

Anti-tumor effects of *salvia atropatana* Alcoholic extract on subcutaneous colorectal carcinoma CT26 in Balb/c mouse

Hoda Radmanesh, Maryam Tehranipour*, Nasaran Amintaheri

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

(Received: 2019/07/15

Accepted: 2020/07/28)

Abstract

Background: Angiogenesis is an essential step in transmitting tumors from dormant to malignant. The use of some angiogenesis inhibitors can be effective in treating cancer. Some changes in cancer cells can be treated with plant extracts. Azerbaijanis belong to the mint family. *Salvia* species have been used in traditional Iranian medicine and in some other countries against various infections, inflammatory diseases, and cancer. The aim of the present study was to determine the anti-tumor effects of Maryam Goli Azerbaijani extract on colorectal 26 CT subcutaneous cancer in Balb / c mice.

Materials and Methods: In the current experimental study, 26 CT cells were injected to the right side of 18 Balb / c mice to induce colon carcinoma. When the size of the tumor became (350 ± 50) mm cubic meters, 18 mice were randomly divided into 3 groups, each group consisting of 6 mice: controls and alcoholic extracts were injected with 50 and 100 mg/kg. The group containing the aqueous extracts of the Azerbaijani Sage herb was injected on a daily basis for 14 days. To monitor the therapeutic effects, the parameters of the stopping rate in the growth of the tumor, the relative volume changes, and the doubling of tumor volume were evaluated. After sacrificing the animals at the end the 14th day, tumors were dissected for histological study. Data were analyzed using frequency distribution, mean, and standard deviation tables. The normality of quantitative variables was examined using the Kolmogorov-Smirnov method (KS test) and to determine the difference between different groups, I-Whitney test was run in SPSS, v.16. Also, the graphs were plotted using Excel 2007.

Findings: Alcoholic extract *Salvia atropatana* reduced average relative size of tumors in the treatment group dose 50 mg/kg from 1468 ± 78 to 900 ± 34 and the average relative size of the tumor at a dose of 100 mg/kg from 1468 ± 78 to 492 ± 78 compared with the control group. Also, alcoholic extract with a dose of 100 mg / kg had the greatest effect. On the 14th day of treatment, there was a significant decrease in the mean tumor volume compared with the control group in the therapeutic group receiving alcohol extract with a dose of 50 mg / kg ($P < 0.01$) and in the treatment group receiving the alcohol extract with a dose of 100 mg/kg ($P < 0.001$).

Conclusion: It seems that the alcoholic extract of *Salvia atropatana* has an anti-angiogenesis activity and a significant inhibitory effect on tumor growth.

Keywords: *salvia atropatana*; Cells CT26; Angiogenesis Tumor growth; Alcoholic extract

* Corresponding author: Maryam Tehranipour

Email: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

آثار ضد توموری عصاره الکلی گیاه *Salvia atropatana* بر مدل زیر جلدی کارسینومای کولون CT26 در موش Balb/c

هدی رادمش، مریم طهرانی پور*، نسترن امین طاهری

گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۵/۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۴/۲۴

چکیده:

سابقه و هدف: آنژیوژنز گامی اساسی در انتقال تومورها از حالت خفته به بدخیم است. استفاده از بعضی فاکتورهای مهارکننده آنژیوژن می‌تواند برای درمان سرطان موثر باشد. بعضی از تغییرهای رخ داده در سلول‌های سرطانی می‌تواند با استفاده از عصاره‌های گیاهی، بهبود یافته و درمان شود. گیاه مریم گلی آذربایجانی متعلق به خانواده نعناست. گونه‌های سالویا در طب سنتی ایران و در برخی دیگر از کشورها علیه عفونت‌های مختلف، درمان بیماری‌های التهابی و سرطان به کار می‌رفته است. هدف از این مطالعه تعیین آثار ضد توموری عصاره الکلی مریم گلی آذربایجانی بر مدل سرطان کولورکتال CT26 زیر جلدی در موش Balb/c است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ابتدا سلول‌های CT26 به پهلوی راست ۱۸ سر موش Balb/c برای القای کارسینومای کولون تزریق شد. زمانی که اندازه تومور به (50 ± 350) میلی‌مترمکعب رسید، ۱۸ سر موش به طور اتفاقی به ۳ گروه تقسیم شدند (هر گروه شامل ۶ موش) این گروه‌ها شامل گروه کنترل، عصاره‌های الکلی به تفکیک هر یک با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تجویز شد. گروه حاوی عصاره‌های الکلی گیاه مریم گلی آذربایجانی روزانه به مدت ۱۴ روز تزریق شدند. برای پیگیری آثار درمانی، پارامترهای میزان توقف در رشد تومور، تغییرهای حجم نسبی و زمان دوبرابر شدن حجم تومورها ارزیابی شدند. پس از کشتن حیوان‌ها در پایان روز چهاردهم، تومورها برای بررسی‌های بافت‌شناسی، اتوپسی شدند. داده‌ها با استفاده از جدول‌های توزیع فراوانی، میانگین و انحراف معیار توصیف شد. نرمالیتی متغیرهای کمی با استفاده از روش کولوگراف - اسمیرنوف (K-S test) و برای تعیین اختلاف معناداری بین گروه‌های مختلف از آزمون من - ویتنی توسط نرم‌افزار آماری (SPSS V. 16) آزمون شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ رسم شد.

یافته‌ها: عصاره الکلی گیاه *Salvia atropatana* میانگین حجم نسبی تومور را در گروه درمانی با دوز ۵۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل از 8641 ± 63 به 43 ± 009 و میانگین حجم نسبی تومور را در دوز ۱۰۰ mg/kg از 8641 ± 63 به 294 ± 87 کاهش داد. همچنین عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشترین تأثیر را داشته است. به طوری که در روز چهاردهم درمان کاهش معناداری در میانگین حجم تومورها نسبت به گروه کنترل درگروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg ($P < 0.01$) و در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg ($P < 0.001$) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که عصاره الکلی گیاه *Salvia atropatana*، فعالیت آنتی آنژیوژنز و آثار مهارکنندگی قابل توجهی علیه رشد تومور نشان دادند.

واژگان کلیدی: مریم گلی، سلول‌های CT26، آنژیوژنز، رشد تومور، عصاره الکلی.

