Archive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۸۸، صفحات ۱۵۴ تا ۱۵۹

Original Article

بررسی اثر سایتوتوکسی‌سیتی عصاره تام زعفران بر روی سلول‌های کارسینومای کبد انسان ($HepG_2$)

خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۱]، جلیل توکل افشاری[۲]، حسن رخشنده[۳]، اعظم بروک[4]

[۱] مربی، دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد.
[۲] دانشیار ، دکترای ایمونوژنتیک، پژوهشکده بوعلی مشهد، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
[۳] مربی ،دکترای حرفه ای داروسازی، بخش فارماکولوژی، بیمارستان قائم مشهد
[۴] کارشناس زیست شناسی، پژوهشکده بوعلی مشهد، بخش کشت سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

چکیده

سابقه و هدف: *در طی چند سال گذشته خواص ضد سرطانی عصاره زعفران به اثبات رسیده است. در این تحقیق اثر سایتوتوکسی‌سیتی عصاره تام زعفران بر روی سلول های کارسینومای کبد انسان ($HepG_2$) بصورت in vitro مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، اثر کمی عصاره بر تکثیر رده های سلولی کارسینومای کبد انسان ($HepG_2$) با استفاده از تکنیک رنگ‌سنجی MTT (دی متیل تیازول-دی فینل تترازولیوم بروماید) تعیین گردید. هم‌زمان اثر عصاره بر روی سلول های طبیعی فیبروبلاست موش (L_{929}) بعنوان شاهد ارزیابی شد. این روش سریع، حساس و قابل اندازه‌گیری برای تکثیر همه انواع سلول‌ها به روش اسپکترفتومتری است. میزان عصاره مورد نیاز جهت تولید ۵۰ درصد سمیت سلول (IC_{50}) توسط رسم نمودار با استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره با توجه به درصد سلول‌های زنده مانده در مقایسه با سلول‌هایی که هیچ دارویی بر علیه آنها استفاده نشده بود، پس از سنجش و مقایسه بدست آمد.*

یافته‌ها: *غلظت مهارکننده ۵۰ درصد رشد سلول‌ها (IC 50) برای سلول‌های سرطانی۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. عصاره هیچگونه اثری بر مهار رشد سلول‌های طبیعی نداشت.*

نتیجه‌گیری: *عصاره تام زعفران می‌تواند با تغییرات درون سیتوپلاسمی و هسته‌ای اثرات سایتوتوکسی‌سیتی بر سلول‌های توموری داشته باشد.*

واژگان کلیدی: *عصاره زعفران، هپاتوکارسینوما، آنتی‌تومور، رنگ‌سنجی، رده سلولی L_{929}*

مقدمه

بسیاری از میوه‌ها، سبزیجات، گیاهان یک‌ساله و ادویه‌ها حاوی عواملی بر علیه سرطان هستند که می‌توانند اثرات خود را در مراحل مختلف شروع و رشد سلول‌های سرطانی اعمال کنند (۱). امروزه استراتژی امیدوار کننده برای جلوگیری از سرطان، داروهایی هستند که بطور صناعی یا طبیعی گسترش سرطان را متوقف می‌کنند. اکنون پذیرفته شده که گیاهان، سبزیجات و ادویه‌هایی که در میان مردم استفاده می‌شوند و نیز داروهای سنتی منبع اصلی جلوگیری از سرطان هستند (۲).

عوامل غذایی نقش مهمی را در مرحله شروع و نیز جلوگیری از پیشرفت سرطان ایفا می‌کنند. تعداد بی‌شماری از بیماران در سراسر دنیا از گیاهان دارویی به منظور حفظ سلامتی استفاده می‌کنند. بنابراین دانشمندان نگاه عمیقی بر خواص بیولوژی، قدرت درمانی و سلامتی این محصولات دارند (۳). بعنوان مثال

آدرس نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی (**email**: shahrokhabay@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۰/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/٤/۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

امروزه از هر سه نفر آمریکایی یک نفر از گیاهان دارویی استفاده می‌کند (۴). در فرهنگ دارویی قدیم زعفران به عنوان یک داروی مفید برای بسیاری از بیماران شهرت یافته است (۶،۵). سابقه زراعت زعفران به بیش از ۲۵۰۰ سال قبل بر می‌گردد. این گیاه ظاهراً بومی یونان و مناطق مدیترانه‌ای است، ولی اعتقاد بر این است که رویشگاه اولیه زعفران در دامنه کوه‌های زاگرس و بویژه ناحیه الوند در ایران است (۷). در حال حاضر ایران بزرگترین تولید کننده و صادر کننده زعفران جهان است و بیش از ۶۵ درصد تولید جهانی این محصول گرانبها به ایران اختصاص دارد (۸).

