

莪术油诱导人胃腺癌SGC-7901细胞凋亡的研究

李玲玲 邵淑丽* 孙宏岩 张伟伟
(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 该实验目的是探究莪术油(zedoary turmeric oil, ZTO)诱导人胃腺癌SGC-7901细胞凋亡的作用。不同浓度的ZTO作用人胃腺癌SGC-7901细胞48 h后, 采用台盼兰拒染法检测细胞生长抑制率; 光学显微镜、荧光显微镜、透射电镜下观察细胞的形态和超微结构; 琼脂糖凝胶电泳检测DNA片段化; Annexin V-FITC法检测细胞的凋亡率; 实时荧光定量PCR和Western blot检测Bax、Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平。结果显示, 作用人胃腺癌SGC-7901细胞48 h, ZTO的最佳浓度是110 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} 为 (108.002 ± 0.305) $\mu\text{g/mL}$; 显微镜下细胞呈不同程度的凋亡特征; DNA电泳可见梯状条带; 最佳药物浓度作用细胞48 h的早期凋亡率为 $(25.07\pm 0.82)\%$; Bax表达水平升高, Bcl-2表达水平降低, Bax/Bcl-2比值显著升高($P<0.05$), 表明ZTO通过上调Bax表达、下调Bcl-2表达诱导人胃腺癌SGC-7901细胞凋亡。

关键词 莪术油; 胃腺癌SGC-7901; 凋亡

Research of Zedoary Turmeric Oil Induced Apoptosis of Human Gastric Carcinoma SGC-7901 Cells

Li Lingling, Shao Shuli*, Sun Hongyan, Zhang Weiwei

(College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract The study of this experiment was to explore the effects for the apoptosis triggered by zedoary turmeric oil (ZTO) on the human gastric carcinoma SGC-7901 cells. The effects of ZTO were studied by trypan blue staining method, light microscope, fluorescence microscope, transmission electron microscope, flow cytometry, Real-time PCR and Western blot. After the human gastric carcinoma SGC-7901 cells treated with various concentrations of ZTO for 48 h, the growth inhibition rate of cell was determined by trypan blue staining method. The morphology and ultrastructure were observed by light microscope, fluorescence microscope and transmission electron microscope. DNA fragmentation was assayed by agarose gel electrophoresis. The apoptotic rate was investigated by flow cytometry. The expression levels of Bax and Bcl-2 were explored by Real-time PCR and Western blot. The results showed that the concentration for the treatment was optimized to 110 $\mu\text{mol/L}$ in this study, and the IC_{50} value was (108.002 ± 0.305) $\mu\text{g/mL}$. The early apoptotic rate was reached to $(25.07\pm 0.82)\%$ under the microscope. The typical DNA ladder was showed on agarose gel electrophoresis. Importantly, the expression level Bax increased and the expression level of Bcl-2 decreased, so that the ratio of Bax and Bcl-2 increased significantly ($P<0.05$). These results suggested that ZTO could induce the apoptosis of the human gastric carcinoma SGC-7901

收稿日期: 2015-03-16 接受日期: 2015-05-25

黑龙江省自然科学基金项目(批准号: C201241)和黑龙江省教育厅科学技术项目(批准号: 12511611)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

Received: March 16, 2015 Accepted: May 25, 2015

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (Grant No.C201241) and the Project of Science and Technology of Heilongjiang Province Educational Department (Grant No.12511611)

*Corresponding author. Tel: +86-452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

网络出版时间: 2015-09-18 17:06:03 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150918.1706.008.html>

cells by up-regulating the expression of Bax and down-regulating the expression of Bcl-2.

Keywords zedoray turmeric oil; SGC-7901 cell; apoptosis

胃腺癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤,居各类癌症死亡率的第一位^[1]。随着胃腺癌治疗研究的不断深入,中医药已成为综合性治疗胃腺癌的主流手段。莪术为常用中药,具有较好的抗血栓、抗肿瘤、保肝等作用,是临床上常用的活血化瘀药物^[2-4]。作为抗肿瘤中药的莪术油(zedoray turmeric oil, ZTO)是莪术根茎所含的挥发油,已被广泛应用于肿瘤干预试验^[5]。实验研究发现,一定剂量的ZTO能诱导细胞凋亡,达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。本研究以体外培养的人胃腺癌SGC-7901细胞为研究对象,观察ZTO作用细胞后的凋亡情况,旨在为胃腺癌的临床治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方方法

