

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00260

Bcl-2 短发夹状 RNA 增强甲氨喋呤对人淋巴瘤裸鼠移植瘤生长的抑制作用

房宝英,何冬梅*,张 洹,刘革修

暨南大学医学院血液病研究所,广州 510632

[摘要] **目的:**观察 Bcl-2 短发夹状 RNA(short hairpin RNA,shRNA)与甲氨喋呤(methotrexate,MTX)联用后对人淋巴瘤裸鼠移植瘤生长的抑制作用。**方法:**45 只裸鼠注射 Raji 细胞悬液制备裸鼠人淋巴瘤模型,将聚乙烯亚胺(polyethylenimine,PEI)与 Bcl-2 shRNA 载体质粒(本实验室制备)的混合物及 MTX 直接注入肿瘤内,观察 Bcl-2 shRNA 及联合 MTX 对肿瘤生长的影响。在用药 21 d 后无痛处死动物,分离皮下肿瘤,称重,计算抑瘤率;H-E 染色观察肿瘤组织的病理形态;以 RT-PCR 法检测 Bcl-2 mRNA 在肿瘤内的表达情况。**结果:**Bcl-2 shRNA 与 MTX 联用组移植瘤的生长最慢,与单用 Bcl-2 shRNA 和 MTX 相比差异有统计学意义($P<0.05$)。处理结束后剥离瘤块,Bcl-2 shRNA 组瘤质量与阴性 shRNA 组、空质粒组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。Bcl-2 shRNA 与 MTX 联用对裸鼠移植瘤生长的抑制率最高,高于 Bcl-2 shRNA 和 MTX 的单用组($P<0.05$)。H-E 染色可见使用 Bcl-2 shRNA 组及 MTX 组出现明显的凋亡和组织坏死。瘤组织的单细胞悬液经 RT-PCR 检测显示 Bcl-2 mRNA 表达在 Bcl-2 shRNA 组均显著下降($P<0.05$),而对照组则无明显变化。**结论:**Bcl-2 shRNA 可增强 MTX 对人淋巴瘤裸鼠移植瘤生长的抑制作用。

[关键词] 淋巴瘤;Raji 细胞;Bcl-2 基因;RNA 干扰;甲氨喋呤

[中图分类号] R 733.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0260-05

Small interfering RNA targeting Bcl-2 enhances the inhibitory effects of MTX on transplanted human lymphoma in nude mice

FANG Bao-ying, HE Dong-mei*, ZHANG Huan, LIU Ge-xiu

Institute of Hematology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China

[ABSTRACT] **Objective:** To explore whether short hairpin RNA (shRNA) targeting Bcl-2 can enhance the inhibitory effect of methotrexate (MTX) on growth of subcutaneously-transplanted human lymphoma in nude mice. **Methods:** Recombinant shRNA expression vector targeting the coding region of Bcl-2 mRNA was constructed and preserved in our lab. Human lymphoma Raji cells were injected subcutaneously into 45 nude mice to establish lymphoma models. The polyethylenimine (PEI)/shRNA complex and (or) MTX were injected into tumors. The influence of Bcl-2 shRNA and (or) MTX on tumor growth was observed. The animals were sacrificed 21 days after administration of drugs and the tumors were removed and weighed; the tumor inhibitory rate was calculated. H-E staining was used to observe the pathological morphology of the tumor. The expression of Bcl-2 mRNA in the tumor tissues was examined by RT-PCR. **Results:** The tumor growth was significantly slower in Bcl-2 shRNA/MTX group than in Bcl-2 shRNA or MTX alone groups ($P<0.05$). The tumor weight of mice in Bcl-2 shRNA plus MTX group was significantly lower than those in negative shRNA and blank plasmid group ($P<0.05$). The inhibition rate of tumor growth in Bcl-2 shRNA/MTX was significantly higher than those in the Bcl-2 shRNA or MTX alone groups ($P<0.05$). H-E staining showed obvious apoptosis and necrosis in Bcl-2 shRNA group and MTX group. RT-PCR result showed that the expression of Bcl-2 mRNA in tumor cell suspension was significantly decreased in Bcl-2 shRNA group ($P<0.05$), and kept unchanged in the control group. **Conclusion:** The shRNA targeting Bcl-2 can enhance the inhibitory effect of MTX on the growth of subcutaneously-transplanted human lymphoma in nude mice.