مقدمه

نئوپلاسم‌هاست (۱). آپوپتوز کلمه‌ای یونانی و به معنی برگ‌ریزان است. اغلب منابع دو واژه آپوپتوز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را مترادف هم به کار برده، عده‌ای دیگر نیز آپوپتوز را مهم‌ترین نوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی قلمداد کرده‌اند (۲). واژه آنژیوژنز به معنی ایجاد مویرگ‌های جدید از عروق موجود برای نخستین بار توسط محقق به نام هرتیگ در سال ۱۹۳۵ به کار

سرطان از مهم‌ترین علل مرگ و میر در جهان و سومین دلیل مرگ در کشور ایران است که روند آن رو به افزایش است. آن چه حتی از میزان مرگ و میر نیز دردناک‌تر است، رنج عاطفی و جسمانی تحمیل شده توسط این

نویسنده مسئول: دکتر مریم طهرانی پور

پست الکترونیک: maryam_tehrani@shdau.ac.ir

سایه، برگ گیاه مریم گلی آذربایجانی توسط دستگاه خردکننده آسیاب و پودر آن تا زمان عصاره‌گیری در جای خشک و خنک نگهداری شد. برای تهیه عصاره الکلی ابتدا ۵۰ گرم پودر گیاه مریم گلی آذربایجانی را داخل کاغذ مخصوص کارتوش ریخته و به همراه ۴۵۰ سی سی اتانول مطلق به عنوان حلال در دستگاه سوکسله با حرارت (۴۵-۵۰) درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، عمل عصاره‌گیری دو روز متوالی صبح تا شب به طول انجامید. بعد از عمل عصاره‌گیری برای حذف حلال به مدت ۹۸ ساعت در انکوباتور با دمای قرار داده شد. پس از حذف حلال عصاره خالص به دست آمد که میزان عصاره الکلی (۱۴/۱ گرم) با بازده (۲۸/۲ درصد) بود. این عصاره را می‌توان برای مدت‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

مواد استفاده شده برای مطالعه‌های سلولی:

رده سلولی CT۲۶ از انستیتو پاستور ایران تهیه و به میزان لازم تکثیر شد (۴). این رده سلولی دیفرانسیه نشده کارسینومهای کولون، نخستین بار با استفاده از N نیترو N متیل اورتال در کولون موش Balb/c ایجاد و سپس رده خالص آن استخراج شده است (۱۳). در این تحقیق، محیط کشت کامل و آماده از RPMI ۱۶۴۰ تهیه شد. برای کندن سلول‌ها از کف فلاسک‌های کشت از محلول تریپسین - EDTA آماده، ساخته شرکت بیوژن استفاده شد (۱۳). برای تعیین تراکم سلولی و درصد بقای سلول‌های تریپسینه شده تریپان بلو آماده، استفاده شد (۱۲). برای فریز کردن سلول‌ها از (دی متیل سولفوکساید) آماده استفاده شد (۱۳).

ایجاد تومور در موش‌های Balb/c

زمانی که سلول‌ها به صورت تک لایه کامل سطح فلاسک را می‌پوشاندند، سلول‌ها تریپسینه شده و پس از سه بار شست‌وشو، تعداد سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده به روش تریپان بلو و با استفاده از لام نتو بار تعیین شد. سپس به هر موش، تعداد 1×10^6 سلول CT ۲۶ در حجم ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی تزریق شد. تزریق به صورت زیر جلدی در پهلوی راست حیوان انجام شد. قبل از آن حیوان‌ها با تزریق داخل صفاقی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم زایلازین (شرکت دارویی بهیار سامان، XY 2% lazine) و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کتامین (Rotex medica GmBH) بیهوش شدند (۱۳).

شرایط درمان:

برای تزریق دوز درمانی لازم بود وزن موش محاسبه شود. از این رو وزن موش‌ها هر روز قبل از تزریق روزانه دوز درمانی توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. تزریق دوزهای درمانی به صورت داخل صفاقی هر روز و طی ۱۴ روز انجام شده (دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم عصاره الکلی). به گروه کنترل نیز روزانه (۰/۳ سی سی) سرم فیزیولوژی به همان میزان که گروه‌های درمانی دریافت کرده بودند تزریق شد.

روزانه قبل از عمل تزریق، ابعاد تومور گروه‌های درمانی و گروه کنترل با کولیس اندازه‌گیری شد تا تغییرهای حجم تومور در دوره درمانی مشخص ارزیابی شود (۱۳).

ارزیابی حجم تومورها:

برای ارزیابی حجم تومورها قبل و بعد از درمان، روزانه اندازه‌گیری ابعاد تومور با کولیس با دقت (۰/۲ میلی متر) انجام شد. قطر بزرگ (a)، قطر کوچک (b) و ضخامت تومورها (c) در نظر گرفته شده و با استفاده از رابطه (۲)، حجم تومورها (V) محاسبه شد. برای کاهش خطا، اندازه‌گیری اقطار سه بار انجام و میانگین گزارش شد (خطای زیر ۵ درصد مورد قبول است).

$$V = \pi / 6 (a.b.c)$$

(رابطه ۲)

برای مقایسه نهایی، نخستین روز درمان روز صفر در نظر گرفته شد و حجم

رفت (۳). آنژیوژنز یا رگ‌زایی، به معنی تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق اولیه است که در حالت‌های مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز، آتریت روماتوئید و همچنین در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشدنمو ارگان، ترمیم زخم و تولید مثل دخالت دارد. اساساً آنژیوژنز یک فرآیند لازم در فیزیولوژی طبیعی است و در صورتی که تعادل بین فاکتورهای القا کننده و مهار کننده آنژیوژنز بر هم خورد، شرایط برای بروز برخی بیماری‌ها به وجود می‌آید (۴). پولیپ، توده‌ای است که به داخل مجرای روده برجسته شده، ممکن است در اثر کشش ساقه‌دار، یا به اصطلاح پرنکوله شود و یا اینکه پولیپ Sessile باشد، یعنی ساقه مشخصی نداشته باشد (۳). امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی به دلیل نداشتن آثار جانبی بر بافت‌های سالم راه درمانی مناسبی برای بسیاری از بیماری‌هاست. امید است روزی بتوان با استفاده از عصاره‌های طبیعی از پیشرفت روند سرطان در افراد جلوگیری کرد (۵). گیاه مریم گلی آذربایجانی گیاهی علفی و چند ساله از خانواده نعنائیان است. ظاهری پر شاخه دارد و ارتفاع آن ۳۰ تا ۶۰ سانتی متر است (۶). این گیاه از روزگاران کهن مورد توجه خاص بوده و ابتدا به عنوان داروی مؤثر برای معالجه عوارض نیش حشرات، به عنوان ضد سم و همچنین داروی تونیک و مقوی برای تقویت روح و بدن و افزایش طول عمر به کار می‌رفته است. گونه‌های مختلف جنس سالویا نشان داده‌است که دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچی، ضد توموری، آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی بوده است (۷). از گل‌های آن نیز در سالاد و برگ آن برای تهیه چای که خاصیت ضد عفونی کننده و متعادل کننده خون را دارد، استفاده می‌شود. همچنین به واسطه وجود برخی ترکیب‌ها نظیر توجن، سینئول و کامفر که خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانتی و به احتمال ضد سرطانی دارند، در صنایع داروسازی از اسانس مریم گلی استفاده می‌شود (۸). ترکیب‌ها و یا اجزای اصلی تشکیل‌دهنده مهم این جنس، اسانس‌ها، دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپنوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، رزین، ساپونین‌ها و فنول‌ها هستند. به علاوه، ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده گونه‌های سالویانولیک اسید است (۹،۱۰). سالوینال، ترکیب جدا شده از دانشن، *Salvia miltirrhiza* بازدارنده تشکیل میکروتوبول و داروی فعالیت ضد میتوزی در سلول‌های سرطانی است، روی رشد سلول سرطانی فعالیت بازدارندگی نشان داده و در سلول‌های سرطانی انسان، مرگ سلولی را ایجاد می‌کند. سالوینال شاید در درمان سرطان‌های انسان مفید باشد به خصوص در بیماری‌هایی که به دارو مقاوم هستند. بنابراین سالوینال می‌تواند به عنوان عامل دپلی‌مریزاسیون میکروتوبول شناخته شود و در درمان انواع سرطان مانند سرطان سینه، مثانه، سر و گردن به کار می‌رود (۱۱). از آن جا که گیاه مریم گلی سابقه طولانی در مصرف پزشکی داشته و ترکیب‌های عمده آن آثار فارماکولوژیکی بی‌نظیری مانند آثار آنتی‌توموریک، آنتی‌دیابتیک، آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانتی و... داشته و باتوجه به اینکه تأثیر سمیت سلولی بعضی از گونه‌های مریم گلی بر بعضی از رده‌های سلول‌های سرطانی گزارش شده است و باتوجه به آثار ضد توموری این گیاه به صورت *in vivo* بررسی نشده، بنابراین بر آن شدیم تا آثار این گیاه را در سلول‌های دیسپلاستیک در مدل تجربی کارسینوم کولون بررسی کنیم. بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی آثار ضد توموری عصاره الکلی گیاه *Salvia atropatana* بر مدل زیرجلدی کارسینومای کولون CT۲۶ در موش Balb/c است که در دانشگاه آزاد مشهد در سال ۱۳۹۰ انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۱۸ سر موش نر Balb/c با وزن (۲۲-۲۰ گرم) استفاده شد. این حیوان‌ها از انستیتو پاستور تهران خریداری و در شرایط یکسان و استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوان‌های دانشکده علوم پایه واحد مشهد نگهداری شدند. هنگام آزمایش، حیوان‌ها به آب و غذای کافی دسترسی داشتند و غذای این حیوان‌ها نیز از شرکت جوانه خراسان تهیه شد. گیاه مریم گلی آذربایجانی از اطراف بجنورد جمع‌آوری و توسط مرکز هرباریوم دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد مشهد به شماره هرباریومی ۹۱۸۴ تأیید شد. پس از خشک کردن گیاه در

