

بررسی خواص ضد جهشی و سایتوتوکسیک عصاره پوست سیب *Malus domestica*

ملیحه انتظاری

استادیار سلولی تکوینی، گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم نوین پزشکی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در حال حاضر سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان است بنابراین از پیشگیری می‌توان به عنوان مهم‌ترین رویکرد درمانی سرطان در نظر گرفت. رژیم غذایی نقش مهمی در پیشگیری از سرطان بازی می‌کند. امروزه محققان توجه ویژه‌ای به غذاهای طبیعی دارند که می‌توانند به طور چشمگیری نقش پیشگیری از سرطان را داشته باشند. هدف از این تحقیق سنجش خواص ضد جهشی و ضد سرطانی عصاره پوست سیب بود.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی، سلول‌های سرطانی سندروم سزاری یا لنفوم T انسانی (HUT-78) در محیط RPMI [Sigma] کشت شدند. در این محیط کشت، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS (Fetal Bovine Serum)، L-گلوتامین، پنی سیلین، و استروپتومايسين اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ روز انکوبه گردید. سپس با عصاره پوست سیب تیمار شدند و با روش MTT، توان زیستی سلول‌ها بررسی شد. همچنین خواص ضد جهشی عصاره پوست سیب بر حسب روش استاندارد سنجش جهش برگشتی (آزمون ایمز) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در روش MTT، سلول‌های سرطانی لنفوم T انسانی مرگ سلولی معنی‌داری را نسبت به گروه‌های شاهد نشان دادند ($p < 0/01$). در آزمون ایمز، عصاره پوست سیب از موتاسیون برگشتی جلوگیری نمود و درصد بازدارندگی در سنجش ضد جهشی ۸۱/۳ درصد بود.

نتیجه‌گیری: در این بررسی، خواص ضد سرطانی عصاره پوست سیب بر روی سلول‌های سرطانی در شرایط *in vitro* مشخص گردید و می‌تواند گامی بر ترویج فرهنگ استفاده از پوست سیب در رژیم غذایی جامعه باشد.

واژگان کلیدی: ضد جهشی، ضد سرطانی، پوست سیب، سلول‌های سرطانی لنفوم T انسانی، آزمون ایمز.

مقدمه

سرطان یک هشدار بزرگ عمومی سلامتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است و استفاده از فلاونوئیدها برای پیشگیری یا سرکوب فرآیندهای کارسینوژنیک امروزه دستاورد مهمی است. فلاونوئیدها یک کلاس از متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند که به طور طبیعی در غذاهای با منشأ گیاهی وجود دارند. فلاونوئیدها که به طور وسیع در گیاهان پخش هستند، عملکردهای بسیاری در پیشگیری سرطان از جمله غیر فعال کردن کارسینوژن، ضد تکثیر، توقف چرخه سلولی، القای آپوپتوز، تمایز و توقف آنژیوژن دارند (۱، ۲).

در مطالعات *in vivo* و *in vitro* مشخص شده است که بعضی فلاونوئیدها متابولیسم و استقرار کارسینوژن‌ها را تعدیل می‌کنند و می‌توانند به پیشگیری از سرطان کمک کنند. از فعالیت‌های بیومولکولی مهم فلاونوئیدها موارد ذیل را می‌توان نام برد (۹-۳).

- اثرات ضد اکسیداتیو: غیر فعال سازی رادیکال‌های اکسیژن
- القای آنزیم‌های محافظت کننده: فاز ۲ با فعالیت‌های

ترکیبی (GT و GST)

- اتصال به الکتروفیل‌ها

- افزایش میزان آپوپتوز

سرطان یک هشدار بزرگ عمومی سلامتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است و استفاده از فلاونوئیدها برای پیشگیری یا سرکوب فرآیندهای کارسینوژنیک امروزه دستاورد مهمی است. فلاونوئیدها یک کلاس از متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند که به طور طبیعی در غذاهای با منشأ گیاهی وجود دارند. فلاونوئیدها که به طور وسیع در گیاهان پخش هستند، عملکردهای بسیاری در پیشگیری سرطان از

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی،

ملیحه انتظاری (email: mentezari@iautmu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۶/۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۸/۱۷