[KEY WORDS] lymphoma;Raji cells;Bcl-2 gene;RNA interference;methotrexate

[Acad J Sec Mil Med Univ,2009,30(3):260-264]

[收稿日期] 2008-08-12 **[接受日期]** 2008-09-18

[基金项目] 广东省自然科学基金(04010446). Suported by Natural Science Foundation of Guangdong Province(04010446).

[作者简介] 房宝英,硕士.

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:020-85220262,E-mail:thedm@jnu.edu.cn

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是双链小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)引起特异性靶 mRNA 裂解的过程,其在癌症基因治疗方面具有良好的应用前景。在细胞内表达短发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA)是产生 RNAi 的一种良好方式,与化学合成的双链 RNA 作用一致^[1-2]。Bcl-2 基因与恶性肿瘤的发生密切相关。聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI)介导的基因转移载体在恶性肿瘤基因治疗中的应用得到了大量研究^[3-5],并取得较好效果。本实验室前期在 Bcl-2 mRNA 蛋白编码区发现了 1 个有效的 RNA 干扰作用靶点,同时体外证实针对这个靶点的 siRNA 能增强高表达 Bcl-2 蛋白的肿瘤细胞对化疗药物、放射线的敏感性,并针对这个靶点成功构建了有效的 Bcl-2 shRNA 表达载体^[6-8]。

本研究采用 PEI 介导的转染方法将 Bcl-2 shRNA 表达载体作用于裸鼠人淋巴瘤模型,进一步观察 Bcl-2 shRNA 体内是否可提高化疗药物甲氨喋呤 (methotrexate, MTX)抑制或延缓淋巴瘤生长的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及动物 Bcl-2 shRNA 表达载体质粒由本实验室前期构建^[6]并保存备用。PEI 购于美国 Sigma 公司。MTX 为苏州市尤利特生物医药科技有限公司产品。45 只 SPF 级 BALB/c 裸鼠,4~5 周龄,雌雄各半,体质量 18~20 g,购于广州中医药大学实验动物部。空质粒 pGenesil-1 购自武汉晶塞生物技术公司。

1.2 细胞培养 Raji 细胞购于中国科学院上海细胞库,采用含 10% 新生牛血清 (60℃ 灭活 30 min)、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基,在 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养,实验选用对数生长期细胞。收集细胞,制成细胞悬液备用。

1.3 人淋巴瘤裸鼠动物模型的制备 裸鼠在恒温 18~22℃,恒湿 50%~80%,SPF 饲养室环境下饲养,自由摄入无菌水和灭菌标准饲料,保持 24 h 通风,换气。将生理盐水配好的 Raji 细胞悬液 0.2 ml (约 2×10⁷ 个细胞)注入鼠右后肢背部皮下。PEI 与质粒按 N/P=5 的比例进行配制,MTX 的用量为每次 0.15 mg/kg。

1.4 实验动物分组及用药 待瘤体直径达到 6 mm 时,选择肿瘤生长良好及体质量相差无几的荷瘤鼠 40 只作为实验模型,随机分为 8 组,每组 5 只动物。生理盐水组:生理盐水 0.3 ml;阴性 shRNA 组:阴性

