Research in Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences *Vol.38, No.4, winter 2015*

Evalution of cytotoxic effect of of Kelussia Odoratissima Mozaff grown in kohrang and freydonshahr regions against MCF7 cell line and peripheral blood monolayer cell (PBMC)

Maliheh kheirandish, Mandana Behbahani*

Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

(Received 24 Aug, 2014 Accepted 13 Apr, 2015)

Abstract

Background: *Kelussia Odoratissima* (Apiaceae family) is an herbaceous plant which traditionally used in Iran as antiache, anti inflammation and anticoughagents. This plant has potent antioxidant and anticancer effects. The present investigation was carried out to study cytotoxic activity of leaves, shoots, seeds, flowers and roots extracts of *K.odoratissima* collected from two different regions against MCF7 cell line and peripheral blood monolayer cell (PBMC).

Materials and methods: The cells used in this research, MCF7 a breast cancer cell lines and normal lymphocytes were cultured in PRMI-1640 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and 5mM/L glutamine. The cytotoxic effect of the crude methanol extract of this plant at different concentrations (10, 100, 500 and 1000 µg/ml) were performed by using MTT assay.

Results: The crude methanol extracts of different organs of *K. odoratissima* grown in korhang didn't have any cytotoxic effect, but the flower, leave and seed extracts of *K. odoratissima* grown in fereydonshahr showed potent cytotoxic effect on the MCF7 cells. However these extracts at different concentrations were not cytotoxic on normal cells.

Conclusion: In conclusion, the results demonstrated that different extracts *K. odoratissima* grown in fereydonshahr could be evaluated as an anticancer agent.

Keywords: *Kelussia Odoratissima*, MTT Assay, MCF7, PBMC.

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات ۲۲۱ تا ۲۲۵

بررسی تأثیر سمیت گیاه *Kelussia odoratissima Mozaff* رویش یافته در دو منطقه کوهرنگ و فریدونشهر، بر رده سلول سرطان سینه انسانی *MCF7* و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسانی

ملیحه خیر اندیش، ماندانا بهبهانی*

گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان

چکیده

سابقه و هدف: کرفس کوهی با نام علمی Kelussia odoratissima Mozaff گیاهی علفی از خانواده چتریان می باشد. این گیاه دارای خواص دارویی مثل خصوصیات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی است. به منظور تعیین تاثیر محل رویش گیاه بر سمیت اندام‌های مختلف، این پژوهش اتجام شد. در این تحقیق، اثر سمیت عصاره متانولی برگ، ساقه، بذر، گل، ریشه کرفس کوهی جمع آوری شده از دو منطقه مختلف، بر رده سلول سرطان سینه انسانی MCF7 و سلول نرمال لنفوسیت انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: سلول‌های مورد استفاده در این پژوهش، رده سلول سرطان سینه MCF7 و سلول نرمال لنفوسیت در محیط کشت PRMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. نمونه‌های گیاهی خشک شده توسط حلال متانولی عصاره گیری شدند و اثر سمیت سلولی بر سلول های سرطانی و نرمال در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: هیچ کدام از عصاره‌های این گیاه جمع آوری شده از کوهرنگ هیچ گونه اثر سایتوتوکسیتی نداشتند و عصاره‌های گل، بذر و برگ جمع آوری شده از منطقه فریدونشهر دارای اثر کشندگی بر روی سلول های MCF-7 بودند. این عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف دارای اثر کشندگی بر روی سلول های نرمال نبودند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد گیاه کرفس کوهی رویش یافته در منطقه فریدونشهر، می‌تواند به عنوان عامل ضد سرطان بر روی سلول‌های سرطان سینه MCF7 مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *کرفس کوهی، تست MTT، MCF7، PBMC.*

مقدمه

سرطان سینه دومین سرطان شایع بعد از سرطان ریه و یکی از شایع ترین نوع سرطان ها در بین بانوان در سراسر دنیا می‌باشد. گزارشات آماری در سال های اخیر بیان داشته است که در حدود ۴۱/۲۴٪ از از سرطان ها در بین بانوان ایرانی از نوع سرطان سینه بوده است (۱). جراحی و درمان های مکمل مانند درمان دارویی، هورمونی، شیمی درمانی و رادیوتراپی از روش‌های درمان سرطان سینه می باشند، این درمان ها دارای محدودیت ها و اثرات جانبی بسیاری برای فرد مبتلا به سرطان می‌باشد. امروزه استفاده از داروهای گیاهی به دلیل وجود عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، مورد توجه قرار گرفته اند (۲). تاکنون بیش از ۵۰۰ نوع گیاه کشف شده اند که در درمان سرطان موثرند. داروهای مهمی مانند وین کریستین، وین بلاستین، پودوفیلوتوکسین، تاکسول و فیلاتیوزید از جمله داروهای دارای منبع گیاهی هستند که برای درمان سرطان کشف شده‌اند (۳).