مساحت $A =$ از مساحت مربعی با اضلاع دو سانت متر به دست می آید، ابتدا لازم است درشت نمایی کل با استفاده از لام میکرومتری محاسبه شود: درشت نمایی کل که با استفاده از لام میکرومتری به دست می آید برابر با ۵۰۰ است.

$$(رابطه ۶) \quad A = (\text{درشت نمایی کل} / \text{هر ضلع مربع})^2$$

$$A = \left(\frac{2.0 \text{ mm}}{500} \right)^2 = 0.0016 = 16 \times 10^{-4} \text{ (mm}^2\text{)}$$

عدد به دست آمده A همان مساحت فریم مربعی با اضلاع دو سانتی متر است که تعداد مقاطع عروقی روی صفحه مانیتور، در آن شمارش شده است. با توجه به تعداد تصاویر تهیه شده و عروق شمارش شده در فریم مربعی، میانگین مقاطع عروقی محاسبه شده و در فرمول بالا به عنوان Q گذاشته می شود و بدین طریق می توان تراکم مویرگی را در واحد سطح، در بافت تومور گروه های تیمار متفاوت و در گروه کنترل به دست آورد.

تحلیل آماری داده ها با استفاده از جداول توزیع فراوانی، میانگین و انحراف معیار توصیف شد و حجم نسبی، درصد تغییر حجم نسبی، درصد توقف تومورها و زمان دو برابر شدن حجم تومورها در هر گروه با سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شد. نرمالیتی متغیرهای کمی با استفاده از روش کولموگراف - اسمیرنوف (K-S test) و برای تعیین اختلاف معناداری بین گروه های مختلف از آزمون من - وینتی توسط نرم افزار آماری (SPSS V ۱۶) آزمون و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ۲۰۰۷ رسم شد. هنگامی که حجم تومورها به حدود (۳۵۰+۵۰) میلی متر مکعب رسید، حیوان ها به طور تصادفی در گروه های درمانی مختلف و گروه کنترل قرار گرفتند. در دوره درمان که ۱۴ روز بود، اندازه حجم تومورها از طریق اندازه گیری با کولیس (دقت ۰/۰۲ میلی متر) مشخص شد.

برای بررسی روند رشد تومورها در گروه های مختلف درمانی و گروه کنترل، نتایج درمان ها از چند دیدگاه بررسی شدند:

- اندازه حجم تومورها (V)

- حجم نسبی تومورها (RV)

- درصد تغییر حجم نسبی تومورها (%RV)

- درصد توقف رشد تومورها (%IR)

- زمان ۲ برابر شدن حجم تومورها (T_2)

متغیرهای اندازه حجم تومورها و حجم نسبی تومورها در ۱۴ روز دوره درمان در روز هفتم و چهاردهم درمان بین گروه های درمانی نسبت به گروه کنترل مقایسه شد. همچنین درصد تغییر حجم نسبی تومور و درصد توقف رشد تومورها در ۱۴ روز درمان بین گروه های درمانی و گروه کنترل مقایسه شد. برای تخمین زمان دو برابر شدن حجم تومورها برای هر موش از گروه کنترل و گروه های درمانی تابعی منطبق بر زمان دو برابر شدن حجم تومورها نسبت به تغییر حجم نسبی آن ها برآورد شد.

برای مقایسه حجم تومورها و حجم نسبی و درصد تغییرهای حجم نسبی تومورها بین گروه های درمانی و گروه کنترل و همچنین برای مقایسه درصد توقف رشد تومور بین گروه های مختلف درمانی، در ۱۴ روز ابتدا توسط آزمون کولموگراف - اسمیرنوف مشخص شد که متغیر دارای توزیع غیر نرمال است. سپس مقایسه دو گروهی از آزمون من - وینتی از سری آزمون های غیر پارامتریک استفاده شد. همچنین با توجه به اینکه آنژیوژن عامل مهمی در رشد تومور بوده و به تغذیه، تکثیر و گسترش بافت تومور کمک می کند، برای بررسی تغییرهای آنژیوژن در بافت تومور در گروه های تحت درمان نسبت به گروه کنترل دانسیته تعداد عروق در واحد سطح (Ln) در بافت توموری گروه های مختلف محاسبه شد.

یافته ها

دانسیته تعداد عروق در واحد سطح شاخص مناسبی برای ارزیابی روند آنژیوژن در گروه های درمانی نسبت به گروه کنترل است. برای مقایسه دانسیته تعداد عروق در واحد سطح، در گروه های درمانی نسبت به گروه کنترل از آزمون ANOVA استفاده شد.

