مقاله پژوهشی

تاثیر عصاره گل همیشه بهار بر بیان پروتئین بتا–کاتنین هسته ای در سرطان کولورکتال موش صحرایی

یوسف دوستار[۱]، داریوش مهاجری[۲]

[۱]استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ایران
[۲]دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ایران

چکیده

زمینه و هدف

آدنوکارسینوم کولورکتال یکی از شایع ترین و درمان پذیرترین موارد بدخیمی های دستگاه گوارش است. تحقیقات آزمایشگاهی اخیر در مورد سرطان‌های کولورکتال نشان می دهد که عصاره گل همیشه بهار دارای خاصیت ضد سرطانی بر رده سلول های کارسینوم کولورکتال می باشد. میزان خاصیت مهاری این عصاره در حدود ۷۰ الی ۱۰۰ درصد بوده و باعث کاهش پدیداری پروتئین بتا-کاتنین هسته ای سلول های دیسپلاستیک نابجای کریپتی کولون در محیط آزمایشگاه[۱] می گردد. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر عصاره گل همیشه بهار بر میزان پدیداری پروتئین بتا-کاتنین هسته‌ای در سلول های دیسپلاستیک نابجای کریپتی کولون در محیط طبیعی[۲] (بافت زنده) می باشد.

روش بررسی

در این مطالعه ۲۰ سر موش صحرایی نر ویستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰ تا۳۰۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی در دو گروه شاهد و تیمار به طور مساوی تقسیم گردیدند. جهت القاء سرطان کولون در هر دو گروه شاهد و تیمار از ماده سرطان زای ۱و۲-دی متیل هیدرازین[۳] به مقدار ۴۰mg/kg به روش تزریق زیر جلدی (۲ تزریق در هر هفته، به مدت ۸ هفته) استفاده گردید. سپس موش های گروه تیمار، عصاره گل همیشه بهار را از طریق گاواژ[۴] ، روزانه و به میزان ۲۰۰mg/kg به مدت ۱۰ هفته دریافت کردند. در گروه شاهد به جای عصاره، سالین نرمال به همان میزان گاواژ گردید. پس از ۱۰ هفته تیمار با عصاره، از بافت ناحیه دیستال کولون هر دو گروه نمونه برداری و شدت بیان بتا-کاتنین با روش ایمونوهیستوشیمی و براساس مقیاسی نیمه‌کمی و ۴ درجه ای ارزیابی گردید. در مقایسه گروه ها از آزمون آماری من ویتنی استفاده شد. سطح معنی داری آماری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

مطالعه ایمونوهیستوشیمی نشان داد که پدپداری پروتیین بتا- کاتنین هسته ای در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد کمتر بوده و اختلاف میانگین بین دو گروه نیز معنی دار ($p<۰/۰۱$) بود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره گل همیشه بهار بر بیان پروتیین بتا-کاتنین هسته ای در سلول های نابجای کریپتی در سرطان کولورکتال تجربی موش صحرایی اثر مهاری دارد.

کلیدواژه: ایمونوهیستوشیمی، بتا - کاتنین، کالندولا

گوارش/ دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، ۲۶-۳۱

زمینه و هدف

در سطح جهانی، سرطان کولورکتال چهارمین سرطان شایع در مردان و سومین در زنان است.(۱)، این بیماری، دومین علت مرگ ناشی از سرطان در اروپا است.(۲)، در ایران، سالانه بیش از ۵۰ هزار مورد سرطان کولورکتال تشخیص داده می‌شود و ۳۵۰۰۰ مورد مرگ ناشی از این بیماری اتفاق

1-in vitro
2-in vivo
3-1,2-dimethylhydrazine; DMH
4-gavage

نویسنده مسئول:
تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، بخش آسیب شناسی، کدپستی: ۵۱۵۸۹
تلفن و نمابر: ۰۴۱۱-۶۳۷۴۶۱۱
پست الکترونیک: vetdoustar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۶
تاریخ اصلاح نهایی: ۸۹/۵/۲۴
تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۴

