

姜黄素通过诱导*Egr-1*基因表达抑制 HepG-2细胞的增殖

虞游 蒋汉伟 卢佳伟 陈建明*

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要 利用姜黄素处理肝癌HepG-2细胞研究其对细胞增殖的影响以及可能的分子机制。姜黄素处理后, 半定量RT-PCR分析HepG-2细胞内肿瘤相关基因的表达水平, 对筛选得到的姜黄素诱导表达上调的*Egr-1*基因作进一步验证。随后, 设计*Egr-1* shRNA并构建pGreenPuro-*Egr-1*重组质粒, 通过转染细胞, 构建稳定干扰细胞系。然后, 在干扰细胞系的基础上分析*Egr-1*表达沉默在姜黄素对HepG-2细胞增殖影响中的作用。结果发现, 不同浓度姜黄素处理24 h或48 h后, HepG-2细胞增殖明显下降并呈剂量效应关系, 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理不同时间后, 其增殖也明显下降并呈时间效应关系; *Egr-1*基因在姜黄素处理后表达明显升高; *Egr-1*表达沉默显著减弱了姜黄素抑制HepG-2细胞增殖的能力。上述结果提示, 姜黄素抑制HepG-2细胞增殖可能是通过诱导*Egr-1*基因表达介导的, 表明其在肝癌的治疗中具有一定的应用前景。

关键词 姜黄素; HepG-2细胞; 增殖; *Egr-1*; RNA干扰

Curcumin Inhibited HepG-2 Cell Proliferation through Inducing *Egr-1* Gene Expression

Yu You, Jiang Hanwei, Lu Jiawei, Chen Jianming*

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract HepG-2 cells were treated with curcumin to investigate its effect on cell proliferation and the underlying molecular mechanism. After curcumin treatment, expression level of tumor-related genes was analyzed. The up-regulated gene *Egr-1* was concerned and its expression in curcumin-treated HepG-2 cells was verified. Subsequently, *Egr-1* shRNA was designed and constructed into pGreenPuro vector to obtain the recombinant plasmid pGreenPuro-*Egr-1*. The stable interfering cell lines were established by puromycin selection. Finally, the resistant cell lines were used to analyze the role of *Egr-1* interference in HepG-2 cells exposed to curcumin. It was found that HepG-2 cell proliferation was decreased in a dose-dependent manner when treated with different concentrations of curcumin for 24 or 48 h. When treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ of curcumin, the proliferation was decreased in time-dependent manner. Furthermore, *Egr-1* gene expression was dramatically elevated when HepG-2 cells were treated with curcumin. Interestingly, the suppression effect of curcumin in HepG-2 cell proliferation was attenuated when *Egr-1* gene expression was interfered. Based on all of the above results, it is concluded that curcumin inhibits HepG-2 cell

收稿日期: 2015-01-09 接受日期: 2015-03-16

《细胞生物学》市级精品课程(批准号: ZX13007002001)、杭州师范大学实验室开放项目(批准号: SYSKF2014001)和杭州师范大学“本科教学创一流工程”(批准号: PD11009009008)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-28933086, E-mail: jianmingchen@hznu.edu.cn

Received: January 9, 2015 Accepted: March 16, 2015

This work was supported by the Municipal Quality Course of Cell Biology (Grant No. ZX13007002001), the Laboratory Developmental Project in Hangzhou Normal University (Grant No. SYSKF2014001) and the First-class Project for Undergraduate Teaching in Hangzhou Normal University (Grant No. PD11009009008)

*Corresponding author. Tel: +86-571-28933086, E-mail: jianmingchen@hznu.edu.cn

网络出版时间: 2015-06-01 14:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1445.004.html>

proliferation through inducing *Egr-1* gene expression, and it might have the prospect in treating hepatocarcinoma.

