Original Article

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات ۹۱ تا ۹۶

بررسی خواص ضدجهشی و ضدسرطانی لیمو شیرین *Citrus Limon*

ملیحه انتظاری[۱]، احمد مجد[۲]، فتح ا...فلاحیان[۳]، صدیقه مهرابیان[۴]، مهرداد هاشمی[۵]

[۱] دانشجوی دکترای سلولی تکوینی،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[۳] استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۴] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم
[۵] استادیار، ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: *در حال حاضر سرطان یکی از عوامل مرگ و میر در جهان می‌باشد. بسیاری از مواد شیمیایی جهش‌زا باعث مرگ میلیون‌ها بیمار سرطانی هستند. امروزه دانشمندان در حال بررسی و پیدا کردن مواد غذایی طبیعی هستند که بتوانند از بروز سرطان پیشگیری کنند. در این تحقیق، خواص ضدجهشی و ضدسرطانی آب میوه لیمو شیرین مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *در این تحقیق تجربی، سلول‌های سرطانی آستروسیتومای انسانی در محیط DMEM (Gibco) بعلاوه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum)، L –گلوتامین، پنی سیلین و استروپتومایسین در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ روز کشت و سپس با آب میوه لیمو شیرین تیمار شدند و توان زیستی سلول‌ها با روش MTT ارزیابی شد. .همچنین خواص ضدجهشی و ضدسرطانی آب میوه لیمو شیرین بر حسب روش استاندارد سنجش جهش برگشتی (آزمون ایمز) مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون ایمز، از سوش سالمونلا تیفی موریوم TA100 استفاده شد که جهشی در اپران هیستیدین خود دارد و جهت رشد نیازمند به منبع هیستیدین خارجی می باشد. سوش مذکور در مقابل مواد سرطان زا (آزید سدیم) ایجاد کلنی برگشتی می‌کند.*

یافته‌ها: *در روش MTT، سلولهای سرطانی آستروسیتومای انسان مرگ سلولی معنی‌داری را نسبت به گروه‌های کنترل نشان دادند ($p<0.01$). در آزمون ایمز، آب میوه از موتاسیون برگشتی جلوگیری نمود و درصد بازدارندگی در سنجش ضدجهشی لیمو شیرین نیمه‌رسیده ۷۱/۷ ٪ و لیمو شیرین رسیده ۳۴/۴٪ و این میزان در سنجش ضدسرطان‌زایی در لیمو شیرین نیمه رسیده ۸۳/۳٪ و لیمو شیرین رسیده ۵۰٪ بود.*

نتیجه‌گیری: *در این بررسی برای اولین بار خواص ضدجهشی و ضدسرطانی آب میوه لیمو شیرین مشخص گردید و این اثر در لیمو شیرین نیمه رسیده بیشتر از اثر لیمو شیرین رسیده بود.*

واژگان کلیدی: *ضدجهشی، ضدسرطانی، لیمو شیرین، سلول‌های سرطانی آستروسیتومای انسان، آزمون ایمز*

مقدمه

در حال حاضر سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان می‌باشد که در اثر عوامل مختلفی از جمله مواد جهش‌زا و مواد شیمیایی سرطان‌زا در محیط بوجود می‌آید. بر طبق برآوردهای انجام شده ممکن است بیش از ۷۵٪ سرطان‌ها دارای منشاء محیطی باشند (۱،۲). آسیب‌ها و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در توالی DNA و بروز جهش در ژنها و دیگر تغییرات در ساختار کروموزومی در سرطان‌زایی نقش بسزایی دارند (۳). بسیاری از مواد جهش‌زا و سرطان‌زا از طریق رادیکال‌های آزاد از جمله گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS: Reactive Oxygen species) اثر تخریبی خود را نشان می‌دهند. موادی که به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، ملیحه انتظاری (**email**: entezarimail@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۲/۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۵/۱۲