می‌افتد. در کشـور ما، سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان و چهارمین سرطان شایع در زنان است و هر سال بیش از ۳۰۰۰ مورد جدید از این بدخیمی تشـخیص داده می شـود.(۳)، بروز سـرطان کولورکتال در امریکای شـمالی رو به کاهش اسـت، اما در بسیاری از نقاط جهان در حال افزایش است.(۴)، برخی عوامل تغذیه ای با وقوع سرطان کولون ارتباط دارند. مطالعات اپیدمیولوژیک گذشته نگر، رژیم غذایی حاوی گوشت قرمز و چربی حیوانی بالا، فیبر اندک، و میوه و سـبزیجات کم را با افزایش وقوع سـرطان کولون مرتبط دانسته اند.(۷-۵)، از سوی دیگر، مصرف ویتامین B_6 و کلسیم، و درمان جایگزینی با استروژن با بروز کمتر سرطان کولون همراه بوده است. (۱۰-۸)، مطالعات در مورد نقش فراورده ها در پیشگیری از سرطان کولورکتال از مدتی قبل آغاز شده است. در مطالعات مشاهده ای، مصرف سیر با کاهش خطر آدنوم کولون همراه بوده است.(۱۱)، مطالعات قبلی حاکی از اثرات مفید گیاه همیشـه بهـار (*Calendula officinalis*) در تخفیف التهاب(۱۲)، تسـریع التیام زخم ها(۱۳)، درمان راش های پوستی(۱۴)، گاستریت(۱۵)، هپاتوتوکسیسـیتی ناشـی از تتراکلریدکربن و نفروتوکسیسـیتی ناشی از سـیس‌پلاتین(۱۶) می باشـد. اخیرا اثرات ژنوتوکسیک و ضدژنوتوکسیکی عصاره گیاه همیشـه بهار در سلول های کبدی موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته اسـت(۱۷)، علاوه بر این، خاصیت ضد توموری عصاره این گیاه با دو مکانیسم سیتوتوکسیسـیتی و فعال سازی لنفوسیت ها، در مطالعات مختلف به تایید رسیده است.(۱۸-۱۹).

بتا-کاتنین[1] یک مولکول اصلی در مسیر پیام رسانی داخل سلولی است که پیشـتر به عنوان عامل دخیل در سـرطان زایی یا تومورزایی انواع سـرطان های دسـتگاه گوارشی از جمله سـرطان معده و کولون شناخته شده است. درمطالعه حاضر به بررسی تاثیر عصاره گل همیشه بهار بر بیان این پروتئین در بافـت اپی تلیالی کولـون موش صحرایی به روش ایمونوهیستوشـیمی پرداخته شده است.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشـگاهی بوده و در سـال ۱۳۸۸ در مرکز تحقیقات دانشـکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسـلامی تبریز انجام پذیرفته اسـت. جامعه آماری این مطالعه شـامل موش های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم و سن ۱۰ هفته می باشد. بر اساس جدول کوهن و ضریب اثـر ۰/۵ و توان آزمون (beta -۱) ۹۹ درصد حداقل حجم نمونه، ۱۰ مورد برای هر گروه در نظر گرفته شد.

نمونـه ای بـه حجم ۲۰ سَـر مـوش صحرایـی از مرکز پـرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه و به طور تصادفی در دو گروه مسـاوی ۱۰ سَری شامل گروه های شـاهد و تیمار تقسیم گردید. موش ها برای سازگاری با محیط جدید، قبل از آغاز مطالعه یک هفته در قفس های فایبرگلاس مخصوص در شـرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمـای ۲°C ± ۲۳ و رطوبـت ۱۰٪ ± ۵۵٪ و دسترسـی آزاد به مقادیر دلخواه آب و غذای پودر شـده اسـتاندارد نگه داری شـدند. در این مطالعه کلیـه ملاحظات اخلاقی و پروتکل های کار بر روی حیوانات آزمایشـگاهی مـورد تایید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشـگاهی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی، مدنظر قرار گرفت. جهت جلوگیری از تورش[2] در تحقیق، مراحل مختلف مطالعه به‌صورت دوسوکور انجام شد. بدین معنی که در هیچ یک از مراحل کارآزمایی، نه تیمارگر و نه آزمایشگاه از تخصیص گروه های مورد و شاهد اطلاع نداشتند.

