

مطالعه آپوتوزیس متعاقب تاثیر عصاره گل همیشه‌بهار در کارسینوم تجربی کولون موش صحرایی

یوسف دوستار^۱، داریوش مهاجری^۲، فاطمه فتحی‌آذر^۳، علی ناموران^۴

^۱ استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز

^۲ دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز

^۳ استادیار، دکترای فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۴ دانشجوی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز

چکیده

سابقه و هدف: تحقیقات آزمایشگاهی اخیر در مورد سرطان‌های کولورکتال نشان می‌دهد که عصاره گل همیشه‌بهار دارای خاصیت ضدسرطانی بر کشت سلول‌های مشتق شده از کارسینوم کولورکتال می‌باشد. میزان خاصیت مهاری این عصاره در حدود ۷۰ الی ۱۰۰ درصد بوده است. هدف از این مطالعه ارزیابی آپوتوزیس سلول‌های دیسپلاستیک کولون متعاقب درمان با عصاره گل همیشه‌بهار می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰-۳۰۰ گرم انتخاب و به دو گروه مساوی تیمار و شاهد تقسیم گردیدند. برای القاء سرطان کولورکتال از ملده کارسینوژن ۱ و ۲-دی متیل هیدرازین به مقدار ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به روش تزریق زیرجلدی (۲ تزریق در هر هفته، به مدت ۲ هفته) استفاده گردید. گروه تیمار علاوه بر دریافت ماده کارسینوژن، عصاره گل همیشه‌بهار را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۱۰ هفته به روش خوراکی روزانه دریافت نمودند. پس از گذشت ۱۰ هفته، از بافت کولون دیستال هر دو گروه جهت تهیه مقاطع ۳-۴ میکرونی و انجام رنگ‌آمیزی تانل نمونه‌برداری به عمل آمد.

یافته‌ها: مطالعات ایمنو‌هیستوشیمی نشان داد که پدیداری سلول‌های آپوتوتیک در گروه تیمار نسبت گروه شاهد بیشتر بوده و اختلاف میانگین هر دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که عصاره گل همیشه‌بهار توانایی القاء آپوتوزیس سلول‌های دیسپلاستیک را در کارسینوم کولورکتال تجربی موش صحرایی را دارا می‌باشد.

واژگان کلیدی: آپوتوز، سرطان کولورکتال، گل همیشه‌بهار.

مقدمه

منابع غیر رسمی اعلام کرده‌اند که بیشترین درصد سرطان مربوط به دستگاه گوارش و به خصوص روده بزرگ است و درصد بالایی از بدخیمی‌ها و مرگ و میر را در ایران شامل می‌شود. میزان بالای چربی (۳) و پروتئین جیره غذایی باعث افزایش وقوع سرطان روده بزرگ می‌شود (۴)؛ این در حالی است که به نظر می‌رسد تغذیه با چربی پایین، فیبر بالا، کلسیم بالا و مصرف مقدار زیاد سبزیجات در غذای روزانه باعث کم شدن میزان بروز سرطان روده بزرگ می‌شود. مطالعات آزمایشگاهی حاکی از ارتباط بین عوامل تغذیه‌ای و سرطان روده بزرگ است (۳، ۵، ۶). با این وجود، مکانیسم

سرطان روده بزرگ، دومین دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان در دنیا است. طبق آمار ارائه شده، این سرطان در هر سال مسئول مرگ ۱۹۰۰۰ نفر در انگلستان، ۸۵۰۰۰ نفر در اروپا و ۶۱۰۰۰ نفر در ایالات متحده است (۱، ۲). در مورد ایران، آمار قابل استنادی برای میزان وقوع این سرطان وجود ندارد، ولی

آدرس نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، دانشکده دامپزشکی، بخش پاتوبیولوژی، دکتر

یوسف دوستار (email: vetdoustar@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۲/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۳

مقدار ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به روش تزریق زیر جلدی (۴ تزریق در هر هفته) استفاده گردید. گروه تیمار علاوه بر دریافت ماده کارسینوزن، عصاره گل همیشه‌بهار را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۱۰ هفته به روش خوراکی روزانه دریافت نمودند. پس از گذشت ۱۰ هفته، از بافت کولون دیستال هر دو گروه جهت تهیه مقاطع ۳-۴ میکرونی و انجام رنگ‌آمیزی تانل نمونه‌برداری به عمل آمد (۱۱). تغییرات آپوپتوزیس در بافت کولون به عنوان متغیر وابسته مورد بررسی قرار گرفت.