می‌توانند آثار زیان بار ROS را کاهش دهند. ROS در سبب‌شناسی بیماری‌هایی مانند سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، مشکلات عصبی و پیری نقش دارد. لذا مصرف روزانه آنتی‌اکسیدان‌ها دفاع و ایمنی بدن را در مقابل تولید رادیکال‌های آزاد افزایش داده و به عنوان ضد سرطان عمل می‌کند (۶-۴).برخی میوه‌ها و سبزیجات به علت داشتن مقدار زیادی آنتی‌اکسیدان‌ها مانند پلی فنل‌ها، ویتامین C، ویتامین E، بتاکاروتن و لیپوتن، از مواد غذایی اصلی ضد سرطان محسوب می‌گردند (۷). مرکبات از میوه‌های غنی از آنتی‌اکسیدان هستند (۸،۹). از شایع‌ترین آزمایش‌ها برای سنجش اثرات ضد سرطانی و ضد جهشی آزمون ایمز با بکارگیری باکتری‌های دارای جهش خاص (۱۰،۱۱) و تاثیر مواد مورد نظر بر سلول‌های سرطانی کشت شده در in vitro می باشد. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ضد سرطانی آب میوه لیموشیرین نیمه‌رسیده و رسیده از طریق تاثیر بر سلول‌های سرطانی و نیز آزمون ایمز برای اولین بار می‌باشد.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی برای بررسی اثر سایتوتوکسیسیته آب میوه لیموشیرین بر رده سلول سرطانی (in vitro) از روش آزمون توان حیاتی(MTT) استفاده شد و نتایج بر حسب اندکس تحریک محاسبه و به روش آماری آزمون t مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای ارزیابی اثر ضد سرطانی و ضد جهشی آب میوه ها، از روش استاندارد آزمون ایمز (Ames) بر روی باکتری‌های جهش یافته سالمونلا تیفی موریوم استفاده گردید و نتایج بر حسب رشد کلونی‌های باکتری در شرایط انتخابی با آزمون آماری ANOVA تحلیل شدند.

در این مطالعه از سلول‌های سرطانی آستروسیتومای انسانی (لاین۱۳۲۱) استفاده شد. سلول‌های مورد آزمایش، در محیط DMEM دارای ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی FBS(Fetal Bovine Serum) و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی ۵ درصد گاز CO2 کشت داده شدند. برای انجام آزمایش‌ها و انکوباسیون سلول‌ها با مواد مورد نظر، پس از رشد و ازدیاد سلول‌ها، سلول های چسبنده به کمک تریپسین ۰/۲۵٪ از کف فلاسک جدا و پس از شمارش به میزان ۵۰۰۰ سلول به فلاسک منتقل شدند. در تمامی موارد برای هر آزمایش فلاسک در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. از آنجا که برخی از سلول‌های فوق چسبنده بوده و برای ارزیابی بایستی در شرایط نرمال رشد قرار داشته باشند، تمامی آزمایش‌ها بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در چاهک های پلیت کشت سلول (چسبیدن کامل سلول به پلیت) انجام گرفت.

در صد سلول های زنده در سوسپانسیون سلولی (viability test) تعیین شد. هدف از انجام این تکنیک، تنظیم وکنترل مقدار سلول‌ها و دانسیته آنها در محیط کشت سلولی است. این تکنیک ناشی از اثر رنگ MTT بر روی سلول‌ها است که سلول‌های زنده را می توان از طریق کریستالهای ارغوانی که ناشی از احیا شدن رنگ توسط دهیدروژناز میتوکندریایی آنها است، شمارش و از طریق فرمول زیر درصد سلول های زنده تعیین می‌گردد:

viability (توان زیستی)= (تعداد سلول های زنده تقسیم بر کل سلول های کشت داده شده) ضرب در ۱۰۰

بعد از گذشت ۱۸ ساعت به منظور چسبیدن کامل سلول به سطح پلیت، غلظت‌های مختلف آب میوه (صفر به عنوان کنترل، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر) را به سلولها اضافه و پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 ۵٪ نگهداری شدند.