نتایج حاصل از اندازه حجم تومورها در گروه های مختلف آزمایش شده در نمودار ۱ و ۲ آمده است.

تومورها نسبت به حجم آن ها در روز صفر تعیین شد. با استفاده از حجم تومور در روزهای مورد بررسی؛ تغییر نسبی حجم تومور (RV) و درصد تغییرهای حجم نسبی تومورها (RV درصد) از رابطه زیر به دست آمد (۱۴).

$$(۳) \quad RV = V/V_0$$

$$(۴) \quad \%RV = [(V - V_0)/V_0] \times 100$$

که در این رابطه، V_0 و V حجم تومور به ترتیب در روزهای پس از درمان و روز شروع درمان هستند (۲۳).

پارامتر درصد توقف در رشد تومور (IR)، میزان موفقیت پروتکل درمانی در گروه های مختلف در روند کاهش رشد تومورها در روزهای متوالی پس از درمان را نسبت به گروه کنترل مطابق رابطه (۵-۲) نشان می دهد (۱۵).

$$(۵) \quad IR = [(V_{\text{control}} - V_{\text{treated}}) / V_{\text{control}}] \times 100$$

که در این رابطه حجم V_{control} ، حجم نرمالیزه شده در همان روز در گروه کنترل است و V_{treated} ، نشان دهنده حجم نرمالیزه شده تومور مورد نظر در گروه مورد نظر پس از درمان است.

پس از آن که حجم تومورها به (۵۰ - ۳۵۰) میلی متر مکعب رسید. حیوان ها به طور تصادفی در سه گروه، هر گروه شامل (۶ سر) موش گروه بندی شدند که دو گروه (گروه درمانی یا تیمار) را تشکیل می دهند و گروه پنجم گروه کنترل را شامل شد که به شرح زیر است.

- گروه کنترل که فقط تومور در آن القا شده بود: شامل ۶ سر موش Balb/c
- گروه تیمار الکلی A (عصاره الکلی گیاه با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم): شامل ۶ سر موش Balb/c
- گروه تیمار الکلی B (عصاره الکلی گیاه با دوز ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم): شامل ۶ سر موش Balb/c

روش نمونه برداری:

پس از اتمام دوره درمان، حیوان در معرض بیهوشی قرار گرفت. سپس روی تشک تشریح قرار داده شد و از ناحیه پهلوی راست حیوان به فاصله یک سانتی متری از لبه های تومور، پوست همراه با تمامی ضایعات به طور کامل برداشته شد. سپس حیوان در قفس نگه داری و برای آزمون پیش تست بعدی استفاده شد. سپس تومور از آن جدا شد و از قسمت های سطحی و عمقی تومور برش های متعددی به اندازه (۸ میلی متر) تهیه شده، نمونه ها برای جلوگیری از اتولیز بافت ها و پایدار شدن هر چه بیشتر آن ها در وضع طبیعی و سهولت رنگ آمیزی و سخت شدن ثابت شدند. بدین منظور نمونه ها در محلول فرمالین بافری ۱۰ درصد (Merk)، به میزان حدود ۱۰ برابر حجم نمونه ها قرار گرفت. هر شیشه مختص یک نمونه بود و مشخصات تومور روی شیشه درج شد.

پس از طی مراحل پاساژ بافتی از بافت برش های ساژیتال سریال چهار میکرونی تهیه و با همتاکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شد. پس از اتمام مراحل رنگ آمیزی و خشک شدن چسب، تصاویر مربوط به هر نمونه بافتی با استفاده از دوربین دیجیتال که لنز آن روی بزرگنمایی ۴ تنظیم شد، تهیه شد. تصاویر با عدسی ۴۰ از برش های مناسب هر لام تهیه شد. تصاویر روی مانیتور کامپیوتر بررسی شد، فریم مربعی با اضلاع دو سانتی متر روی تصویر سطح مقطع مورد نظر به صورت تصادفی قرار گرفت. تعداد مویرگ های داخل فریم با مجموع نصف تعداد مویرگ هایی که بر روی اضلاع قرار داشتند، شمارش و به صورت تعداد کل مویرگ های مقطع محاسبه شدند (۵۹).

مرحله شمارش مویرگ ها و رگ ها:

تخمین دانسیته تراکم عروق

برای تخمین دانسیته تراکم عروق در واحد سطح از فرمول زیر استفاده شد (۱۶):

$$(رابطه ۵) \quad Ln = 2QA$$

Ln = دانسیته تعداد عروق در واحد سطح را نشان می دهد.

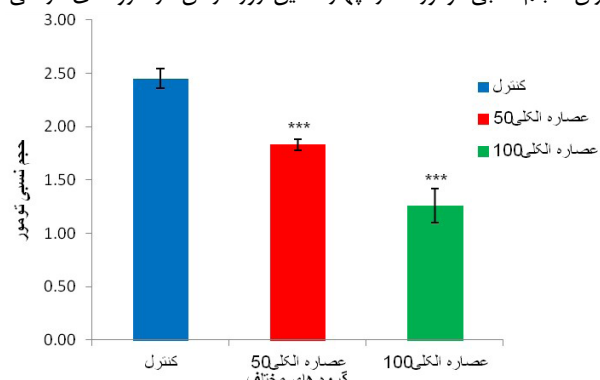
Q = تعداد مقاطع عروق در مساحت A را نشان می دهد.

زیر آورده شده است.

میزان حجم نسبی تومورها در هفتمین روز درمان در گروه‌های درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg و گروه کنترل در نمودار (۳) نشان داده شده است. طبق این نمودار در روز هفتم درمان حجم نسبی تومورها در گروه‌های درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg کاهش پیدا کرده است و گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg کاهش حجم بیشتری نسبت به گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg داشته است.

آزمون آماری نشان می‌دهد که در روز هفتم درمان کاهش معناداری در میانگین حجم نسبی تومورها نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg ($P < 0.001$) و گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg ($P < 0.001$) مشاهده می‌شود.

میزان حجم نسبی تومورها در چهاردهمین روز درمان در گروه‌های درمانی



نمودار (۳): حجم نسبی تومورها (RV) در روز هفتم پس از درمان (عصاره الکلی) بر حسب گروه‌ها

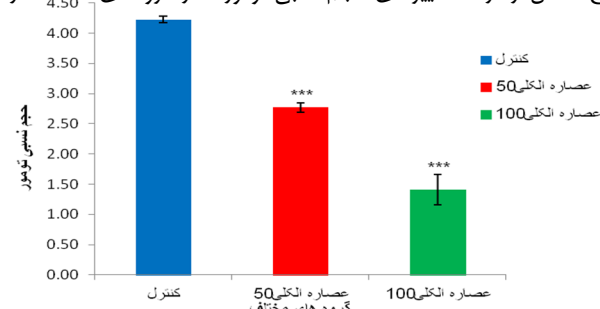
*** $P < 0.001$

دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg و گروه کنترل در نمودار (۴) نشان داده شده است. طبق این نمودار در روز چهاردهم درمان حجم نسبی تومورها در گروه‌های درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده است و گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg کاهش حجم بیشتری نسبت به گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg داشته است.