shRNA (阴性对照的寡核苷酸克隆到 pGenesil-1) 20 μg+PEI 14 μg 混合液;空质粒组:空质粒 20 μg+PEI 14 μg 混合液;Bcl-2 shRNA 组:Bcl-2 shRNA 20 μg+PEI 14 μg 混合液;MTX 组:MTX 0.15 mg/kg;阴性 shRNA+MTX 组:阴性 shRNA 20 μg+PEI 14 μg 混合液+MTX 0.15 mg/kg;空质粒+MTX 组:空质粒 20 μg+PEI 14 μg 混合液+MTX 0.15 mg/kg;Bcl-2 shRNA+MTX 组:Bcl-2 shRNA 20 μg+PEI 14 μg 混合液+MTX 0.15 mg/kg。每次对每组每只荷瘤鼠瘤体内同时多点注射用药。3 d 注射 1 次,连续 21 d。用药期间每日观察各组裸鼠的精神、饮食、活动等一般情况;每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤长径和短径,计算肿瘤体积:瘤体积 = 0.5a×b² (a 为长径, b 为短径)。在开始用药后的 21 d 无痛处死动物,分离皮下肿瘤,并称质量。计算抑瘤率:抑瘤率 = (对照组平均瘤体质量 - 实验组平均瘤体质量) / 对照组平均瘤体质量 × 100%。部分肿瘤组织进行固定,脱水,制成冷冻切片。

1.5 组织学观察 标本冰冻切片固定 10~30 s,采用常规 H-E 染色,苏木精水溶液中染色数分钟,41% 盐酸乙醇中分色数秒钟;入 0.5% 伊红染色液染色 1~2 min;脱水,透明,封片;光镜观察,摄像。

1.6 RT-PCR 新鲜肿瘤组织用筛网法制成单细胞悬液。用 TRIzol RNA 提取试剂盒提取总 RNA, RNA 定量采用紫外分光光度计,取 1 μg 的 RNA,加逆转录酶 M-MLV (Gibco) 200 U,按随机六聚脱氧核苷酸引物合成法合成 cDNA。对 Bcl-2 基因扩增的引物及内对照 GAPDH 引物均由上海生工生物工程技术服务公司合成,其序列如下。Bcl-2 上游引物:5'-CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C-3',下游引物:5'-CCG CAT GCT GGG GCC GTA CAG TTC C-3';以 GAPDH 为内参照,上游引物为 5'-GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT-3',下游引物为 5'-TGA GGA GGG GAG ATT CAG TG-3'。Bcl-2 基因扩增产物为 318 bp。PCR 条件:94℃ 变性 30 s;60℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 1 min。循环 30 次后,72℃ 延伸 5 min,在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学软件使用 SPSS 11.5,采用两两比较的 *t* 检验 (two-sample/group *t*-test) 进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bcl-2 shRNA 联用 MTX 作用后对裸鼠移植瘤生长的影响

2.1.1 对移植瘤生长的影响 裸鼠经接种 Raji 细胞 5 d 后肉眼可见皮下肿瘤生长,成瘤率为 100%,接种后 14 d 左右肿瘤直径达 5~8 mm。此时对裸鼠进行分组处理。由图 1 可见,生理盐水组、阴性 shRNA 组和空质粒组鼠肿瘤呈持续增长状态;经 Bcl-2 shRNA 或 MTX 处理过的裸鼠相对生理盐水组而言,肿瘤生长速度较慢;Bcl-2shRNA 与 MTX 联用组肿瘤体积虽未见缩小,但生长速度要缓慢很多,与其他组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$)。实验期间 8 组动物均无死亡。