کاربردهای متنوع زعفران، خواص دارویی، مصرف غذایی و از همه مهم‌تر نقش عمده آن در زندگی کشاورزی باعث شده که توجه ویژه ای به مسائل تولید و بهنژادی آن در سال‌های اخیر معطوف شود. اصلاح و دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان زراعی، بویژه زعفران نیزه عمده مطالعات مهم قرن اخیر است. اثرات دارویی عصاره زعفران بر سرطان و شناخت ترکیبات اصلی آن نیز از جمله تحقیقات مهم است (۱۳-۹). زعفران آنتی‌کارسینوژن است (۱۷-۱۴) و عصاره زعفران فعالیت توموری را در موش به تأخیر انداخته است (۲۰-۱۸). مطالعات گوناگونی اثر سیتوتوکسی‌سیتی عصاره زعفران را بر روی سلول‌های سرطانی بصورت *in vitro* نشان داده است. قرار دادن سلول‌های سرطانی در معرض عصاره زعفران باعث مهار سنتز اسیدنوکلئیک (DNA) در سلول می‌شود (۲۲،۱۱-۲۱). هم‌چنین تغییرات مرفولوژیکی از قبیل میزان واکوئله شدن، کاهش اندازه و تراکم هسته نیز در سلول‌های تیمار شده با زعفران دیده شده است. در این تحقیق، اثر سیتوتوکسی‌سیتی عصاره تام زعفران بر روی سلول‌های سرطان کبد اولیه ($HepG_2$) هم از نظر کمی و هم از نظر مرفولوژی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

