

بررسی اثر توکسیسیته عصاره الکلی زنجبیل تازه بر سلول های سرطانی کبد

دکتر جلیل توکل افشاری*، نسرین محقی**، اعظم بروک***

دریافت: ۸۹/۲/۱۸، پذیرش: ۸۹/۵/۲۶

چکیده:

مقدمه و هدف: بطور کلی عصاره بسیاری از ادویه ها اثرات بالای مهار کنندگی (سایتوتوکسی سیتی) بر کشت سلولهای توموری نشان داده اند. زنجبیل گیاهی طبی بوده و مطالعات اخیر نشان میدهد که دارای خواص آنتی توموری، ضد قارچ، حشره کشی و anti ulcer میباشد. با اینحال تاثیرات آنتی توموری آن بر روی رده سلول سرطان کبد انجام نشده است. لذا در این مطالعه اثر آنتی توموری عصاره الکلی آن مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: در این مطالعه تجربی سلول های HepG2 و سلولهای نرمال (L929) در محیط DMEM حاوی سرم جنین گاو و آنتی بیوتیک کشت گردیدند. سپس سلولها با رقت دو گانه از غلظت ۵۰۰ تا ۷۸,۱۲۵ میکروگرم/میلی لیتر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند و زیست پذیری (Viability) سلولها به روش MTT تعیین گردید.

نتایج: نتایج تست MTT بعد از ۴۸ ساعت در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر نشان داد که ۵۰٪ سلولها نسبت به گروه کنترل (L929) زنده بودند ($p < 0.001$)، ولی سلولهای L929 از نظر مورفولوژی سالم و زنده بودند. لذا IC50 در حدود غلظت ۲۵۰۰ در نظر گرفته میشود. نتایج مرفولوژی نشان می دهد که سلولهای L929 تحت اثر عصاره هیچگونه تغییرات مرفولوژیکی مشخصی نسبت به سلولهای کنترل (بدون عصاره) ندارد. مقایسه نتایج مرفولوژیکی در سلولهای سرطانی (HepG2) در روزهای مختلف نتایج مهمی را نشان می دهد. سلولهای تحت اثر عصاره در روزهای مختلف تفاوتهای بسیار بارز و وابسته به دوزی نشان دادند. بطوریکه بندریج و با افزایش زمان و در دوزهای بالاتر تغییر شکل سلولی بسیار واضح تر بود. مهار رشد سلولها، تحلیل رفتگی و افزایش اندازه واکوئل، کاهش سیتوپلاسم و پیگمانته شدن هسته قابل مشاهده بود.

نتیجه نهایی: با توجه به اینکه عصاره الکلی زنجبیل خواص سایتوتوکسیسیته در سلولهای سرطانی داشته ولی با اینحال اثرات سمی در سلولهای نرمال ندارد، از آن می توان به عنوان یک ماده در درمان سرطان استفاده کرد.

کلید واژه ها: زنجبیل / سرطان کبد / سمیت

مقدمه:

خود فرد به سلولهای کبدی که آلوده به ویروس هستند میباشد.

در امریکای شمالی و اروپای غربی Hcc بیشتر به علت متاستاز تومور از سایر ارگانها می باشد (۱) در حالیکه در جنوب آسیا و چین دومین سرطان شایع کشنده می باشد و مطالعات اپیدمیولوژیک رابطه نزدیکی بین ابتلا به عفونت هپاتیت B و این بیماری را نشان داده است (۲).

در بیماران مزمن هپاتیت B ابتلا به Hcc ۱۰۰ برابر بیشتر از افراد غیر مبتلا می باشد و اکثر بیماران Hcc سالها

هیپاتوسل کارسینوما (Hcc) یک نوع سرطان کبدی می باشد که اکثراً پس از ابتلاء فرد به هپاتیت ویروسی B و C یا سیروز که در بیشتر موارد بعلت مصرف الکل می باشد رخ می دهد (۱). هیپاتوسل کارسینوما مانند سرطانهای دیگر زمانیکه یک موتاسیون در ماشین سلولی رخ دهد و منجر به تکثیر بی رویه سلولها شود و یا ناشی از پرهیز سلول از پدیده آپوپتوزیس باشد بوجود می آید. در مورد هپاتیتهای B و C علت عمده Hcc حمله سیستم ایمنی

* دانشیار گروه ایمونولوژی و عضو مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (moheghin1@mums.ac.ir)

*** کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

در این مطالعه به بررسی اثر کشندگی عصاره الکلی زنجبیل تازه بر سلولهای سرطان کبد (HEPG2) پرداخته شده است.