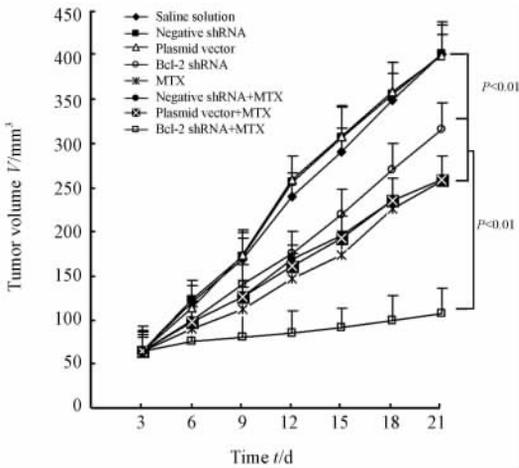


图 1 各组裸鼠治疗后肿瘤生长情况

Fig 1 Growth of tumors in nude mice of each group $n=5, \bar{x} \pm s$

2.1.2 对移植瘤质量的影响 开始用药 21 d 后无痛处死裸鼠,剥瘤称质量。经分析发现,Bcl-2 shRNA 与 MTX 联用组肿瘤最轻,抑制率达 65.95%,低于单用 Bcl-2 shRNA 或单用 MTX 的鼠肿瘤质量($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组裸鼠肿瘤质量及抑瘤率的比较

Tab 1 Median weights and inhibitory rate of tumor in each group

($n=5, \bar{x} \pm s$)

Group	Median tumor weight m/g	Inhibitory rate(%)
Saline solution	2.611±0.023	0
Negative shRNA	2.592±0.090	0.90
Plasmid vector	2.595±0.160	0.61
Bcl-2 shRNA	2.001±0.633	23.36*
MTX	1.621±0.197	37.92*
Negative shRNA+MTX	1.552±0.550	40.56*
Plasmid vector+MTX	1.579±0.259	39.53*
Bcl-2 shRNA+MTX	0.889±0.790	65.95*△

* $P < 0.05$ vs saline solution; △ $P < 0.05$ vs Bcl-2 shRNA

2.2 病理观察 由图 2 可见,生理盐水组、阴性 shRNA 组及空质粒组癌细胞体积较大,密集分布,有明显而大的胞核,不规则,胞质浅染,量少,病理性核分裂较多。Bcl-2 shRNA 处理组细胞体积无明显变化,但可见到凋亡细胞。在 MTX 与 Bcl-2 shRNA 联合处理的组织中可见较多的凋亡细胞及坏死灶,炎性细胞浸润明显(图 2H)。

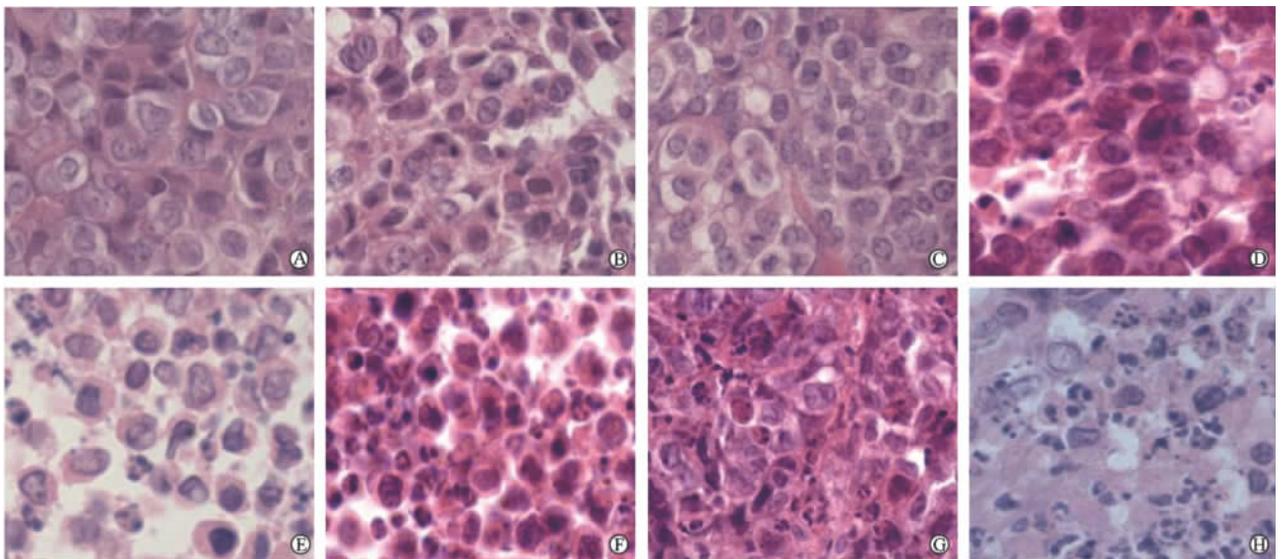


图 2 H-E 染色观察组织病理形态

Fig 2 Histology of Raji cells transplanted into nude mice (H-E staining)

