

· 基础研究 ·

姜黄素对人食管癌 EC 9706 细胞凋亡的诱导作用 *

陈兰英² 杨海波¹ 李祺福^{1△} 宋建晔¹ 荆光军¹

(¹ 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室 厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361005;

² 平顶山工学院 河南 平顶山 467044)

摘要 目的:应用姜黄素处理人食管癌 EC9706 细胞,研究姜黄素对人食管癌 EC9706 细胞凋亡的诱导作用。方法:应用细胞计数、流式细胞仪、琼脂糖凝胶电泳、Hoechst 染色、H E 染色和透射电镜检测经姜黄素诱导处理后人食管癌 EC9706 细胞的凋亡。结果:经姜黄素诱导处理后,人食管癌 EC9706 细胞生长抑制率达 69.9%;细胞周期检测出现亚二倍体(亚 G1 期)细胞峰值,细胞凋亡率达 23%;琼脂糖凝胶电泳显示出细胞凋亡典型的 180-200 bp 及其倍体的 DNA“梯状”条带;Hoechst 染色显示细胞核内出现浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光;光镜和电镜下可见典型的细胞凋亡特征:细胞体积缩小,染色体凝集,可见有成群或单独存在的凋亡细胞,电镜下可见凋亡小体存在。结论:姜黄素能够有效诱导人食管癌 EC9706 细胞的凋亡,从而进一步为食管癌等恶性肿瘤疾病的治疗和凋亡机理的研究提供重要基础和科学依据。

关键词 姜黄素;食管癌细胞;细胞凋亡

中图分类号:R735.1, R979.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2008)09-1601-04

A Poptosis of Human Esophageal Carcinoma Cell Line EC 9706 Induced by Curcumin*

CHEN Lan-ying², YANG Hai-bo¹, LI Qi-fu^{1△}, SONG Jian-ye¹, JING Guang-jun¹

(¹ The Key Laboratory of China Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005, Fujian, China; ² Pingdingshan Institute of Technology, 467044, Pingdingshan Henan, China)

ABSTRACT Objective: To study the apoptosis effects of the human esophageal carcinoma cell line EC9706 cells induced by curcumin (Cur). **Methods:** The apoptosis effects of EC9706 cells induced by curcumin were detected by cell count, flow cytometry analysis, light microscope and electron microscope. **Results:** After treated with curcumin, the proliferation of EC9706 cells was inhibited, and the inhibitory rate was 69.9%. The results of flow cytometry analysis showed that curcumin could induce the emergence of the phase of apoptosis, and the rate was 23%. A agarose gel electrophoresis revealed that cell DNA fragment exhibited characteristic "DNA ladder". Cell nucleus concentrated and appeared granular fluorescence by Hoechst3258 staining. Light microscope and electron microscope showed that the morphology of the cells treated with curcumin appeared shranked, cell nucleus concentrated, chromatin agglutinated, mitochondria swelled, and apoptosis body formed. **Conclusion:** This study suggested that curcumin could induce apoptosis of the human esophageal carcinoma cell line EC9706 effectively, and provided important foundation and research proofs to study more about the therapy of esophageal carcinoma, the malignant tumor and apoptosis mechanism.

Key words: Curcumin; Human esophageal carcinoma cell; Cell apoptosis

Chinese Library Classification: R735.1; R979.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2008)09-1601-04

前言

细胞凋亡是一种细胞自主生理死亡,对多细胞动物机体的正常发育和自身稳定具有及其重要的作用,细胞凋亡失衡与许多疾病尤其是与肿瘤的发生发展有关。肿瘤细胞凋亡的诱导及其机理研究,是当前抗肿瘤研究的一个重要方向。食管癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,全世界每年约有 30 万人死于此疾病,其死亡率在癌症总死亡率中占第 4 位。但目前有关食管癌细胞凋亡及其机理研究仍缺乏深入全面的研究工作。姜黄素(Curcumin,分子式为 C₂₁H₂₀O₆,分子量 368.4,纯度 99%)是

