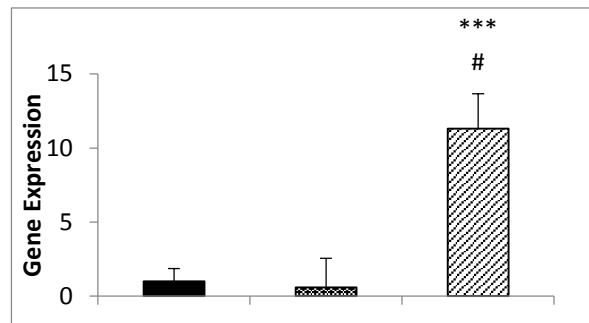
نمودار ۴. منحنی ذوب ژن GAPDH با نقطه ذوب 83/04°C

نتایج بیان ژن و آنالیزهای آماری

جداول ۵-۸ میزان معناداری بیان ژن BCL-XL در گروه های مختلف را نسبت به یکدیگر نشان می دهند.

نمودار مقایسه بیان ژن

نمودار ۶ مقایسه‌ای بین میزان بیان ژن BCL-XL در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل و همچنین بین دو گروه BDL - کورکومین و BDL است.



نمودار ۶. مقایسه میزان بیان ژن BCL-XL در گروه‌های مختلف نسبت به یکدیگر و نسبت به گروه کنترل. معنی‌داری با گروه کنترل: * معناداری با گروه BDL: #

بحث

نارسایی‌های حاد کبدی ناشی از عوامل متعددی از جمله هیپاتیت‌های ویروسی، آسیب‌های توکسیک ناشی از سموم و داروها و ایسکمی‌ها است. کبد اولین سد دفاعی بدن در برابر مواد سمی بیولوژیک است که در صورت آسیب دیدن، نکروز سلول‌های کبدی را نیز به دنبال دارد. در آسیب‌های توکسیک کبد، استرس‌های اکسیداتیو نقشی اساسی بر عهده دارند (۱۷). طی دهه‌های اخیر تعداد زیادی از محصولات طبیعی و ترکیبات غذایی به عنوان محافظ کبد مورد بررسی قرار گرفته‌اند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که فاکتورهای غذایی نقش مهمی را در بالا بردن توانایی بدن برای سم‌زدایی مواد شیمیایی و داروها ایفا می‌نمایند.

در مطالعه‌ای که توسط چم و در انجام شد مشخص شد که زردچوبه باعث مهار ترشح فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور-آلفا می‌شود (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای که توسط کانگ و چونگ انجام شد مشخص شد که زردچوبه سبب مهار اینترلوکین ۱ (یکی از عوامل نکروز بافتی) می‌شود (۱۹).

در مقالات متعددی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد سمیت، ضد التهاب و ضدسرطانی کورکومین نیز گزارش شده است. لازم به ذکر است که کورکومین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی توانایی جمع‌آوری و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزادی نظیر گونه‌های فعال اکسیژن را دارد (۲۰).

همانطور که پژوهش‌های انجام شده در گذشته نشان داده‌اند، کلستاز باعث القای آپوپتوز و افزایش بیان ژن BAX نیز می‌شود، در این پژوهش که به منظور بررسی تاثیر داروی کورکومین بر میزان بیان ژن BCL-XL انجام شد، به این نتیجه رسیدیم که کورکومین در گروه BDL - کورکومین باعث افزایش بیان ژن BCL-XL می‌شود و در نتیجه القای آپوپتوز را در سلول‌های بدن کاهش می‌دهد.

از بررسی و مقایسه نتایج به دست آمده و مطالعات پیشین می‌توان به این نتیجه رسید که کلستاز سبب ایجاد آپوپتوز و افزایش میزان بیان ژن BAX می‌شود و همان طور که از نتیجه این پژوهش نیز به دست آمد نشان داده شد که داروی کورکومین با توجه به هدفش باعث افزایش بیان ژن BCL-XL و در نتیجه کاهش آپوپتوز می‌شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات اساتید گران قدر جناب آقای دکتر مهرداد هاشمی و جناب آقای دکتر محمد ناصحی بسیار سپاسگزارم که با راهنمایی‌های ارزشمندشان مرا در انجام این پروژه یاری کردند.

REFERENCES

- Elferink RO. Cholestasis. Gut 2003;52:ii42-8.
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol 2010;11:655-67.
- Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. Cell 2012;148:228-43.
- Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. Gastroenterology 2010;139:1481-96.
- Trauner M. Molecular alterations of canalicular transport systems in experimental models of cholestasis: possible functional correlations. Yale J Biol Med 1997;70:365-78.
- Kronsten V, Fitzpatrick E, Baker A. Management of cholestatic pruritus in paediatric patients with alagille syndrome: the King's College Hospital experience. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2013;57:149-54.
- Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. World J Gastroenterol 2006;12:4445-51.

8. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:85-94.
9. Singh S. From exotic spice to modern drug? *Cell* 2007;130:765-8.
10. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005;41:1955-68.
11. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003;23:363-98.
12. Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1056:206-17.
13. Rivera-Espinoza Y, Muriel P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. *Liver Int* 2009;29:1457-66..
14. Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 2014;156:1072-83.
15. Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a018812.
16. Reza Zarrindast M, Eslimi Esfahani D, Oryan S, Nasehi M, Torabi Nami M. Effects of dopamine receptor agonist and antagonists on cholestasis-induced anxiolytic-like behaviors in rats. *Eur J Pharmacol* 2013;702:25-31.
17. Wilhelm EA, Jesse CR, Roman SS, Nogueira CW, Savegnago L. Hepatoprotective effect of 3-alkynyl selenophene on acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Exp Mol Pathol* 2009;87:20-6.
18. Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1551-6.
19. Kang BY, Chung SW, Chung W, Im S, Hwang SY, Kim TS. Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated macrophages by curcumin. *Eur J Pharmacol* 1999;384:191-5.
20. Aggarwal BB. Prostate cancer and curcumin: add spice to your life. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1436-40.