Keywords curcumin; HepG-2 cell; proliferation; *Egr-1*; RNA interfering

肝癌是起源于肝脏的一种恶性肿瘤。近年来,肝癌的发病率及死亡率呈逐渐上升的趋势^[1]。目前,肝癌的治疗手段仍以手术、放疗和化疗为主,但对晚期肝癌患者来说,治疗效果及预后往往不是很理想,患者难以忍受治疗带来的副作用。为了提高肝癌患者的治愈率和生存率,近年来人们致力于姜黄素在肝癌细胞增殖及凋亡中的作用研究^[2]。姜黄素是中药姜黄(*Curcuma longa*)的有效成分,国内外众多的研究结果发现,姜黄素能抑制多种肿瘤细胞增殖^[3]。同时,姜黄素对人体正常细胞没有毒副作用^[4]。早期生长反应因子-1(early growth response-1, *Egr-1*)是一种典型的C₂H₂型锌指转录因子,参与细胞增殖、分化以及凋亡等过程^[5]。研究发现,*Egr-1*能够被生长因子、细胞因子、抗癌药物等众多刺激源所激活,激活后的*Egr-1*作为转录因子影响细胞的生命活动^[6-7]。研究发现,*Egr-1*在一些肿瘤细胞和组织中表达明显下调,外来过表达*Egr-1*能够显著抑制肿瘤细胞的增殖,表明*Egr-1*可能是一个肿瘤抑制基因^[8-9]。由此我们推测,姜黄素可能是通过诱导*Egr-1*基因表达而抑制肝癌HepG-2细胞增殖的。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

姜黄素(Bio Basic公司,纯度>90%),DMEM高糖培养基(武汉博士德生物工程有限公司),新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶、青链霉素、Trizol试剂、WST-1细胞增殖检测试剂盒(碧云天生物技术研究所),PCR试剂盒、AMV第一链cDNA合成试剂盒(生工生物工程上海(股份)有限公司),*Egr-1*一抗(Santa Cruz公司),HRP标记羊抗兔二抗、GAPDH(碧云天生物技术研究所),GeneTran转染试剂(Biomiga公司),SYBR[®] qPCR Mix(Thunderbird公司),蛋白裂解液、PMSF(碧云天生物技术研究所),蛋白酶抑制剂Cocktail(Selleckchem公司),其余生化试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

人肝癌HepG-2细胞(杭州师范大学基础医学部刘晓玲老师馈赠)贴壁培养于含10%新生牛血清、1%青链霉素的DMEM培养液中,于37℃、5% CO₂及饱

和湿度的培养箱中进行培养。每隔2~3 d进行换液,取生长状态良好的细胞用于实验。

1.3 WST-1细胞增殖分析

取对数生长期的细胞接种于96孔板中,每孔接种3 000个细胞于100 μL培养液中,常规培养24 h。按实验要求,利用不同浓度的姜黄素(0~50 μmol/L)处理24 h及48 h或利用20 μmol/L姜黄素分别处理12, 24, 48 h。处理结束后,按说明书每孔加入10 μL的WST-1检测试剂,充分混匀,于37℃孵育1 h,用酶标仪检测450 nm处的吸光度。相对细胞增殖率的计算如下:将对照组设为1,计算处理组与对照组的比值作为相对细胞增殖率。每次实验设3个复孔,独立实验重复3次。

1.4 半定量RT-PCR分析及荧光定量PCR

取对数生长期的细胞接种于60 mm的培养皿中,常规培养24 h。第二天,按照实验要求,加入姜黄素处理。处理结束后,收集细胞,Trizol法提取细胞总RNA。取4 μg总RNA用于逆转录合成cDNA。将cDNA稀释3倍后用于PCR分析。半定量RT-PCR分析时,以β-actin为内参。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,拍照分析。

荧光定量PCR扩增时,以GAPDH为内参。扩增完成后,收集各组的Ct值,利用LightCycler[®] 480II仪器配套的软件自动计算出样品的Ct值,用于数据分析。本实验采用相对定量的方法(2^{-ΔΔCt})来分析目的基因的相对表达情况。荧光定量PCR扩增时,*Egr-1*引物上游序列为:5'-TCA CCT ATA CTG GCC GCT TTT C-3';下游序列为:5'-TGG GTG CCG CTG AGT AAA TG-3'。