برای رنگ‌آمیزی از روش MTT استفاده شد. این روش بر اساس احیای رنگ MTT (dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide) محلول به یک فرآورده نامحلول(Formazan) بنفش آبی توسط فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری در سلول‌های زنده استوار است. برای تهیه محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۵۰ میلی‌گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی‌لیتر ازPBS ۰/۱۵ مولار حل شد و هنگام استفاده در رنگ آمیزی ۱۰ برابر با PBS رقیق گردید تا محلول ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT به دست آید. لازم به ذکر است که پس از تهیه PBS، محلول اتوکلاو گردید. پس از انکوباسیون سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف آب میوه در زمان ۴۸ ساعت، پلیت‌هایی که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد وCO2 ۵ درصد انکوبه شده بودند با محلول MTT ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رنگ آمیزی شدند. پس از ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مایع رویی سلول‌ها برداشته شد و به جای آن ۲۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانل(Merck, Germany) به حفره‌های مربوط اضافه شد و پلیت مربوط بمدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. سپس آن را توسط یک

میکروتیتر پلیت ریدر(ELISA-reader, Organon-Teknika, Netherland) در ۵۷۰ نانومتر مطالعه نمودیم. میزان توکسیسیتی ایجاد شده با استفاده از فرمول ذیل مورد محاسبه قرار گرفت.

%Cytotoxicity= (1- mean absorbance of toxicant)× 100/ mean absorbance of negative control
% Viability = 100 - % Cytotoxicity

برای کم کردن میزان خطای آزمایش در چند چاهک بدون سلول نیز رنگ MTT اضافه وسپس شستشو داده شد و همراه دیگر چاهک ها میزان جذب آن خوانده شد ودر نهایت ازکل جذب ها کم گردید.

از باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم TA100 برای آزمون Ames استفاده شد. سوش سالمونلا تیفی‌موریوم TA100 موتان محتاج به هیستیدین مستقیماً از پروفسور ایمز دریافت شد. برای آزمون می‌بایست از کشت تازه باکتری استفاده شود و مدت زمان انکوباسیون در کشت تازه شبانه باکتری در محیط نوترینت براث نباید از ۱۶ ساعت تجاوز کند. غلظت مناسب باکتریها $۱-۲ \times ۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. پس از بررسی اثر سایتوتوکسیسیته آب میوه بر روی سلول سرطانی، آزمون ایمز با اضافه کردن آب میوه به ۰/۵ میلی‌لیتر کشت تازه شبانه TA100 و ۰/۵میلی‌لیتر محلول هیستیدین و بیوتین به میزان ۰/۵ میلی مول از هر کدام در لوله محتوی ۱۰ میلی‌لیتر تاپ آگار (50 gr/lit Agar + 50 gr/lit Nacl) و ماده سرطان‌زای آزید سدیم (1.5 µgr/ml Sadium azide) صورت گرفت. محتویات این لوله پس از ۳ ثانیه تکان‌دهی در سطح محیط گلوکز آگار حداقل (گلوکز ۴۰ درصد) گسترده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در این آزمون پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های آزمایشی و کنترل شمارش شدند و در نتایج پس از تبدیل زاویه‌ای به روش تجزیه واریانس مقایسه گردیدند.

بسیاری از مواد در شکل اصلی خود از نظر جهش‌زایی و سرطان‌زایی غیر فعالند و بسیاری از ترکیبات برای بروز خصوصیات جهش‌زایی (سرطان‌زایی) از نظر متابولیکی می‌بایست فعال شوند؛ لذا افزودن آب میوه استریل به عصاره میکروزومی سلولهای کبد پستانداران مانند موش الزامی است. بر این اساس پس از ۲۴ ساعت گرسنگی ۱۰ موش نر، کبد آنها جدا گردید. گرسنگی باعث تحریک ترشح آنزیمهای کبدی و افزایش آن شده بود. کبدها در محلول کلرید پتاسیم ۰/۱۵ مولار هموژن گردیده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ سانتی‌گراد عمل سانتریفوژ انجام شد. مایع رویی (مخلوط، S9) جدا شد و باکوفاکتورهای لازم (NADP و گلوکز ۶ فسفات) مخلوط شدند و ۰/۵ میلی‌لیتر برای بررسی خاصیت ضد سرطانی به مخلوط Top agar اضافه شد.