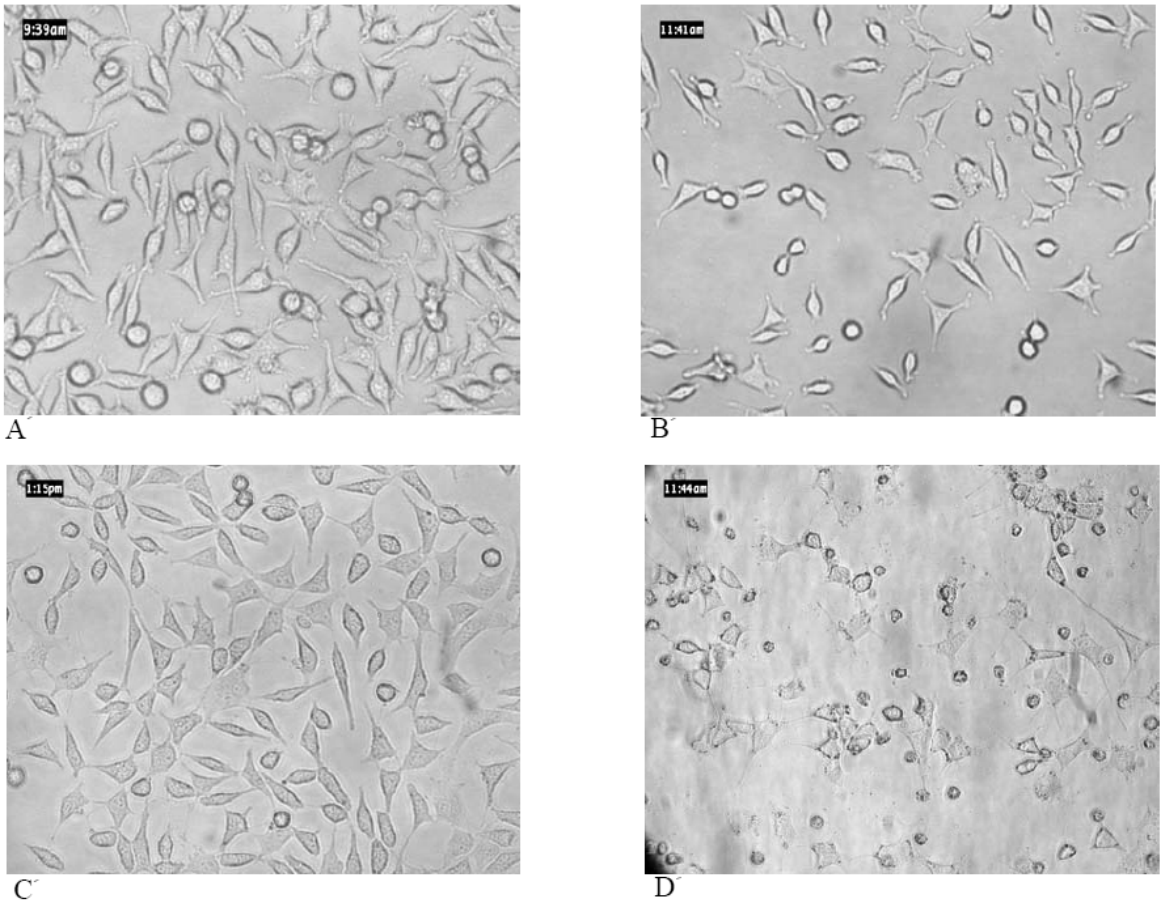
در این مطالعه تجربی، عصاره آبی زعفران تجارتی در بخش فارماکولوژی بیمارستان قائم مشهد و به روش سوکسله تهیه شد. عصاره آبی تهیه شده به مدت کوتاه در یخچال و برای زمان طولانی‌تر در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس عصاره به روش منجمد و سپس خشک کردن (Lyphilization) با استفاده از دستگاه لیوفیلیزر (Frez Dry–Backman) به صورت پودر خشک شده آماده شد. عصاره خشک شده برای تهیه غلظت‌های مختلف در محیط کشت بدون سرم (DMEM) حل شده و بصورت الکوات در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. دو رده سلولی مورد نیاز، سلول‌های سرطانی کبد ($HepG_2$) و سلول‌های طبیعی فیبروبلاست موش (L_{929}) به عنوان شاهد، در محیط کشت DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) به همراه FBS ۱۰ درصد و ۱/۵ میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۰/۵ میلی‌لیتر پنی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درانکوباتور ۵ درصد CO_2 با RH=100 رشد داده شدند. برای اطمینان از درصد بالای سلول‌های زنده در حال رشد، تست viability با رنگ تریپان‌بلو محاسبه شد. درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۰ درصد بدست آمد.

برای بررسی اثر عصاره تام زعفران بر روی رده‌های سلولی پیش بینی شده آزمایشات در دو مسیر انجام شد. ابتدا برای بررسی کیفیت، سلول‌ها از نظر مرفولوژی، میزان چسبندگی بر بستر و میزان گرانوله شدن سیتوپلاسم و هسته، تحت تیمار عصاره قرار گرفتند. برای هر رده سلولی ۵ فلاسک کوچک حاوی 1×10^6 سلول در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت که از چسبندگی سلول‌ها اطمینان حاصل شد، نوبت به افزایش عصاره با غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰،۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیترگردید. برای تهیه این غلظت‌ها عصاره لیوفیلیزه در محیط کشت بدون سرم حل گردید. برای مقایسه مرفولوژی سلول‌ها، میزان چسبندگی و میزان گرانوله شدن آنها از فلاسک‌های حاوی سلول‌ها هر روز به مدت شش روز عکس گرفته شد. عکس‌ها با دوربین دیجیتال (Camera Hp-America) و با درشت‌نمایی ×۲۰ میکروسکوپ معکوس تهیه شد. عکس‌ها برای مقایسه و نتیجه‌گیری در کامپیوتر ذخیره گردید.