1.5 *Egr-1* shRNA表达载体的构建

参照文献[10]报道的*Egr-1* siRNA序列(5'-GAC CTG AAG GCC CTC AAT A-3'),同时利用RNAi Designer(<http://bioinfo.clontech.com/rnadesigner/frontpage.jsp>)设计*Egr-1* siRNA序列(5'-GAT GAA CGC AAG AGG CAT A-3')。根据pGreenPuro[™] shRNA表达载体的要求,首先在siRNA上游加入BamH I酶切位点,下游加入Loop环序列(5'-TTC AAG AGA-3'),之后加入siRNA反向互补序列,最后加入转录终止序列TTTTT及EcoR I酶切位点,此为*Egr-1* shRNA正义链。按照同样的方法,设计其反义

链序列。将设计好的序列交由生工生物工程上海(股份)有限公司合成,合成好的两条序列退火形成双链后,与线性化的pGreenPuro™ shRNA表达载体进行连接,连接产物转化大肠杆菌DH5 α ,扩大培养后提取质粒。经测序正确的质粒用于转染实验。其中,阴性对照siRNA序列(5'-ACT CTA TCT GCA CGC TGA C-3')、pGreenPuro-Egr-1 shRNA1采用参考文献提供的siRNA; pGreenPuro-Egr-1 shRNA2采用设计的siRNA; pGreenPuro-Negative control为阴性对照质粒。

1.6 细胞转染及稳定细胞系建立

转染前一天,取对数生长期的细胞接种于6孔板中,细胞密度达到80%以上用于转染实验。按照说明书要求,将2 μ g质粒和5 μ L的转染试剂分别稀释到50 μ L的DMEM中,室温静置5 min后,将二者轻轻混合,制备转染复合物。转染复合物室温静置20 min后,逐滴加入到6孔板中,轻轻混匀,置于培养箱中过夜培养。第二天,用含有5 μ g/mL的嘌呤霉素的DMEM继续培养4周即可筛选得到稳定的细胞系,利用荧光定量PCR及Western blot检测RNA干扰效率。

1.7 Western blot

取对数生长期的细胞接种于60 mm的培养皿中,常规培养24 h。第二天,按照实验要求利用姜黄素处理,处理结束后,用蛋白裂解液处理细胞,离心后收集细胞总蛋白。取20 μ g蛋白进行SDS-PAGE

电泳后,转移到PVDF膜上。TBST 4 $^{\circ}$ C封闭过夜后,Egr-1一抗4 $^{\circ}$ C过夜孵育(1:1 000),TBST洗膜后加入HRP标记的二抗(1:5 000)继续孵育1 h。TBST洗膜后,ECL曝光显影并拍照分析,检测蛋白表达。

1.8 统计分析

实验数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,样本之间采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

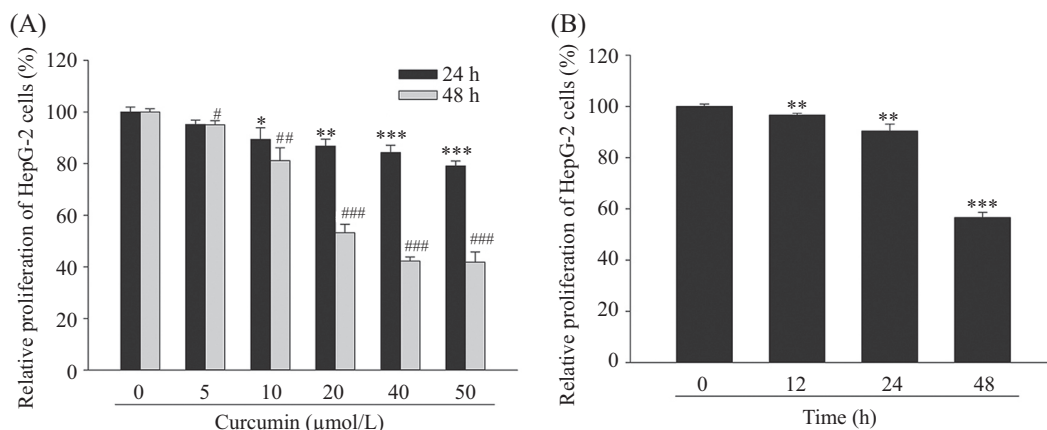
2 结果

2.1 姜黄素对HepG-2细胞增殖的影响

WST-1细胞增殖结果显示,培养的HepG-2细胞经不同浓度的姜黄素(0~50 μ mol/L)分别处理24 h和48 h后,与对照组相比,其增殖率明显下降,且呈剂量效应关系(图1A);此外,利用20 μ mol/L姜黄素分别处理0, 12, 24, 48 h后,姜黄素处理时间越长,细胞增殖越慢,呈时间效应关系(图1B)。上述结果表明,姜黄素能够抑制HepG-2细胞的增殖。