آزمایش فلاسک در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

تعیین درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی (viability test)

هدف از انجام این تکنیک بیشتر تنظیم و کنترل مقدار سلول‌ها و دانسیته آنها در محیط کشت سلولی است. این تکنیک ناشی از اثر رنگ MTT بر روی سلول‌ها است که سلول‌های زنده را می‌توان از طریق کریستال‌های ارغوانی که ناشی از احیا شدن رنگ توسط دهیدروژناز میتوکندریایی آنها است شمارش و از طریق فرمول زیر درصد سلول‌های زنده را تعیین کرد.

$$100 \times (\text{کل سلول‌های کشت داده شده} / \text{تعداد سلول‌های زنده}) = \text{viability (توان زیستی)}$$

غلظت‌های مختلف عصاره به سلول‌ها اضافه و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت، درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂، نگهداری شدند.

این روش بر اساس احیای رنگ MTT (dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide) محلول به یک فرآورده نامحلول (Formazan) بنفش آبی توسط فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری در سلول‌های زنده استوار است. برای تهیه محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml، ۵۰ mg از پودر MTT در ۱۰ ml از PBS، ۰/۱۵ M حل شد و هنگام استفاده در رنگ آمیزی ۱۰ برابر با PBS رقیق گردید تا محلول ۰/۵ mg/ml MTT به دست آید. لازم به ذکر است که پس از تهیه PBS، محلول اتوکلاو شد. سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف عصاره (صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، و ۵۰ mg/ml) در زمان ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد انکوبه شدند. در غلظت صفر عصاره، سلول‌ها تنها با حجم حلال استن به عنوان شاهد تیمار شدند. با محلول MTT ۰/۵ mg/ml رنگ آمیزی، پس از ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مایع رویی سلول‌ها برداشته شد و به جای آن ۲۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانل (Merck, Germany) به حفره‌های مربوط اضافه شد. پلیت مربوطه به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. سپس آن را توسط یک میکروتیتر پلیت ریدر (ELISA-reader, Organon-Technika, Netherland) در ۵۷۰ نانومتر مطالعه نمودیم. میزان توکسیسیتی ایجاد شده با استفاده از فرمول ذیل مورد محاسبه قرار گرفت.

- مهار تکثیر سلولی
- مهار پراکسیداسیون لیپید
- مهار رگ‌زایی
- اهدای H (مثلاً GSH - پراکسیدازها)
- مهار اکسیداسیون DNA

سبب منبعی غنی از مواد غذایی و ترکیباتی مانند فیبر، مواد معدنی و ویتامین‌ها است. پوست سبب حاوی مقدار چشم‌گیری تری‌ترپنوئیدهای لیپوفیل است که این تری‌ترپنوئیدها در لایه کوتیکولی پوست سبب متمرکز شده‌اند. اورسولیک اسید و اولئانولیک اسید فراوان‌ترین تری‌ترپنوئید موجود در پوست سبب هستند (۸،۹).

از شایع‌ترین آزمایش‌ها برای سنجش اثرات ضد جهشی، آزمون ایمز (۱ و ۱۰) و برای سنجش ضدسرطانی، آزمون توان حیاتی MTT است. هدف از این تحقیق سنجش خواص ضد جهشی و ضدسرطانی عصاره پوست سبب بود.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی برای بررسی اثر سایتوتوکسیسیته عصاره پوست سبب بر رده سلول سرطانی و اثر ضد جهشی از روش استاندارد آزمون ایمز (Ames) بر روی باکتری‌های جهش یافته سالمونلا تیفی موریوم استفاده شد.

از عصاره استنی پوست سبب قرمز در این مطالعه استفاده شد. سبب قرمز در اواخر شهریور سال ۱۳۹۳ از دامنه جنوبی کوه‌های البرز تهیه و توسط متخصص سیستماتیک گیاهی گونه مورد نظر تایید شد.

پوست‌های ۱ کیلوگرم سبب جدا و پس از خشکاندن پودر آن تهیه شد. سپس ۱ gr پودر را در ارلن استریل ریخته و به آن استن اضافه شد. قبل از افزودن استن، پودر به روش تندالیزاسیون در طی ۳ روز استریل شد. پس از گذشت ۱ هفته، عصاره استنی، با کمک کاغذ صافی و در زیر هود استخراج شد.