روش تهیه عصاره گل همیشه بهار

گل همیشه بهار پس از تهیه، توسط گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشـگاه علوم پزشـکی تبریز مورد تایید قرار گرفت. ابتدا گل ها خشک و پودر گردیده، سپس به روش ماسراسیون (خیساندن) در سرما توسط حلال ان- هگزان چربی زدایی شـدند. جهت حصول عصاره با محتوای مواد موثره حداکثر، ازحلال متانول ۷۰ درصد اسـتفاده گردید. عمل استخراج تا خروج کامل مواد از پودر نمونه ۳ بار تکرار گردید. عصاره های به دست آمده تحت خلا و در دمای پایین کاملا خشک و و تا پایان دوره آزمایش در دمای انجماد نگه داری گردید.

ماده شیمیایی جهت القای کارسینوم تجربی کولون در موش صحرایی

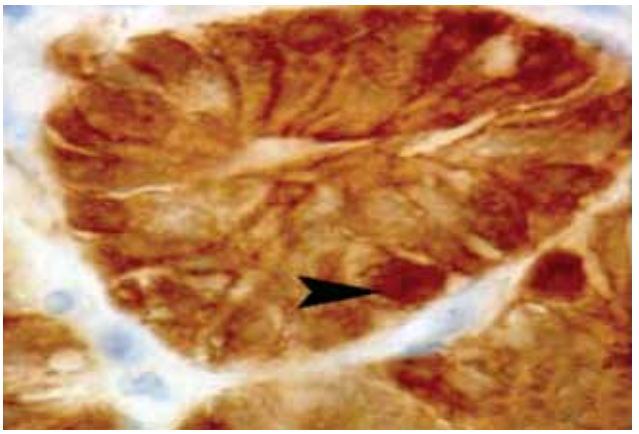
جهت ایجاد تجربی سرطان روده بزرگ در جوندگان از ماده ۱و۲- دی متیل هیدرازین استفاده می شود که قابلیت سرطان زایی در روده بزرگ و کوچک را داشته و با القای کریپت های نابجا در روده و متعاقب آن ایجاد تومور همراه است و روش استاندارد مطالعه تجربی سرطان روده بزرگ است. کریپت های نابجا در روده از عوامل مستعد کننده روده برای ایجاد آدنوم و آدنوکارسینوم بوده و از طریق بررسی آنها می توان در شناسایی زود هنگام سرطان کمک گرفت.(۲۰)

روش انجام ایمونوهیستوشیمی

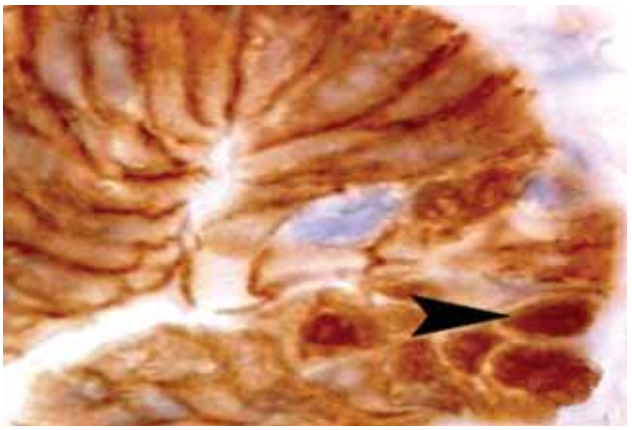
۱-تهیه بلوک پارافینـی، ۲- برش به ضخامت ۳ میکرون و قرار دادن مقاطع بر روی لام سـالین، ۳- پارافین زدایی، ۴- قرار دادن مقاطع در مایکروویو، ۵- قرار گرفتن مقاطع در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه، ۶- شستشـوی بافت ها در آب جاری، ۷- شستشو در بافرTBS (بافر تریس نمکی یا Tris-buffered saline به نسـبت ۱۰ میلی مول تریس با pH= ۷/۴ به همراه ۱۵۰ میلی مول کلرید سـدیم)، ۸- پوشاندن لام ها با آب اکسیژنه، ۹- شستشو با بافر تریس نمکی، ۱۰- پوشاندن لام ها با منوکلونال‌آنتی بادی بتا- کاتنین موش به همراه آنتی سرم آنتی بتا- کاتنین خرگوش (ساخت کمپانی DAKO)، ۱۱- قرار دادن مقاطع در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۲- شستشو با بافر تریس نمکی، ۱۳- پوشـاندن سطح لام ها با پلیمر لیبل شده با پراکسیداز، ۱۴- شستشو با بافر تریس نمکی، ۱۵- پوشـاندن سـطح لام ها با کروموژن + سوبسـترا، ۱۶- شستشو با بافر تریس نمکی، ۱۷- رنگ آمیزی هماتوکسیلین و مونته کردن.(۲۱)