A; Saline solution; B; Negative shRNA; C; Plasmid vector; D; Bcl-2 shRNA; E; MTX; F; Negative shRNA + MTX; G; Plasmid vector + MTX; H; Bcl-2 shRNA + MTX. Original magnification: $\times 400$

2.3 Bcl-2 mRNA 表达水平检测 如图3所示: Bcl-2 mRNA 扩增产物片段长度为 318 bp,内对照 GAPDH 基因扩增产物片段长度为 400 bp。用凝胶图像分析仪定量分析后,以 Bcl-2/GAPDH 的比值作为 Bcl-2 mRNA 相对表达水平,结果显示:生理盐水组 0.996 ± 0.002 ;阴性 shRNA 组 0.970 ± 0.010 ;空质粒组 0.972 ± 0.008 ;Bcl-2 shRNA 组值最低,为 0.742 ± 0.006 。统计分析显示 Bcl-2 shRNA 组的 Bcl-2 mRNA 表达量显著低于生理盐水组、阴性 shRNA 组及空质粒组 ($P < 0.05$),而阴性 shRNA 组、空质粒组与生理盐水组相比差异无统计学意义。结果表明,Bcl-2 shRNA 转入淋巴瘤内后,可以在体内抑制淋巴瘤中 Bcl-2 mRNA 的表达。

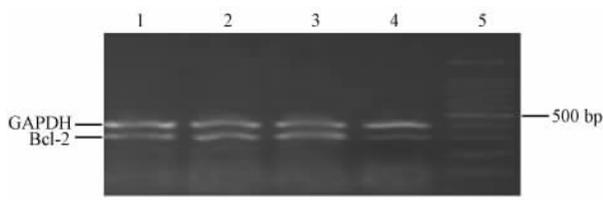


图3 半定量 RT-PCR 测得各组细胞的 Bcl-2 mRNA 表达水平

Fig 3 Expression of Bcl-2 mRNA in tumor cells of each group by RT-PCR

1: Saline solution; 2: Negative shRNA; 3: Plasmid vector; 4: Bcl-2 shRNA; 5: 100 bp DNA ladder marker

3 讨论

本课题组^[6]先前已针对 Bcl-2 基因合成的寡核苷酸克隆到载体质粒的 U6 启动子下游,使其表达小发夹结构的 shRNA,表达的 Bcl-2 shRNA 质粒载体具有理想的基因沉默效果。许多化疗药物均是通过诱导肿瘤细胞发生凋亡而产生抗癌效应的。在 Bcl-2 过度表达的细胞中药物仍能进入细胞内诱导细胞损伤,但这种损伤不能有效地转换成凋亡信号,以致肿瘤细胞的生理性凋亡受抑,增加了肿瘤细胞的生存时间,结果在化疗期间表达 Bcl-2 的肿瘤细胞仍能以较快的速度重新生长^[9]。Bcl-2 的过表达在白血病细胞的凋亡中也起重要作用,Bcl-2 蛋白过度表达可明显降低肿瘤细胞对阿糖胞苷、MTX 及环磷酰胺等多种化疗药物的敏感性。已证实 MTX 有促肿瘤细胞凋亡的作用^[10]。PEI 为非病毒载体,能协助载体质粒转入组织细胞,具有使用方便、可大规模生产和无免疫原性等优点。同时,PEI 具有较强的缓冲能力,能够避免 DNA 在溶酶体的酸性条件下水解失活。而且 PEI 还可以抑制溶酶体,在吞噬泡