در مرحله دوم، سنجش کمیت سلول‌ها به روش رنگ‌سنجی MTT صورت گرفت. رنگ سنجی MTT (دی متیل‌تیازول-دی فینل تترازولیوم بروماید) ابتدا توسط Mosman توصیف شد و سپس توسط Alley و همکاران تغییراتی در آن صورت گرفت (۲۳،۲۴). این روش برای اندازه‌گیری لنفوکاین‌های پرولیفراتیو، میتوژن‌ها ،لیز شدن با واسطه کمپلمان، تعیین فاکتورهای رشد T-Cell و بررسی اثرات سایتوتوکسی‌سیتی مواد و داروهای مختلف بر روی سلول‌ها به کار می‌رود (۲۵). تست MTT برای هر دو رده سلولی به صورت سه‌تائی (Triplicate) و در سه پلیت ۹۶ خانه‌ای جداگانه انجام شد. سوسپانسیون سلولی از هر دو رده سلولی تهیه شد و ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به هر ول از پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد . سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و سپس عصاره رقیق شده با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به هر ول اضافه شد. پلیت‌ها به ترتیب به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. رنگ MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS استریل حل شد و سپس توسط فیلتر استریل گردید . به

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تغییرات مرفولوژیکی سلول‌ها.

A: سلول‌های نرمال L_{929} بدون تاثیر عصاره پس از ۴۸ ساعت. B: سلول‌های نرمال L929 در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره پس از روز ششم. C: سلول‌های سرطانی $HepG_2$ بدون تاثیر عصاره پس از ۴۸ ساعت. D: سلول‌های سرطانی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره پس از روز ششم.

ازاء هر ۲۰۰ میکرولیتر ازمحیط کشت ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT به هر ول از پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد و به مدت چهارساعت انکوبه گردید. پس از چهار ساعت با برگرداندن پلیت محیط روی سلول‌ها خالی شد. سپس به هر ول ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۰ میکرولیتر بافر گلایسین اضافه شد. بعد از آنکه ذرات رنگ بخوبی حل شدند، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط Eliza plate reader قرائت شد.

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS/11.5 انجام شد. در متغیرهایی که از توزیع نرمال برخوردار بودند از آزمون t و ANOVA و در متغیرهایی که از توزیع نرمال برخوردار نبودند از آزمون Mann-whitney U استفاده شد.

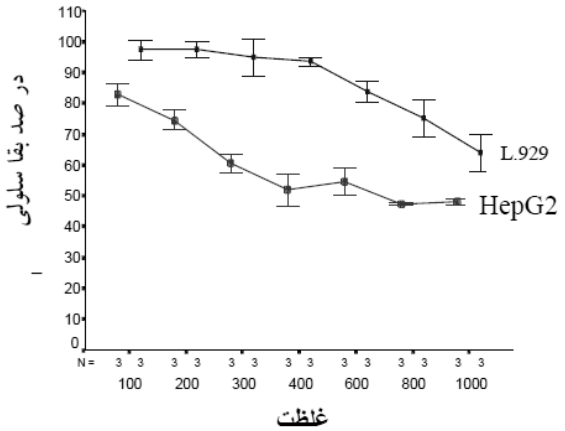
یافته‌ها

سلول‌های طبیعی L_{929} شاهدی که تحت تاثیر عصاره قرار گرفته بودند، هیچ‌گونه تغییرات مرفولوژیکی مشخصی نسبت به سلول‌های شاهدی که بدون تاثیر عصاره بودند نداشتند (شکل ۱).

سلول‌های سرطانی بدون تاثیر عصاره نیز تغییرات مشخصی را نشان ندادند. اما سلول‌های سرطانی ($HepG_2$) تحت تاثیر عصاره در روزهای مختلف تفاوت‌های بسیار بارز و وابسته به دوز عصاره نشان دادند، بطوری که بتدریج و با افزایش زمان و در دوزهای بالاتر تغییر شکل سلولی بسیار واضح‌تر بود. مهار رشد سلولی به طور دسته‌جمعی یا منفرد به صورت مرفولوژی ستاره‌ای شکل، تحلیل رفتگی و افزایش اندازه واکوئل، کاهش سیتوپلاسم و پیگمانه شدن هسته مشخص بود. این دو تغییر یعنی تحلیل رفتگی و پیگمانه شدن هسته از ویژگی‌های نهایی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) است. تغییرات مرفولوژیکی شامل سطوح واکوئله شده و کاهش اندازه تراکم هسته‌ها می‌تواند بازتاب تغییرات متابولیکی باشد که تنها در سطح مولکولی در سلول‌های تیمار شده با زعفران قابل بررسی است. شکل‌ها نشان دادند که تغییرات درون سیتوپلاسمی و هسته‌ای تحت تاثیر عصاره زعفران می‌تواند اثرات سایتوتوکسی‌سیتی بر سلول‌های توموری داشته باشد (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