从多年草本植物姜黄中提取的一种酚类色素,具有消炎、抗氧化、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化和降血脂等作用,对于多种肿瘤细胞系均具有明显的凋亡诱导作用,是一种理想的细胞凋亡诱导物^[1]。我们应用姜黄素处理人食管癌 EC9706 细胞,鉴定姜黄素对食管癌细胞凋亡的诱导效果,从而为进一步研究食管癌等恶性肿瘤疾病的治疗和凋亡机理研究提供重要基础和科学依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和诱导处理

人食管癌 EC9706 细胞由中国医科院肿瘤研究所赠送。

* 基金项目:国家自然科学基金项目 30470877)

作者简介:陈兰英(1956-),女,教授,主要研究方向:分子细胞生物学和遗传学

△通讯作者:李祺福, E-mail: chifulee@xm.u.edu.cn

收稿日期:2008-01-22 接受日期:2008-03-22

EC9706 细胞培养于 RPM I-1640 培养液中 内含 15% 热灭活小牛血清和 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素及 50 μg/mL 卡那霉素 (pH 7.2), 于 37 °C 培养。姜黄素 (购自中国药品生物制品检定所) 用二甲基亚砜 (DM SO) 溶解, 母液浓度为 10 mg/mL, 过滤除菌后 -20 °C 避光保存, 临用前用培养液稀释成 8 μg/mL 作用液。取对数生长期的 EC9706 细胞进行消化传代, 接种 24 h 后, 对照组细胞更换新鲜培养液, 诱导处理组更换姜黄素作用液。

1.2 细胞生长曲线的测定

取对数生长期细胞, 以 5×10^4 个/mL 细胞浓度接种于一批 25 mL 培养瓶中, 接种 24 h 后, 对照组细胞换上新鲜培养液, 处理组换上含 8 μg/mL 姜黄素的作用液, 逐日 (1-7 d) 从对照组和处理组各取三瓶细胞, 用台盼蓝拒染法进行活细胞计数, 取其平均值, 绘制细胞生长曲线。实验重复三次, 结果基本一致, 以其中一次为准。

1.3 细胞周期测定

取对照组和处理组细胞分别用 PBS 清洗, 消化收集细胞, 并用 PBS 离心洗涤, 细胞沉淀重悬于 70% 乙醇 (预冷) 中固定, 4 °C 过夜 (可暂存 1-2 周)。细胞周期检测时先离心除去乙醇, PBS 洗涤, 加入不含 DNase 的 10 mg/mL RNaseA 37 °C 温育 30 min, 加入 50 μg/mL 碘化丙锭 (PI) 4 °C 染色 30 min, 300 目滤网过滤。用流式细胞仪 (Becton-Dickson 公司产品) 进行细胞周期时相动力学检测, 根据所测得的 DNA 分布直方图, 分析细胞周期分布。

1.4 DNA 凝胶电泳检测

参照细胞实验指南方法, 取对照组和处理组细胞 (各约 5×10^5 个细胞) 离心收集后, 加入 20 μL 溶解缓冲液, 小心混匀, 加入 10 μL RNaseA (500 U/mL), 小心混匀, 37 °C 孵育, 加入 10 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 50 °C 孵育。DNA 样品开始电泳。

1.5 Hoechst 荧光染色检测

取分别附着有对照组和处理组细胞的盖玻片条, 温 PBS 液漂洗 3 次, 4% 多聚甲醛 (pH 7.2) 4 °C 固定 10 min, PBS 漂洗, 滴加 Hoechst35258 荧光染料, 避光, 温育 10 min, PBS 漂洗, 90% 甘油 / PBS 封片。用荧光显微镜 (OLYMPUS BX 41) 进行检测。

1.6 光镜显微样品制备与观察

取对数生长期细胞, 接种于一批放有盖玻片条的培养瓶中, 接种 24 h 后, 对照组细胞换上新鲜培养液, 处理组换上含 8 μg/mL 姜黄素的作用液, 培养 72 h 后取出长有细胞的盖玻片条, 温 PBS 液漂洗, Bouin-Hollande 液固定过夜, 70% 乙醇脱色, 苏木精染色, 0.5% 盐酸-乙醇分色, 1% NH₄OH 碱化, 伊红染色, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