酸性环境中质子化、正电荷增加,对 DNA 提供更大的保护作用,有利于质粒逃离吞噬泡^[11]。因此,本实验选用 PEI 作为介导载体。

本研究对成瘤鼠进行处理后发现,单用 Bcl-2 shRNA 组及单用 MTX 组,肿瘤的生长快于两者联用组。处死后的裸鼠肿瘤称重发现 Bcl-2 shRNA 与 MTX 组的瘤质量最低 ($P < 0.05$),显示 Bcl-2 shRNA 及 MTX 均可部分性抑制裸鼠淋巴瘤的生长,Bcl-2 shRNA 与 MTX 的联用可显著抑制肿瘤的生长。对肿瘤组织病理观察可见 Bcl-2 shRNA 与 MTX 联合处理组瘤块内出现凋亡细胞及大片变性坏死灶,炎性细胞浸润明显,而生理盐水处理组瘤体内癌细胞则呈弥漫性密集分布。制成单细胞悬液后 RT-PCR 测得 Bcl-2 mRNA 表达量在用 Bcl-2 shRNA 组的值为最低,这显示 Bcl-2 shRNA 经转导进入体内淋巴瘤组织后可特异性抑制肿瘤细胞中 Bcl-2 基因的表达。从以上的结果可看出,Bcl-2 shRNA 能特异下调 Bcl-2 mRNA 的表达,即 Bcl-2 shRNA 能抑制淋巴瘤细胞中的目的基因 Bcl-2 的表达,Bcl-2 的表达下调能明显增加 MTX 对淋巴瘤的抑制作用,提高 MTX 的疗效。Wacheck 等^[12]研究在体内用 Bcl-2 反义寡核苷酸 G3139 来下调 Bcl-2 的表达,观察胃癌对化疗药物的敏感性。结果发现,G3139 与顺铂联合应用在人胃癌 SCID 鼠模型中,顺铂的抗癌效应明显提高,同时伴随更高的凋亡率。

综上所述,本实验结果表明,在裸鼠人淋巴瘤模型中 Bcl-2 shRNA 增强了 MTX 抑制或延缓淋巴瘤生长的作用,这将为 RNA 干扰的临床应用提供进一步的实验依据。

[参考文献]

- [1] Gan H Z, Zhang G Z, Zhao J S, Zhang F C, Bu L S, Yang S J, et al. Reversal of MDR1 gene-dependent multidrug resistance using short hairpin RNA expression vectors[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118: 893-902.
- [2] Zhu L, Somlo G, Zhou B, Shao J, Bedell V, Slovak M L, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 inhibition by short hairpin RNAs leads to apoptosis in multiple myeloma[J]. Mol Cancer Ther. 2005, 4: 787-798.
- [3] Hassani Z, François J C, Alfama G, Dubois G M, Paris M, Giovannangeli C, et al. A hybrid CMV-H1 construct improves efficiency of PEI-delivered shRNA in the mouse brain[J]. Nucleic Acids Res. 2007, 35: e65.
- [4] Ito T, Iida-Tanaka N, Koyama Y. Efficient *in vivo* gene transfection by stable DNA/PEI complexes coated by hyaluronic acid[J]. J Drug Target. 2008, 16: 276-281.
- [5] Moffatt S, Papisakelariou C, Wiehle S, Cristiano R. Successful *in vivo* tumor targeting of prostate-specific membrane antigen

with a highly efficient J591/PEI/DNA molecular conjugate[J]. Gene Ther, 2006, 13:761-772.

[6] 何冬梅,张 涇,刘革修,邹飞雁. Bcl-2 shRNA 表达载体的构建及其对 HL-60 细胞生长的抑制作用[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15:3736-3739, 3742.

[7] 何冬梅,张 涇,刘革修. Bcl-2 短发夹状 RNA 对 BEL-7402、Caco2 细胞的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27:995-997.

He D M, Zhang H, Liu G X. Inhibitory effect of Bcl-2 short hairpin RNA on growth of BEL-7402 and Caco2 cells[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27:995-997.

[8] He D M, Zhang Y, Liu G X. Bcl-2 small hairpin RNAs enhance radiation-induced apoptosis in A549 cells[J]. Cell Biol Int, 2007, 31:1442-1445.