روش کار:

تهیه عصاره زنجبیل: در این مطالعه تجربی ریزوم زنجبیل پس از پوست کندن رنده شده و مقدار ۵ گرم از آن با ۱۰ میلی لیتر از محلول الکل اتیلیک ۹۶ درجه مخلوط گشته و به مدت ۳۰ دقیقه سونیکه گردید، سپس از صافی گذرانده شده و در حرارت اتاق خشک گردید. عصاره خشک وزن شده و غلظت مورد نظر در محیط کشت DMEM تهیه شد. این محلول از فیلتر ۰/۲ میکرو متر عبور داده شد و استریل گردید. رقت دو گانه از غلظت ۵۰۰۰ تا ۱۲۵، ۷۸ میکروگرم/ میلی لیتر از عصاره تهیه گردید و در پلیتهای ۹۶ تایی با تعداد سلولهای ۵۰۰۰ به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شد و اثرات عصاره بر زنده بودن سلولها از نظر مورفولوژیک وبا استفاده از تست MTT بررسی گردید.

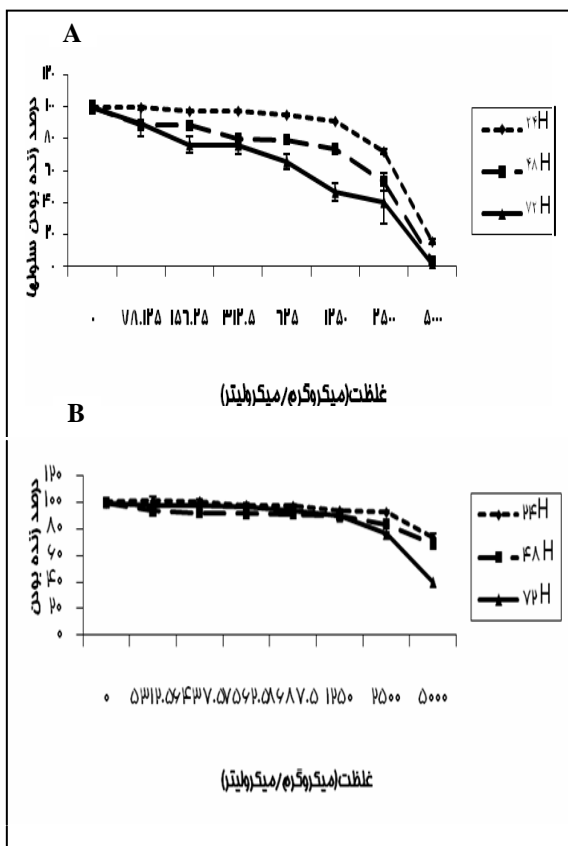
کشت سلول: سلولهای HEPG2 و L929 از انستیتو پاستور ایران - تهران تهیه گردید، سپس در محیط DMEM به همراه ۵٪ سرم جنین گوساله (FCS)، پنی سیلین ۱۰۰ یونیت/میلی لیتر و استرپتو مایسین ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر کشت گردید. سلولها در انکوباتور ۳۷ درجه در رطوبت ۹۰ درصد و ۵٪ CO2 قرار گرفتند. سلولهای L929 در ۱۰٪ FCS قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت سلولها در معرض عصاره الکلی در رقت دو گانه از غلظت ۵۰۰۰ تا ۱۲۵، ۷۸ میکروگرم/میلی لیتر قرار گرفت. همزمان نمونه کنترل فاقد عصاره نیز بصورت سه تایی مانند نمونه های حاوی عصاره در نظر گرفته شد.