1.1 材料

人胃腺癌SGC-7901细胞株购自中国科学院上海细胞库;莪术油注射液(每支0.1 g/10 mL)购自山东特利尔医药有限公司;RPMI 1640培养基干粉购于Gibco公司;优级胎牛血清、胰蛋白酶均购自上海生工生物工程有限公司;Tris饱和酚、吖啶橙(acridine orange, AO)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司;UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒、膜蛋白和质蛋白提取试剂盒均购自上海生工生物工程有限公司。实验所用到的仪器有: B×51/B×52型荧光显微镜(OLYMPUS)、CK×41/CK×31型倒置显微镜(OLYMPUS)、流式细胞仪(Beckman Coulter)、荧光定量PCR仪(Eppendorf)、Odyssey红外荧光扫描成像系统(Licor)和JEM-1220型透射电子显微镜(日本电子)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人胃腺癌SGC-7901细胞于含10%优级胎牛血清的RPMI 1640完全培养液,37℃、5%CO₂培养箱中培养,细胞贴壁生长,每2~3 d传代一次。

1.2.2 台盼蓝拒染法测定莪术油对胃腺癌细胞的增殖抑制率(IC₅₀) 取生长状态良好的SGC-7901细胞消化后,以1×10⁵/mL的密度接种于细胞培养瓶中,孵育到对数生长期后,以ZTO终浓度为50, 70, 90,

110, 130, 150 μg/mL分别作用SGC-7901细胞,同时设置空白对照组,培养48 h,采用台盼蓝拒染法数出拒染的活细胞个数,并按公式计算出细胞增殖抑制率:细胞的增殖抑制率=1-(实验组的平均活细胞数/对照组的平均活细胞数)×100%。利用软件得出细胞的半数抑制浓度,即IC₅₀值。

1.2.3 莪术油对SGC-7901细胞形态的影响 取培养至对数生长期的细胞,分别以0, 50, 110, 150 μg/mL莪术油作用细胞48 h,光学显微镜下观察细胞形态,拍照。然后收集细胞, PBS洗2次,向瓶中加入200 μL吖啶橙,静置孵育3 min,于荧光显微镜下观察并照相。收集经0, 50, 110, 150 μg/mL莪术油作用24 h的细胞,然后用2.5%戊二醛先固定2 h,再经1%锇酸固定2 h,磷酸盐缓冲液漂洗20 min后丙酮梯度脱水,EPON812环氧树脂中包埋。LKB-III型超薄切片机定位后做超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅双重染色,于JEM-1220型透射电子显微镜下观察细胞形态以及细胞质和细胞核的变化并摄影,记录实验结果。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳检测DNA片段化 收集经不同浓度的莪术油作用48 h的细胞,用酚氯仿法提取DNA,1.2%琼脂糖凝胶电泳(120 V, 50 min),ZF型紫外分析仪观察并用数码相机拍照。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI检测细胞凋亡 收集经0, 50, 110, 150 μg/mL莪术油作用48 h的SGC-7901细胞, PBS洗涤2次,加入200 μL Binding Buffer,重悬细胞后,分别加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI,室温避光反应15 min,再加入300 μL Binding Buffer,上机检测。

1.2.6 实时荧光定量 PCR检测Bax、Bcl-2 mRNA表达水平 收集经0, 50, 110, 150 μg/mL莪术油作用48 h的SGC-7901细胞, PBS洗涤2次,利用UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒提取细胞总RNA。Bcl-2(F: 5'-ATG TGT GTG GAGAGC GTC AAC-3', R: 5'-AGA CAG CCA GGA GAA ATC AAA-3')扩增产物180 bp。Bax(F: 5'-AAG CTG AGC GAG TGT GAG TGT CTC AAG-3', R: 5'-CAA AGT AGAAAA GGG CGA CAA-3')扩增产物178 bp。内参β-actin(F: 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3', R: 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3')扩增产物205 bp。荧光定量PCR扩增条件: 94℃预变性4 min; 94℃变性30 s, 57℃退火30 s,

72 °C延伸30 s, 循环35次; 72 °C检测信号, 循环结束后, 进行溶解曲线检测, 实验重复3次, 数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