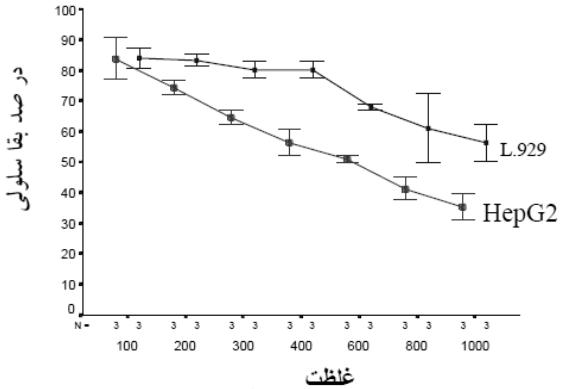
نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره پس از ۴۸ ساعت با روش MTT.

عصاره تا غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تأثیری بر سلول های طبیعی ندارد. اما اثر وابسته به دوز بر سلول های سرطانی دیده می شود. محور افقی غلظت های مختلف عصاره (µg/ml) و محور عمودی درصد بقای سلولی را نشان می دهد.

نتایج سنجش رنگ MTT با اندازه‌گیری جذب نوری (OD) بر اساس غلظت عصاره مورد استفاده در مقایسه با میزان تکثیر مولکولی در نمودارهای ۱ و ۲ ارائه شده است. درصد سلول‌های زنده تحت تاثیر عصاره نسبت به سلول‌هایی که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید (۲۶):

جذب نوری سلول های تیمار شده با عصاره در هر ول × ۱۰۰

میانگین جذب نوری سلول های کنترل



نمودار ۲- تأثیر مقادیر مختلف عصاره پس از ۷۲ ساعت با روش MTT.

اثر مهارکنندگی عصاره بر سلولهای سرطانی در غلظت های مختلف دیده می شود. محور افقی غلظت های مختلف عصاره (µg/ml) و محور عمودی درصد بقای سلولی را نشان می دهد.

نمودارها تاثیر عصاره را پس از ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌ها نشان می‌دهند. شواهد نشان می‌دهند که عصاره بر روی سلول‌های طبیعی تاثیری ندارد، اما برروی سلول‌های سرطانی به‌خصوص در غلظت‌های ۶۰۰-۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر مهارکنندگی نشان می‌دهد. با مقایسه نمودارها، غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول‌ها (IC 50) برای سلول‌های سرطانی ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد.

بحث

به نظر می‌رسد عصاره بعضی از ادویه‌ها دارای مواد متوقف کننده رشد باشد. مطالعات گوناگون دلیلی بر قدرت ایجاد سمیت سلولی بر علیه سلول‌های توموری گوناگون در عصاره زعفران است (۲). بر طبق مطالعات، یکی از فعالیت‌های بیولوژیکی زعفران که بزرگترین کاربرد پزشکی آن محسوب می‌شود، توانایی آن در مهار سرطان‌زایی است. مطالعات نشان داده است که عصاره زعفران دارای فعالیت آنتی‌توموری بر علیه تومورهای جایگزین شده و نیز فعالیت ضدسرطان زایی علیه تحریک و القاء سرطان توسط مواد شیمیائی به صورت *in vivo* و هم چنین اثرات سایتوتوکسیک برروی سلول های جدا شده از سرطان بصورت *in vitro* می‌باشد (۲۷). زعفران ماده‌ای است که فعالیت‌های سه فرایند مهم متابولیکی یعنی ساخت DNA، RNA و پروتئین را در سلول های زیان‌آور انسانی متوقف و مهار می‌کند. اما اثر متوقف کننده‌ای بر شکل‌گیری کلونی ندارد (۱۱). این یافته‌ها نشان می‌دهد که اثر بازدارندگی زعفران روی سنتز اسیدنوکلئیک می‌تواند یک اساس بیوشیمیایی برای اثر بازدارندگی آن روی تکثیر سلول‌های توموری را نشان دهد. این نکته توسط آزمایش اثرات زعفران روی ساخت DNA و RNA در یک سیستم بدون سلول (cell free) که هسته‌ها ایزوله شده بودند، بررسی شد (۲۲). بنابراین تائید شد که عصاره زعفران اثر مستقیم روی واکنش‌های سنتزی ندارد. بطور کلی می‌توان مکانیسم‌های عمل آنتی‌تومورال زعفران را بطور خلاصه اینگونه بیان نمود: ۱- اثر مهارکنندگی که بر سنتز DNA و RNA دارد اما بر سنتز پروتئین ندارد. ۲- اثر مهارکنندگی زعفران برروی فعل و انفعالات زنجیره رادیکال آزاد. زیرا اغلب کارتنوئیدها قابل حل در چربی‌اند و بعنوان اعضاء مرتبط کننده با افیشنتی بالا برای رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند که با خواص آنتی‌اکسیدانی آنها نیز ارتباط پیدا می‌کند. ۳- اثر آنتی توموری زعفران که به صورت طبیعی کارتنوئیدها را به رتنوئید تبدیل می‌کند (۲۸).