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه زیست فناوری، ماندانا بهبهانی (**e-mail:** Ma_behbahani@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۶/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹٤/۱/۲٤

کرفس کوهی با نام علمی Kelussia odoratissima Mozaff گیاهی علفی و چند ساله متعلق به خانواده چتریان است که تاکنون تنها یک گونه از این گیاه در ایران یافت شده است. وجود این گیاه در سایر مناطق در سطح جهان گزارش نشده است. نام محلی این گیاه کلوس می باشد که از نوع خود رشد وبومی منطقه غرب ایران است. این گیاه که جنبه دارویی و غذایی دارد مختص برخی مراتع ایران مانند استانهای اصفهان، چهارمحال بختیاری، کهکیلویه و بویراحمد، فارس، لرستان و ارتفاعات و مناطق برفگیر ناحیه زاگرس می‌باشد (۴).

گزارش‌های متعددی در مورد خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد افسردگی از گونه کرفس کوهی بیان شده است (۵). این گیاه دارای اثرات ضد درد و التهاب (۶)، آرامبخش (۷)، انعقاد خون (۸)، کاهنده اسید و پپسین معده (۹) و تقویت کننده حافظه (۱۰) می باشد. تاکنون وجود ترکیباتی مثل فتالید، فلاونوئید و ترپنوئید در این گیاه گزارش شده است (۱۱).

در این پژوهش اثر سایتوتوکسیک عصاره متانولی گیاه K.odoratissima جمع آوری شده از ارتفاعات کوهرنگ و فریدونشهر بر رده سلولی سرطان سینه انسانی MCF7 و سلول تک هسته ای خون محیطی به صورت تجربی در شرایط in vitro مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. نمونه‌های گیاهی در اوایل اردیبهشت و اواخر شهریور ماه سال ۱۳۹۲ از دو شهر کوهرنگ و فریدونشهر جمع آوری و پس از شستشو، در تاریکی خشک گردیدند. قسمت های مختلف گیاه از جمله برگ، ساقه، بذر، گل و ریشه به صورت جداگانه آسیاب و پودر شدند. در ادامه ۵۰ گرم از پودر اندام های مختلف گیاه با ۲۵۰ میلی لیتر حلال متانولی اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر با دور RPM۱۹۲ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. عصاره‌های فیلتر شده توسط دستگاه روتاری (Stero glass, Italy) در شرایط خلاء و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در نهایت خشک گردیدند. عصاره‌های حاصل در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شدند و با رقیق کردن آنها در محیط کشت، غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

کشت و نگه داری سلول‌ها

کشت و نگه داری سلول‌های تک هسته ای خون محیطی

نمونه‌های خونی اهدا کنندگان سالم درون لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد هپارین جمع آوری شدند. سپس لنفودکس به نمونه‌های خون اضافه و در سانتریفوژ با دور ۱۸۰۰ RPM به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، جمع آوری شده و در محیط کشت RPMI شامل ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰۰U/ml پنی سیلین، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین، ۲mM گلوتامین و ۱mM پیروات به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۵٪ Co2 دار کشت داده شد.

کشت و نگه‌داری سلول‌های سرطانی رده MCF7

سلول‌های سرطانی MCF7 از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت PRMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۱۰۰U/ml پنی سیلین، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین و ۲mM گلوتامین کشت داده شدند. سپس این سلول‌ها در انکوباتور (حاوی ۵٪ Co2) نگهداری و هر سه روز یک بار محیط کشت آنها تعویض گردید.