جهت ایجاد تجربی سرطان روده بزرگ در جوندگان از ماده 1,2-dimethylhydrazine (DMH) استفاده می‌شود که قابلیت کارسینوژنیک در روده بزرگ و کوچک داشته و با القای کریپت‌های نابجا در روده و متعاقب آن ایجاد تومور، روش استاندارد مطالعه تجربی سرطان در روده بزرگ و کوچک است (۱۲، ۱۳). با این حال ارگان هدف آن روده بزرگ است (۱۳، ۱۴). از طرف دیگر، انسان‌ها با DMH و دیگر مشتقات هیدرازین از طریق محیط (۱) و غذا در ارتباط هستند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که DMH از طریق استرس اکسیداتیو و القاء موتاسیون اثرات خود را بر جای می‌گذارد (۴، ۱۵). جهت ارزیابی سرطان ایجاد شده توسط DMH، کریپت‌های نابجای ایجاد شده (Aberrant Crypt Foci ACF) مورد بررسی قرار می‌گیرد. کریپت‌های نابجای ایجاد شده در روده از عوامل مستعد کننده روده برای ایجاد پولیپ و مراحل پیشرفته سرطان هستند و از طریق بررسی آنها می‌توان در شناسایی زودهنگام سرطان کمک گرفت. برای القاء کارسینوم کولون ماده شیمیایی ۱ و ۲ دی متیل هیدرازین با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم محلول در EDTA به روش زیرجلدی تزریق می‌گردد. مدت زمان تزریق هر هفته دو تزریق با فاصله مساوی، به مدت دو هفته است (۱۶، ۱۷).

به منظور تهیه عصاره گل همیشه‌بهار، ابتدا گل‌ها خشک و پودر شده و سپس به روش ماسراسیون (خیساندن) در سرما توسط حلال ان‌هگزان چربی‌زدایی شدند. جهت حصول عصاره با محتوای مواد موثره حداکثر، از حلال متانل ۷۰ درصد استفاده گردید. استخراج نمونه در سرما به روش ماسراسیون انجام و عمل استخراج تا خروج کامل مواد از پودر نمونه چندین بار تکرار گردید. عصاره‌های بدست آمده تحت خلا و در دمای پائین کاملاً خشک و جهت مطالعه اثر آن در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره هیدروالکلی فوق به صورت پودر به همراه سرم سالین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم گاواژ گردید.

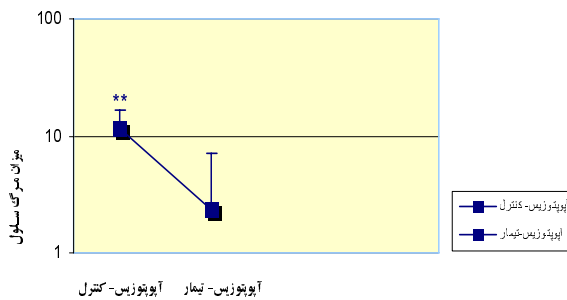
برای تشخیص آپوپتوز، از کیت تانل (insitu cell death detection kit, POD، کمپانی Roche، ساخت کشور آلمان) استفاده شد. تکنیک تانل به شرح زیر انجام شد:

حمایتی اجزای اشاره شده هنوز به درستی مشخص نشده است. به نظر می‌رسد تجمع زیاد سلول‌های جهش یافته در روده بزرگ و رکتوم باعث ایجاد تومور و بدخیمی می‌شود (۴). سرطان روده بزرگ یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در مردان و زنان به خصوص در آینده و افزایش شهرهای صنعتی خواهد بود (۳، ۶). از عوامل مهارکننده سرطان روده بزرگ می‌توان به گیاهان دارویی و میوه‌جات اشاره کرد که به صورت روزانه مورد مصرف قرار می‌گیرند، ولی باید قبل از مصرف آنها اثرات محافظتی و ضدسرطانی آنها شناسایی شود. مطالعات در مورد نقش گیاهان مختلف در پیشگیری از سرطان روده از مدتی قبل آغاز شده است (۷). مطالعات قبلی حاکی از اثرات مفید گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) در التهابات، تسریع التیام زخم‌ها، اثرات مفید در بشورات پوستی در مصارف خارجی و اثرات مفید در کوله‌سیستیت، کولانژیت، گاستریت، سیستیت و ضد هایپرلیپیدمی در مصارف داخلی است (۵). گاهی در منابع قدیمی به اثرات سیتوتوکسیک و آنتی‌توموری آن اشاره شده (۸)، ولی در مطالعاتی که اخیراً انجام شده است اثرات زئوتوکسیک و ضد زئوتوکسیکی در رده سلول‌های کبدی (۹) و اثرات آپوپتوتیک آن بصورت *In vitro* بر روی سلول‌های سرطان رده سلول‌های لوسمی، ملانوما، فیروسارکوما، پستان، پروستات، سرویکس، پانکراس و کولورکتال مورد بررسی قرار گرفته است. به طوری که عصاره گیاه فوق با مهار تقسیم سلولی در فاز G0/G1 و فعال کردن آنزیم کاسپاز-۳ باعث راه‌اندازی آبشار کاسپازی و آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی در شرایط *In-vitro* می‌گردد (۱۰). با توجه به اثرات ضدتوموری و القاگر عصاره گیاه همیشه‌بهار و عدم مطالعه اثرات این گیاه به صورت *In vivo*، بر آن شدیم تا اثرات آن در آپوپتوزیس سلول‌های دیسپلاستیک در مدل تجربی کارسینوم کولون را مورد بررسی قرار دهیم.

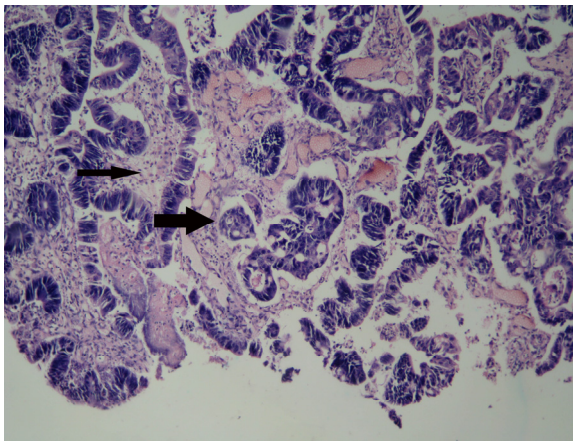
مواد و روشها

در این مطالعه تجربی مداخله‌ای، تعداد ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد وبستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰-۳۰۰ گرم انتخاب و به صورت تصادفی به دو گروه مساوی تیمار و شاهد تقسیم گردیدند. رت‌های نر در شرایط ۵ حیوان در هر قفس و نیز با سیکل ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 55 ± 10 درصد نگهداری شدند.

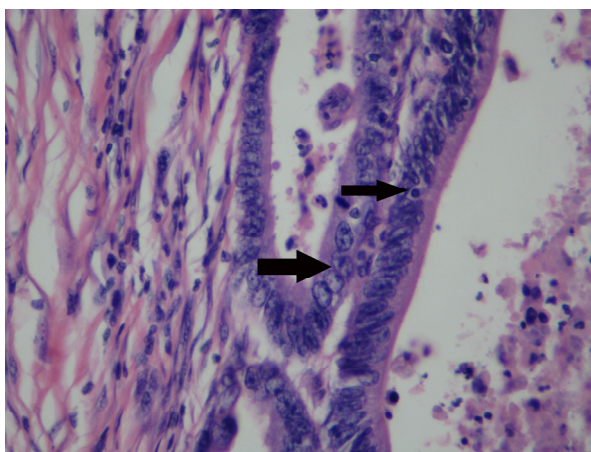
برای القاء سرطان کولورکتال در هر دو گروه تیمار و شاهد از ماده کارسینوزن ۱ و ۲-دی متیل هیدرازین (ساخت کمپانی سیگما) به



نمودار ۱- میانگین تغییرات آپوپتوزیس در بافت کولون گروه تیمار و شاهد (n=28). داده‌ها بصورت میانگین \pm خطای معیارنمایش داده شده است. $p < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد.