[9] Wang P, Song J H, Song D K, Zhang J, Hao C. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis[J]. Cell Signal, 2006, 18: 1528-1535.

[10] Selga E, No V, Ciudad C J. Transcriptional regulation of aldo-keto reductase 1C1 in HT29 human colon cancer cells resistant to methotrexate: role in the cell cycle and apoptosis[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75:414-426.

[11] Gharwan H, Wightman L, Kircheis R, Wagner E, Zatloukal K. Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between the cationic polymer PEI and naked DNA)[J]. Gene Ther, 2003, 10:810-817.

[12] Wacheck V, Heere-Ress E, Halaschek-Wiener J, Lucas T, Meyer H, Eichler H G, et al. Bcl-2 antisense oligonucleotides chemosensitize human gastric cancer in a SCID mouse xenotransplantation model[J]. J Mol Med, 2001, 79:587-593.

[本文编辑] 贾泽军

· 读者 作者 编者 ·

中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(十六)

汉语拼音名	中文名	拉丁名	英文名
ingxiao	芒硝	<i>Mirabilitum</i>	Mirabilite
injingzi	蔓荆子	<i>Fructus Viticis Simplicifoliae</i>	Simpleleaf Shrub Chastetree Fruit
inshanhong	满山红	<i>Folium Rhododendri Dahurici</i>	Dahurian Rhododendron Leaf
iodongqing	毛冬青	<i>Radix Ilicis Pubescentis</i>	Pubescent Holly Root
iogaocai	茅膏菜	<i>Herba Droserae Lunatae</i>	Lunate Peltate Sundew Herb
iogen	毛茛	<i>Herba Ranunculi Japonici</i>	Japanese Buttercup Herb
ohuayangdihuangye	毛花洋地黄叶	<i>Folium Digitalis Lanatae</i>	Digitalis Lanata Leaf
ioju	毛茛	<i>Herba Piperis Puberuli</i>	Pubescent Pepper Herb
iqianzi	马钱子	<i>Semen Strychni</i>	Nux Vomica
ishihua	马屎花	<i>Herba Sedi Bulbiferi</i>	Bulbiferous Stonecrop
itijin	马蹄金	<i>Herba Dichondrae Repentis</i>	Creeping Dichondra Herb
iweilian	马尾连	<i>Radix et Rhizoma Thalictri</i>	Meadowrue Root and Rhizome
yingdan	马缨丹	<i>Folium Lantanae Camarae</i>	Common Lantana Leaf
iguihua	玫瑰花	<i>Flos Rosae Rugosae</i>	Rose
irenjiaogen	美人蕉根	<i>Rhizoma Cannae Indicae</i>	India Canna Rhizome
ingchong	虻虫	<i>Tabanus</i>	Gadfly
anbixie	绵萆解	<i>Rhizoma Dioscoreae Septemlobae</i>	Sevenlobed Yam Rhizome / Foochow Yam Rhizome
anhuagen	棉花根	<i>Radix Gossypii</i>	Levant Cotton Root
anmaguanzhong	绵马贯众	<i>Rhizoma Dryopteridis</i>	Male Fern Rhizome
menghua	密蒙花	<i>Flos Buddlejae</i>	Pale Butterflybush Flower
ingdangshen	明党参	<i>Radix Changii</i>	Medicinal Changium Root
onghua	蜜桶花	<i>Herba Brandisiae Hancei</i>	Hance Brandisia Herb
uoseng	密陀僧	<i>Lithargyrum</i>	Lithargite
hanlian	墨旱莲	<i>Herba Ecliptae</i>	Yerbadetajo Herb
lihua	茉莉花	<i>Flos Jasmini Sambac</i>	Arabian Jasmine Flower
iyao	没药	<i>Myrrha</i>	Myrrh
iyu	魔芋	<i>Rhizoma Amorphophalli</i>	Rivier Giantarum Rhizome