بررسی رشد و تکثیر سلول های لنفوسیت با استفاده از روش MTT

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره‌ها بر روی سلول های تک هسته‌ای خون محیطی و MCF7 به روش رنگ سنجی با استفاده از تست MTT صورت گرفت. این روش بر مبنای فعالیت آنزیم سوکسینات د هیدروژناز سلول های زنده استوار است که محلول زرد رنگ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) را احیا کرده و کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان را تشکیل می‌دهد. این کریستال‌های غیرمحلول را، پس از حل کردن در حلال مناسبی مانن DMSO می توان در دستگاه الیزا ریدر (Awareness) مورد سنجش قرار داد. در ابتدا مقدار ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی که معادل $۱۰^۴$سلول بود، را در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ریخته شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره ها (۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) به چاهک‌های پلیت اضافه گردید، به گونه‌ای که حجم نهایی چاهک‌ها به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. پلیت به مدت ۴۸ ساعت به منظور انکوبه کردن سلول‌ها در انکوباتور قرار گرفت و درصد زنده بودن سلول ها توسط روش دیوید و مورگان اندازه گیری شد. بدین صورت که پس از ۴۸ ساعت ۲۰ مکرولیتر محلول MTT درون چاهک ها ریخته و به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به محلول اضافه گردید و جذب در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. برای هر غلظت از عصاره سه تکرار منظور گردید. در این پژوهش از دی متیل سولفوکساید

(DMSO) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. درصد بقای سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ در نظر گرفته و با فرمول زیر محاسبه شد. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش می‌دهد CC50 در نظر گرفته شد.

$$\text{توانایی زیستی سلول ها} = \frac{OD_{\text{نمونه}}}{OD_{\text{کنترل}}} \times 100$$

تحلیل آماری

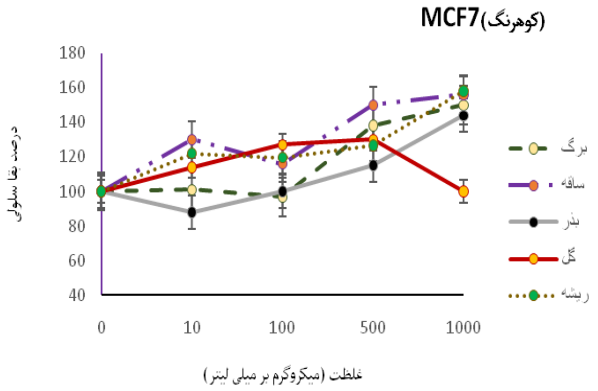
نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD, n=3) نشان داده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آنالیز واریانس یکطرفه (One Way ANOVA) انجام گرفت. سطح معنی‌دار بودن اختلافات P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

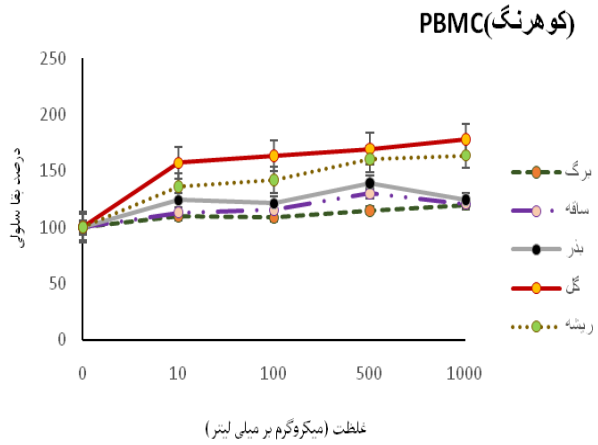
یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر عصاره متانولی ۵ اندام (برگ، ساقه، ریشه، بذر وگل) جمع آوری شده از دو شهرکوهرنگ و فریدونشهردر ۴ غلظت ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی رده سلول‌های سرطانی و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در نمودار ۱ و ۲ خلاصه شده است.