کشت سلول سرطانی لنفوم T انسانی (HUT-78)

لیمفوبلاست HUT-78 که یک رده لنفوسیتی Human cutaneous T-cells lymphoma (sezary syndrome) است، در محیط RPMI 1640 دارای ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS (Fetal Bovine Serum) و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد گاز CO₂ کشت شد. برای پس از رشد و ازدیاد سلول‌ها، پس از شمارش به میزان ۵۰۰۰ سلول، آنها به فلاسک منتقل شدند. در تمامی موارد برای هر

$$\% \text{Cytotoxicity} = \frac{1 - \text{mean absorbance of toxicant}}{\text{Mean absorbance of negative control}} \times 100$$

$$\% \text{ Viability} = 100 - \% \text{ Cytotoxicity}$$

برای کم کردن میزان خطای آزمایش در چند چاهک بدون سلول نیز رنگ MTT اضافه و سپس شستشو داده شد و همراه دیگر چاهک‌ها میزان جذب آن خوانده شد و در نهایت از کل جذب‌ها کم شد.

تعیین IC50 (میزان مرگ سلول‌ها به میزان ۵۰ درصد در غلظت خاصی از جهش‌زایی عصاره پوست سیب)

جهت تعیین دوز ۵۰٪ کشندگی مواد توکسیک روی رده سلولی، تمامی اطلاعات به دست آمده (درصد توکسیسیتی) از شاهدها و تست‌ها وارد برنامه کامپیوتری Pharm-PCS statistical package (Springer-Verlag, New York) شد و میزان دقیق IC50 مربوطه تعیین شد.

آزمون AMES

از باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم TA100 برای آزمون Ames استفاده شد. سوش سالمونلا تیفی‌موریوم TA100 موتان محتاج به هیستیدین است. برای آزمون باید از کشت تازه باکتری استفاده شود و مدت زمان انکوباسیون در کشت تازه شبانه باکتری در محیط نوترینت برات نباید از ۱۶ ساعت تجاوز کند. غلظت مناسب باکتری‌ها $10^9 \times 2-1$ سلول در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. آزمون ایمز با اضافه کردن ۱۵mg/ml عصاره به ۰/۵ml کشت تازه شبانه TA100 و ۰/۵ml محلول هیستیدین و بیوتین (۰/۵mM/۰/۵mM) در لوله محتوی ۱۰ml تاپ آگار (50 gr/lit Agar + 50 gr/lit NaCl) و ماده سرطان‌زای آزید سدیم (1.5 µgr/ml Sadium azide) انجام شد. سپس محتویات این لوله پس از ۳ ثانیه تکان‌دهی در سطح محیط گلوکز آگار حداقل (۴۰ درصد glucose) گسترده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های آزمایشی و شاهد شمارش شدند. بسیاری از مواد در شکل اصلی خود از نظر جهش‌زایی سرطان‌زایی غیرفعال هستند و بسیاری از ترکیبات برای بروز خصوصیات جهش‌زایی (سرطان‌زایی) از نظر متابولیسم باید فعال شوند؛ افزودن عصاره استریل به عصاره میکروزومی سلول‌های کبد پستانداران مانند موش الزامی است. لذا پس از ۲۴ ساعت

گرسنگی ۱۰ موش نر، کبد آنها جدا شد. گرسنگی باعث تحریک ترشح آنزیم‌های کبدی و افزایش آن می‌شود. کبدها در محلول کلرید پتاسیم ۰/۱۵M هموزن شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد عمل سانتریفوژ انجام شد. مایع رویی (مخلوط، S₀) جدا شد و باکوفاکتورهای لازم (NADP و G-6p (گلوکز ۶ فسفات)) مخلوط شدند و ۰/۵ml برای بررسی خاصیت ضد سرطانی به مخلوط Top agar اضافه شد.