www.SID.ir

Archive of SID

۴- اثر سایتوتوکسیک زعفران که با میان‌کنش کارتنوئیدها با توپوایزومراز II ارتباط دارد، بعنوان آنزیمی که میان‌کنش بین پروتئین و DNA را انجام می‌دهد. از طرفی تیمار سلول‌های توموری با زعفران کاهشی را در سطح ترکیبات سولفیدریلی داخل سلولی نشان می‌دهد که این نیز می‌تواند یکی از توضیحات برای قدرت سایتوتوکسی‌سیتی زعفران باشد. مکانیسم پیشنهادی دیگر اثر سایتوتوکسیک کارتنوئید حاصل از زعفران است که راه حد واسط آپوپتوزیس است. هم چنین نشان داده شده که زعفران پایداری زیادی در برابر اشعه گاما دارد که این پایداری می‌تواند در جستجوی آزمایشاتی برای قدرت دارویی این ادویه بکار گرفته شود. بنابراین گرچه فرضیات متعددی مطرح است، اما مکانیسم واقعی اثر آنتی‌کارسینوژنی و آنتی‌توموری زعفران و ترکیبات اصلی آن هنوز روشن نشده است. بنابراین شواهد علمی غیرقابل انکار پیشنهاد می‌کند که عوامل و فاکتورهای رژیم گیاهی می‌توانند مسیر کارسینوژنی عوامل سرطان‌زا را مهار کنند (۲۹).

به دلیل ارتباطی که بین زعفران و سرطان بوجود آمده است، لازم است که اطلاعات عمیق و مطالعات ضروری در موارد ذیل صورت گیرد: ۱- تعیین مکانیسم‌هایی که خواص درمانی زعفران را آشکار می‌کنند. ۲- تعیین فعالیت بیولوژیکی ترکیبات آنالیز شده زعفران. ۳- تحقیق و بررسی برروی مسیرهایی که خواص دارویی ضد سرطانی زعفران را اثبات می‌کنند. ۴- انجام مطالعات انسانی برای تعیین اثربخشی زعفران برای درمان و جلوگیری از شیوع سرطان.

تشکر وقدر دانی

بدین وسیله از کلیه همکاران در پژوهشکده بوعلی مشهد که در این طرح پژوهشی مارا یاری نمودند سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