همچنین پس از شمارش کلنی‌ها در آزمون ضد جهش‌زایی- ضد سرطانی، درصد بازدارندگی یا آنتی‌اکسیدانی از فرمول ذیل محاسبه گردید (۱۲).

درصد بازدارندگی=(۱- T/M) x ۱۰۰

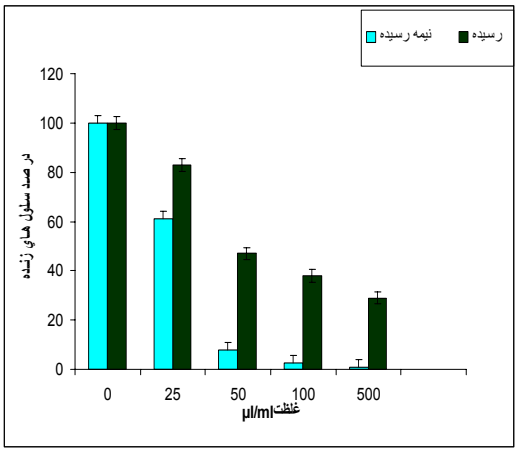
T نشان دهنده کلنی‌های برگشتی در هر پتری‌دیش در مجاورت ماده جهش‌زا و آب میوه‌ها و M نشان دهنده کلنی‌های برگشتی موجود در پتری‌های مربوط به کنترل مثبت (ماده جهش‌زا) می‌باشد.

یافته‌ها

از مقایسه نتایج حاصل از آزمون MTT بر سلولهای سرطانی که در مجاورت غلظت‌های مختلف آب میوه قرار گرفته بودند، مشخص گردید که سلولهای سرطانی توان زیستی خود را از دست داده‌اند و تفاوت معنی‌داری بین اثر آب میوه نیمه‌رسیده و رسیده در سرکوبی رشد سلول‌های سرطانی دیده شد ($P<۰/۰۵$) و اثر بازدارندگی آب میوه نیمه‌رسیده بیشتر بود (نمودار ۱).

از مقایسه نتایج حاصل از شمارش کلنی‌ها که در مجاورت غلظت ۲۵ میکرولیتر آب میوه (با توجه به نتایج آزمون توان زیستی) قرار گرفته بودند، مشخص گردید تاثیر آب میوه‌های نیمه‌رسیده و رسیده تفاوت آماری معنی‌داری در خاصیت ضد جهشی رشد کلنی نسبت به کنترل‌ها (آزید سدیم و آب مقطر) دارند ($P<۰/۰۵$). آب میوه‌های رسیده اثر ضدجهشی متوسط و آب میوه‌های نیمه‌رسیده اثر ضدجهشی قوی داشتند، به طوری که درصد بازدارندگی جهشی در آب میوه‌های رسیده ۳۴/۳۶ درصد و در آب میوه‌های نیمه‌رسیده ۷۱/۷۱ درصد بود. برای بررسی اثر ضدسرطانی پس از اضافه کردن S_9 برای فعال شدن متابولیکی آب میوه‌ها، آزمون ایمز تکرار گردید. آب میوه‌های نیمه‌رسیده و رسیده اثر بیشتری در خاصیت ضد سرطان زایی رشد کلنی نسبت به کنترل‌ها (آزید سدیم و آب مقطر) داشتند ($P<۰/۰۵$).

هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین تاثیر آب میوه‌های نیمه‌رسیده و رسیده وجود داشت (P<۰/۰۵)، البته هر دوی آنها اثر ضدسرطانی قوی داشتند و درصد بازدارندگی سرطان‌زایی در آب میوه‌های رسیده ۵۰ درصد و در آب میوه‌های نیمه‌رسیده ۸۳/۳۳ درصد بود.



نمودار ۱ – نتایج توان زیستی سلولهای سرطانی پس از تیمار با آب میوه رسیده و نیمه رسیده

بحث

از آنجایی که روش‌های معمول در درمان سرطان (جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی) علاوه بر سلولهای توموری بر سلول‌های طبیعی در حال تقسیم نیز اثرات کشنده یا مهار تقسیم سلولی را بهمراه دارد (۱۳)، در سالهای اخیر استفاده از داروهای طبیعی گیاهی برای پیشگیری و درمان سرطان مطرح شده است. در این روش نه تنها سلول‌های توموری کنترل می‌شوند، بلکه به سلول‌های سالم آسیب رسانده نمی‌شود (۱۴). اثر انواع آنتی‌اکسیدان‌های خوراکی بر سرطان و بیماری‌های قلبی- عروقی به اثبات رسیده و مشخص شده که این مواد موجب افزایش بیش از شصت درصد طول عمر می‌گردند (۱۵). طی بررسی‌های آزمایشگاهی بر روی فلاونوئیدهای پلی متوکسیله از جمله تانگرتین مشخص شده است که این مواد اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی و محافظت کننده نورون‌ها را دارند (۱۶). در سال ۲۰۰۱ اثر لیمونین‌ها (فلاونوئیدها) بر چرخه سلولی بررسی و نشان داده شد که این مواد سبب تغییر در تقسیم سلولی و یا مرگ سلولی (آپوپتوزیس) می‌گردند که این توقف تقسیم سلولی در مرحله G1 تقسیم رخ می‌دهد (۱۷). در سال ۲۰۰۵ با انجام آزمایشاتی برروی نوبیلتین (فلاونوئید موجود در پوست مرکبات) مشخص گردید که این ماده فعالیت ضد سرطانی، ضد ویروسی و ضد التهابی دارد (۱۸). در سال ۲۰۰۶ با جداسازی لیمنوئیدهای مرکبات اثر ضدسرطانی آنها بر روی سلول‌های سرطانی نوروبلاستوما (SH-SY5Y) و آدنوکارسینوما (Caco-2) به روش MTT تایید شد و مشخص گردید نوروبلاستوما حساسیت بیشتری دارد (۱۹). طی مطالعه‌ای مشخص گردید القای آپوپتوریس با فعال‌سازی مسیر کاسپازی انجام می‌شود (۲۰). مسیرهای انتقال سیگنال‌ها که باعث آغاز فعال شدن آبشاری آنزیم‌هایی بنام کاسپاز می‌گردد، آسیب‌های سلولی که افزایش نفوذ پذیری غشاء میتوکندری‌ها وفعال شدن آنزیم‌های کاسپازی اتفاق می افتد، آسیب DNA که منجر به تجمع پروتئین P53 و تسهیل ترمیم DNA توسط پروتئین فوق صورت می‌گیرد و مسیر آسیب‌های غشا سلولی که باعث فعال شدن آنزیم اسفنگومیلیناز و نهایتا تولید عامل سرامیدی از ترکیبات لیپیدی غشا سلول می‌شود، چهار سیستم اصلی در راه‌اندازی آپوپتوزیس می‌باشند (۲۴-۲۱).