پس از شمارش کلنی‌ها، درصد بازدارندگی از فرمول ذیل محاسبه شد (۱۲):

$$\text{درصد بازدارندگی} = (1 - \frac{T}{M}) \times 100$$

T نشان دهنده کلنی‌های برگشتی در هر پتری دیش در مجاورت ماده جهش‌زا و عصاره و M نشان دهنده کلنی‌های برگشتی موجود در پتری‌های مربوط به کنترل مثبت (ماده جهش‌زا) است.

برای تحلیل داده‌ها از آزمون آماری ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج آزمون توان زیستی

از مقایسه نتایج حاصل از آزمون MTT بر سلول‌های سرطانی که در مجاورت غلظت‌های مندرج در نمودار ۱ از عصاره قرار گرفته بودند، مشخص شد که سلول‌های سرطانی توان زیستی خود را از دست می‌دهند و تفاوت معنی‌داری در سرکوبی رشد سلول‌های سرطانی دیده شد (۰/۰۱ < p) (نمودار ۱). با استفاده از نرم افزار Pharm میزان IC50 عصاره در زمان ۴۸ ساعت برای سلول‌های سرطانی اندازه‌گیری شد. LC50 برای این سلول‌ها $15/21 \pm 0/3$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

نتایج آزمون ضد جهش‌زایی عصاره پوست سیب

آزمون Ames که در مجاورت غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره قرار گرفته بودند، تفاوت آماری معنی‌داری در خاصیت ضد جهشی رشد کلنی نسبت به کنترل‌ها (آزید سدیم بعنوان کنترل مثبت و حلال استن به عنوان کنترل منفی) نشان داد (۰/۰۱ < p). با توجه به نمودار ۲ عصاره اثر ضد جهشی قوی دارد.

می‌کنند. Liu در سال ۲۰۰۳ در تحقیقی نشان داد افرادی که مقدار اندکی میوه و سبزیجات مصرف می‌کنند، در مقایسه با افرادی که مقدار زیادی میوه و سبزیجات مصرف می‌کنند، دو برابر بیشتر به سرطان مبتلا می‌شوند. وی معتقد است بخش عمده‌ای از اثرات ضد سرطانی میوه‌ها و سبزیجات مربوط به فیتوکمیکال‌ها یا همان ترکیبات گیاهی غیرغذایی است (۱۵). مطالعات دیگر پیشنهاد می‌کنند که آنتی‌اکسیدان‌های موجود در رژیم غذایی دفاع و ایمنی بدن را در مقابل تولید رادیکال‌های آزاد افزایش داده و به عنوان ضدسرطان عمل می‌کنند، به عبارت دیگر مهم‌ترین وظیفه آنها حفاظت در برابر اکسیداسیون است (۱۱).

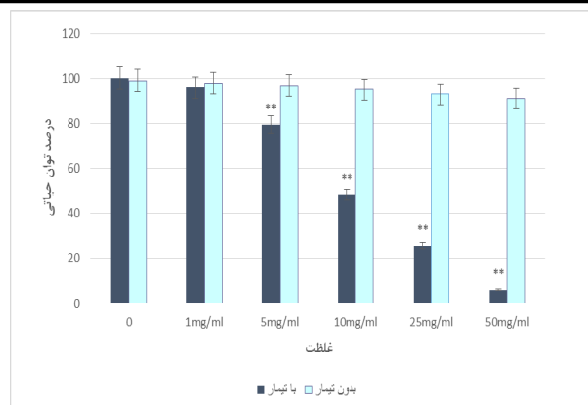
سیب منبعی غنی از مواد غذایی، مواد معدنی، فیبر، کربوهیدرات و فیتوکمیکال است. سیب نه تنها در بسیاری از فرهنگ‌ها میوه‌ای لذیذ محسوب می‌شود، بلکه منبع خوبی از آنتی‌اکسیدان نیز است. تحقیقات نشان داده‌اند که خوردن سیب ممکن است خطر ابتلا به سرطان کولون، پروستات و ریه را کاهش دهد (۱۶).

در تحقیقی که MJ. Mccann در سال ۲۰۰۷ انجام داد، مشخص شد که ترکیبات فنولی موجود در ضایعات سیب (پوست و تفاله سیب) در شرایط آزمایشگاهی بر روی سرطان کولون خاصیت ضدسرطانی داشته است (۱۶).