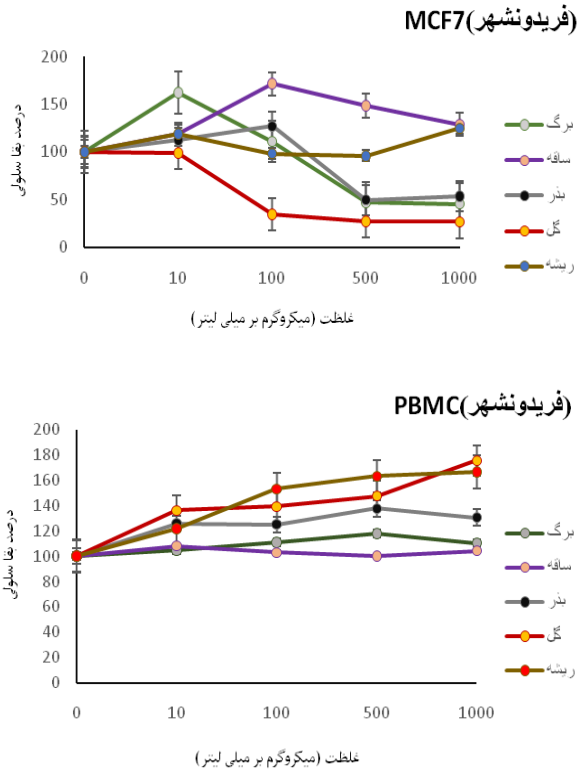
نتایج حاصل از اثر عصاره‌های مختلف کرفس کوهی جمع آوری شده از کوهرنگ نشان داد که هیچکدام از عصاره‌ها دارای اثر سایتوتوکسیتی بر روی سلول‌های MCF7 و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نیستند. تمامی عصاره‌ها در غلظت‌های بالا قادر به افزایش سلول‌های MCF7 تا حد ۱۰-۴۰٪ بودند. CC50 محاسبه شده برای تمام عصاره‌های اثر داده بر روی سلول‌های MCF7 بالاتر از ۱۰۰۰ بود. همچنین این عصاره‌ها در یک روش واسطه به دوز قادر به افزایش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بودند. به طوری که عصاره گل بیشترین اثر و برگ کمترین اثر را بر رشد و تکثیر سلول‌های خون محیطی داشتند.

نتایج حاصل از اثر عصاره اندام‌های مختلف (برگ، ساقه، بذر، گل و ریشه) گیاه کرفس کوهی جمع آوری شده از فریدونشهر بر روی سلول MCF7 نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد بقا سلول ها نیز کاهش می‌یابد، به طوری که کمترین درصد بقا در غلظت ۱۰۰۰ مشاهده شد. مطابق با این نتایج ساقه و ریشه این گیاه دارای کمترین اثر سمیت بر روی سلول‌های MCF7 بود و همچنین گل این گیاه رشد یافته در فریدونشهر دارای بیشترین اثر سمیت بر روی رده سلول‌های سرطانی بود و CC50 محاسبه شده برای عصاره های گل، برگ و بذر اثر داده شده بر روی سلول های MCF7 به ترتیب ۹۷،۸، ۴۸۵،۲ و ۴۹۷،۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود. CC50 برای عصاره‌های ساقه و ریشه بالاتر از ۱۰۰۰ بود. نتایج حاصل از اثر عصاره‌های مختلف بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان این سلول‌ها نیز افزایش می‌یابد، به طوری که عصاره گل و ریشه در غلظت ۱۰۰۰ قادر به افزایش سلول‌ها تا ۶۰-۷۰٪ بودند، ولی عصاره ساقه و برگ هیچ گونه اثر افزایشی بر روی سلول‌های خون محیطی نداشت.





نمودار ۱. میزان سمیت عصاره (برگ، ساقه، بذر، گل و ریشه) کرفس کوهی شهر کوهرنگ برروی رده سلولهایMCF7 و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر. Error Bar نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. (n=۳)



نمودار ۲. میزان سمیت عصاره (برگ، ساقه، بذر، گل و ریشه) کرفس کوهی شهرفریدونشهربر روی رده سلول‌هایMCF7 و سلول-های تک هسته‌ای خون محیطی در غلظتهای ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر. Error Bar نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. (n=۳)

بحث

نتایج حاصل از پژوهش نشان می‌دهد که عصاره متانولی اندام‌های گل، برگ و بذر کرفس کوهی منطقه فریدونشهر دارای خاصیت سیتوتوکسیک بر سلول MCF7 می‌باشند، ولی عصاره تمام اندام های کرفس کوهی منطقه کوهرنگ هیچ گونه اثر سمی بر روی سلول های MCF7 ندارند.