1.7 透射电镜样品制备与观察

取对数生长期细胞, 接种于一批 50 mL 培养瓶中, 接种 24 h 后, 对照组细胞换上新鲜培养液, 处理组换上含 8 μg/mL 姜黄素的作用液, 温 PBS 液漂洗, 用橡皮刮刀推下细胞移入离心管中, 1500 rpm 离心 10 min, 弃上清液。细胞沉淀用 2.5% 戊二醛 4 °C 预固定 2 h, PBS 漂洗 3 次, 1% 四氧化锇 4 °C 固定 2 h, 乙醇系列脱水, 环氧树脂 823 包埋, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后, 于 JEM 100-CX 型透射电镜下观察拍照。

2 结果

2.1 姜黄素对 EC9706 细胞增殖的影响

细胞生长曲线测定结果显示, 对照组细胞培养 7 天后, 由 5.125×10^4 细胞/mL 增加至 58.655×10^4 细胞/mL, 为原来的 11.445 倍, 群体平均倍增时间为 12.57 h, 增殖较快; 而 8 μg/mL 姜黄素处理组细胞在同样接种量的情况下, 仅增加至 17.625×10^4 细胞/mL, 为接种量的 3.439 倍, 群体平均倍增时间为 41.87 h, 是对照组的 3.33 倍, 增殖速度减慢将近 3 倍。8 μg/mL 姜黄素对 EC9706 细胞的抑制率为 69.9% (图 1)。

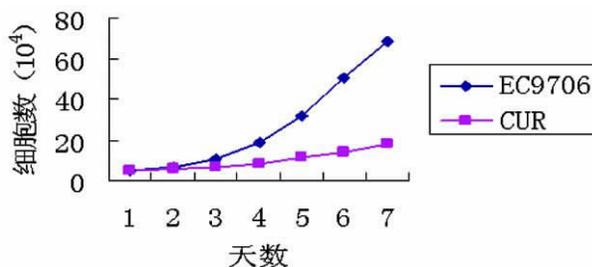


图 1 姜黄素对 EC9706 细胞增殖的影响

Fig.1 The effect of curcum in on the proliferation of EC9706 cells

2.2 姜黄素对 EC9706 细胞周期的影响

应用流式细胞仪检测姜黄素对 EC9706 细胞周期分布的影响。检测结果显示, 经姜黄素处理后, EC9706 细胞在细胞周期各个阶段的分布发生了明显变化, 其中, 姜黄素诱导 EC9706 细胞产生凋亡, 即出现了亚 G1 峰, 细胞比例为 23%; 处于 G0/G1 期的细胞比例增加, 由 41.6% 增加为 50.8%; S 期细胞比例减少, 由 22.9% 下降为 9.91%, 降低幅度为 56.7%; 而 G2/M 期细胞比例下降, 由 29.7% 下降为 16.1%, 降低幅度为 45.8% (表 1)。细胞周期柱形图可见, 与对照组相比, 姜黄素处理组细胞 S 期和 G2/M 期细胞比例明显下降, 其中 S 期细胞比例减少尤为明显; G0/G1 期细胞增多, 出现 G0/G1 期细胞堆积的现象 (图 2)。

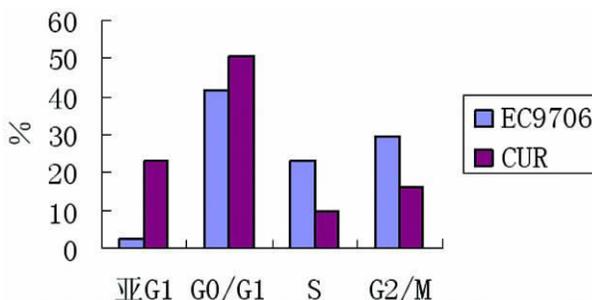


图 2 姜黄素对 EC9706 细胞周期的影响 (%)

Fig2 The effect of curcum in on the cell cycle of EC9706 cells

表 1 姜黄素诱导处理之后对 EC9706 细胞周期的影响 (%)