1.2.7 Western blot检测Bax、Bcl-2蛋白的表达水平收集经0, 50, 110, 150 $\mu\text{g/mL}$ 莪术油作用48 h的SGC-7901细胞, PBS洗涤2次, 分别利用在上海生工生物

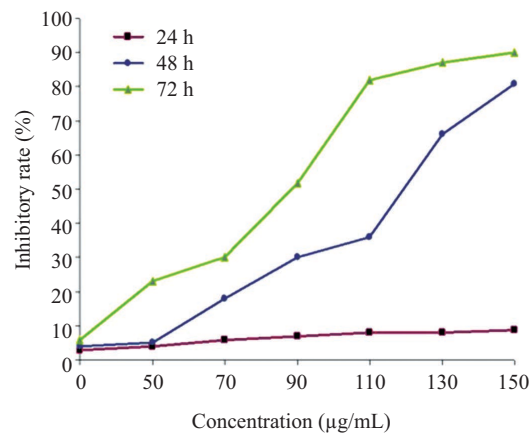


图1 莪术油对SGC-7901细胞的生长抑制曲线

Fig.1 The growth inhibition curve of ZTO of SGC-7901

表1 SGC-7901细胞曲线拟合结果

Table 1 The results of curve fitting on SGC-7901 cells

时间(h)	回归方程	半数抑制率	相关性系数	回归方程显著性	差异显著性
Time (h)	Regression equation	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	R ²	F	P
24	$Y=0.686+0.093\log X$	488.362	0.943	81.999	<0.01
48	$Y=-10.75+0.542\log X$	108.002	0.876	35.386	<0.01
72	$Y=-2.892+0.682\log X$	75.545	0.927	63.075	<0.01

工程有限公司购买的全蛋白抽提试剂盒提取细胞全蛋白, 蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳, 用Bio-Rad电转仪将蛋白印迹到NC膜上, 转膜条件为120 V、3.5 h, 立春红染色5 min, 封闭液封闭1 h, PBS洗膜, Bax、Bcl-2、内参 β -actin一抗(1:500)孵育过夜(4 °C), PBST洗膜, 二抗IgG(1:10 000)室温避光孵育1 h, PBST洗膜, PBS洗膜, Odyssey红外荧光扫描成像系统进行扫描检测。

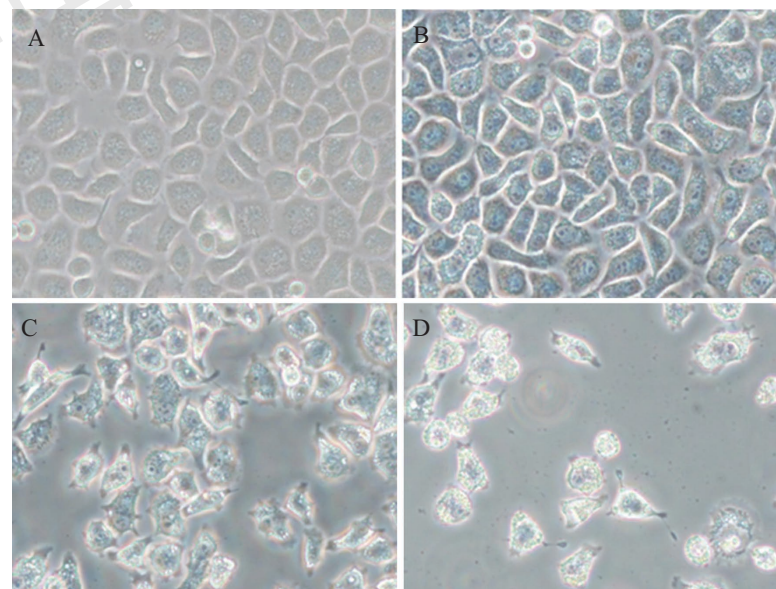
1.3 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示, 并采用单因素方差分析, 组间比较用LSD法检测其差异性; 所有数据均用SPSS 17.0软件进行分析处理, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 莪术油对人胃腺癌SGC-7901细胞增殖抑制曲线

不同浓度莪术油对SGC-7901细胞作用24 h、

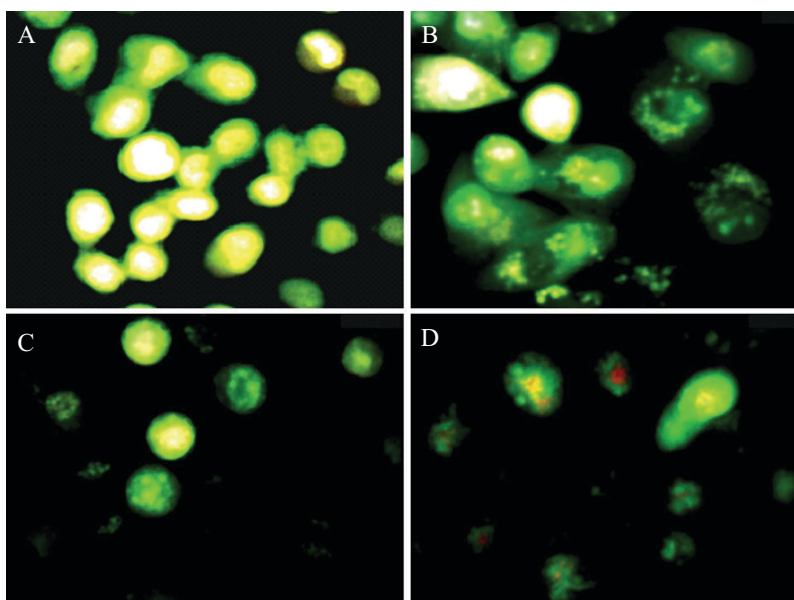


A: 0 $\mu\text{g/mL}$ 莪术油; B: 50 $\mu\text{g/mL}$ 莪术油; C: 110 $\mu\text{g/mL}$ 莪术油; D: 150 $\mu\text{g/mL}$ 莪术油。