شکل ۱- نمای ریزبینی از بافت اپی‌تلیوم کولون موش صحرایی گروه شاهد که تحت تاثیر ۱ و ۲ دی‌متیل هیدرازین قرار گرفته است. به تغییرات دیسپلاستیک بافت اپی‌تلیالی توجه نمایند. تعداد کثیری از کریپت‌های دیسپلاستیک یا Aberrant Crypt Foci (فلش ضخیم) به همراه ارتشاح سلول‌های آماسی در لامینا پروپریا و شکل‌گیری حوضچه‌های خونی نیز قابل مشاهده می‌باشد. (بزرگنمایی ۲۰ برابر؛ رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)



شکل ۲- نمای ریزبینی از بافت اپی‌تلیوم کولون موش صحرایی گروه تیمار که در آن تعدادی از سلول‌های دیسپلاستیک (فلش ۱) و سلول آپوپتوتیک (فلش ۲) قابل مشاهده می‌باشد. (بزرگنمایی ۲۰ برابر و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)

۱- ابتدا مقاطع تهیه شده، پس از پارافین‌زدائی و آب دهی با پروتئیناز K مجاور و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول فسفات بافر شستشو گردیدند.

۲- مقاطع بافتی با محلول واکنش‌گر تانل به میزان ۵۰ میکرولیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجاور گردیدند، سپس با محلول فسفات بافر شستشو داده شدند.

۳- در این مرحله، مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول کانورتر (۵۰ میکرو لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول فسفات بافر شستشو و سپس با محلول دی‌آمینو بنزیدین تتراکلراید نیز مجاور گشته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد مجدداً انکوبه گردیدند.

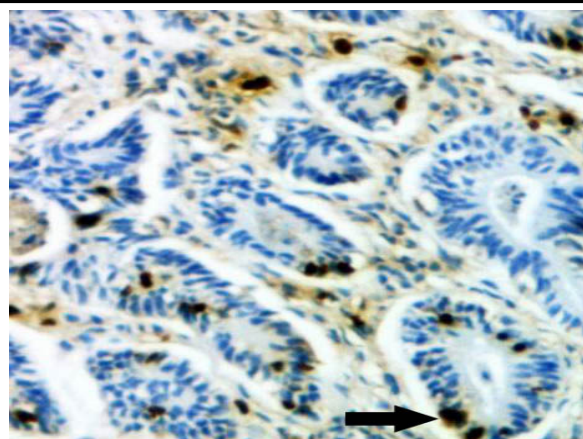
۴- سپس برش‌ها با فسفات بافر شستشو و باتولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند (۱۸، ۱۹).

بر اساس جدول کوهن و ضریب اثر ۰/۵ و توان آزمون ۹۰ درصد، حداقل حجم نمونه ۲۸ مورد به دست آمد. سلول‌های آپوپتوتیک در ۱۰ میدان میکروسکوپی بطور تصادفی شمارش گردیدند. برای تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین سلول‌های آپوپتوز دو گروه تیمار و شاهد از آزمون t مستقل استفاده شد.