آزمون آماری نشان می‌دهد که در روز چهاردهم درمان، کاهش معناداری در میانگین حجم نسبی تومورها نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg ($P < 0.001$) و عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg ($P < 0.001$) مشاهده می‌شود.

با استفاده از K-S Test مشخص شد که حجم نسبی تومورها در دوره درمان دارای توزیع غیرنرمال هستند و با استفاده از آزمون من - ویتنی حجم نسبی بین گروه‌های مختلف به صورت دو به دو پس از دو هفته دوره درمان مقایسه شد. نتایج آزمون من ویتنی کاهش معناداری را در میانگین حجم نسبی تومورها نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی A ($P < 0.001$) و گروه درمانی B ($P < 0.001$) نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از درصد تغییرهای حجم نسبی تومورها در گروه‌های مختلف در



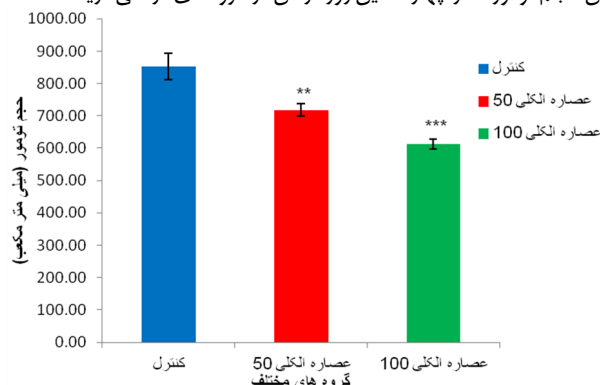
نمودار (۴): حجم نسبی تومورها (RV) در روز چهاردهم پس از درمان (عصاره الکلی) بر حسب گروه‌ها

*** $P < 0.001$

میزان حجم تومورها در هفتمین روز درمان در گروه‌های درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg و گروه کنترل در نمودار (۱) نشان داده شده است. طبق این نمودار در روز هفتم درمان حجم تومورها در گروه‌های درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده است و گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg کاهش حجم بیشتری نسبت به گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg داشته است.

آزمون آماری نشان می‌دهد که در روز هفتم درمان، کاهش معناداری در میانگین حجم تومورها نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg ($P < 0.001$) و در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg ($P < 0.001$) مشاهده می‌شود.

میزان حجم تومورها در چهاردهمین روز درمان در گروه‌های درمانی دریافت‌کننده



نمودار (۱) حجم تومورها (V) در روز هفتم بر حسب گروه‌ها

*** $P < 0.001$ و ** $P < 0.01$

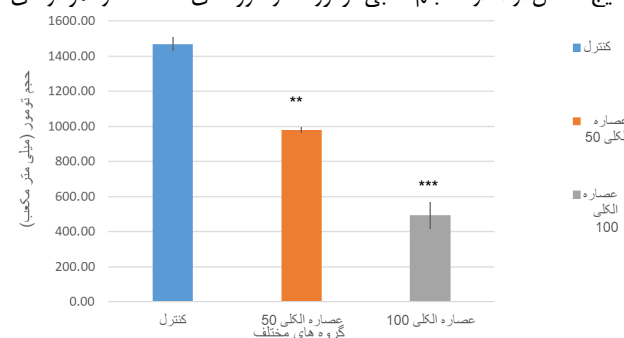
عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg و گروه کنترل در نمودار (۲) نشان داده شده است. طبق این نمودار در روز چهاردهم درمان، حجم تومورها در گروه‌های درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده است و گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg کاهش حجم بیشتری نسبت به گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg داشته است.

آزمون آماری نشان می‌دهد که در روز چهاردهم درمان، کاهش معناداری در میانگین حجم تومورها نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg ($P < 0.001$) و در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg ($P < 0.001$) مشاهده می‌شود.

با استفاده از K-Stest مشخص شد که حجم تومورها در دوره درمان دارای توزیع غیرنرمال هستند و با استفاده از آزمون من - ویتنی حجم تومور بین گروه‌های مختلف به صورت دو به دو پس از دو هفته دوره درمان مقایسه شد.

نتایج آزمون من - ویتنی کاهش معناداری را در میانگین حجم تومورها نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی A ($P < 0.001$) و گروه درمانی B ($P < 0.001$) نشان می‌دهد.

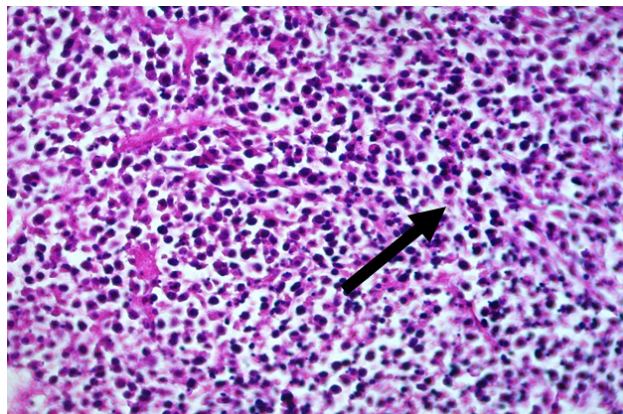
نتایج حاصل از اندازه حجم نسبی تومورها در گروه‌های مختلف در نمودارهای



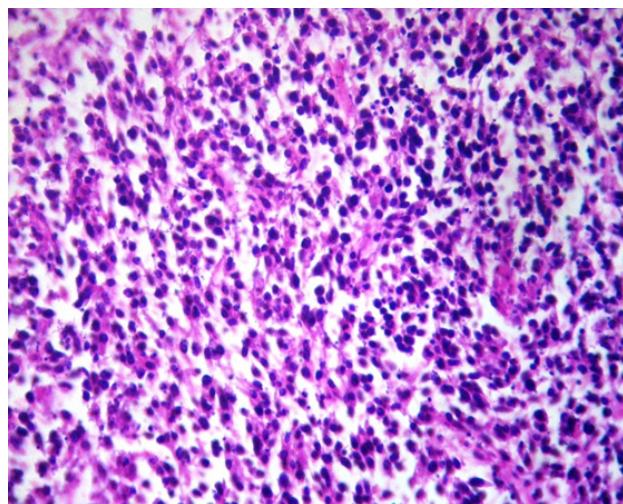
نمودار (۲): حجم تومورها (V) در روز چهاردهم بر حسب گروه‌ها

نتایج هیستولوژیک:

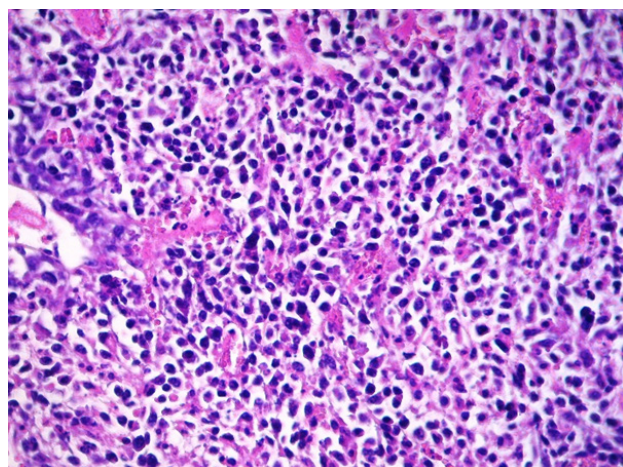
شکل (۱) تا شکل (۳) عکس‌های مربوط به برش‌های بافتی نمونه‌های گروه کنترل و گروه‌های درمانی مختلف است. عکسهای گروه‌های درمانی کاهش تراکم سلول‌ها و مقاطع عروق، نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد.