A: 0 $\mu\text{g/mL}$ ZTO; B: 50 $\mu\text{g/mL}$ ZTO; C: 110 $\mu\text{g/mL}$ ZTO; D: 150 $\mu\text{g/mL}$ ZTO.

图2 光学显微镜下莪术油作用SGC-7901细胞48 h的细胞形态的变化(200 \times)

Fig.2 The morphological changes in ZTO-treated SGC-7901 cells for 48 h under light microscope (200 \times)



A: 0 µg/mL 莪术油; B: 50 µg/mL 莪术油; C: 110 µg/mL 莪术油; D: 150 µg/mL 莪术油。

A: 0 µg/mL ZTO; B: 50 µg/mL ZTO; C: 110 µg/mL ZTO; D: 150 µg/mL ZTO。

图3 荧光显微镜下莪术油作用SGC-7901细胞48 h的细胞形态(200×)

Fig.3 The nuclear morphological changes in ZTO-treated SGC-7901 cells for 48 h under fluorescence microscope (200×)

48 h和72 h的生长抑制作用呈剂量依赖性(图1), IC_{50} 见表1。作用SGC-7901细胞48 h时, 莪术油的最佳浓度为110 µg/mL, IC_{50} 为 (108.002 ± 0.305) µg/mL ($R^2=0.876$)。

2.2 光学显微镜下人胃腺癌SGC-7901细胞形态

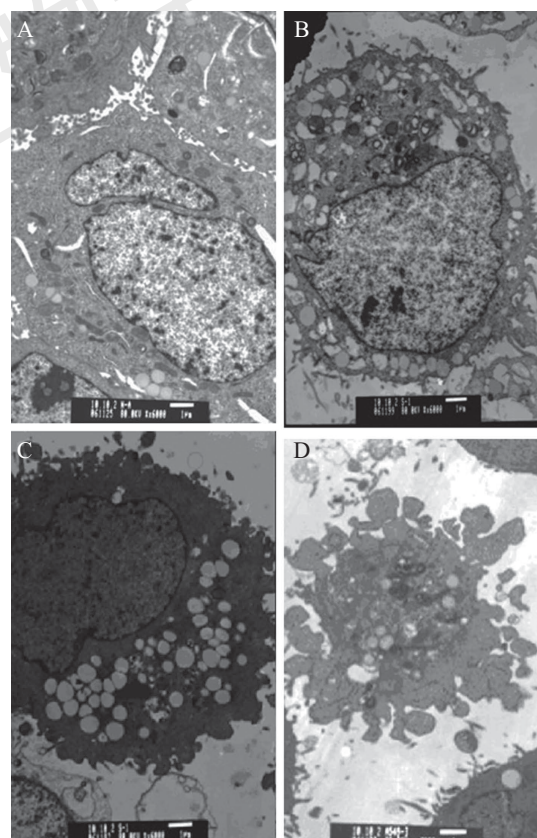
光学显微镜下, 未经药物处理的人胃腺癌SGC-7901细胞形态如图2A所示, 细胞呈上皮样贴壁生长, 轮廓清晰, 呈梭形, 核质均匀, 且折光性良好。经莪术油作用48 h后的细胞, 核染色质浓缩并在核膜周围大量的聚集, 胞质浓缩、胞膜有起泡现象, 有凋亡小体产生, 大部分细胞出现凋亡现象(图2B~图2D)。

2.3 荧光显微镜下人胃腺癌SGC-7901细胞形态

荧光显微镜下, 未经莪术油作用的人胃腺癌SGC-7901细胞经吖啶橙(AO)染色后的形态如图3A所示, 细胞数量较多, 细胞体积较大且结构清晰, 胞质丰富, 细胞质均匀, 核仁呈现出黄色荧光。经莪术油作用48 h后, 细胞体积缩小, 核固缩, 部分细胞核破碎, 出现形态不规则、大小不等的荧光碎片, 细胞核呈现致密浓染的绿色或亮黄色荧光, 呈现明显的凋亡特征(图3B~图3D)。

