مطالعه بیان پروتئین BCL۲ در کارسینوم تجربی کولون متعاقب تاثیر عصاره گل همیشه بهار در موش صحرائی

یوسف دوستار[*۱]، داریوش مهاجری[۱]، فاطمه فتحی آذر[۲]، علی نامووران[۳]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز- ایران.

۲- گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز- ایران.

۳- دانش آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز- ایران.

*نویسنده مسئول: Vetdoustar@yahoo.com

چکیده

پروتئین BCL2 نقش بسیار مهمی در تنظیم آپوپتوز در تومورهائی نظیر کارسینوم کولون و پستان دارا می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی پدیداری پروتئین BCL2 در کریپت‌های غیرعادی کولون متعاقب درمان با عصاره‌گل همیشه بهار می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۵۶ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰-۳۰۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی به دوگروه مساوی تیمار و شاهد تقسیم گردیدند. برای القاء سرطان کولورکتال در هردو گروه تیمار و شاهد از ماده کارسینوژن ۱و۲-دی متیل هیدرازین به مقدار ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به روش تزریق زیر جلدی (۲ تزریق در هر هفته، بمدت ۲ هفته) استفاده گردید. گروه تیمار علاوه بر دریافت ماده کارسینوژن، عصاره‌گل همیشه بهار را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن را بمدت ۱۰ هفته به روش خوراکی روزانه دریافت نمودند. پس ازگذشت ۱۰ هفته، از بافت کولون دیستال هر دوگروه جهت تهیه مقاطع ۳-۴ میکرونی و انجام ایمونو هیستوشیمی نمونه‌برداری به عمل آمد. مطالعات ایمونوهیستوشیمیائی نشان داد که بیان BCL2 در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد کمتر و اختلاف میانگین بین دوگروه معنی دار ($p<0.01$) بود. مطالعه in vivo حاضر نشان داد که پدیداری پروتئین BCL2 در کریپت های غیرعادی کارسینوم تجربی کولون موش صحرائی با مصرف خوراکی عصاره گل همیشه بهار کاهش می‌یابد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه‌آزاد اسلامی‌واحد گرمسار، ۱۳۸۸، دوره ۵، شماره ۲، ۱۲۰-۱۱۵.

واژه‌های کلیدی: BCL2، کارسینوم کولون، کولون، گل همیشه بهار، نئوپلازی.

Study of Bcl2 Protein Expression in Experimental Colon Carcinoma Following Effects of Calendula Officinalis in Rats

Doustar, Y.[1*], Mohajeri, D.[1], Fathi Azar, F.[2], Namvaran, A.[3]

[1]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz- Iran.*

[2]*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical sciences, Tabriz- Iran.*

[3]*Graduated from, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz- Iran.*

Abstract

Bcl-2 plays an important role in apoptosis regulation of solid tumors, such as colon and breast cancer. The purpose of this study is to determine bcl-2 expression on aberrant crypt foci epithelial following treatment with Calendula officinalis extract. In this study, 56 male wistar rats with approximate age of 12 weeks and 200-300g weight were randomly allocated into two equal groups (treatment & control). For induction of colorectal carcinoma these two groups were injected by 1, 2-dimethylhydrazine (40mg/kg) subcutaneously (2 injection/week for two weeks). Treatment group simultaneously received orally the Calendula officinalis extract (200mg/kg/day) for 10 weeks. After 10 weeks, tissue specimens were collected from distal parts of colon in both experimental groups and 3-4? m thick microscopic sections were prepared through immunohistchemistry staining method. Immunohistopathologi cal study revealed that expression of BCL2 protein in aberrant crypt foci of colon in treatment group in comparison with control group was lesser. Mean difference between two experimental groups was significant ($p<0.01$). This in-vivo study indicated that BCL2 protein expression decreases in aberrant crypt foci epithelial cells of experimental colorectal carcinoma in rats following orally administration of Calendula officinalis extract. ***et.J.of Islamic.Azad.Univ., Garmsar Branch. 5,2:111-116,2009-2010.***

Keywords: BCL2, Colon Carcinoma, Colon, Calendula officinalis, Neoplasia.