Table1 The effect of curcum in on the cell cycle of EC9706 cells (%)

G groups	Cell cycle distribution(%)			
	sub-G1	G0/G1	S	G2/M
EC9706	2.52	41.6	22.9	29.7
Cur	23	50.8	9.91	16.1

2.3 DNA 凝胶电泳检测

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 对照组细胞不出现 DNA 降解现象, 电泳时出现高分子量的亮带; 而经 8 μg/mL 姜黄素处理

组细胞形成 180~200 bp 的整数倍的寡核苷酸片段,在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱 (DNA ladder)。随着处理时间的延长,显示出明显的细胞凋亡典型的 180-200 bp 的整数倍的 DNA“梯状”条带 (图 3)。

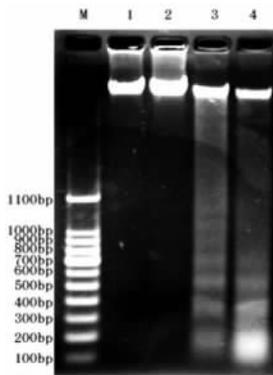


图 3 DNA 凝胶电泳结果

注: M: Marker, 1: control, 2: 24h 3: 36h, 4: 48h

Fig.3 Results detected by DNA fragmentation.

Note: M: Marker, 1: control, 2: 24h 3: 36h, 4: 48h

2.4 Hoechst 染色

Hoechst 染色结果显示, 对照组细胞核出现弥散均匀的低强度荧光, 细胞核结构完整; 姜黄素处理组细胞核出现浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光, 荧光发光强度不均匀, 部分核膜崩解, 细胞核碎裂 (图 4:1-2)。

2.5 苏木精-伊红染色

苏木精-伊红染色显示, 对照组 EC9706 细胞体积较小, 细胞折光性强, 形态多样, 有多边形、梭形、圆形、不规则形等形态, 常见癌巨细胞、多核细胞及分裂相细胞, 细胞核质比较大, 细胞核形态不规则, 有圆形、椭圆形、肾形及梭形, 核仁数目多达 3-5 个, 且大而深染, 细胞群体排列不规则, 没有明显的极性, 生长至汇合时呈上皮样排列; 姜黄素处理组细胞显示, 细胞体积缩小, 核固缩, 深染, 核染色质集边呈心月形, 并且可见有成群或单独存在的凋亡细胞 (图 4:3-4)。

2.6 透射电镜观察

超薄切片透射电子显微镜观察显示, EC9706 细胞核质比较大, 细胞核大且形状不规则, 核内异染色质多见, 呈团块状散在分布于核内以及核膜部位; 细胞质内, 细胞器较少, 线粒体数量少, 线粒体体积小, 形状不规则, 常可见呈深色负染, 细胞表面有微绒毛突起。经姜黄素处理后的 EC9706 细胞的超微结构产生了明显的变化。细胞核质比减小, 细胞核固缩, 染色质边聚, 核内出现了透明区域; 细胞质空泡化明显; 细胞膜皱缩但完整, 细胞器数目减少, 线粒体增多, 肿胀; 内质网网腔扩大; 可见体积小、数目多的凋亡小体 (图 4:5-8)。

3 讨论

细胞凋亡是当细胞受到内外信号刺激发生的一种由细胞内部基因控制的、主动性的死亡行为^[2]。凋亡细胞常伴有特征性的形态学和生化改变, 表现在细胞增殖抑制和细胞周期阻滞、细胞质浓缩、染色质凝集并聚集在核膜周围、细胞膜出泡、形成凋亡小体以及 DNA 发生规则断裂等。目前这些变化已成为判断细胞凋亡的重要指标。