با توجه به حساسیت سلول‌های سرطانی نوروبلاستوما، در این تحقیق نیز اثر ممانعت از رشد آب میوه لیموشیرین بر سلول سرطانی آستروسیتومای انسانی به روش MTT تایید شد. در سال ۲۰۰۲ با آنالیز ترکیبات میوه مرکبات از جمله ویتامین C، بتاکاروتن، فلاونوئید، لیمنوئید و فولیک اسید خاصیت ضدسرطانی آنها مطرح شد (۲۵). با توجه به اینکه تا کنون اثر ضدجهشی و ضدسرطانی آب میوه لیموشیرین نیمه‌رسیده و رسیده گزارش نشده است، در این راستا برای بررسی اثر ضدسرطانی آن از روش‌های آزمون توان زیستی و آزمون Ames استفاده گردید و این آزمون با توجه به تاکیدهای به‌عمل آمده بر روی استفاده از باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم برای شناسایی میزان جهش‌زایی و ضد سرطانی مواد شیمیایی انتخاب گردید. در تحقیق حاضر لیموشیرین نیمه‌رسیده و رسیده خاصیت ضد جهشی و ضد سرطانی را نشان دادند. طبق تئوری Ames که در سال ۱۹۸۲ ارائه شده است، در صورتی که تعداد کلنی‌ها بر روی محیط کشت کنترل مثبت (حاوی ماده جهش‌زا) دو برابر نمونه آزمایش باشد ماده ضد جهش‌زا و ضد سرطان محسوب می‌گردد. زمانی‌که درصد بازدارندگی بین ۲۵ الی ۴۰ درصد باشد، اثر متوسط فرض می‌شود؛ هنگامیکه درصد بازدارندگی بیشتر از ۴۰ درصد باشد، اثر ضدجهشی نمونه آزمایشی قوی است و درصورتی‌که کمتر از ۲۵ درصد باشد، اثر ضد جهشی منفی است که این موضوع در زمان بررسی اثر ضدسرطانی با اضافه کردن S9 برای فعال

شدن متابولیکی نیز صادق است (۱۱،۱۰). این خواص در نمونه‌های آب میوه لیمو شیرین مشاهده گردید. در بررسی in vitro اثر آب میوه لیموشیرین بر کشت سلولهای سرطانی مشخص گردید که آب میوه موجب سرکوب سلول‌های سرطانی می‌شود و هم‌چنین اثر آب میوه لیموشیرین نیمه‌رسیده بیشتر از لیموشیرین رسیده است.

با بررسی درصد بازدارندگی یا آنتی‌اکسیدانی آب میوه‌ها مشخص گردید، هر دو نوع آب میوه ها اثرات بازدارندگی جهش زائی و سرطان زائی داشته و این اثر در لیموشیرین نارس بسیار بیشتر می‌باشد. در سال ۲۰۰۰ القای مرگ سلولی یا آپوپتوزیس در سلولهای سرطانی HL-60 توسط فلاونوئید موجود در لیمو گزارش گردید (۲۶). در سال ۲۰۰۷ پیشنهاد شد تغییرات pH در سلول‌های سرطانی می‌تواند خاصیت ضدسرطانی داشته باشد (۲۷). همسو با گزارش مذکور تصور می‌کنیم که علت تاثیر بیشتر میوه نیمه‌رسیده مربوط به تفاوت مقدار فلاونوئیدها یا pH در این آب میوه‌ها می باشد.

همان‌طور که در آزمون ضد جهش‌زایی مشخص گردید، آب میوه لیموشیرین به تنهایی قادر به بروز خاصیت ضد جهشی است. در این تحقیق از آب میوه مذکور همراه با عصاره کبدی موش (S9) آزمون به عمل آمد. بسیاری از مواد ضد سرطانی تا زمانی که در یک فعالیت آنزیمی الکتروفیلیک وارد نشوند، غیرفعال می‌مانند و نمی‌توانند به DNA متصل شوند. لذا چون باکتری فاقد این سیستم می‌باشد، ازعصاره کبد S9 سیستم فعال سیتوکروم P-450/P-448 برای فعال‌سازی این مواد استفاده می‌شود (۲۸). همان طور که ملاحظه شد آب میوه همراه با عصاره کبدی S9 فعالیت ضد سرطانی دارد و درصد بازدارندگی لیمو شیرین نیمه‌رسیده نسبت به رسیده در این سیستم نیز بیشتر است. قوی‌تر بودن خاصیت ضدسرطانی آب میوه رسیده نسبت به خاصیت ضدجهشی می تواند حاکی از این موضوع باشد که احتمالا ترکیباتی در آب میوه موجود است که برای فعال شدن نیاز به سیستم آنزیمی P-450/P-448 دارد.