مقدمه

سرطان روده بزرگ دومین دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان در دنیا است، طبق آمار ارائه شده سالانه این سرطان مسئول مرگ ۱۹۰۰۰ نفر در انگلستان، ۸۵۰۰۰ نفر در اروپا و ۶۱۰۰۰ نفر در ایالات متحده

است (۱،۲،۳،۴،۲۴). در مورد ایران آمار قابل استنادی برای میزان وقوع سرطان وجود ندارد ولی منابع غیر رسمی اعلام کرده اند که بیشترین درصد سرطان مربوط به دستگاه گوارش و به خصوص روده بزرگ است و درصد بالایی از بدخیمی ها و مرگ و میر را در ایران شامل می‌شود. میزان بالای چربی(۲۵) و پروتئین جیره باعث افزایش وقوع سرطان روده بزرگ می شود(۵)، 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 (۶،۷،۸). مطالعات آزمایشگاهی حاکی از ارتباط بین فاکتورهای تغذیه و سرطان روده بزرگ دارد(۱۴،۱۵،۱۶). با این وجود مکانیسم 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(۹). سرطان روده بزرگ یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در مردان و زنان به خصوص در آینده و افزایش شهرهای صنعتی خواهد بود(۱۲،۱۳). از عوامل مهارکننده سرطان روده بزرگ می توان به گیاهان دارویی و میوه جات اشاره کرد که به صورت روزانه مورد مصرف قرار می‌گیرند ولی باید قبل از مصرف آن‌ها اثرات محافظتی و ضد سرطانی آن‌ها شناسایی شود. مطالعات در مورد نقش گیاهان مختلف در پیشگیری از سرطان روده مدت‌هاست آغاز شده و مطالعات قبلی حاکی از اثرات مفید گیاه همیشه بهار (calendula officinalis) در التهابات، تسریع التیام زخم‌ها، راشهای پوستی در مصارف خارجی کوله سیستیت، کولانژیت، گاستریت، سیستیت، ضد هایپرلیپیدمی و... در مصارف داخلی اشاره کرد. بعضاً در منابع قدیمی به اثرات سیتوتوکسیک و آنتی توموری آن اشاره شده است. ولی در مطالعاتی که اخیراً انجام شده است اثرات ژنوتوکسیک و ضدژنوتوکسیکی در رده سلول‌های کبدی و اثرات آن بصورت In vitro روی سرطان رده سلول‌های لوسمی، ملانوما، فیبروسارکوما، پستان، پروستات، سرویکس، پانکراس و کلورکتال مورد بررسی قرار گرفته است. پروتئین BCL2 نقش بسیار مهمی در کارسینوم کولون داشته و پدیداری آن در تنظیم آپوپتوز و به عنوان یک ایندکس تشخیصی می تواند حائز اهمیت باشد(۱۷،۲۲). بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی پدیداری پروتئین BCL2 در کریپت‌های غیر عادی کولون متعاقب درمان با عصاره گل همیشه بهار می‌باشد.

مواد و روش کار

حیوانات:

رتهای نر نژاد wistar خریداری و در شرایط ۵ حیوان در هر قفس و با سیکل ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی، درجه حرارت ۲±۲۲ سلسیوس و رطوبت ۱۰ درصد±۵۵ نگهداری شدند.

طراحی آزمایش

در این مطالعه تعداد ۵۶ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰-۳۰۰ گرم انتخاب و به دو گروه مساوی تیمار و شاهد تقسیم گردیدند. 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(۸،۹). با این حال ارگان هدف آن روده بزرگ است(۹،۱۰). از طرف دیگر انسان‌ها با DMH و دیگر مشتقات هیدرازین از طریق محیط (۱۷) و غذا در ارتباط هستند مطالعات اخیر نشان می دهد که DMH از طریق استرس اکسیداتیو و القاء موتاسیون اثرات خود را بر جای می‌گذارد(۳،۵). جهت ارزیابی سرطان ایجاد شده توسط DMH کریپتهای نابجای ایجاد شده (Crypt Foci ACF Aberrant) مورد بررسی قرار می‌گیرد. کریپتهای نابه جای ایجاد شده در روده از عوامل مستعد کننده روده برای ایجاد پولیپ و مراحل پیشرفته سرطان هستند و از طریق بررسی آن‌ها می توان در شناسایی زود هنگام سرطان کمک گرفت. برای القاء کارسینوم کولون ماده شیمیائی ۲،۱ دی متیل هیدرازین با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن و محلول در EDTA به روش زیرجلدی تزریق گردید. مدت زمان تزریق هر هفته دو تزریق با فاصله مساوی، به مدت دو هفته خواهد بود(۲،۱۴).