شکل ۱: برش بافتی سرطانی کولورکتال زیر پوستی در گروه کنترل، فلش رگ خونی را نشان می‌دهد (درشت‌نمایی ۱۶۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین)



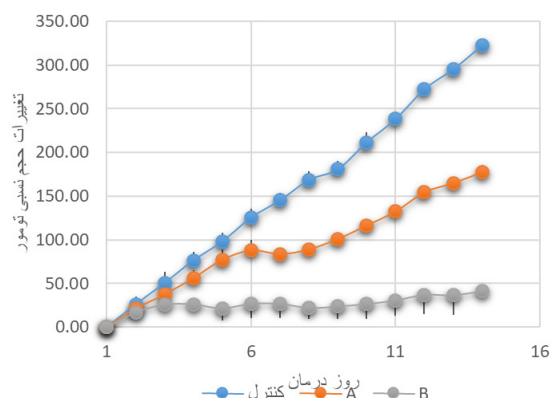
شکل ۳: برش بافتی سرطانی کولورکتال زیر پوستی در گروه درمانی عصاره الکلی با دوز ۵۰ میلی گرم / کیلوگرم، فلش رگ خونی را نشان می‌دهد (درشت‌نمایی ۱۶۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین)



شکل ۴: برش بافتی سرطانی کولورکتال زیر پوستی در گروه درمانی عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ میلی گرم / کیلوگرم، فلش رگ خونی را نشان می‌دهد (درشت‌نمایی ۱۶۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین)

نمودارهای زیر آمده است. میزان درصد تغییرهای حجم نسبی در دوره درمان در گروه‌های درمانی و گروه کنترل در نمودار (۵) نشان داده شده است. طبق این نمودار در دوره درمان تغییرهای حجم نسبی تومورها در گروه‌های درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی نسبت به گروه کنترل کاهش حجم داشته است. گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg کاهش حجم بیشتری نسبت به گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg داشته است. با استفاده از K-SteSt مشخص شد که درصد تغییرهای حجم نسبی تومورها در دوره درمان دارای توزیع غیر نرمال هستند و با استفاده از آزمون من - ویتنی درصد تغییرها، حجم سنی بین گروه‌های مختلف به صورت دو به دو پس از دو هفته دوره درمان مقایسه شد.

نتایج آزمون من - ویتنی کاهش معناداری را در میانگین تغییرهای حجم نسبی تومورها نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی A ($P < 0.01$) و گروه درمانی B ($P < 0.001$) نشان می‌دهد.

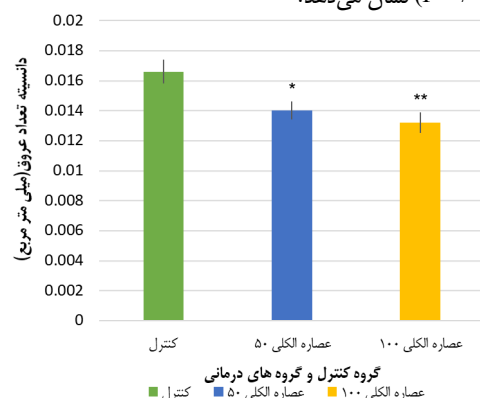


نمودار (۵): درصد تغییر حجم نسبی تومورها (%RV) در طی چهارده روز دوره درمان بر حسب گروه‌ها

نتایج آنژیوژنز:

مویرگ‌های شمارش شده ($Q\Sigma$) و محاسبه دانسیته تراکم عروق (Ln) در گروه کنترل آورده شده است. در هر نمونه ۲۴ بار شمارش از قسمت‌های متعدد بافت تومور انجام شده است.

میزان دانسیته تعداد عروق در گروه کنترل و گروه‌های درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg در نمودار (۶) نشان داده شده است. طبق این نمودار دانسیته تعداد عروق در واحد سطح در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg کاهش بیشتری نسبت به گروه کنترل داشته است. نتیجه تست ANOVA کاهش معناداری را در میانگین دانسیته تعداد عروق در واحد سطح نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg ($P < 0.05$) و گروه درمانی دریافت‌کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg ($P < 0.01$) نشان می‌دهد.



نمودار (۶): دانسیته تعداد عروق در واحد سطح (Ln) بر حسب گروه‌ها

بحث

عصاره الکلی گیاه *Salvia atropatana* میانگین حجم نسبی تومور رادر گروه درمانی با دوز ۵۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل از 1468 ± 36 به 900 ± 34 و میانگین حجم نسبی تومور را در دوز ۱۰۰ mg/kg از 1468 ± 36 به 492 ± 78 کاهش داد. همچنین عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیشترین تاثیر را داشته است. به طوری که در روز چهاردهم درمان، کاهش معناداری در میانگین حجم تومورها نسبت به گروه کنترل در گروه درمانی دریافت کننده عصاره الکلی با دوز ۵۰ mg/kg ($P < 0.01$) و در گروه درمانی دریافت کننده عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg ($P < 0.001$) مشاهده شد.

بسیاری از گیاهان خاصیت فارماکولوژیک و بیوشیمیایی شامل خاصیت آنتی اکسیدانتی و ضدالتهابی داشته که به نظر می رسد در فعالیت های آنتی کارسینوژنیک و آنتی موتاژنیک دخالت دارند. با توجه به این که پیشرفت تومور ارتباط بسیار نزدیکی با التهاب و استرس اکسیداتیو دارد، ترکیبی که خواص ضدالتهابی یا آنتی اکسیدانتی داشته باشد، می تواند یک عامل آنتی کارسینوژن باشد (۱۷).

نتایج حاصل از مطالعه های مختلف نشان داده است که ترکیب های عصاره های آبی و الکلی این جنس دارای خاصیت آنتی اکسیدانتی، ضدالتهابی (۱۶، ۱۷ و ۱۸) و ضد توموری هستند و همچنین سبب القای آپوپتوز می شوند و به این طریق از رشد و تکثیر سلول های سرطانی متعدد جلوگیری می کنند (۱۸ و ۱۹ و ۲۰).