بررسی زنده بودن سلولها: زنده بودن سلولها توسط تست MTT [۳،۴،۵] دی متیل تیازول ۲ یل ۲،۵ دی فنیل تترازولیوم (۹) مورد ارزیابی قرار گرفت. بطور خلاصه سلولها به تعداد ۵ هزار در هر ول ۹۶ تایی پلیت سلولی قرار گرفت و در زمانهای ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن عصاره به سلولها محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلولها در محلول MTT (۵ میلی گرم/ میلی لیتر در PBS) به مدت ۴ ساعت قرار گرفت و پس از محلول سازی فرمازان توسط DMSO (Dimethylsulfoxid) ۱۰۰ میکرولیتر جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر (رفرانس ۶۲۰ نانومتر) توسط دستگاه خوانده شد (stat fax 2000 USA).

پس از ابتلا به هیپاتیت کرونیک تحت تاثیر عوامل موثراژنیک محیط یا تغییرات ژنتیک تصادفی که رخ می دهند مبتلا به Hcc میگردند. یک مطالعه در تایوان نشان داده است که واکسیناسیون هیپاتیت B در کودکان سبب کاهش Hcc می گردد (۳). مطالعات حاکی از این است که ریسک بیماری Hcc در حال افزایش بوده و در کل جهان به ۵ میلیون در سال رسیده است (۴).

گیاه زنجبیل بعنوان دارو، ادویه و خوراک لذیذ در دنیا استفاده می گردد این ریزوم از گیاه Zingiber officinale تهیه می گردد. کشت گیاه زنجبیل ابتدا در آسیا بوده که سپس به افریقای غربی و سپس کارائیب گسترش یافته است (۵). بو و طعم خاص زنجبیل ناشی از مخلوط (gingerols و shogaols و zingerone) روغن های فراری است که ۳٪ وزن زنجبیل تازه را تشکیل می دهند. در حیوانات آزمایشگاهی gingerols ها سبب افزایش تحریک لوله گوارش گردیده و ضد درد، مسکن تب برو خاصیت ضد باکتریایی دارند (۶). چربی زنجبیل در موش ضد سرطان نشان داده شده است (۷) و مطالعات دانشگاه میشیگان خاصیت کشندگی gingerols را بر سلولهای سرطان تخمدان نشان داده اند (۸). زنجبیل شامل بیش از سه درصد از چربی های اسانسی معطر است که ترکیب اصلی سسکوئی ترین ها را دارا می باشند که zingerone ترکیب اصلی آن می باشد. مقدار کمتری از سسکوئی ترین ها و farnesene و مقادیر کمی از مونوترپنوئیدها و citral نیز در آن وجود دارد. طعم تند آن ناشی از فنیل پروپانوئید غیر فرار و تا حدی gingerols و shogaols می باشد که در هنگام طبخ و خشک شده گیاه وجود دارد. همچنین یک ترکیب شیمیایی محرک بوده و به این دلیل در جنگ های قدیم استفاده میشده است. زنجبیل خاصیت بزاق آور داشته و سبب تحریک تولید بزاق و در نتیجه عمل بلع را آسان می نماید. در طب کاربرد فراوانی داشته و بعنوان یک محرک و داروی ضد نفخ بوده و در کولیک و سوئی هاضمه استفاده فراوان می شود. همچنین جهت بر طرف کردن بوی بد برخی از دارو ها استفاده می گردد. زنجبیل در لیست FDA بعنوان داروی معمولاً سالم (safe) معرفی گردیده است و با داروی وارفارین تداخل دارد. در افرادی که از سنگ کیسه صفرا رنج می برند تداخل داشته و سبب افزایش تولید صفرا می گردد (۸).

اثر مهارکنندگی دارد. نتایج همچنین بیانگر این مطلب است که بعد از ۴۸ ساعت در غلظت ۲۵۰، ۵۰٪ سلولهای HEPG2 نسبت به گروه کنترل (L929) زنده بودند. لذا IC50 در حدود غلظت ۲۵۰ در نظر گرفته می شود (شکل ۱).