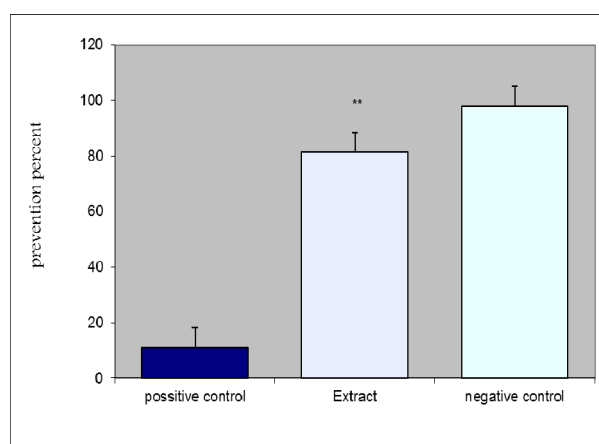
تحقیقات مختلف، از جمله مطالعه Gerhauser، روی سیب، آب سیب و فرآورده‌های حاصل از سیب مانند سرکه سیب نشان داده‌اند که پوست حاوی تری‌ترپنوئیدهایی است که احتمالاً خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند (۹، ۱۷-۱۹).

همچنین در پژوهشی، Liu و همکارانش بیان کردند که علاوه بر پلی‌فنول‌های موجود در سیب، تری‌ترپنوئیدهای جدا شده از پوست سیب نیز از تکثیر سلول‌های سرطان کبد (HepG2)، سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) و سلول‌های سرطان کولون (Caco-2) جلوگیری می‌کنند و ممکن است مسئول خاصیت ضدسرطانی سیب باشند (۱۸).

در این مطالعه، بررسی خواص ضدسرطانی عصاره استنی پوست سیب با استفاده از آزمون توان حیاتی و ضد جهش زایی آن با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA100 و تست ایمر انجام شد. در این تحقیق آزید سدیم به عنوان ماده جهش‌زا انتخاب شد و اثرات جهش‌زایی آن بر روی سویه TA100 مشخص شد. تعداد کلنی‌های برگشتی در کنترل مثبت در بالاترین حد (نسبت به سایر موارد مورد آزمایش) قرار داشت که با دیگر مطالعات انجام شده به روش ایمر



نمودار ۱. نتایج به دست آمده از سنجش توان زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با عصاره



نمودار ۲. نتایج به دست آمده از سنجش درصد بازدارندگی جهشی عصاره

بحث

در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، ناراحتی‌های قلبی و سرطان دو عامل اصلی مرگ محسوب می‌شوند. علت هر دو بیماری به شیوه زندگی و به ویژه رژیم غذایی مرتبط است (۱۳).

رژیم غذایی انسان حاوی انواع گسترده‌ای از موتازن‌ها و کارسینوزن‌های طبیعی و نیز بسیاری از آنتی‌موتازن‌ها و کارسینوزن‌ها است و ممکن است سبب تولید رادیکال آزاد شود. رادیکال‌های آزاد همچنین ممکن است به عنوان آغازگرهای درونی فرآیندهای تخریبی عمل کنند و سبب آسیب DNA و جهش شوند (۱۴).

امروزه دانشمندان بر این عقیده هستند که آسیب‌های ایجاد شده در DNA و بروز جهش در ژن‌ها در سرطان‌زایی و بیماری‌های مزمن نقش به‌سزایی دارند (۱۲).

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که رژیم‌های غذایی نقش مهمی در پیشگیری از سرطان و دیگر بیماری‌های مخرب ایفا

مورد استفاده قادر به سنتز هیستیدین نمی باشد، وجود مقدار هیستیدین در محیط برای فعال کردن موتاسیون برگشتی و فعال سازی اپرن هیستیدین باکتری ضروری است (۲۱).

در این بررسی از عصاره کبدی موش (S9) نیز استفاده شد، زیرا بسیاری از مواد ضد سرطانی تا زمانی که در یک فعالیت آنزیمی الکترو دینامیک وارد نشوند غیر فعال می مانند و نمی توانند به DNA متصل شوند. لذا چون باکتری (سالمونلا تیفی موریوم) فاقد این سیستم است از S9 که حاوی سیستم فعال سیتوکروم است، برای فعال سازی این مواد استفاده می شود (۲۱).