تحقیق های دانشمندان نشان می دهد که ترکیب های عصاره های گونه های مختلف این گیاه دارای آثار آنتی اکسیدانتی و ضدالتهابی بوده است (۲۱). همچنین با اثر گذاشتن روی مکانیسم های مختلف سلول سرطانی از رشد و تکثیر و بدخیمی آن ها جلوگیری می کند. تحقیق ها در سال ۲۰۰۶ نشان داده که عصاره های الکلی پنج گونه از این گیاه با دوزهای مختلف روی رشد و تکثیر محیط های کشت سلول های سرطانی متعدد نظیر گلیوبلاستوما (MG, T98G, U-DBTRG, ۰.۵)، کولورکتال کارسینوما (۷۹-WiDr, HT)، آدنوکارسینوما (۷۷MG)، پروستات (MDA, Pca۲b) آدنوکارسینوما آندومتریوم (HEC-۱۸) و لئوفوبلاست (CIR) اثر گذاشته و نتایج نشان داده که عصاره های الکلی این جنس یک منبع حیاتی ضد توموری محسوب می شود (۲۲). در همین راستا تحقیقی دیگر در جنوب آفریقا نشان داد که عصاره این گیاه توانسته است آثار مهارکنندگی روی رشد و تکثیر سلول های سرطانی متعدد نظیر آدنوکارسینوما سینه (۷-MCF)، آدنو کارسینوما کولون (۲۹-HT) و گلیوبلاستوما (۲۶۸-SF) بگذارد (۲۳). این یافته ها می تواند توجیهی در ارتباط با آثار آنتی توموریک عصاره الکلی این گیاه باشد (۲۲). همچنین آزمایش دیگری نشان داده است که عصاره های آبی و الکلی گونه ای از سالویا *Salvia triloba* قادر است تقسیم سلولی را در سلول های سرطانی آدنوکارسینوما سینه (MCF۷) کاهش دهد (۱۸). در سال ۲۰۰۹ نیز آثار ضد توموری در دو گونه از سالویا علیه سلول های سرطانی ملانوما انسانی (M۱۴) تأیید شد. در مجموع، این تحقیق ها نشان داد که عصاره های آبی و الکلی این گیاه با اثر روی رده های سلول های سرطانی متعدد قادر به مهار رشد این سلول ها است که در این تحقیق هم شاهد کاهش سرعت رشد سلول های تومور کارسینوما کولون موش Balb/c در گروه های درمانی با عصاره های آبی و الکلی گیاه مریم گلی آذربایجانی در مقایسه با گروه کنترل بوده ایم (۲۳).

در سال ۲۰۱۰ نیز تحقیق ها نشان داده که اسکارئول، دیگر ترکیب موثر این گیاه با اثر گذاشتن روی سیستم بدن موجود زنده، اندازه تومور سلول سرطانی سینه را کاهش می دهد و رشد آن را متوقف می سازد که این تحقیق نشان می دهد در ۱۸ روز دوره درمان حجم تومورها که

توسط کولیس اندازه گیری شده بود اندازه حجم تومورهای تحت درمان را نسبت به گروه کنترل کاهش داده بود. این یافته ها می تواند مطابق با نتایج به دست آمده در این تحقیق باشد که در گروه های درمانی با این گیاه حجم تومور نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری دارد (۲۴). دانشمندان آمریکا نشان داده اند که ترپنتول حاصل از عصاره گونه ای از سالویا *Salvia libanotica* با فعال نمودن مسیر ابشاری کاسپازی سبب القای آپوپتوز در سلول های سرطانی کولون انسانی (HCT-۱۱۶) می شوند و همچنین اشاره داشتند که مهم ترین مسیر آنزیمی موثر، آنزیم کاسپاز ۳- است (۱۴). از دیگر ترکیب های موثر در این گیاه می توان فلاونوئیدها را نام برد. فلاونوئیدها ترکیب های دیگری از این جنس هستند که روی رشد سلول های سرطانی اثر می گذارند و اثر مهارری روی چرخه سلول دارند. تحقیق ها در سال ۲۰۰۷ نشان داده که فلاونوئیدها روی چرخه سلول در فاز M/G۲ اثر می گذارند و بدین طریق از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری می کنند (۱۸). در این راستا، تحقیق دیگری نشان داده که این ترکیب ها به واسطه آثار آنتی اکسیدانتی قوی که دارند به حذف رادیکال های آزاد در بسیاری از سلول های آسیب دیده و توموری کمک می کنند (۲۲). مطالعه ها در سال ۲۰۱۱ نیز نشان می دهد که فلاونوئیدها دارای اثر سیتوتوکسیکی روی رده سلولی سرطانی انسانی (Colo۲۵۰) هستند (۲۵). از دیگر ترکیب های این جنس منوتوین ها را می توان نام برد. این ترکیب ها با اثر روی مسیرهای سیگنالی ژن و مهار چرخه سلولی در فاز رشد سلول های سرطانی دهانی (HNSCC) را مهار می کنند (۲۳ و ۲۴). کاربوفیلین و آلفا کاربوفیلین نیز که گروه دیگری از ترپن ها هستند، دارای آثار ضد تکثیری در سلول های سرطانی هستند (۲۵). این یافته ها می تواند توجیهی در ارتباط را با آثار آنتی توموریک گیاه مریم گلی آذربایجانی در این تحقیق باشد به طوری که در دوره درمان با عصاره الکلی این گیاه سرعت رشد مدل توموری در گروه های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش پیدا کرده است.

ترکیب دیگر در جنس سالویا دی هیدروتانسیون I است که تحقیق ها نشان می دهد که این ترکیب قادر است بر اتصال، مهاجرت و بلوغ سلول های اندوتلیال اثر گذاشته و آنژیوژن را مهار کند (۲۶).

تحقیق دیگر در سال ۲۰۰۹ نشان داده که عصاره الکلی گیاه *Salvia plebeia* نیز دارای آثار آنتی آنژیوژنیک است. عصاره الکلی این گیاه با کاهش سطح نیتریک اکساید در بافت توموری آنژیوژن را مهار می کند به طوری که نخستین مرحله در آنژیوژن اتساع رگی در پاسخ به نیتریک اکسید است و عصاره گیاه سالویا با کاهش سطح نیتریک اکساید در بافت توموری سبب کاهش آنژیوژن می شود (۲۶).

در سال ۲۰۱۰ نیز دانشمندان دریافتند که دانش ها آنژیوژن را در سلول های سرطانی ملانوما مهار می کنند این ترکیب سبب مهار آنژیوژن می شود (۲۷).