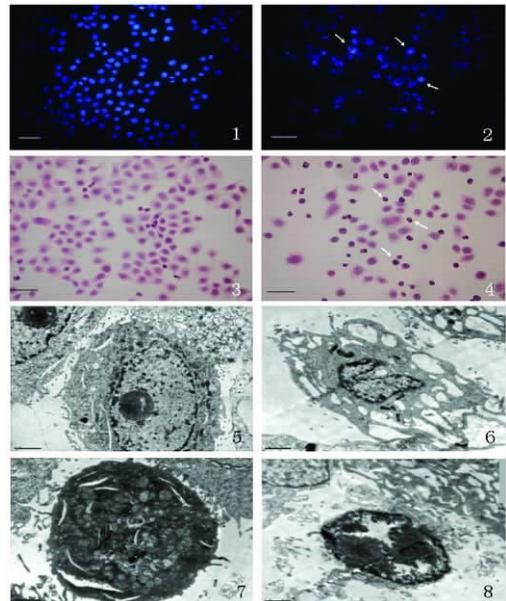


图 4 姜黄素对 EC9706 细胞处理前后光镜和透射电镜观察

注: 1 Hoechst 染色荧光显微镜观察 EC9706 细胞。(Bar=40 μm); 2 Hoechst 染色荧光显微镜观察姜黄素处理后的 EC9706 细胞, 染色质边聚, 细胞核有破裂现象, 荧光聚集。(Bar=50 μm); 3 H&E 染色光镜观察 EC9706 细胞。(Bar=40 μm); 4 H&E 染色光镜观察姜黄素处理后的 EC9706 细胞, 细胞体积缩小, 细胞核固缩, 染色质深染, 细胞质有出芽现象。(Bar=40 μm); 5 透射电镜观察对照组 EC9706 细胞超微结构。(Bar=1 μm); 6 透射电镜观察姜黄素处理后的 EC9706 细胞超微结构, 线粒体肿胀, 细胞核固缩, 染色质边聚。(Bar=1 μm); 7 透射电镜观察姜黄素处理后的 EC9706 细胞超微结构, 出现致密核。(Bar=1 μm); 8 透射电镜观察姜黄素处理后的 EC9706 细胞超微结构, 细胞核固缩, 染色质凝聚。(Bar=1 μm)

Fig.4 Observation of optic and electron microscope of EC9706 cells previous and after treated with curcumin

Note: 1 Control EC9706 cells stained by Hoechst33258 showing that, the cell nucleus appeared well-proportioned fluorescence and the nucleus structure were intact (Bar=40 μm); 2 EC9706 cells after treated with 8 μg/ml curcumin stained by Hoechst33258 showing that, cell nucleus concentrated and appeared granular fluorescence, and the nucleus structure were disintegrated (Bar=50 μm); 3 Control EC9706 cells stained by HE showing that the morphology of the EC9706 cells were various, the proportion of nucleus and cytoplasm was big, the size of nucleus was big and more nucleolus (Bar=40 μm); 4 EC9706 cells after treated with 8 μg/ml curcumin stained by HE showing that, cell shrunk, cell nucleus concentrated (Bar=40 μm); 5 Control EC9706 cells observed under electron microscope (Bar=1 μm); 6 EC9706 cells after treated with 8 μg/ml curcumin in observed under electron microscope, cell shrunk, cytoplasm mitochondria swelling (Bar=1 μm); 7 EC9706 cells after treated with 8 μg/ml curcumin in observed under electron microscope, nuclear compaction (Bar=1 μm); 8 EC9706 cells after treated with 8 μg/ml curcumin in observed under electron microscope, nuclear concentrated, chromatin condensation (Bar=1 μm)

鉴定对肿瘤细胞增殖活动的抑制和周期调控是鉴定外源性物质抗肿瘤作用的一个基本方面, 也是鉴定外源性物质诱导肿瘤细胞凋亡的一项重要指标。本实验结果显示, EC9706 细胞是一株分裂增殖旺盛的细胞。但是, 经 8 μg/ml 姜黄素诱导处理七天后, 细胞生长抑制率达到 69.9%, 细胞群体倍增时间由 12.57 h 延长至 41.87 h, 是原来的 3.33 倍。细胞周期各时相的细胞比例发生了显著的变化, 对照组 EC9706 细胞 G₀/G₁ 期的