1 -Beta-Catenin

2-Bias



شکل ۱: نمای ریزبینی از کریپت غیرعادی و نابجای اپی‌تلیوم کولون موش صحرایی گروه شاهد که درآن پروتئین بتا-کاتنین هسته‌ای در سلول‌های مخاط کولون به رنگ قهوه ای روشن (پیکان) قابل رویت می باشد (ایمونوهیستوشیمی پروتئین بتا- کاتنین، بزرگنمایی۱۰۰×).



شکل ۲: نمای ریزبینی از بافت اپی‌تلیوم کولون موش صحرایی گروه تیمار تحت تاثیر عصاره گل همیشه بهار که در آن پروتئین بتا- کاتنین هسته‌ای در معدودی از سلول های کریپت مخاط کولون به رنگ قهوه ای روشن (پیکان) قابل رویت می باشد (ایمونوهیستوشیمی پروتئین بتا- کاتنین، بزرگنمایی۱۰۰×).

طرح آزمایش

بعد از عادت کردن حیوانات به محیط جدید، برای القاء کارسینوم کولون، ماده شیمیایی ۱و۲ دی متیل هیدرازین با دوز ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت محلول در EDTA[3] به روش زیر جلدی هفته‌ای دو بار با فاصله مساوی و به مدت ۸ هفته تزریق گردید. سپس، موش‌های گروه تیمار، عصاره گل همیشه بهار را از طریق گاواژ، روزانه به میزان ۲۰۰mg/kg به مدت ۱۰ هفته دریافت کردند. در گروه شاهد به جای عصاره، سالین نرمال به همان میزان گاواژ گردید. پس از ۱۰ هفته تیمار با عصاره، از بافت ناحیه دیستال کولون هر دو گروه نمونه برداری و رنگ آمیزی به روش ایمونوهیستوشیمی به عمل آمد.

جهت ارزیابی اثرات ۱و۲- دی متیل هیدرازین، بیان پروتئین بتا- کاتنین به صورت تغییر رنگ قهوه ای در کانون کریپت های نابجای ایجاد شده (ACF)[4] مورد بررسی قرار گرفت. بررسی هیستولوژیک براساس یک مقیاس نیمه کمّی[5] جهت ارزیابی تغییرات در بیان پروتیین بتا- کاتنین انجام شد. میزان پروتئین بتا- کاتنین برمبنای شدت تغییر رنگ قهوه ای روشن در کریپت های نابجای ایجاد شده، از صفر تا ۳+ (صفر نشانگر میزان حضور بسیار کم پروتئین بتا- کاتنین، ۱+ نشانگر میزان کم، ۲+ نشانگر میزان متوسط و ۳+ نشانگر میزان زیاد حضور پروتئین بتا- کاتنین) درجه بندی شد.

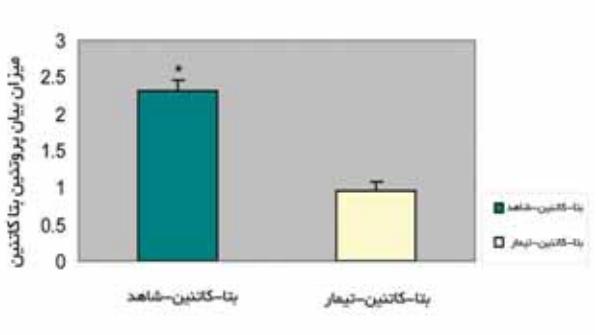
تحلیل آماری داده ها

برای تحلیل داده ها از برنامه آماری SPSS ویرایش ۱۳ استفاده شد. آزمون ناپارامتری من ویتنی[6] برای مقایسه نتایج درجه بندی شده ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده قرار گرفت. اختلاف در سطح $p<0/05$ معنی دار تلقی شدند.