از این بررسی علاوه بر درک خاصیت ضد جهشی و ضد سرطانی عصاره پوست سیب به این نتیجه می رسیم که پوست سیب که عمدتاً به عنوان ضایعات سیب محسوب شده و دور انداخته می شود، خود منبعی غنی از آنتی اکسیدان است و باید حتماً همراه سیب خورده شود.

همسویی داشت (۱۲). در هر آزمایش، کنترل منفی نیز به منظور سنجش موتاسیون خود به خودی در سویه باکتری در نظر گرفته می شود. تعداد کلنی های برگشتی در اثر موتاسیون خود به خودی به تعداد باکتری های اگزوتروف بستگی دارد که این تعداد به نوبه خود نتیجه عملکرد هیستیدین اضافه شده به پلیت است. اگر تعداد کلنی های برگشتی در کنترل منفی به طور غیرعادی زیاد باشد، می تواند دو علت داشته باشد: یا آلودگی یا افزایش موتاسیون های خود به خود در اثر تجدید کشت های متوالی که در ۲ صورت باید دوباره باکتری را از نمونه اصلی فریز شده جدا و کشت داد (۲۰).

یکی از فاکتورهای مهم در این روش به کارگیری غلظت هیستیدین است. اگر هیستیدین در غلظت بالا به کار رود، باعث افزایش کلنی های ریز می شود که شکل آنها با کلنی های اصلی باکتری فرق می کند و ممکن است با کلنی های اصلی و برگشتی باکتری اشتباه گرفته شود و آزمایش توام با خطا گردد. البته همان طور که قبلاً گفته شد، چون سویه باکتری

REFERENCES

1. Marchand LL, Murphy SP, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:154-60.
2. Rui HL. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr* 2003;78:517-20.
3. Wang HM, Soica CM, Wenz G. A comparison investigation on the solubilization of betulin and betulinic acid in cyclodextrin derivatives. *Nat Prod Comm* 2012;7:289-91.
4. Sass C, Bojin F, Heges A, Galuscan A, Paunescu V. Oleanolic and ursolic acid in human skin cancer. A preliminary in vitro comparative study. *Fiziol Physiol* 2012;22:30-33.
5. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 768-80.
6. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:S243-255.
7. Wolfe K, Liu RH, Xianzhong Wu. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 2003;51:609-14.
8. Gerhauser C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice and apple components. *Planta Med* 2008;74:1608-24.
9. Ames BN. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian microsome mutagenicity test. *Utat Res* 1976;31:347-49.
10. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogenes are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci* 1973;70:2281-85.
11. Ong T, Wong WZ, Stewart JD, Brockman HE. Chlorophyllin: A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutation Res* 1986;173:111-15.
12. Lauthier F, Taillet L, Trouillas P, Delage C, Simon A. Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. *Anticancer Drugs* 2000;11:737-45.
13. Xiangjiu HE, Rui Hui L. Triterpenoids Isolated from Apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apples' anticancer activity. *J Agric Food Chem* 2007;55:4366-70.
14. Ong T, Mony W, Stewart JD, Brockman HE. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutat Res* 1986;173:111-15.
15. Ma CM, Cai SQ, Cui JR, Wang RQ, Tu PF, Hattori M, et al. The cyto toxic Activity of Ursolic Acid derivatives. *Eur J Med Chem* 2005;40:582-89.

16. McCann MJ, Gill CI, O' Brien G, Rao JR, McRoberts WC, Hughes P, et al. Anticancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogens in vitro. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1224-35.
17. Zhu YM, Shen JK, Wang HK, Cosentino LM, Lee KH. Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:3115-18.
18. Liu J. Oleandic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol* 2005;100:92-94.
19. Zeiger E, Mortelmans K. The ames salmonella/ microsome mutagenicity assay. *Mutant Res* 2000;455:29-60.
20. Lancaster JE, Dougall Dk. Regulation of Skin Color in apples. *Criti Rev Plant Sci* 1992;10:487-502.
21. Hakura A, Shimada H, Nakajima M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S, et al. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis* 2005;20:217-28.