2.2 姜黄素对HepG-2细胞肿瘤相关基因mRNA表达的影响

参照文献[11],挑选出经姜黄素处理后表达明显升高的基因(≥ 2 倍)作为候选基因,用于半定量RT-PCR分析。结果发现,培养的HepG-2细胞经20 μ mol/L姜黄素处理24 h后,一些肿瘤相关的基因mRNA水平表达明显升高,如HSPA6、IRF1、p53、XAF1、Egr-1等(图2A)。

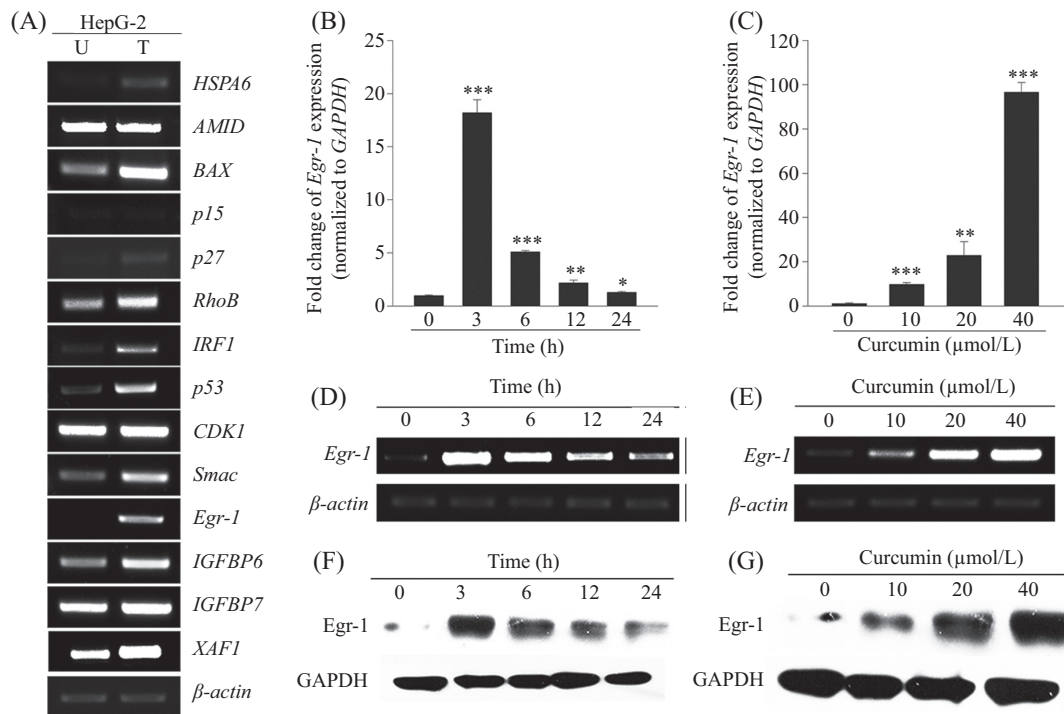


A: 不同浓度的姜黄素(0~50 μ mol/L)处理相同时间(24 h或48 h)对HepG-2细胞增殖的影响。* $^{\#}P<0.05$, ** $^{\#\#}P<0.01$, *** $^{\#\#\#}P<0.001$,与未经姜黄素处理组相比。*代表24 h组, #代表48 h组; B: 同一浓度的姜黄素(20 μ mol/L)处理不同时间(0, 12, 24, 48 h)对HepG-2细胞增殖的影响。每次实验设3个复孔,每组实验独立重组3次,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$,与处理0 h组相比。