细胞比例为 41.6% ,S 期细胞占 22.9% , 而 G2M 期细胞占 29.7% ;经姜黄素诱导处理后,细胞周期出现明显的凋亡峰,亚 G1 期细胞比例高达 23% ,G0/G1 期细胞比例增加为 50.8% ,S 期细胞比例下降为 9.91% ,G2M 期细胞比例降低为 16.1% 。实验结果表明,姜黄素诱导 EC9706 细胞的增殖受到了显著抑制,细胞周期在 G0/G1 期受到阻滞,出现明显的亚 G1 期凋亡峰。这一结果与 Shahar Lev-A ri、朱艳琴、刘淑霞、曹静等分别用姜黄素、苦参素、戊地昔布、5-氟脲嘧啶处理 HT-29 细胞、食管癌细胞时观察到的细胞增殖抑制和细胞周期阻滞结果相一致^[3-6]。由此表明,姜黄素能显著地抑制 EC9706 细胞的增殖活动,阻滞细胞周期的运转,诱导细胞凋亡。

DNA 发生断裂是细胞凋亡的最主要特征,也是目前判断细胞是否凋亡的一个最有效指标。本实验结果显示,对照组细胞在凝胶电泳时不出现 DNA 降解现象;但是,经 8 μg/ml 姜黄素处理组的细胞则出现细胞凋亡典型的 180-200 bp 及其倍体的 DNA“梯状”条带。通过 Hoechst 33258 染色显示,对照组 EC9706 细胞经 Hoechst33258 染色后,细胞核结构完整,出现均匀的低强度荧光,但是,姜黄素处理组的细胞核浓缩,裂解,荧光发光强度不均匀。透射电镜观察结果显示,姜黄素处理的组细胞核染色质凝聚,趋边化。这与 Ming Li、彭玮丹、杨成梁等分别用阿司匹林、紫杉醇、全反式维甲酸处理食管癌细胞,也与 Sivagurunathan Somasundaram、M aryam M oussavi、Christine Syng-ai、舒建国、张莉等分别用姜黄素、华蟾素处理 MCF-7 细胞、HT29 细胞、MCF-7 细胞肝星状细胞 HSC-T6、U937 细胞的观察结果一致^[7-14]。由此表明,姜黄素能使 EC9706 细胞的 DNA 发生降解,诱导细胞凋亡。

观察和鉴定诱导凋亡处理前后细胞形态与超微结构特征的变化,是判断细胞是否凋亡的一个重要指标。本文光镜和透射电镜观察结果显示,EC9706 细胞形态多样,细胞核质比较大,细胞核形态不规则,异染色质多见,细胞质内细胞器数量少,细胞群体排列不规则,生长至汇合时呈上皮样排列。经姜黄素处理后的 EC9706 细胞显示细胞质固缩,细胞核质比减小,细胞核固缩,染色质边聚;细胞质空泡化明显;基质的电子密度增高;细胞器数目减少,线粒体数量增多,肿胀;可见体积小、数量多的凋亡小体。本文研究观察到的 EC9706 细胞的形态和超微结构变化不仅与本实验室用姜黄素处理后的人胃腺癌 BGC-823 细胞^[15],也与於常兰用三氧化二砷处理食管癌细胞,王威、黄秀榕等分别用姜黄素处理人肝癌细胞株 HepG-2 细胞、牛晶状体上皮细胞 JEC 细胞时观察到的细胞核固缩、核膜凹陷、异染色质增多、边聚、可见明显的致密核、基质的电子密度高、细胞质固缩、细胞器数量减少、线粒体肿胀、可见凋亡小体等变化相一致^[16-18]。由此可见,姜黄素对 EC9706 细胞形态和超微结构的作用与对其他细胞诱导凋亡作用是一致的,说明姜黄素具有诱导 EC9706 细胞凋亡的生物学效应。

本研究结果充分证实了姜黄素能有效诱导人食管癌 EC9706 细胞的凋亡,因此,深入探索姜黄素诱导食管癌细胞凋亡的机理,对于进一步研究食管癌等恶性肿瘤疾病的治疗具有重要的指导意义和实际应用意义。

参考文献 References)

[1] Li Nian, Shao Shu-li. A research progress on apoptosis mechanisms of malignant tumor cells induced by curcumin [J]. Journal of Science of Teachers' College and University, 2007, 27 (1) : 27-29 (In Chinese)
 [2] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide [J]. Science,