شکل ۱: A: نمودار تأثیر عصاره بر روی سلول HEPG2 با غلظت‌های مختلف پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT را نشان می دهد. B: نمودار تأثیر عصاره بر روی سلول L929 با غلظت‌های مختلف پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT را نشان می دهد

بحث:

گیاهانی که در خانواده زنجبیل قرار دارند بطور چشمگیری در رژیم غذایی افراد در دنیا قرار دارند. اولئورزینی که از ریشه گیاه زنجبیل تهیه میشود حاوی gingerol است که یک ماده فعال از نظر فارماکولوژیک می باشد. همچنین تاثیر این مواد بر ممانعت از تکثیر سلولهای سرطان انسانی از مسیر آپوپتوزیس به اثبات رسیده است (۱۰-۱۳) با این وجود هنوز آنالیز مکانیسمهای ملکولی خاصیت ضد سرطانی آنها بطور وسیع انجام نشده است. بسیاری از گیاهان و ادویه جات دارای خاصیت

بررسی آماری: نتایج آماری با استفاده از آنالیز بنفرونی و نرم افزار آماری SPSS بدست آمد

نتایج:

اثرات عصاره الکلی بر زیست پذیری سلولی (Viability): نتایج مورفولوژی نشان می دهد که سلولهای سرطانی نسبت به غیر سرطانی تیمار شده با عصاره زنجبیل تغییرات مورفولوژیکی داشته است. تأثیرات اثر عصاره وابسته به دوز و زمان، قابل مشاهده بود. تغییرات مورفولوژی در سلولهای سرطانی بصورت مهار رشد سلولها و تغییر چسبندگی سلولها به سطح فلاسک و سلولها به یکدیگر و ایجاد مورفولوژی ستاره‌ای شکل، تغییرات در شکل دیواره سلولی، کاهش سطح سلولی و پیگمانته شدن سلول همراه بود. این تغییرات مورفولوژیک مشاهده شده بیانگر القای مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) در سلولهای سرطانی تیمار شده با زنجبیل میباشد که در سلولهای غیر سرطانی مشاهده نگردید.

سلولهای تحت اثر عصاره در روزهای مختلف تفاوتی بسیار بارز و وابسته به دوزی با یکدیگر نشان دادند. با افزایش زمان و افزایش دوز تغییر شکل سلولی بسیار واضح بود و این تغییرات در سلولهای HEPG2 تا زمان ۴۸ ساعت مشاهده گردید. تغییرات مورفولوژی در سلولهای HEPG2 در زمان ۴۸ ساعت بیشترین اثرات سایتوتوکسیک قابل مشاهده بود. عصاره زنجبیل در سلول های غیر سرطانی (L929) تاثیر چندانی نداشت.

نتایج سنجش رنگ MTT با اندازه گیری جذب نوری (OD) بر اساس غلظت عصاره مورد استفاده در مقایسه با میزان تکثیر مولکولی بصورت رسم نمودار بدست آمد. درصد سلولهای زنده تحت اثر عصاره نسبت به سلولهایی که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید:

$$\text{جذب نوری سلولهای تیمار شده با عصاره در هر ول} \times 100 = \text{میانگین جذب نوری سلولهای کنترل}$$

نتایج با استفاده از آنالیز آماری بدست آمد که نمودارها اثر عصاره را پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلولها نشان می دهد. نتایج آماری نشانگر آنست که عصاره الکلی برروی سلولهای نرمال اثری ندارد ولی برروی سلولهای سرطانی با توجه به دوز ماده موثر و زمان تاثیر،

این اثرات بر مراحل اولیه کارسینوزن کولون توسط ماده DMH در حیوان Wistar Rat نیز گزارش شده است (۲۲) که موجب کاهش بروز تومور می گردد. تجویز خوراکی عصاره آبی زنجبیل در موش اثر مهارى بر تومور تخمدان داشته است (۲۳). اثر مهارى Gingerol بر ممانعت از متاستاز سرطان ریه در موش بررسی گردید و احتمالاً این اثر از طریق تحریک عملکرد سیستم ایمنی میزبان پیشنهاد گردیده است (۲۴) همچنین Gingerol دارای اثر آنتی آنژیوژنیک بوده و مانع از رشد تومور و متاستاز آن میگردد (۲۵) زنجبیل در سلولهای Hep2 از طریق افزایش تولید انواع اکسیژن فعال، سبب آپوپتوزیس می گردد (۲۶). همچنین موجب آپوپتوزیس در سلولهای سرطان تخمدان در موش می شود (۲۷).