3-Ethylenediamine tetra-acetic acid
4-Aberrant Crypt Foci
5-Semi-quantitative scale
6-Mann-Whitney Test

یافته ها

در ارزیابی ایمونوهیستوشیمی مقاطع بافتی، در نمونه های متعلق به گروه تیمار ظهور رنگ قهوه ای از گسترش و تراکم کمتری در مقایسه با گروه شاهد برخوردار بود. (شکل ۱ و ۲). گروه‌های تیمار و شاهد از لحاظ شدت بیان پروتئین بتا-کاتنین هسته ای در نمودار ۱ مقایسه گردیده اند. شدت بیان پروتئین بتا-کاتنین بین دو گروه تیمار و شاهد تفاوت معنی‌داری ($p<0/01$) داشت.



نمودار ۱: میانگین بیان پروتئین بتا- کاتنین در بافت کولون گروه تیمار و شاهد (n=۱۰) داده‌ها به صورت Mean ± SEM نمایش داده شده است، $p<0/01$* در مقایسه با گروه تیمار.

بحث

ژن های سرکوبگر تومور[7] دسته ای از ژن ها هستند که به طور طبیعی بر چرخه سلولی اثر مهاری دارند. در صورتی که یکی از این ژن ها حذف شود یا فعالیت آن کاهش یابد، مکانیسم های طبیعی کنترل تقسیم سلولی از کار می افتند و رشد بی‌رویه سلول اتفاق می افتد. نخستین بار شواهد دخالت ژن‌های سرکوبگر تومور در سرطان کولورکتال در سال های پایانی دهۀ منتهی به

7- Tumor suppressor genes

۱۹۹۰ انتشار یافت.(۲۲و۲۳)، مهم ترین ژن در ایجاد سرطان کولورکتال، ژن سرکوبگر تومور APC است. در ۸۰٪ موارد اسپورادیک سرطان کولورکتال، جهش های سوماتیک در هر دو آلل این ژن مشاهده می‌شود و جهش همین ژن مسئول ایجاد سندرم غالب پولیپوز آدنوماتوز فامیلیال است. عملکرد محصولات ژن APC و مکانیسم ایجاد تومور متعاقب جهش در این ژن، تا همین اواخر ناشناخته بود. یک سرنخ مهم در این زمینه مشاهداتی بود که نشان داد در اغلب بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال اسپورادیک که ژن APC طبیعی دارند، جهش در پروتئینی به نام بتا- کاتنین (محصول ژن CTNNB۱) وجود دارد. بتا-کاتنین و APC، هردو در یکی از مسیرهای میانجی به نام Wnt دارای نقش هستند.(۲۴)، فرضیه رایج فعلی آن است که اغلب موارد سرطان کولورکتال اسپورادیک محصول جهش هایی است که مسیر Wnt را فعال می سازند. مسیر Wnt یک مسیر انتقال سیگنال است که برای تکامل جنین ضروری است و هم چنین نقشی محوری در تجدید سلول های پوششی روده دارد.(۲۵)، به طور طبیعی، پروتئین APC با دخالت در فسفریلاسیون و تخریب بتا- کاتنین سیتوزولی و هسته ای، از تجمع آن جلوگیری می کند. تخریب بتا- کاتنین هنگامی صورت می گیرد که بتا- کاتنین به کمپلکس APC/AXIN/GSK-۳b اتصال یافته باشد. گلیکوژن کیناز سنتاز (GSK-۳b) با فسفریله کردن بتا- کاتنین آن را تخریب می کند. اغلب جهش های ژن APC سبب تشکیل ناقص پروتئین APC می شوند، به گونه ای که دامنه مهارکننده بتا - کاتنین از مولکول آن حذف می گردد. اختلال عملکرد APC (و نیز جهش در ژن بتا- کاتنین) موجب تجمع بتا - کاتنین در سیتوزول و انتقال آن به هسته می شود. این مقادیر تجمع یافته بتا - کاتنین به فاکتور رونویسی Tcf-۴ اتصال می‌یابد و آن را فعال می سازد.(۲۶)، شواهد حاکی است که کمپلکس بتا - کاتنین Tcf-۴/ سبب تغییر مسیر سلول های پوششی کریپتی روده از «تمایز»، به سمت «تکثیر» می شود.(۲۷)، البته اثر تومورزایی جهش های APC منحصر به مکانیسم ذکر شده نیست و جهش های این ژن، مستقیما و بدون واسطه بتا - کاتنین سبب ناپایداری کروموزوم ها می شوند و ژن‌های دیگری را مستعد آسیب هایی می‌کنند که بدخیمی و پیشرفت تومور را به دنبال دارند.(۲۸)، در این مطالعه، عصاره گل همیشه بهار بیان پروتئین بتا - کاتنین را در ناحیه دیستال کولون موش های صحرایی مواجهه یافته با ماده کارسینوژن ۱و۲- دی متیل هیدرازین، در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری کاهش داد. براساس اطلاعات نگارنده، بررسی حاضر اولین مطالعه ای است که در مورد اثرات عصاره گل همیشه بهار بر بیان پروتئین بتا - کاتنین در کارسینوم تجربی کولون دیستال موش های صحرایی انجام شده است.