طی تحقیقات سعیدی و همکارانش و همچنین سجادی و همکارانش، کرفس کوهی حاوی ترکیباتی مانند فلاونوئید (لیمونن، میرسن، کامفن، کامفور، ۳-O-متیل اتر و ...)، فرولیک اسید، فتالید (Z-لیگوستئید، ۳-E-بوتیلیدن فتالید، E-لیگوستئید و ...)، کافئیک اسید، ترپنوئید (α-تریپین آل، α-پنین، β-پنین و ...) و ... می باشد (۵،۱۳). سلیمی و همکارانش در ۱۳۸۹ بیان کردند که مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره کرفس کوهی از گروه فتالیدها به ویژه Z-لیگوستئید می‌باشد و کافئیک اسید موجود در این گیاه دارای خواص آنتی اکسیدانی می‌باشد (۱۴). همچنین فتالیدهای یافت شده در عصاره برگ گیاه مهار کننده پروستوگلاندین F2α است که مهارکننده قوی تومورهای سرطانی به ویژه در معده، درمان کننده اپی لپسی، اختلالات کبدی و مهارگر قوی سرطان دهانه رحم می‌باشد (۱۴). αپنین، α تریپین آل، β پنین، لیمونن و میرسن موجود در بذر و گل کرفس کوهی عامل احتمالی مهار رشد سلول‌های سرطان سینه، کبد و ملانوما انسانی می‌باشد (۱۵). Romeilah در ۲۰۰۹، α پنین، α ترپینین ال و لیمونن را عامل احتمالی مهار سلول های NB4 وMCF7 توسط عصاره متانولی مرزنگوش M.hortensis گزارش کرده است (۱۶). تحقیقات نشان داده که عوامل محیطی می‌توانند باعث تغییر در مواد موثره گیاه از جمله فلاونوئید، فتالید و ترپنوئیدها شوند، بنابراین می‌توان تفاوت اثر سمیت گونه‌های بررسی شده در این پروژه را در دو منطقه به تغییر شرایط آب و هوایی نسبت داد (۲).

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که عصاره‌های اندام‌های مختلف کرفس کوهی قادر به افزایش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی می‌باشند. Rui Long و همکارانش طی مطالعه‌ای بیان کردند که ترکیب لیگوستئید با افزایش شاخص طحال و تیموس، افزایش بیگانه خواری ماکروفاژها، افزایش غلظت سرم هموگلوبین، تکثیر لنفوسیت‌های طحال و فعال کردن سلول‌های لنفوسیت T و سلول‌های کشنده طبیعی از بروز سرطان جلوگیری می‌کند (۱۷).

تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر اثر عصاره کرفس کوهی و گیاهان خانواده چتریان بر روی سلول‌های لنفوسیت بیان نشده است. ولی فلاونوئیدهای موجود در گیاهان انگور، هندوانه ابوجهل و جنسینگ قادر به افزایش سلول‌های لنفوسیت هستند. درنتیجه می‌توان اثر تحریک کنندگی سلول‌های خون محیطی را به ترکیباتی مثل کوئرسیتین، ۳-[-متیل اتر و... نسبت داد (۱۹-۱۸).

حیدری و همکاران در ۱۳۹۲ گزارش کردند که عصاره آبی و اتانولی کرفس کوهی دارای اثر بازدارندگی بر روی باکتری‌های *B.cereus*، *L.innocua* و *E.coli* در غلظت‌های بالا می‌باشد. در این مطالعه همچنین مشخص شد که مقدار MIC عصاره آبی و اتانولی برای *B.cereus* و *L.innocua* به ترتیب ۱۶ و ۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر و برای *E.coli* ۳۲ و ۱۶ ملی گرم بر میلی لیتر بود. مقدار MBC عصاره آبی و اتانولی نیز برای *B.cereus*، *L.innocua* به ترتیب ۳۲ و ۱۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر و برای *E.coli* ۶۴ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود (۲۰).

در مطالعه حاضر، اثر ضد سرطانی کرفس به عنوان یکی از اعضای خانواده چتریان بررسی شد تا در تکمیل اطلاعات فارماکولوژیکی بتوان اطلاعات کامل تری از خواص گیاه فراهم آورد.

از یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که کرفس کوهی رویش یافته در فریدون شهر دارای خاصیت ضد سرطانی موثری بر روی رده سلول سطان سینه می‌باشد و گل و برگ این گیاه دارای سمیت بیشتری نسبت به بقیه قسمت‌های گیاه هستند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه کارشناسی رشته زیست فن‌اوری می‌باشد که با مساعدت دانشکده علوم و فن‌اوری‌های نوین دانشگاه اصفهان و کمیته زیست فناوری فرآورده‌های طبیعی انجام گرفته است.

REFERENCES

1.Hamta A, Parvini P. Study of cytotoxic effects of Taxol and Rosemary extracts on cancerous cells derived from DMBA-induced breast cancer in SD rats. J Cell Tissue 2011; 2: 117-26.

2.Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M . In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five Artemisia species . RPS 2014;9:91-96.

3.Hoffman E, ed. Cancer and the search for selective biochemical inhibitors. New York: CRC Press; 2010. P.95-97.

4.Mozaffarian V. Two new Genera of Iranian umbelliferae. Botanical J 2003; 88: 88-94.

5.Sajjadi SE, Shokoohinia Y, Moayedi NS. Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of *Kelussia odoratissima Mozaff*. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2012;7:159-62.

6.Haj Hashemi V, Ghannadi A, Soltani L. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Amirkabiria odoratissima.* Res Med Sci 2003; 7: 121-25.

7.Rabbani M, Sajjadi SE, Sadeghi M. Chemical composition of the essential oil from *Kelussia odoratissima Mozaff* and the evaluation of its sedative and anxiolytic effects in mice. Clinics 2011; 66: 843-48.

8.Asgari S, Naderi G, Jaafarian A, Asgarian N. Evalution of fibrinolytic effect of *Kelussia odoratissima Mozaff.* J Med Plants 2006; 4: 19-25.

9.Shahrani M, Rafian M, Pilevarian A, Shirzad H, Hashemzade Chaleshtori M, Yosefi H, et al. The effect of *Amirkabiria odoratissima* extract on gastric acid and pepsin secretion level in rat. Shahrekord Univ Med Sci J 2007;8:88–95.

10.Rogani M, Baluch Nejad T, Ramezani M. Evaluation of chronic oral administration effect of aerial part of *Kelussia odoratissima Mozaff* on learning and memory in diabetic Wistar rats. J Med Plants 2008; 7: 98-105.

11.Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima Mozaff* in model and food systems. Food Chemistr 2007; 105: 57-64.

12.Tian B, Wang Z, Zhao Y, Wang D, Wang D, Li Y, Ma L, et al. Effects of curcomin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. Cancer Lett 2008: 264: 299-308.

13.Saeedi KA, Omidbaigi R. Chemical characteristics of the seed of Iranian endemic plant *Kelussia odoratissima Mozaff.* Chemistry of Natural Compounds 2009; 4: 547-913.

14. Salimi M, Ebrahimi A, Saei-Dehkordi SS, Shojaei Z. Extraction and identification of chemical composition of *Klussia odoritissima* Mozaff. Iranian J of Med and Arom Plants 2010;6: 147-56.

15. Jahantab E, Sepehri A, Barani H, Qasemi Aryan Y, Farajolahi A, Moghiminejad F. An introduction on the ndangered medicinal species of Mountain's Kelavs (*Kelussia Odoratissima* Mozaff.) J of Rangeland Sci 2011;2:409-415.

16.Romeilal RM. Anticancer and antioxidant activities of *Matricaria chamomilla* l. and *Marjorana hortensis* essential oil. Research Journal of Medicine and Medical Sciences 2009; 4: 332-39.

17.Long R, Yang F, Du JR, Qian ZM, Wang Ch, Chen Ch. Effects of ligustilide on tumor growth and immune function in institute of cancer research mice. Trop J Pharmaceut 2012; 11: 421-28.

18.Saedi Z, Behbahani M. Evaluation of methanol extracts activity of seed, skin, leaf and juice from five Iranian grape cultivars on lymphocyte proliferation. Pejouhesh 2014; 37: 200-204. [In Persian]

19.Shan BE, Yoshida Y, Sugiura T, Yamashita U. Stimulating activity of Chinese medicinal herbs on human lymphocytes in vitro. Int J Immunopharmacol 1999; 21: 149-59.

20.Sureshjani MH, Yazdi FT, Mortazavi SA, Behbahani BA, Shahidi F. Antimicrobial effects of Kelussia odoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria in vitro. J Paramed Sci 2014;5:115-20.