1995, 267 (5203) : 1445-1449
 [3] Shahar Lev-A ri, Ludmila Strier, Diana Kazanov, Celecoxib and Curcumin Synergistically Inhibit the Growth of Colorectal Cancer Cells [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (18) : 6738-6744
 [4] Zhu Yan-qin. Experimental study of the inhibition effect of oxymatrine on the Eca2109 cell [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23 (10) : 1400 (In Chinese)
 [5] Liu Shu-xia, Zhang Yu-jun, Qi Feng-ying, et al. The Effect of Valdecoxib on Apoptosis and Expression of the COX-2 of Human Esophageal Cancer Cells [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2006, 33 (4) : 213-217 (In Chinese)
 [6] Cao Jing. The Research on the Expression of HIF-1 α and Its Relationship with Apoptosis and Proliferation in Esophageal Carcinoma EC9706 Cell Line [D]. Zhengzhou University, 2006: 1-64 (In Chinese)
 [7] Ming Li, Reuben Lotan, Bernard Levin. Aspirin Induction of Apoptosis in Esophageal Cancer: A Potential for Chemoprevention [J]. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2000, 9: 545-549
 [8] Peng Wei-dan, Zhang Jie, Hui Hong-xiang, et al. Taxol-induced apoptosis in human esophageal carcinoma cell line [J]. J Fourth Military Medical Univ, 1998, 19 (2) : 129-133 (In Chinese)
 [9] Yang Cheng-liang, Fan Qing-xia, Lu Tai-ying, et al. A Study of Effects of All-Trans Retinoic Acid on Esophageal Cancer Cell EC109 [J]. Journal of Basic and Clinical Oncology, 2007, 20 (3) : 190-192 (In Chinese)
 [10] Sivagurunathan Somasundaram, Natalie A. Edmund, Dominic T. Moore, Dietary Curcumin Inhibits Chemotherapy-induced Apoptosis in Models of Human Breast Cancer [J]. CANCER RESEARCH, 2002, 62: 3868-3875
 [11] M aryam M oussavi, K iran Assi, Antonio Gomez-Munoz. Curcumin mediates ceramide generation via the de novo pathway in colon cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2006, 27 (8) : 1636-1644
 [12] Christine Syng-ai, A . Leela Kumari, Ashok Khar. Effect of curcumin on normal and tumor cells: Role of glutathione and bcl-2 [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2004, 3 (9) : 1101-1108
 [13] Shu Jian-guo, He Ya-jun, Lv Xia, et al. Preliminary study on mechanism of apoptosis of hepatic stellate cells induced by curcumin [J]. Chin J Dig, 2006, 26 (11) : 758-761 (In Chinese)
 [14] Zhang Li, Li Ya-m in, Qian Ying, et al. Cinobufacin induces the apoptosis of U937 cells and its mechanism. Tumor [J]. Cancer, 2007, 27 (5) : 341-344 (In Chinese)
 [15] Li Peng, Li Qi-fu, Huang Da-chuan, et al. The Research of Isoactive Peptides from Saccostrea Cucullata and Biological Effect on the Human Gastric Adenocarcinoma BGC2823 Cells [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2002, 41 (5) : 618-622 (In Chinese)
 [16] Yu Chang-lan, Zhang Jun-wen. Apoptosis of esophageal cancer inducing cell by arsenic trioxide and its influence on expression of C-myc and TGF-β1 [J]. Chongqing Medicine, 2006, 35 (11) : 1000-1004 (In Chinese)
 [17] Wang Wei, He Hong-guang, Fan Li, et al. Effect of Curcumin on Growth and Ultrastructure of Human Hepatocarcinoma Cell Line HepG-2 [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2005, 34 (3) : 323-325 (In Chinese)
 [18] Huang Xi-ruo, Qi Ming-xin, Kang Ke-ren, et al. Apoptosis of lens epithelial cell induced by curcumin and its mechanism [J]. Chin J Ophthalmol, 2006, 42 (7) : 649-653 (In Chinese)