بلام و همکاران، تاثیر اصلی ۱و۲- دی متیل هیدرازین در القاء کارسینوم تجربی کولون و بیان پروتئین بتا - کاتنین هسته ای را ایجاد موتاسیون در ژن مولد پروتئین بتا - کاتنین دانسته اند.(۲۹)، می توان چنین نتیجه گرفت که اثر مهاری عصاره گل همیشه بهار احتمالا از راه تاثیر بر مسیر میانجی Wnt و شکل گیری کمپلکس پروتئین بتا - کاتنین هسته ای اعمال می‌شود.

نتیجه گیری

یافته های مطالعه حاضر حاکی از آن است که عصاره گل همیشه بهار می تواند در کاهش تجمع پروتئین بتا - کاتنین هسته ای و تغییرات دیسپلاستیک کولون در شرایط in vivio موثر واقع گردد و ما براین باور هستیم که استفاده از عصاره گل همیشه بهار بنابر خاصیت ضد موتاسیونی خود توانسته است با تاثیردر جهش ژنی، از تجمع پروتئین بتا - کاتنین هسته‌ای جلوگیری کند. تعیین تاثیر دوزهای مختلف عصاره گل همیشه بهار و شناخت دقیق مکانیسم یا مکانیسم های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن نیاز به مطالعات آتی دارد.

سپاسگزاری

مؤلفین مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581-92.
3. Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in iran: a review. *Arch Iran Med* 2009;12:161-9.
4. Gellad ZF, Provenzale D. Colorectal cancer: national and international perspective on the burden of disease and public health impact. *Gastroenterology* 2010;138:2177-90.
5. Meyerhardt JA, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, Hu FB, Mayer RJ, et al. Association of dietary patterns with cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer. *JAMA* 2007;298:754-64.
6. Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:650-61.
7. Young TB, Wolf DA. Case-control study of proximal and distal colon cancer and diet in Wisconsin. *Int J Cancer* 1988;42:167-75.
8. Martinez ME, Willett WC. Calcium, vitamin D, and colorectal cancer: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:163-8.
9. Theodoratou E, Farrington SM, Tenesa A, McNeill G, Cetnarskyj R, Barnetson RA, et al. Dietary vitamin B6 intake and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:171-82.