مطالعه های دیگر نشان می دهد که عصاره الکلی گیاه *Salvia officinalis* در آئورت رت از مهاجرت سلول های اندوتلیال جلوگیری می کنند و آنژیوژن را در آن مهار می کند (۲۸). در مجموع با توجه به تحقیق های انجام شده خواص آنتی توموریک این گیاهان از ابعاد گوناگون ثابت شده است که به طور خلاصه می توان گفت عصاره های الکلی و یا آبی این گیاه با اثر روی فاکتورهای متفاوت از جمله پروتئین های Bax، مسیر سیگنالینگ MPK-ERK اوروکیناز فعال کننده پلاسمینوژن و تاثیر روی فازهای مختلف چرخه سلول مهار سنتز DNA دارای آثار آنتی توموریک هستند. به طور کلی می توان گفت ترکیب های عصاره الکلی گیاه سالویا با اثر بر متالوپروتئین های خارج سلولی، نیتریک اکسید، رشد سلول های اندوتلیالی VEGF و FGF سبب مهار آنژیوژن می شوند. مطالعه های انجام شده همسو با نتایج تحقیق های این مطالعه است.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد که گروه‌های تحت درمان با عصاره‌های الکلی گیاه مریم گلی روند رشد تومورها و دانسته تعداد عروق در واحد سطح در مقایسه با گروه کنترل را به طور معناداری کاهش می‌دهند و کاهش دانسته عروق عاملی موثر در کاهش روند رشد تومور است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد بود. بدینوسیله از همه همکاران گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مدیریت گروه سرکار خانم دکتر نخعی و ریاست محترم دانشکده علوم آقای دکتر سعیدی برای همکاری‌های بی دریغ‌شان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

- Boyle O. (2003). The role of the Deleted colon cancer (DCC) gene in colorectal and gastric cancer. *cancer invest*. 12:484-485.
- Bottini A. (2002). Changes in microvessel density as assessed by CD34 antibody after primary chemotherapy in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 8:1816-1821.
- Capasso R., Borrelli F., Siebert D.J., Silbert D.J. (2006). The hallucogenic herb *salvia divinorum* and its active ingredient salvinorin A enteric cholinergic transmission in the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterol Motil*. 18(1):69-75.
- Byung _Soo K., Tae- Sig K., Cheorl _Ho K. (2004). *Salvia miltiorrhiza* Radix inhibits superoxide generation by activated rat microglia and imics the action of amphetamine on in vitro rat striatal dopamine release. *Neurochem Res* 29:1837-1845.
- Abdolrasoul H., Ebrahimabadi A., Mazoochi A., Jookar Kashi F., Djafari-Bidgoli Z., Batooli H. (2010). Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss from Iran. *Food and Chemical Toxicology*. 48 : 1371-1376.
- Carrao G., Bagnardi V., Zambon A., La Vecchia C. (2004). A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev Med*. 38(5):613-619.
- Chan J., Meyerhardt J., Niedzwiecki D. (2008). Family history of colorectal cancer: a new survival predictor of colon cancer. *JAMA*. 299(21): 2515-2522.
- Cristina P.R., Cristovao F., Lima M.F., Pereira-Wilson C. (2009). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and Rosmarinic Acid Induce Apoptosis and Inhibit Proliferation of Human Colorectal Cell Lines: The Role in MAPK/ERK Pathway. *Nutrition and Cancer*. 61(4):564-571.
- Dai Z.K., Qin J.K., Huang J.E., Luo Y., Xu Q., Zhao H.L. (2012). Tanshinone IIA activates calcium-dependent apoptosis signaling pathway in human hepatoma cells. *J Nat Med*. 66(1):192-201.
- Dong X., Dong J., Zhang R., Fan L., Liu L., Wu G. (2009). Anti-inflammatory effects of tanshinone IIA on radiation-induced microglia BV-2 cells inflammatory response. *Cancer Biother Radiopharm*. 24(6):681-687.
- Fan T.P., Yeh J.C., Leung K.W., Patrick Y.K., Wong Y., Ricky N.S. (2006). Angiogenesis: from plants to blood Vessels. *Pharmacological Sciences*. 27(6):297-309.
- 48-Fawn S.H., Naveen K.K., Margarita M., Morton S.K. (2007). Flavonoid, Silibinin, Inhibits Proliferation and Promotes Cell-Cycle Arrest of Human Colon Cancer. *Journal of Surgical Research*. 143(1):58-65.
- Brattain M.G., Strobel-Stevens J., Fine D. (1980). Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res*. 40:2142-146.
- Folkman J. (2006). Angiogenesis. *Ann Rev Med*. 57:1-18.
- Lee W.Y., Cheung C.C., Liu K.W., Fung K.P., Wong J., Lai P.B., Yee J.H. (2010). Cytotoxic effects of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* on doxorubicin-resistant human liver cancer cells. *J Nat Prod*. 73(5):854-9.
- Liang- Cheng C.h., Yu-Hsien W., I-Hshiang L., Chung-L., et al. (2011). Pharmacokinetics, dosimetry and comparative efficacy of 188Re-liposome and 5-FU in a CT26-luc lung-metastatic mice model. *Nuclear Medicine and Biology* 39(1):35-43.
- Shukla Y., Singh M. (2007). Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food Chem Toxicol*. 45: 683-690.
- Senol s., Orhan I., Celep F., Kahraman A., Dogan M., Yilmaz G. (2010). Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chemistry*. 120: 34-43.
- Junga H.J., Songa Y.S., Limb C.G., Parka E.H. (2010). Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia*. *Journal of Ethnopharmacology* 126 :355-360.
- Hawas U.W., Gamal-Eldeen A.M., El-Toumy S.A., Meyer J.J., Hussein A.A., Naturforsch C. (2009). Inhibition of the initiation stage of carcinogenesis by *Salvia disermas* constituents. 64(11-12):831-839.
- Sung H.J., Choi S.M., Yoon Y., An K.S. (1999). Tanshinone IIA, an ingredient of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, induces apoptosis in human leukemia cell lines through the activation of caspase-3. *Exp Mol Med*. 31(4):174-178.
- Zhou L., Chan W.K., Xu N., Xiao K., Luo H., Luo K.Q., Chang D.C. (2008). Tanshinone IIA, an isolated compound from *Salvia miltiorrhiza* Bunge, induces apoptosis in HeLa cells through mitotic arrest. *Life Sciences*. 83 : 394-403.
- Yang Y., Ge P.J., Jiang L., Lif L., Zhu Q.Y. (2011). Modulation of growth and angiogenic potential of oral squamous carcinoma cells in vitro using salvianolic acid B. *BMC Complement Altern Med*. 11:54.
- Tang C., Xue H.L., Huang H.B., Wang X.G. (2010). Tanshinone IIA inhibits constitutive STAT3 activation, suppresses proliferation, and induces apoptosis in rat C6 glioma cells. *Neurosci Lett*. 470(2):126-129.
- Shi H., Zhang Q., Li H., Chu T., Jin H., Mao S. (2011). Growth inhibition of tanshinones on SPC-A-1 cell line and their structure-activity relationship. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 14(1):7-12.
- Junga H.J., Songa Y.S., Limb C.G., Parka E.H. (2010). Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia*. *Journal of Ethnopharmacology* 126 :355-360.
- Zegi H.M., Ulka K.N. (2001). Antibacterial activity of *salvia tomentosa*. *Plant Med* 72:829-831.
- Sertel S., Eichhorn T., Plinkert P.K., Efferth T. (2011). Anti-cancer activity of *Salvia officinalis* essential oil against HNSCC cell line (UMSCC1). *HNO*. 59(12):1203-1208.