A: effect of different concentrations (0~50 μ mol/L) of curcumin on HepG-2 cell proliferation after treated for 24 or 48 h. * $^{\#}P<0.05$, ** $^{\#\#}P<0.01$, *** $^{\#\#\#}P<0.001$ compared with 0 μ mol/L of curcumin group. * stands for 24 h group, # stands for 48 h group; B: effect of 20 μ mol/L of curcumin on HepG-2 cell proliferation after treated for 0, 12, 24 or 48 h. Each assay was performed in triplicate and repeated at least three times independently and the values presented here were shown as $\bar{x}\pm s$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with 0 h group.

图1 姜黄素对HepG-2细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of curcumin on HepG-2 cell proliferation



A: 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理24 h对HepG-2细胞肿瘤相关基因mRNA表达的影响。U: 对照组, T: 处理组; B、D: 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理不同时间(0, 3, 6, 12, 24 h)对*Egr-1* mRNA表达的影响; C、E: 不同浓度姜黄素(0~40 $\mu\text{mol/L}$)处理3 h对*Egr-1* mRNA表达的影响; F: 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理不同时间(0, 3, 6, 12, 24 h)对Egr-1蛋白表达的影响; G: 不同浓度姜黄素(0~40 $\mu\text{mol/L}$)处理3 h对Egr-1蛋白表达的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与处理0 h组相比。

A: effect of 20 $\mu\text{mol/L}$ of curcumin on tumor-related genes expression in HepG-2 cells after treated for 24 h. U: control group, T: treated group; B,D: effect of 20 $\mu\text{mol/L}$ of curcumin on *Egr-1* mRNA expression after treated for 0, 3, 6, 12, 24 h; C,E: effect of different concentrations (0~40 $\mu\text{mol/L}$) of curcumin on *Egr-1* mRNA expression after treated for 3 h; F: effect of 20 $\mu\text{mol/L}$ of curcumin on Egr-1 protein expression after treated for 0, 3, 6, 12, 24 h; G: effect of different concentrations (0~40 $\mu\text{mol/L}$) of curcumin on Egr-1 protein expression after treated for 3 h. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with 0 h group.

图2 姜黄素对HepG-2细胞*Egr-1*基因表达的影响

Fig.2 Effect of curcumin on *Egr-1* expression in HepG-2 cells

2.3 姜黄素对HepG-2细胞*Egr-1*表达的影响

荧光定量PCR、半定量RT-PCR以及Western blot结果显示, HepG-2细胞经20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, *Egr-1* mRNA和蛋白表达明显升高, 且在3 h达到峰值; 但随着处理时间的延长, *Egr-1* mRNA和蛋白的表达呈现逐渐下降的趋势(图2B、图2D和图2F)。经不同浓度的姜黄素处理3 h后, 姜黄素的浓度越高, *Egr-1* mRNA和蛋白水平表达也越高(图2C、图2E和图2G)。上述结果表明, 姜黄素能够诱导HepG-2细胞中*Egr-1* mRNA和蛋白质的表达。