گروه تیمار علاوه بر دریافت ماده کارسینوژن، عصاره گل همیشه بهار را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن 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 ایمونوهیستوشیمی نمونه‌برداری به عمل آمد(۱۶). مطالعه حاضر به روش مطالعه تجربی مداخله‌گر و متغیرهای مورد ارزیابی در آن ۱- عصاره گل همیشه بهار به عنوان متغیر مستقل می‌باشد ۲- تغییرات پدیداری پروتئین BCL2 در بافت کولون به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد.

روش تهیه عصاره گل همیشه بهار

به منظور تهیه عصاره گل همیشه بهار، ابتدا گل‌ها خشک و پودر شده و سپس به روش ماسراسیون (خیساندن) در سرما توسط حلال ان-هگزان چربی زدایی می‌شوند. جهت حصول عصاره با محتوای مواد موثره حداکثر، از حلال متانل ۷۰درصد 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 ۲۰۰میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن گاواژ گردید.

روش انجام ایمونوهیستو شیمی:

۱- تهیه بلوک پارافینی ۲- برش به ضخامت ۳ میکرون و قرار دادن مقاطع بر روی لام سایلین ۳- پارافین زدائی ۴- قرار دادن مقاطع در مایکروویو۵- قرار گرفتن مقاطع در دمای اتاق بمدت ۱۵ دقیقه ۶- شستشو بافت‌ها در آب جاری ۷- شستشو در بافر TBS۸- پوشاندن لام‌ها با آب اکسیژنه ۹- شستشو با بافر TBS۱۰- پوشاندن لام‌ها با منوکلونال آنتی بادی BCL2موش به همراه آنتی سرم آنتی BCL2 خرگوش (ساخت کمپانی DAKO) ۱۱- قراردادن مقاطع در دمای اتاق بمدت ۳۰ دقیقه ۱۲- شستوبابافر TBS۱۳- پوشاندن سطح لام‌ها با پلیمر لیبل شده با پراکسیداز ۱۴- شستشو با بافر TBS۱۵- پوشاندن سطح لام‌ها با کروموژن+سوبسترا ۱۶- شستشو با بافر TBS۱۷- رنگ آمیزی هماتوکسیلین و مونت کردن (۱۸،۲۰،۲۲).

روش نمونه‌برداری و آنالیز آماری داده‌ها:

مطالعه حاضر به روش مطالعه تجربی مداخله گر و متغیرهای مورد ارزیابی در آن ۱- عصاره گل همیشه بهار به عنوان متغیر مستقل می‌باشد ۲- تغییرات پدیداری پروتئین BCL2 در بافت کولون به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شده است. روش نمونه‌گیری به صورت تصادفی بوده و برای آنالیز نتایج حاصله از هر گروه تیمار با شاهد از آزمون تی مستقل استفاده شده است. بر اساس جدول کوهن و ضریب اثر ۰/۵ و توان آزمون (beta-۱) ۹۰ درصد حداقل حجم نمونه ۲۸ مورد است. جهت بررسی میزان پدیداری پروتئین BCL2 به روش رتبه‌بندی میزان پدیداری پروتئینی در گروه‌های تیمار و شاهد استفاده گردید که الگوی رتبه بندی در جدول شماره یک آورده شده است.

جدول۱- نحوه رتبه بندی میزان پدیداری پروتئین BCL2ه به روش ایمونوهیستوشیمی

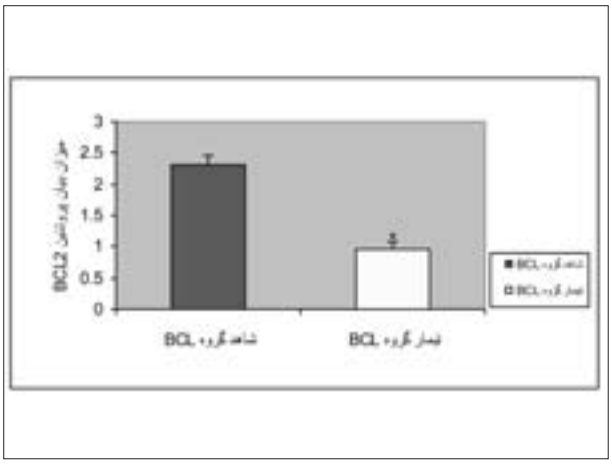
	میزان بسیار کم حضور پروتئین BCL۲	میزان کم حضور پروتئین BCL۲	میزان متوسط حضور پروتئین BCL۲	میزان زیاد حضور پروتئین BCL۲
میزان حضور پروتئین BCL۲	۰	۱	۲	۳