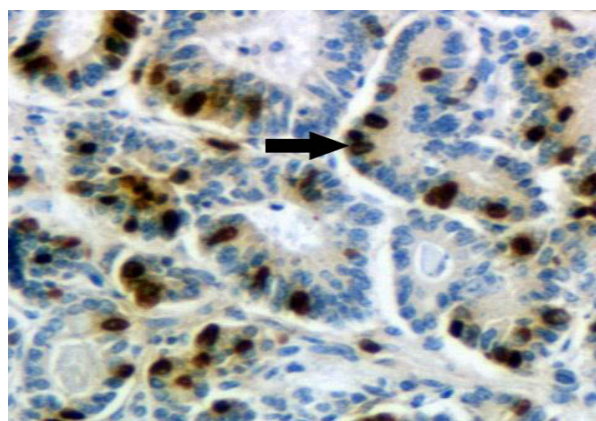
یافته‌ها

در مقاطع بافتی که به روش رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین-انوزین تهیه شده بودند، سلول‌های دیسپلاستیک، نئوپلاستیک، کریپت‌های غیرعادی یا Aberrant Crypt Foci به همراه سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای مشاهده گردیدند که نشانگر تاثیر کارسینوژنیکی ماده شیمیائی ۱ و ۲ دی‌متیل هیدرازین می‌باشد (شکل ۱ و ۲). مطالعات میکروسکوپی از مقاطع بافتی بخش دیستال کولون که به روش رنگ‌آمیزی تانل تهیه گردیده بودند، نشانگر تعداد کثیری از سلول‌های آپوپتوتیک در اپی‌تلیوم کریپت‌های دیسپلاستیک کولون (Aberrant Crypt Foci) گروه تیمار بود که در مقایسه با گروه شاهد تعداد سلول‌های آپوپتوتیک بیشتری داشتند (شکل ۳ و ۴) و اختلاف معنی‌داری بین دو گروه تیمار و شاهد مشاهده شد. میانگین (\pm انحراف معیار) میزان آپوپتوزیس در گروه تیمار ۱۱/۷ \pm ۲/۱ و در گروه شاهد ۲/۴ \pm ۱/۴ بود ($p < 0.01$). در نمودار ۱ تغییرات آپوپتوزیس در بافت کولون گروه تیمار و شاهد نشان داده شده است.

سرکوب کننده رشد تومور و مشوق آپوتوزیس شناخته شده است. محصول ژن APC پروتئینی است به وزن ۳۱۲ کیلو دالتون که دارای دومن‌های متعددی است که از آن طریق با سایر پروتئین‌ها باند می‌شود که شامل پروتئین بتا-کاتنین، آکسین، CTBC، Asefs، IQGAPI و میکروتوبول می‌باشد. نقش دیگری که برای APC بیان شده اتصال و مهاجرت سلولی، سازمان‌دهی آکتین و شبکه میکروتوبولی سلول‌ها است و از این نظر می‌توان تغییرات آناپلاستیک مشاهده شده در مطالعه حاضر را تفسیر نمود، زیرا که با نقص ایجاد شده در شکل‌گیری دوک‌های تقسیم سلولی و اتصال بین سلولی (موتاسیون ژن APC) شرایط برای برهم خوردن پلاریته سلولی و تشکیل سلول‌های پلی‌پوئیدی مساعد می‌گردد که نتایج، گویای آن است (۱۸، ۲۰). تاثیرات آنتی‌موتاسیونی عصاره گل همیشه بهار در پدیداری پروتئین‌های مشوق آپوتوزیس نظیر پروتئین APC نیز نمی‌تواند در توجیه نتایج معنی‌دار مطالعه حاضر مطرح باشد. البته نباید نقش پروتئین بتاکاتنین را نیز در این مورد فراموش نمود که عصاره گل همیشه بهار به شکل غیرمستقیم بر روی آن اثر گذاشته و الگوی مرگ سلول‌های دیسپلاستیک را در کارسینوم کولورکتال تحت تاثیر قرار می‌دهد. الیس و همکاران در سال ۱۹۹۰، جیمنز در سال ۲۰۰۶ و باراجیز در سال ۲۰۰۶ به این نتیجه رسیدند که عصاره گل همیشه بهار دارای خاصیت ضد سرطانی است که دلیل آن وجود ماده شیمیایی بنام ساپونین در آن می‌باشد. ساپونین موجود در عصاره گل همیشه بهار آنتی‌موتاسیون و مشوق آپوتوزیس می‌باشد (۹، ۱۰، ۱۸). هم‌چنین موتوهیوگو و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان داشتند که دو ترکیب شیمیایی موجود در عصاره گل همیشه بهار بنام تری‌ترین‌گلیکوزیداز-۹ و ۱۰ دارای خاصیت سیتوتوکسیسیته می‌باشند که توانسته‌اند در رده‌های سلولی سرطان‌های کولون، ملانوم و لوسمی در حد ۵۰ درصد پتانسیل لقاء مرگ سلولی را نشان دهند. ناگفته نماند که محصول تری‌ترین‌گلیکوزیداز-۱۰ حاصل از عصاره گل همیشه بهار در مهار فرآیندهای انتهایی نیز موثر بوده است (۲۱). نتایج مطالعات سایر دانشمندان و مقایسه آن با نتایج مطالعه حاضر نشانگر آن است که عصاره گل همیشه بهار تا حدودی می‌تواند در لقاء آپوتوزیس سلول‌های دیسپلاستیک کولون در شرایط *in vivo* موثر واقع گردد، هر چند باید با دسترسی به ترکیبات موثرتر عصاره گیاهی فوق و مطالعات بیشتر به نتایج دقیق‌تر و راه‌گشایتری دست یافت و با استفاده از عوامل موجود در طبیعت تا حدودی در درمان بیماری‌های نئوپلاستیک موفق بود.