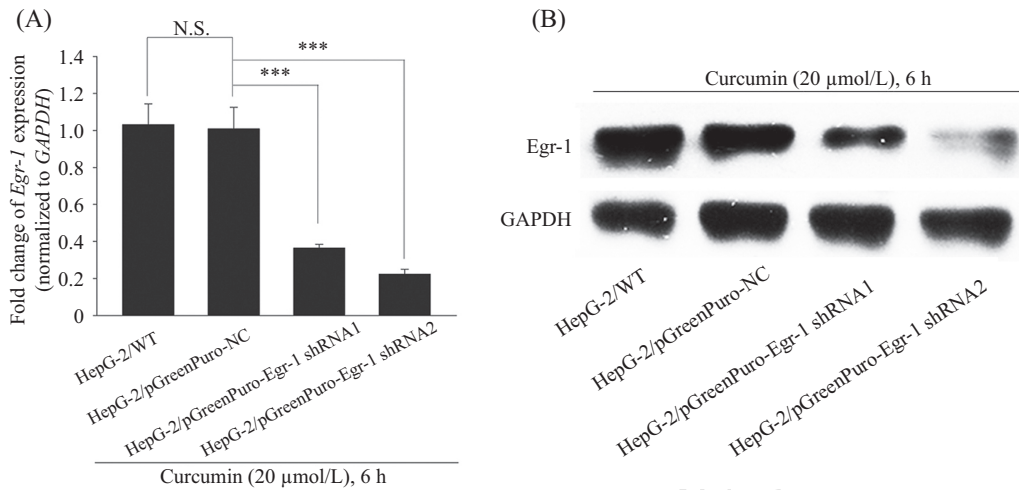
2.4 HepG-2/pGreenPuro-Egr-1干扰细胞系的鉴定

荧光定量PCR及Western blot结果显示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素分别处理HepG-2/WT、HepG-2/pGreenPuro-NC、HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 shRNA1、HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 shRNA2后, 与母本细胞HepG-2/WT和阴性干扰细胞系HepG-2/pGreenPuro-NC相比,

干扰细胞系中*Egr-1* mRNA及蛋白质表达明显降低(图3)。上述结果表明, HepG-2/pGreenPuro-Egr-1干扰细胞系构建成功。

2.5 *Egr-1*表达沉默对姜黄素抑制HepG-2细胞增殖的影响

WST-1结果表明, 母本细胞HepG-2/WT、阴性对照细胞HepG-2/pGreenPuro-NC、干扰细胞HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 shRNA1以及HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 shRNA2经不同浓度的姜黄素(0~50 $\mu\text{mol/L}$)处理48 h后, 姜黄素抑制HepG-2/WT和HepG-2/pGreenPuro-NC两种细胞增殖的能力之间没有明显差异; 与阴性对照细胞HepG-2/pGreenPuro-NC相比, 抑制两种干扰细胞系HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 shRNA1和HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 shRNA2的增殖能力明显变弱。同样, 经20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理不同时间后(0, 12, 24, 48 h), 姜黄素抑制HepG-2/

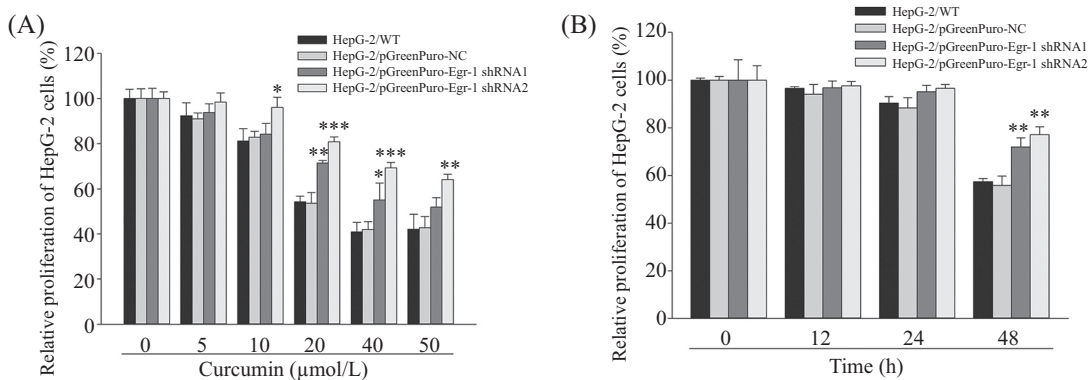


A: 荧光定量PCR分析*Egr-1* mRNA水平干扰效率; B: Western blot分析*Egr-1*蛋白质水平干扰效率。*** $P < 0.001$; N.S.: 无统计学差异。

A: interfering efficiency of *Egr-1* on mRNA level by Real-time PCR; B: interfering efficiency of *Egr-1* on protein level by Western blot. *** $P < 0.001$; N.S.: not significant.