نتایج

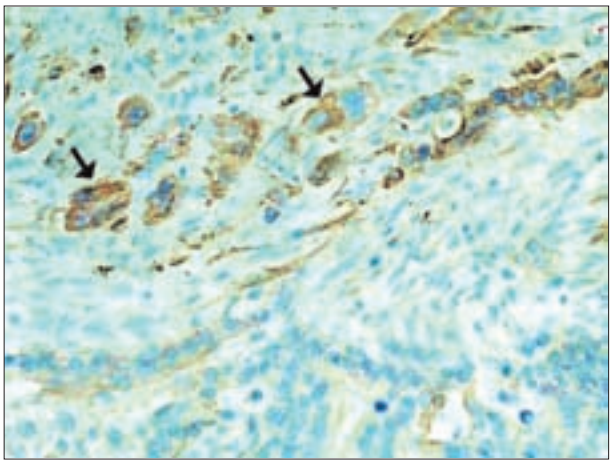
مطالعات ایمونوهیستوشیمیائی مقاطع بافتی نشان داد که بیان پروتئین BCL2 در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد کمتر و اختلاف میانگین هر دو گروه معنی دار ($p<0.01$) بود. بطوری که تراکم بروز پروتئین BCL2 در بافت اپی تلیالی کولون با تاثیر عصاره گل همیشه بهار به رنگ قهوه ای روشن در زمینه مقاطع بافتی قابل مشاهده می‌باشد (نگاره‌های ۱،۲).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:

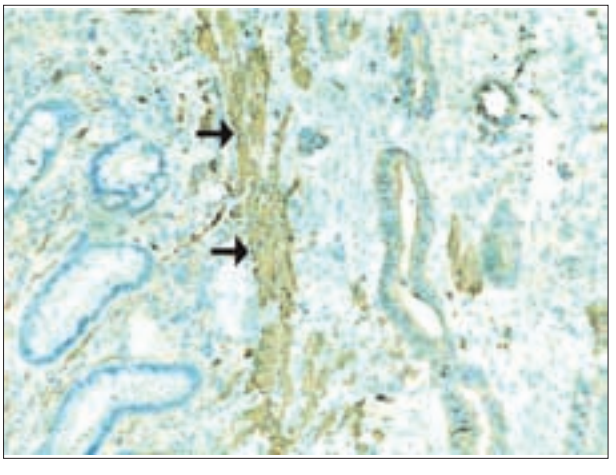
آنالیز آماری داده‌ها در هر دو گروه تیمار و شاهد، توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۳ و آزمون T-Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف میانگین تغییرات پروتئین BCL2 بین گروه‌های تیمار و شاهد معنی دار ($p<0.01$) بوده (نمودار۱).



نمودار۱: میانگین تغییرات پروتئین BCL2 در بافت کولون گروه تیمار و شاهد داده‌ها بصورت mean±SEM ارائه شده است، $p<0.01$* در مقایسه با گروه شاهد .(n=28).



نگاره۱- نمای ریزبینی از بافت اپی تلیوم نئوپلاستیک کولون موش صحرائی گروه شاهد که درآن پدیداری BCL2 درکریپت‌های غیرعادی کولون یا (Aberrant Crypt Foci) به‌رنگ قهوه ای روشن (فلش‌ها) به وسعت بیشتری قابل رویت می‌باشد. (بزرگنمائی۴۰× ایمونو هیستوشیمی پروتئین BCL2. پدیداری پروتئین BCL2 بوسیله آنتی بادی مونوکلونال آنتی BCL2 موش و آنتی سرم آنتی بتا-کاتنین خرگوش).