نتیجه نهایی:

در این مطالعه مشخص گردید که عصاره الکی تازه تهیه شده از ریزوم تازه زنجبیل اثر کشندگی بر سلولهای سرطانی کبد (HepG2) داشته و تغییرات مورفولوژی مشاهده شده بیانگر القای مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) در سلولهای سرطانی تیمار شده با زنجبیل می باشد (در صورتیکه این تغییرات مورفولوژی در سلولهای غیر سرطانی مشاهده نگردد) لذا استفاده روزانه آن بصورت خوراکی بخصوص در افرادی که در مناطق با احتمال ابتلا بالاتر به این بیماری هستند توصیه میگردد. به نظر می رسد عصاره زنجبیل خواص سیتوتوکسیسیته در سلولهای سرطانی داشته ولی با اینحال اثرات سمی در سلولهای نرمال ندارد. مطالعات بیشتری در اثبات آن ونحوه تاثیر این ماده بر سلول های سرطانی لازم است انجام گردد.

سپاسگزاری:

بودجه این تحقیق از محل اعتبارات طرحهای پژوهشی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد پرداخت شده است که بدینوسیله قدردانی می گردد.

منابع:

1. Kumar V, Fausto N, Abbas A. Robbins & Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003: 914-7
2. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. Lancet 1981; 2: 1129-1133.
3. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS. Universal hepatitis B vaccination in

فارماکولوژیک و بیوشیمیایی شامل خاصیت آنتی اکسیدانی ضد التهاب داشته که به نظر میرسد در فعالیت های آنتی کارسینوژنیک و آنتی موتاژنیک دخالت دارند. با توجه به اینکه پیشرفت تومور ارتباط بسیار نزدیکی با التهاب و استرس اکسیداتیو دارد، ترکیبی که خواص ضد التهابی یا آنتی اکسیدانی داشته باشد میتواند یک عامل آنتی کارسینوژن باشد (۱۴).

تاکنون بیش از ۵۰ نوع آنتی اکسیدان از ریزوم زنجبیل جدا گردیده است، [6]-gingerol عمده ترین آنها میباشد که مزه تندی داشته و خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی دارد. تحریک اثر مهارى پراکسیداسیون فسفولیپیدی در سیستم FeCl اسکوربات به اثبات رسیده است (۱۵).

[6]-gingerol اثر مهارى روی سیستم گزانتین اکسیداز دارد (۱۶) که مسئول تولید انواع اکسیژن فعال نظیر آنیون های سوپر اکسید می باشد. در مطالعه دیگری اثر مهارى این ماده بر آراشیدونیک اسید هایی که سبب اگریگیشن پلاکتهها و تشکیل ترومبوکسان B2 و پروستاگلاندین D2 به اثبات رسیده است.

Gingerol و shogaol ترکیبات ساختمانی مشابه آنها در زنجبیل از بیوسنتز لوکوترینها و پروستاگلاندینها با مهار کردن مسیر ۵-لیپو اکسیژناز و پروستاگلاندین سنتتاز جلوگیری می نمایند (۱۷).

خاصیت عصاره های زنجبیل بر مهار و جلوگیری از گسترش سرطان پوست در موش به اثبات رسیده است و این امر به دلیل ترکیبات vanillyl ketones آن نظیر [6]-gingerol و [6]paradol می باشد (۱۱).

پارک و همکارانش گزارش کردند که استفاده موضعی از [6]-gingerol و [6]paradol ۳۰ دقیقه قبل از TPA باعث تضعیف papilomagenesis اولیه توسط DMBA در موش ICR ماده گردید و بطور واضح مانع تحریک پروموتوری تومور می گردد (۱۸). عصاره های الکی زنجبیل نیز دارای این خاصیت هستند (۱۹). همچنین خاصیت chemopreventive ماده Gingerol در Rat و کاهش کارسینوزن در سیستم گوارش به اثبات رسیده است (۲۰). عصاره های استنی زنجبیل نظیر zingiberene و همچنین اثر مهارى [6]-gingerol بطور چشمگیری در زخم معده در Rat گزارش گردیده است (۲۰).