图3 HepG-2细胞*Egr-1* mRNA和蛋白水平干扰效率分析

Fig.3 Analysis of *Egr-1* interfering efficiency on mRNA and protein levels in HepG-2 cells



A: 不同浓度的姜黄素(0~50 $\mu\text{mol/L}$)处理48 h对干扰细胞系HepG-2/pGreenPuro-Egr-1增殖的影响; B: 同一浓度的姜黄素(20 $\mu\text{mol/L}$)处理不同时间(0, 12, 24, 48 h)对干扰细胞系HepG-2/pGreenPuro-Egr-1增殖的影响。每次实验3个复孔, 每组实验独立重组3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, *Egr-1*干扰细胞组与阴性干扰细胞系相比。

A: effect of different concentrations (0~50 $\mu\text{mol/L}$) of curcumin on HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 cell proliferation after treated for 48 h; B: effect of 20 $\mu\text{mol/L}$ of curcumin on HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 cell proliferation after treated for 0, 12, 24, 48 h. Each assay was performed in triplicate and repeated at least three times independently and the values presented here were shown as $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the *Egr-1* interfering cell lines compared with the HepG-2/pGreenPuro-NC group.

图4 *Egr-1*表达沉默对姜黄素抑制HepG-2细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of *Egr-1* silencing on the anti-proliferation role of curcumin in HepG-2 cells

WT和HepG-2/pGreenPuro-NC的增殖能力之间没有明显差异, 而与阴性对照细胞HepG-2/pGreenPuro-NC相比, 抑制两种干扰细胞系HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 shRNA1和HepG-2/pGreenPuro-Egr-1 shRNA2的增殖能力明显变弱。上述结果表明, *Egr-1*表达沉默减弱了姜黄素抑制HepG-2细胞增殖的能力。

3 讨论

姜黄素是中药姜黄的主要活性成分。国内外大

量的研究表明, 姜黄素能够有效地抑制多种肿瘤细胞增殖, 并诱导其凋亡^[12]。分子生物学研究结果发现, 姜黄素可以通过调节多种转录因子、生长因子、激酶和细胞因子, 参与细胞内的多种信号转导途径, 进而影响细胞的生命活动^[13-14]。尽管姜黄素对正常的细胞没有毒性, 且在机体内具有较高的耐受度, 但是其生物利用度却很低。因此, 人们也一直致力于姜黄素小分子类似物的研究, 以提高其生物利用度^[12,15]。早期生长反应因子-1(*Egr-1*)作为一

种锌指转录因子,定位于细胞核内,主要参与细胞的分化和增殖。诸如细胞因子、生长因子、抗癌药物等一些外界刺激能够瞬时诱导*Egr-1*的表达^[16],但*Egr-1*在细胞内瞬时表达后被降解,其机制至今尚不清楚。有研究发现,*Egr-1*蛋白在肿瘤细胞及组织中低表达以及外来过表达*Egr-1*能够抑制肿瘤细胞的增殖,表明*Egr-1*可能是一个潜在的肿瘤抑制基因^[8,17]。

本文以人肝癌细胞HepG-2为实验材料,利用姜黄素处理后发现,姜黄素能够显著抑制HepG-2细胞的增殖;随后,根据已有文献的报道,利用半定量RT-PCR研究发现,在HepG-2细胞中,姜黄素也能够诱导一些肿瘤相关基因的表达(图2A)。另外,通过荧光定量PCR及Western blot进一步验证了姜黄素能够诱导*Egr-1*基因的mRNA和蛋白的表达(图2B~图2G)。为了进一步研究*Egr-1*基因在姜黄素抑制肿瘤细胞增殖中的作用,通过细胞转染构建了*Egr-1* shRNA稳定干扰细胞系。在此基础上,利用姜黄素处理发现,与阴性对照细胞系及母本细胞系相比,姜黄素对干扰细胞系的增殖抑制能力明显下降,表明*Egr-1*表达沉默能够减弱姜黄素抑制HepG-2细胞增殖的能力。