نگاره۲- نمای ریزبینی از بافت اپی تلیوم نئوپلاستیک کولون موش صحرائی گروه تیمار که درآن پدیداری BCL2 درکریپت‌های غیرعادی یا(Aberrant Crypt Foci ACF) کولون به رنگ قهوه ای روشن (فلش‌ها) با وسعت کمتری در مقایسه با گروه شاهد قابل رویت می‌باشد. (بزرگنمائی۴۰× ایمونو هیستوشیمی پروتئین BCL2. پدیداری پروتئین BCL2 بوسیله آنتی بادی مونوکلونال آنتی BCL2 موش و آنتی سرم آنتی BCL2 خرگوش.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصله 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 توجیح نمودند که عصاره گل همیشه بهار بواسطه اثر مهاری بر تقسیم سلولی در فاز G0/G1 و فعال نمودن مسیر آبشار کاسپازی باعث القاء آپوپتوز و مهار BCL2 در سلول‌های سرطانی محیط کشت می‌شود، همچنین اشاره داشتند که مهمترین مسیر آنزیمی موثر، آنزیم کاسپاز-۳ می‌باشد(۶،۷). آکوئی و همکاران و دینا درسال ۲۰۰۷ بیان نمودند که ژن APC یا Adenomatous Polyposis Coli به‌عنوان یک ژن ساپرس کننده رشد تومور و مشوق آپوپتوز 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، IQGAP1 و میکروتوبول ه 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 پلی پوئیدی مساعد می‌گردد (۴،۲۱). تاثیرات آنتی موتاسیونی عصاره گل همیشه بهار در بیان پروتئین‌های مشوق آپوپتوز نظیر پروتئین APsC، BAX و BCL2 می‌تواند یک توجیح دیگری برای نتاج معنی دار مطالعه حاضر مطرح باشد، البته نباید نقش پروتئین بتاکاتنین را نیز در این مورد فراموش نمود که عصاره گل همیشه بهار به شکل غیر مستقیم بر روی آن اثر گذاشته و الگوی مرگ سلول‌های نئوپلاستیک را در کارسینوم کولورکتال تحت تاثیر قرار می‌دهد. الیس و همکاران درسال ۱۹۹۰، جیمنز درسال ۲۰۰۶ و باراجیز در سال ۲۰۰۶ به این نتیجه رسیدند که عصاره گل همیشه بهار دارای خاصیت ضدسرطانی است که دلیل آن وجود ماده شیمیائی بنام ساپونین در آن می‌باشد، ساپونین موجود در عصاره گل همیشه بهار آنتی موتاسیون، مشوق آپوپتوز و مهار گر پروتئین BCL2 می‌باشد(۱،۴،۷) ، مچنین موتوهیوکو و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان داشتند که دو ترکیب شیمیائی موجود در عصاره گل همیشه بهار بنام تری ترپن گلیکوزیداز-۹ و ۱۰ دارای خاصیت سیتوتوکسیسیتی می‌باشند که توانسته‌اند در لاین‌های سلولی موارد سرطان‌های کولون، ملانوم و لوسمی در حد ۵۰ درصد پتانسیل القاء مرگ سلولی را نشان دهند ناگفته نماند که محصول تری ترپن گلیکوزیداز- ۱۰ حاصل از عصاره گل همیشه بهار در مهار فرآیندهای التهابی نیز موثر بوده است(۱۹). نتایج مطالعات سایر دانشمندان و مقایسه آن با نتایج مطالعه حاضر نشانگر آن است که عصاره گل همیشه بهار تا حدودی می‌تواند در مهار بیان پروتئین BCL2 در سلول‌های نئوپلاستیک کولون در شرایط in vivio موثر واقع گردد در حقیقت مهار این پروتئین می‌تواند آغاز گر فعالیت پروتئین Bax و آبشار کاسپازی در مسیرهای درونزاد سلولی برای وقوع آپوپتوز باشد. بر اساس مطالعات سارکز و همکاران وی در سال ۲۰۰۱ کاهش بیان پروتئین BCL2 در کارسینوم‌های کولون می‌تواند علاوه بر بیان وقوع میزان تغییرات آپوپتوتیک به‌عنوان یک ایندکس تشخیصی در تفسیر وضعیت پیشرفت تومور حائز اهمیت باشد (۲۴،۲۵ ,۲۲،۲۳). به هرشکل آنچه که در این مطالعه مشخص شد این است که با تاثیر

عوامل ضد التهابی و ضدسرطانی عصاره گل همیشه بهار میزان بیان پروتئین BCL2 تغییر می‌یابد.