در مطالعه دیگری اثرات مهارى Gingerol در رشد سلولهای سرطان کولون انسان گزارش شده است (۲۱) و

- Taiwan and the incidence of hepato- cellular carcinoma in children. *N Engl J Med* 1997; 336: 1855–1859.
4. Chang G, Roth CB. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 2001; 293: 1793-1800.
 5. Spices: Exotic Flavours & Medicines: Ginger. Retrieved 2007-08. Available From: Spice Exhibit URL: <http://unitproj.library.ucla.edu/biomed/spice/index.cfm>
 6. O' Hara M, Kiefer D, Farrell K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Fam Med* 1998; 7 (7): 523–536.
 7. Levin R. Glorious ginger: Root out ailments with this ancient spice published. Available from URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ginger>
 8. Al-Achi A. A current look at ginger use. Retrieved 2007-08-02. Available From: URL: http://www.uspharmacist.com/oldformat.asp?url=newlook/files/Comp/ginger2.htm&pub_id=8&article_id=772.
 9. Masada Y, Inoue T, Hashimoto K, Fujioka M, Shiraki K. Studies on the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by GC-MS. *Yakugaku Zasshi* 1973;93:318-321
 10. Lee E, Surh YJ. Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids [6]-gingerol and [6]paradol. *Cancer Lett* 1998; 134(2):163-168.
 11. Surh Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effect of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 1999 ; 428: 305-327.
 12. Bode AM, MA WY, Surh YJ, Dong Z. Inhibition of epidermal growth factor induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol. *Cancer Res* 2001;61(3):850-853.
 13. Keum YS, Kim J, Lee KH, Park KK, Surh YJ, Lee JM, et al. Induction of apoptosis and caspase-3 activation by chemopreventive [6]-paradol and structurally related compounds in KB cells. *Cancer Lett* 2002; 177 (1):41-47.
 14. Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 683–690
 15. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol* 1994; 32: 31–36.
 16. Chang WS, Chang YH, Lu FJ, Chiang, HC. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Res* 1994;14: 501– 506.
 17. Flynn DL, Raerty MF, Boctor AM. Inhibition of human neutrophil 5-lipoxygenase activity by gingerdione , shogaol , capsaicin and related pungent compounds. *Prostaglandins Leukot Med* 1986;24: 195–198.
 18. Park KK, Chun KS, Lee JM, Lee SS, Surh YJ. Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer Lett* 1998; 129: 139– 144.
 19. Kim SO, Chun KS, Kundu JK, Surh YJ. Inhibitory effects of [6]-gingerol on PMA-induced COX-2 expression and activation of NF- κ B and p38 MAPK in mouse skin. *Biofactors* 2004;21: 27–31.
 20. Yoshimi N, Wang A, Morishita Y, Tanaka T, Sugie S, Kawai K, et al. Modifying effects of fungal and herb metabolites on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Japan J Cancer Res* 1992;83: 1273–1278.
 21. Bode A. Ginger is an effective inhibitor of HCT116 human colorectal carcinoma in vivo. paper presented at the frontiers in cancer prevention Research Conference, Phoenix, AZ. 2003;October 26–30.
 22. Manju V, Nalini N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clinica Chimica Acta* 2005;358: 60–67.
 23. Nagasawa H, Watanabe K, Inatomi H. Effects of bitter melon (*Momordica charantia* L.) or ginger rhizome (*Zingiber officinale* rosc) on spontaneous mammary tumorigenesis in SHN mice. *Am J Chinese Med* 2002; 30: 195–205.
 24. Kim EC, Min JK, Kim TY, Lee SJ, Yang HO, Han S, et al. [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 300–308.
 25. Suzuki F, Kobayashi M, Komatsu Y, Kato A, Pollard RB. Keishi-ka-kei-to, a traditional Chinese herbal medicine, inhibits pulmonary metastasis of B16 melanoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 873–878.
 26. Viswanadha VP, Swamidurai ADC, Kunga MR. Induction of Apoptosis by Ginger in HEp-2 Cell Line Is Mediated by Reactive Oxygen Species. *J Compilation Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100: 302–307
 27. Rhode JM, Huang J, Fogoros S, Tan L, Zick S Liu JR. Ginger induces apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2006; 47.