2.4 透射电镜下人胃腺癌SGC-7901细胞形态

透射电镜下, 未经药物处理的SGC-7901细胞的形态结构如图4A所示, 细胞圆形, 表面有球形质膜突起和微绒毛, 细胞核较大, 胞质较多, 细胞器丰富,



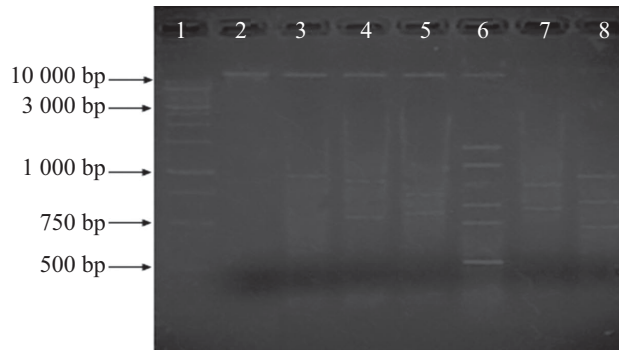
A: 0 µg/mL 莪术油; B: 50 µg/mL 莪术油; C: 110 µg/mL 莪术油; D: 150 µg/mL 莪术油。

A: 0 µg/mL ZTO; B: 50 µg/mL ZTO; C: 110 µg/mL ZTO; D: 150 µg/mL ZTO。

图4 透射电镜下莪术油作用SGC-7901细胞48 h的细胞形态(6000×)

Fig.4 The nuclear morphological changes in ZTO-treated SGC-7901 cells for 48 h under TEM (6 000×)

细胞质内充满大量的游离核蛋白体, 线粒体多分布在核周区, 絮状度不明显且嵴清晰可见。经莜术油作用48 h后, 细胞体积明显变小, 细胞核固缩, 染色



1: 1 Kb marker; 2: 0 µg/mL莜术油; 3: 50 µg/mL莜术油; 4: 70 µg/mL莜术油; 5: 90 µg/mL莜术油; 6: 110 µg/mL莜术油; 7: 130 µg/mL莜术油; 8: 150 µg/mL莜术油。

1: 1 Kb marker; 2: 0 µg/mL ZTO; 3: 50 µg/mL ZTO; 4: 70 µg/mL ZTO; 5: 90 µg/mL ZTO; 6: 110 µg/mL ZTO; 7: 130 µg/mL ZTO; 8: 150 µg/mL ZTO。

图5 莜术油作用SGC-7901细胞48 h的DNA电泳图

Fig.5 The DNA ladder of SGC-7901 cells treated with ZTO for 48 h

质团块状散布核内或边集核膜下, 游离核蛋白体减少, 线粒体嵴呈溶解状态, 部分细胞的核溶解, 细胞器结构崩解消失(图4B~图4D)。

2.5 人胃腺癌SGC-7901细胞DNA的片段化

不同浓度ZTO作用SGC-7901细胞的结果如下, 0 µg/mL ZTO时只有一条基因组条带, 50 µg/mL、110 µg/mL和150 µg/mL ZTO作用时有梯状条带, 但在最佳浓度110 µg/mL ZTO作用时出现了清晰的条