قدردانی و تشکر

با تقدیر و تشکر از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی به ارائه بودجه مورد نیاز این طرح پژوهشی.

References

1. Barajas-Farias, LM., Pérez-Carreón, JI., Arce-Popoca, E. (2006) A dual and opposite effect of Calendula officinalis flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. *Planta Med.*, **72**(3):217-21.
2. Bird, R.P. (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters*, **93:** 55-71.
3. Chithra, V., Leelamma, S. (2000) Coriandrum sati6um- effect on lipid metabolism in 1, 2- dimethyl hydrazine induced colon cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, **71:**457-463.
4. Dikavsakaya, D., Schiffmam, D., Lan, P. (2007) Loss of APC incidence polypoidy as a results of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *Journal of Cell Biol*, **176:**183-195.
5. Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61:** 759-767.
6. Pe´ rez-Carreo´ Na, G. Cruz-Jime´ nezb, J.A. Licea-Vegab, E. (2001) Genotoxic and anti-genotoxic properties of Calendula officinalis extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. Toxicology in Vitro, **16:**253-258.
7. Jimenez-Medina, E., Garcia- Lora, A., Paco, L., et al. (2006) A new extract of the plant Calendula officinalis produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*, **6:**119.
8. Kamaleeswari, M., Deeptha, K., Sengottuvelan, M., Nalini, N. (2006) 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. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **214:**290-296.
9. Mc Dias, A. L. T., Spinardi- Barbisan, M. A. (2006) Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhyrazine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **44**(6):877-884.
10. Manju, V., Nalini, N. (2005) Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1, 2 dimethylhydrazine- induced colon cancer. *Clinica Chimica Acta*, **358:**60-67.
11. Mason, J.B. (2002) Nutritional chemoprevention of colon cancer. *Seminaries in Gastrointestinal Disease*, **13:**143-153.
12. Negri, E., D'Avanzo, B., Tavani, A. (1994) The role of vegetables and fruit in cancer risk. In: Hill, M.J., Giacosa, A., Caygill, C.P. (eds.) Epidemiology of Diet and Cancer. Ellis Horwood, London, 327-334.
13. Reddy, B.S. (1995) Nutritional factors and colon cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **35:**175-90.
14. Rodrigues, M.A.M., Silva, L.A.G., Salvadori, D.M.F., Camargo, J.L.V., Montenegro, M.R. (2002) Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. Brazilian *Journal of Medical and Biological Research*, **35:**351-355.
15. Shike, M., Winamer, S.J., Greenwald, P.H., Bolch, A., Hill, M., Swaroop, S.V. (1998) Primary prevention of colorectal cancer. Bull. *World Health Org*, **68:**377-385.
16. Thurnherr, N., Deschner, E.E., Stonehill, E.H., Lipkin, M. (1973) Induction of adenocarcinomas in the colon in mice by weekly injection of 1, 2-dimethylhydrazine. *Cancer Research*, **33:**940-945.
17. Willett, W.C., Stamfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, F.E. (1990) Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med*, **323:**1664- 72.
18. Wynder, E.L. (1975) The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res*, **35:**3388- 94.
19. Motohiko, U., Toshihiro, A., Ken, Y., Harukuni, T., Takashi, S., Yumiko, K. (2006) Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, Cytotoxic Activities of

Constituents of Marigold (Calendula officinalis) Flowers. *J. Nat. Prod*, **69:**1692-1696.

20. Boucaud-Maitre, Y., Algernon, O., Raynaud, J. (1988) Cytotoxic and antitumoral activity of Calendula officinalis extracts. *Pharmazie*, **43:**220-221.
21. Aoki, K., Taketo, M. (2007) Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene *J. Cell Sci*, **120:** 3327-3335.
22. Sarkis, H., Meterissian, M.D., Kontogiannea, M. (2001) BScBcl-2 Is a Useful Prognostic Marker in Dukes' B Colon Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, **8:** 533-537.
23. Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., et al. (1993) Bcl-xL, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regular of apoptotic cell death. *Cell*, **74:**597-608.
24. Ofner, D., Riehemann, K., Maier, H., et al. (1995) Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumor stage and patient survival. *Br J Cancer*, **77:** 981-5.
25. Baretton, G.B., Diebold, J., Christoforis, G., et al. (1996) Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. Cancer, **77:**255-64.