本研究结果表明, HepG-2细胞中*Egr-1*表达低下,姜黄素能够诱导HepG-2细胞表达*Egr-1*。同时,姜黄素也能抑制HepG-2细胞增殖。由此,我们推测,姜黄素抑制HepG-2细胞增殖可能和*Egr-1*基因的表达上调有关。Choi等^[18]在研究人胶质瘤细胞U-87MG中发现,姜黄素能够诱导*Egr-1*基因的表达进而上调p21,而这一过程不依赖于p53信号途径;另有研究表明,*Egr-1*作为转录因子能够直接结合到p53基因启动子区域,进而正向调节p53基因的表达^[19]。因此,在HepG-2细胞中,姜黄素是如何诱导*Egr-1*表达升高的? *Egr-1*抑制HepG-2细胞增殖是否和下游的p53、p21有关?这些都是我们今后需要进一步探究的课题。综上,本研究的结果为姜黄素运用于临床肝癌的辅助治疗提供了实验依据和理论基础,同时也为以姜黄素为基础的小分子类似物的设计提供了新的靶点依据。

参考文献 (References)

- 1 Daoudaki M, Fouzas I. Hepatocellular carcinoma. Wien Med Wochenschr 2014; 164(21/22): 450-5.
- 2 Vera-Ramirez L, Perez-Lopez P, Varela-Lopez A, Ramirez-

- Tortosa M, Battino M, Quiles JL. Curcumin and liver disease. Biofactors 2013; 39(1): 88-100.
- 3 Shehzad A, Lee J, Lee YS. Curcumin in various cancers. Biofactors 2013; 39(1): 56-68.
- 4 Fan H, Tian W, Ma X. Curcumin induces apoptosis of HepG2 cells via inhibiting fatty acid synthase. Target Oncol 2013; 9(3): 279-86.
- 5 Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor *Egr-1*. J Cell Physiol 2002; 193(3): 287-92.
- 6 Song LJ, Liu RJ, Zeng Z, Alper SL, Cui HJ, Lu Y, et al. Gastrin inhibits a novel, pathological colon cancer signaling pathway involving EGR1, AE2, and P-ERK. J Mol Med (Berl) 2012; 90(6): 707-18.
- 7 Chu L, Wang T, Hu Y, Gu Y, Su Z, Jiang H. Activation of *Egr-1* in human lung epithelial cells exposed to silica through MAPKs signaling pathways. PLoS One 2013; 8(7): e68943.
- 8 Huang RP, Fan Y, de Belle I, Niemeyer C, Gottardis MM, Mercola D, et al. Decreased *Egr-1* expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. Int J Cancer 1997; 72(1): 102-9.
- 9 Shozu M, Murakami K, Segawa T, Kasai T, Ishikawa H, Shinohara K, et al. Decreased expression of early growth response-1 and its role in uterine leiomyoma growth. Cancer Res 2004; 64(13): 4677-84.
- 10 Seki T, Kokuryo T, Yokoyama Y, Suzuki H, Itatsu K, Nakagawa A, et al. Antitumor effects of alpha-bisabolol against pancreatic cancer. Cancer Sci 2011; 102(12): 2199-205.
- 11 van Erk MJ, Teuling E, Staal YC, Huybers S, van Bladeren PJ, Aarts JM, et al. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. J Carcinog 2004; 3(1): 8.
- 12 Cretu E, Trifan A, Vasincu A, Miron A. Plant-derived anticancer agents—curcumin in cancer prevention and treatment. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 2012; 116(4): 1223-9.
- 13 Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action: Signal transduction. Biofactors 2013; 39(1): 27-36.
- 14 Shishodia S. Molecular mechanisms of curcumin action: Gene expression. Biofactors 2013; 39(1): 37-55.
- 15 Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. Curr Drug Targets 2011; 12(3): 332-47.
- 16 Han MH, Kim GY, Yoo YH, Choi YH. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated *Egr-1* activation and mitochondrial dysfunction. Toxicol Lett 2013; 220(2): 157-66.
- 17 Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor *Egr-1* inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cell lines. World J Gastroenterol 2002; 8(2): 203-7.
- 18 Choi BH, Kim CG, Bae YS, Lim Y, Lee YH, Shin SY. p21 Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: Role of early growth response-1 expression. Cancer Res 2008; 68(5): 1369-77.
- 19 Kronen-Herzig A, Mittal S, Yule K, Liang H, English C, Urcis R, et al. Early growth response 1 acts as a tumor suppressor *in vivo* and *in vitro* via regulation of p53. Cancer Res 2005; 65(12): 5133-43.