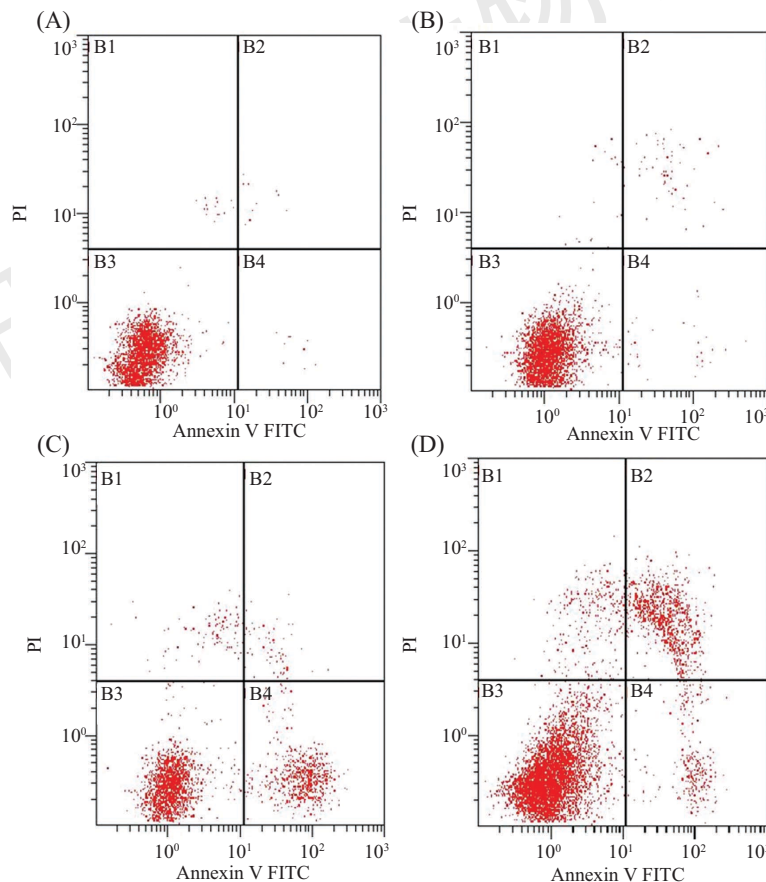
表2 莜术油作用SGC-7901细胞48 h的早期凋亡率

Table 2 Early apoptosis rate of SGC-7901 cells treated with ZTO for 48 h

ZTO浓度(µg/mL)	早期凋亡率(%)
ZTO concentration (µg/mL)	Early apoptosis rate (%)
0	0.52±0.13
50	4.23±0.50*
110	25.07±0.82*
150	16.95±0.87*

* $P < 0.05$, 与对照组比较(0 µg/mL组)。

* $P < 0.05$ vs control group (0 µg/mL group).

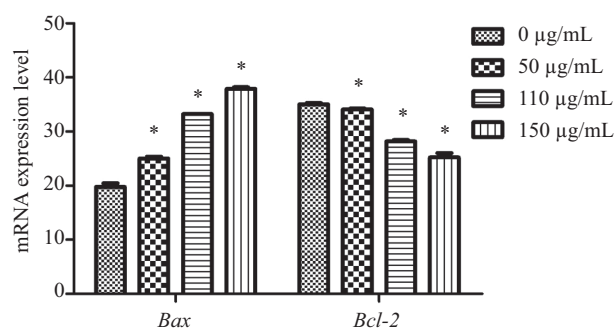


A: 0 µg/mL莜术油; B: 50 µg/mL莜术油; C: 110 µg/mL莜术油; D: 150 µg/mL莜术油。

A: 0 µg/mL ZTO; B: 50 µg/mL ZTO; C: 110 µg/mL ZTO; D: 150 µg/mL ZTO。

图6 莜术油作用SGC-7901细胞48 h Annexin V-FITC/PI凋亡检测

Fig.6 Annexin V-FITC/PI apoptosis detection of SGC-7901 cells treated with ZTO for 48 h

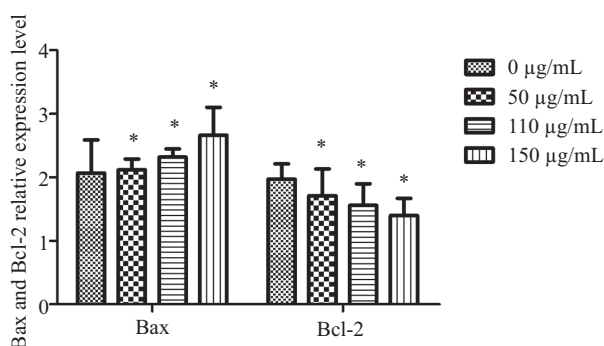
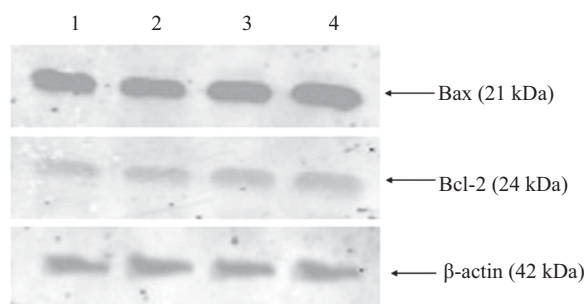


* $P < 0.05$, 与对照组比较(0 µg/mL组)。

* $P < 0.05$ vs control group (0 µg/mL group).