10. Rennert G, Rennert HS, Pinchev M, Lavie O, Gruber SB. Use of hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:4542-7.
11. Ngo SN, Williams DB, Cobiac L, Head RJ. Does garlic reduce risk of colorectal cancer? A systematic review. *J Nutr* 2007;137:2264-9.
12. Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Anti-inflammatory activity of flower extract of Calendula officinalis Linn. and its possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol* 2009;47:113-20.
13. Preethi KC, Kuttan R. Wound healing activity of flower extract of Calendula officinalis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2009;20:73-9.
14. Guala A, Oberle D, Ramos M. Efficacy and safety of two baby creams in children with diaper dermatitis: results of a postmarketing surveillance study. *J Altern Complement Med* 2007;13:16-8.
15. Chakurski I, Matev M, Stefanov G, Koichev A, Angelova I. [Treanntment of duodenal ulcers and gastroduodenitis with a herbal combination of Symphitum officinalis and Calendula officinalis with and without antacids]. *Vutr Boles* 1981;20:44-7.
16. Preethi KC, Kuttan R. Hepato and reno protective action of Calendula officinalis L. flower extract. *Indian J Exp Biol* 2009;47:163-8.
17. Perez-Carreon JI, Cruz-Jimenez G, Licea-Vega JA, Arce Popoca E, Fattel Fazenda S, Villa-Trevino S. Genotoxic and antigenotoxic properties of Calendula officinalis extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol In Vitro* 2002;16:253-8.
18. Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (Calendula officinalis) flowers. *J Nat Prod* 2006;69:1692-6.
19. Jimenez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant Calendula officinalis produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 2006;6:119.
20. Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1973;33:940-5.
21. Barker N, van den Born M. Detection of beta-catenin localization by immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 2008;468:91-8.
22. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
23. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*1989;244:207-11.
24. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993;262:1734-7.
25. Uthoff SM, Eichenberger MR, McAuliffe TL, Hamilton CJ, Galandiuk S. Wingless-type frizzled protein receptor signaling and its putative role in human colon cancer. *Mol Carcinog* 2001;31:56-62.
26. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-90.
27. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111:241-50.
28. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001;3:433-8.
29. Blum CA, Xu M, Orner GA, Fong AT, Bailey GS, Stoner GD, et al. beta-Catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 2001;22:315-20.

Original Article

Immunohistochemical Study of the Effect of *Calendula officinalis* of β-catenin Protein Expression in Experimental Colon Cancer

Doustar Y[1], **Mohajeri D**[2]

[1]Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Iran
[2]Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Iran

ABSTRACT

Background: Colorectal adenocarcinoma is one of the most prevalent and treatable malignancies of the gastrointestinal tract. Recent in vitro studies have demonstrated the anticancer effect of *Calendula officinalis* extract on a tumor cell line derived from colorectal cancers. The inhibitory effect of this extract ranges from 70-100% and an in vitro study has demonstrated that *Calendula officinalis* extract inhibits expression of nuclear β-catenin protein on dysplastic colonic aberrant cryptal cells. The aim of present study was to evaluate in vivo the effect of *Calendula officinalis* extract on the expression of β-catenin protein in dysplastic colonic aberrant cryptal.

Materials and Methods: In this study 20 male Wistar rats with an approximate age of 12 weeks that weighed 200-300g were assigned to two equal groups (treatment and control). For the induction of colorectal carcinoma these two groups were given two subcutaneous injections of 1,2-dimethylhydrazine (40mg/kg) twice a week for eight weeks. Thereafter, the treatment group received *Calendula officinalis* extract (200mg/kg) daily for ten weeks through gavage. The control group received normal saline by the same manner. After ten weeks of treatment with *Calendula officinalis* extract, distal parts of colonic tissue were sampled in both groups. Expression of β-catenin was assessed semi-quantitatively by four scales through immunohistochemical analysis. Significant difference between the groups was determined by the Mann-Whitney U test. Statistical significance was considered at $p<0.05$.

Results: Immunohistochemical studies revealed that the expression of nuclear β-catenin protein in dysplastic colonic aberrant cryptal cells was lower in the treatment group compared to the control group. The mean difference between the treatment and control groups was significant ($p <0.01$).

Conclusion: The results of this in vivo study indicated that *Calendula officinalis* extract has an inhibitory potential on the expression of nuclear β-catenin protein in dysplastic colonic aberrant cryptal cells in experimental colorectal carcinoma of rats.

Keywords: **Immunohistochemistry, β-Catenin, Calendula**

Govaresh/ Vol.15, No.1, Spring 2010: 26-31

Corresponding Author:
Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran
Tel: +98 411 6374611
Fax: +98 411 6373935
Email: vetdoustar@yahoo.com

Received: 15 Apr. 2010
Edited: 15 Aug. 2010
Accepted: 26 Aug. 2010