1. Abdullaev FI. Riveron-Negretts L. Rotenburd-Belacortu V, Kasumov FJ. Saffron as chemopreventive agent. In: Abdullaev FI. Riveron-Negretts L. Rotenburd-Belacortu V, Kasumov FJ, eds. Food of 21st century: Food and resource technology environment. China: Ligh Industry Press; 2000; 185-95.
2. Abdullaev FI. Plant-derived agents cancer. In: Gupta SK, ed. Pharmacology and therapeutics in the New Millennium. New Delhi: Narosa Publishing House; 2001; 345-54.
3. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumorical properties of saffron (*Crocus sativus L.*). Mexicocity, Mexico: Laboratory of Experimented Oncology, National Institute of Pediatncs; 2001.
4. Eisenberg D, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR. Unconventional medicine in United States: prevalence, cost and patterns of use. N Engl J med 1993; 328:246-52.
5. Bssker D, Neyhi M. The used of saffron. Econ Bot 1983; 37:228-36.
6. Gainer JI, Jones JR. The use of crocetine in experimental atherosclerosis. Experientol 1975; 31:548-49.
7. Coffee M. Saffron: technology of produce and manufacture. Mashhad: The University of Mashhad; 2006.
8. Sabzevari M. Saffron, red gold of brackish. Tehran, Iran: Bank Keshavarzi; 1995.
9. Nair SC, Pannikor B. Antitumor activity of saffron (*Crocus sativus L.*). Cancer Lett 1991; 57:109-14.
10. Nair SC, Kurumboor SK. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. Cancer Biother 1995; 10:257-64.
11. Abdullaev FI, Frenkle GD. Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein syntheses. Biofactor 1992; 3:201-204.
12. Abdullaev FI, Gonzales DE, Mejia E. Activated antitumoral decompuestos naturales: Lectines Yazafron. Arch Latinoma 1997; 47:195-202.
13. Abdullaev FI, Frenked GD. Saffron in biological and medical research. U.S.A: Harward Academic Publishers; 1999; 103-13.
14. Fernandez JA, Escribano J. Glycoconjugate from corm of saffron plant inhibits root growth and affects *in vitro* cell viability. J Exp Bot 2000; 345:731-37.
15. Escribano J, Diaz-Guerra MY. *In vitro* activation of macrophages from corm of *Crocus sativus L.* Cancer Lett 1999; 144:107-14.
16. Escribano J, Piqueras A. b. Production of a cytotoxic proteoglycan using callus culture of saffron corns. J Biotech 1999; 73:53-59.
17. Escribano J, Deaz-Guerra MJ.The cytotoxic effect of glucoconjugate extracted in culture. Planta Med 2000; 66:157-62

www.SID.ir

Archive of SID

18. Salomi MY, Nair SC. Inhibitory effect of *Niyella sativa* and saffron on chemical carcinogenesis in mice. Nutr Cancer 1991; 16:67-72.

19. Molnar J, Szabo D. Membrane associated antitumor effects of crocine– ginseniside and cannabinoid derivates. Anticancer Res 2000; 20:861-67.

20. Chany VE, Lin YL, Lee MJ, Show SJ. Inhibitory effect of crocetin on benzo(a) pyrece genotoxicity and neoplastic transformation in c_3H_1 OT ½ Cells. Anticancer Res 1996; 765:3603-608.

21. Abdullaev FI, Frenkel GD. The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells. Biofactors 1991; 4:43-45.

22. Abdullaev FI, Macvicar C, Frenkel GD. Inhibition by selenium of DNA and RNA synthesis in normal and malignant cells *in vitro*. Cancer Lett 1994; 139:43-49.

23. Alley MC, Scudiero DA, Monks A. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro culture tetrazolium assay. Cancer Res 1998; 48:589-601.

24. Mossmann T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Immun Method 1983; 65:55-63.

25. Rapaport L, Robinson C. Cell titer 96 and titer 96 AG, non radioactive cell proliferation assay. Promega Notes Magazine 1993; 44:46-47.

26. Carmichael J, Decroff W. Evaluation of a tetrazolium based semiau tomated coloimetric assary. Assessment of radiosensitivity. Cancer Res 1987; 47:943-46.

27. El-Daly ES. Protective effect of cystein and vitamin E *Crocus sativus* and *Niyella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in bats. J Pharm Belg 1998; 3:93-95.

28. Dufresene C, Cormier F, Dorion S. *In vitro* formation of crocetin glucosyl esters by *Crocus sativus* callas extract. Plant med 1997; 63:1525-30.

29. Escribano J, Alonso GL. Crocin, sofranol and picocrocine from saffron (*Crocus sativus L.*) inhibit the growth of human cancer cell *in vitro*. Cancer lett 1996; 100:23-30.

www.SID.ir