图7 SGC-7901细胞Bax与Bcl-2 mRNA表达水平

Fig.7 The Bax and Bcl-2 mRNA expression levels of the SGC-7901 cells



1: 0 µg/mL 莪术油; 2: 50 µg/mL 莪术油; 3: 110 µg/mL 莪术油; 4: 150 µg/mL 莪术油。* $P < 0.05$, 与对照组比较(0 µg/mL组)。

1: 0 µg/mL ZTO; 2: 50 µg/mL ZTO; 3: 110 µg/mL ZTO; 4: 150 µg/mL ZTO。* $P < 0.05$ vs control group (0 µg/mL group)。

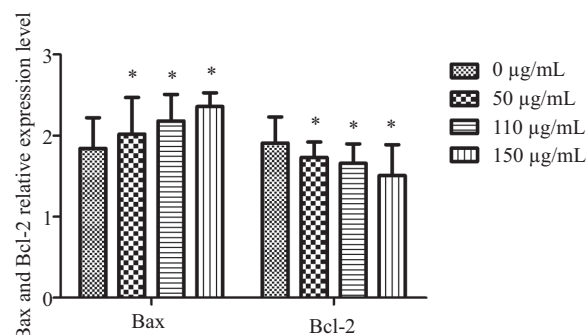
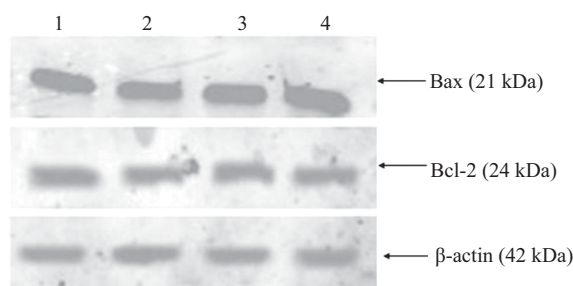
图8 SGC-7901细胞Bax和Bcl-2蛋白表达水平(膜蛋白)

Fig.8 The Bax and Bcl-2 protein expression levels of the SGC-7901 cells (membrane protein)

带, 在130 µg/mL、150 µg/mL 莪术油作用时, 部分细胞呈现凋亡晚期或者坏死状态, 梯状条带显得模糊(图5)。

2.6 莪术油对人胃腺癌SGC-7901细胞凋亡率的影响

流式细胞术Annexin V-PI染色结果如图6和表2所示, 莪术油能使胃腺癌SGC-7901细胞发生凋亡, 随着药物浓度的不断增大早期凋亡细胞的百分比先



1: 0 µg/mL 莪术油; 2: 50 µg/mL 莪术油; 3: 110 µg/mL 莪术油; 4: 150 µg/mL 莪术油。* $P < 0.05$, 与对照组比较(0 µg/mL组)。

1: 0 µg/mL ZTO; 2: 50 µg/mL ZTO; 3: 110 µg/mL ZTO; 4: 150 µg/mL ZTO。* $P < 0.05$ vs control group (0 µg/mL group)。

图9 SGC-7901细胞Bax和Bcl-2蛋白表达水平(质蛋白)

Fig.9 The Bax and Bcl-2 protein expression levels of the SGC-7901 cells (cytoplasmic protein)

升高后降低, 当莪术油浓度为110 µg/mL时早期凋亡细胞百分比达到最大。

2.7 莪术油对人胃腺癌SGC-7901细胞Bax与Bcl-2 mRNA表达的影响

应用荧光定量PCR仪自带的数据分析软件可以获得对应样品的Ct值, 并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出各组细胞Bax、Bcl-2 mRNA的相对表达量。结果表明, 莪术油作用SGC-7901细胞后, 可上调Bax基因表达, 下调Bcl-2基因表达, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(图7)。

2.8 莪术油对人胃腺癌SGC-7901细胞Bax与Bcl-2蛋白表达的影响

莪术油作用SGC-7901细胞48 h后, Western blot检测各组细胞中蛋白Bax和蛋白Bcl-2的表达水平, 结果表明, 莪术油可上调SGC-7901细胞Bax蛋白表达水平, 下调Bcl-2蛋白表达水平, 差异有统计学意义(图8和图9, $P < 0.05$)。

3 讨论

近年来, 在中药中寻找和开发具有抗癌活性成分已成为抗癌药物筛选及研究的热点。莪术作为传

统的中草药逐渐引起医学界学者的重视,大量研究证实莪术油是一种药理活性强、高效、安全的药物^[6]。早期研究表明,莪术油对多种癌细胞表现出抗癌活性,包括乳腺癌、卵巢癌、肝癌、口腔癌及皮肤癌等^[7-8],这促使我们对其诱导胃腺癌细胞凋亡做进一步的研究,本实验通过光学显微镜和荧光显微镜观察发现,随着莪术油浓度的增加,出现核皱缩,胞质浓缩,胞膜有起泡现象,出现凋亡小体,部分细胞形成大小不等的细胞碎片,凋亡小体是由核内异染色质凝聚破碎成多块,且由胞膜包裹,是细胞凋亡的突出特点^[9]。透射电镜观察细胞超微结构可见,核固缩,游离核蛋白体减少非常明显,线粒体嵴呈溶解状态,细胞器结构崩解消失,呈现明显的凋亡特征,同时,还可观察到莪术油诱导胃腺癌细胞的凋亡具有明显的浓度依赖性。110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莪术油作用48 h时,SGC-7901细胞的增殖抑制率为 $(108.002\pm 0.305) \mu\text{g}/\text{mL}$,凋亡率为 $(25.07\pm 0.82)\%$ 。