شکل ۳- نمای ریزبینی از کریپت اپی‌تلیوم کولون موش صحرایی گروه شاهد که در آن سلول‌های تانل مثبت به رنگ قهوه‌ای (فلش) قابل رویت می‌باشد. (بزرگنمایی ۴۰ برابر و رنگ آمیزی تانل)



شکل ۴- نمای ریزبینی از کریپت اپی‌تلیوم کولون موش صحرایی گروه تیمار که در آن سلول‌های متعدد تانل مثبت متعدد به رنگ قهوه‌ای (فلش) قابل رویت می‌باشد. (بزرگنمایی ۴۰ برابر و رنگ آمیزی تانل)

بحث

نتایج حاصل از مطالعات جیمنز و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ نشان می‌دهد که عصاره گل همیشه بهار توانسته است در محیط‌های کشت، سلول‌های سرطانی متعد نظیر لوسمی، ملانوما، فیبروسارکوم، کارسینوم‌های پستان، پروستات، سرویکس، ریه، پانکراس و کولورکتال را در حد ۷۰ الی ۱۰۰ درصد از بین ببرد. آنها این موضوع را چنین توجیه نمودند که عصاره گل همیشه بهار به واسطه اثر مهار بر تقسیم سلولی در فاز G0/G1 و فعال نمودن مسیر آبشار کاسپازی باعث لقاء آپوتوزیس در سلول‌های سرطانی محیط کشت می‌شود. همچنین اشاره داشتند که مهم‌ترین مسیر آنزیمی موثر، آنزیم کاسپاز-۳ می‌باشد (۸، ۱۰). آکوئی و همکاران و دینا در سال ۲۰۰۷ بیان نمودند که ژن APC یا Adenomatous Polyposis Coli به عنوان یک ژن

REFERENCES

1. Willett WC, Stamfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990; 323: 1664–72.
2. Wynder EL. The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res* 1975; 35: 3388–94.
3. Reddy BS. Nutritional factors and colon cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35: 175–90.
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759–67.
5. Mason JB. Nutritional chemoprevention of colon cancer. *Semin Gastrointest Dis* 2002; 13: 143–53.
6. Negri E, D'Avanzo B, Tavani A. The role of vegetables and fruit in cancer risk. In: Hill MJ, Giacosa A, Caygill CP, Eds. *Epidemiology of diet and cancer*. London: Ellis Horwood; 1994. P.327–34.
7. Shike M, Winamer SJ, Greenwald PH, Bolch A, Hill M, Swaroop SV. Primary prevention of colorectal cancer. *Bull World Health Org* 1998; 68: 377–85.
8. Pe'rez-Carreo' NG, Cruz-Jime'nezb JA, Licea-Vegab E. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol In Vitro* 2001; 16: 253–58.
9. Barajas-Farias LM, Pérez-Carreón JI, Arce-Popoca E. A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. *Planta Med* 2006; 72: 217-21.
10. Jimenez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 2006; 6: 119.
11. Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, LipkinM. Induction of adenocarcinomas in the colon in mice by weekly injection of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1973; 33: 940–45.
12. Kamaleeswari M, Deeptha K, Sengottuvelan M, Nalini N. Effect of dietary caraway (*Carum carvi* L.) on aberrant crypt foci development, fecal steroids, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 214: 290–96.
13. Dias MC, Spinardi-Barbisan AL, Rodrigues MA, de Camargo JL, Terán E, Barbisan LF. Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine in rats. *Food Chem Toxicol* 2006; 44, 6,877-884.
14. 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. *Clin Chim Acta* 2005; 358: 60–67.
15. Chithra V, Leelamma S. *Coriandrum sativum* — effect on lipid metabolism in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 457–63.
16. Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 1995; 93: 55–71.
17. Rodrigues MAM, Silva LAG, Salvadori DMF, Camargo JLV, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimemthylhydrazine in Wistar rats. *Brazilian J Med Biol Res* 2002; 35: 351–55.
18. Dikavsakaya D, Schiffmam D, Lan P. Loss of APC incidence polypoidy as results of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol* 2007; 176: 183–95.
19. Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. *Pharmazie* 1988; 43: 220–21.
20. Aoki K, Taketo M, Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* 2007; 120: 3327-35.
21. Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Anti-Inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J Nat Prod* 2006; 69: 1692–96.