细胞凋亡是细胞的程序性死亡,它并不引起溶酶体的裂解和细胞膜的破裂以及细胞内容物的释放,而且也不会引发炎症或继发性损伤,这是抗癌药物要达到的理想效果。研究发现,Bcl-2家族的基因和蛋白的表达调控是影响及调控细胞凋亡的一个重要因素,其中的Bcl-2和Bax基因在癌细胞的凋亡中具有重要的调控作用^[10]。杨丽华等^[11]研究发现,一定浓度的莪术油能抑制人乳腺癌MCF-7细胞增殖,促进其凋亡,其机制可能与调控Bcl-2、Bax基因表达有关。刘竹等^[5]研究表明,莪术油能调控Bcl-2、Bax基因表达进而抑制卵巢癌细胞的增殖,促进其凋亡。Chen等^[12]研究发现,莪术油可通过调控Bax、Bcl-2的表达,诱导非小细胞肺癌的凋亡。

本研究结果显示,莪术油作用SGC-7901细胞48 h后,Bax表达水平上调,Bcl-2表达水平下调,Bax/Bcl-2比值显著升高,表明莪术油能通过上调Bax和下调Bcl-2基因表达诱导胃腺癌SGC-7901细胞凋亡。本研究将为胃腺癌的临床治疗奠定理论基础,但如何将莪术油应用于胃腺癌临床治疗还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 侍力刚,刘文韬,朱正纲. 胃癌干细胞及其治疗的研究进展. 国际外科学杂志(Shi Ligang, Liu Wentao, Zhu Zhenggang. The research progress of gastric cancer stem cells and its treatment. International Journal of Surgery) 2011; 38(7): 478-81.
- 2 Oh JO, Hye YM, Sang KL. Inhibition of inducible prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 expression by curdione from *Curcuma zedoaria*. Arch Pharm Res 2007; 30(10): 1226-39.
- 3 Hong CM, Min, Lee WY, Lee SK. Inhibitory effects of natural sesquiterpenoids isolated from the rhizomes of *Curcuma zedoaria* on prostaglandin E and nitric oxide production. Planta Medica 2002; 68(6): 545-7.
- 4 Chuan BL, Nung K, Hui, MN, Hamza M, Yan Z. *Curcuma wenyujin* extract induces apoptosis and inhibits proliferation of human cervical cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Integr Cancer Ther 2010; 9(1): 36-49.
- 5 刘竹,韩凤娟,吴效科. 莪术油的抗肿瘤及治疗卵巢癌的研究概况. 现代中西医结合杂志(Liu Zhu, Han Fengjuan, Wu Xiaoke. Zedoary turmeric oil anti-tumor and research for the treatment of ovarian cancer. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and western medicine) 2010; 19(17): 2209-10.
- 6 Abdul BH, Adel SZ, Tailan ND, Wahab SA, Zain NM, Ruslay S. Anticancer activity of natural compound (Zerumbone) extracted from *Zingiber zerumbet* in human HeLa cervical cancer cells. Int J Pharmacol 2008; 4(3): 160-8.
- 7 Dolara PC, Luceri C, Ghelardoni C, Monserrat C, Aiolfi S, Luceri F. Analgesic effects of myrrh. Nature 1996; 379(6560): 29.
- 8 Morikawa TH, Matsuda K, Ninomiya M, Yoshikawa. Medicinal foodstuffs. XXIX. Potent protective effects of sesquiterpenes and curcumin from *zedoariae* rhizoma on liver injury induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . Biol Pharm Bull 2002; 25: 627-31.
- 9 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-57.
- 10 Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science 1985; 228(4706): 1440-3.
- 11 杨丽华,姜杰. 莪术油对人乳腺癌MCF-7细胞凋亡及Bcl-2、Bax表达的影响. 浙江中西医结合杂志(Yang Lihua, Jiang Jie. Influence of zedoary turmeric oil on expression of Bcl-2/Bax in human breast cancer MCF-7 cells. Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine) 2010; 20(12): 741-3.
- 12 Chen CC, Chen Y, Hsi YT. Chemical constituents and anticancer activity of *Curcuma zedoaria* roscoe essential oil against non-small cell lung carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. J Agric Food Chem 2013; 61(47): 11418-27.