REFERENCES

1. Moller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated psychological stress and life-style factor. Chem Bio Interact1996;102:1-36
2. Namiki M. Antioxidants/antimutagenes in foods. Crit Rev.Food Sci Nutr1990;29:273-300.
3. McCord JM. Free radicals and prooxidants in health and nutrition. Food Technol 1994;48:106-10.
4. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidant: What role do they play in physical activity and health? Am J Clin Nutr 2000;72:637-46.
5. Fujiki H, Suganuma M, Imai K, Nakachi K. Green tea: Cancer preventive beverage and /or drug. Cancer Lett 2002;188:9-13
6. Chen SC, Chung KT. Mutagenicity and antimutagenicity studies of Tannic acid and related compounds. Food Chem Toxicol 2000;38:1-5.
7. Ghasemian A, Mehrabian S, Majd A. Peel Extracts of two Iranian cultivars of Pomegranate(punica granatum) have antioxidant and antimutagenic activities. Pak J Biol Sci 2006;7:1402-405.
8. Jacob R, Hasegawa Sh, Manners G. The potential of Citrus Limnoids as anticancer agents. perishables Handling Quarterly 2000;102:6-8.
9. Mazaki M**,** Ishii T**,** Uyeta M**.** Mutagenicity of hydrolysates of citrus fruit juices. Mutat Res 1982;101:283-91.
10. Ames BN. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian microsome mutagenicity test. Mutat Res 1976;31:347-49.
11. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinoges are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Natl Acad Sci 1973;70:2281-85.
12. Ong T, Wong WZ, Stewart JD, Brockman HE. Chlorophyllin:A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. Mutat Res 1986;173:111-15.
13. Chabner BA, Friedman MA. Progress against rare and not so-rare cancer. New Engl J Med 1992;236:564-68.
14. Franks LM, Teich NM. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. New York: Oxford university press; 1997.
15. Sunj J, Chu YF, Wu X. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. J Agric Food Chem 2002;25:7449-54.
16. Bennett JP, Gompert S, Wollenweber E. Inhibitory effects of natural inflavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. Arzneimittelforschung 1981;31:433-37.

17. Nijveldt RJ, Nood EV, Boelens PG. Flovonoids: A review of probable mechanisms of action and potentioal applications. Am J Cli Nutr 2001;74:418-25.

18. Li S, Yu H, Ho CT. Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. Biomed Chromatogr 2006;20:133-38.

19. Poulose MP, Harris ED, Datil BS. Anti-proliferative effects of Citrus Limnoids againt Human Neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells. Nutr Cancer 2006;56:103-12.

20. Poulose SM, Harris ED, Patil BS. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. Am Soci Nutr Sci 2005;135:870-77.

21. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. Immuol Today 1995;16:569-574.

22. Nozawa K. Soluble Fas (apo- 1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic disease. Arthritis Rheum 1997;40:1126-29.

23. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben- Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nucleow DNA pragmentation**.** J Cell Biol 1992;119:493-501.

24. Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ. Apoptosis. In: Potten CS (ed). Perspectives on mamalian cell death. Oxford : Oxford University Press; 1987: 93.

25. Sillani J. Anticancer and health protective properties of fruit components. Asia Pac J Clin Nutr 2002;11:79-84.

26. Ogata S, Miyake Y, Yamamoto K, Okumura K, Taguchi H. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (Citrus limon BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. Biosci Biotechnol Biochem 2000;64:1075-78.

27. Gross L. Manipulating cellular pH suggests novel anticancer therapy. PLoS Biol 2007;5: e10

28. Hakura A, Shimada H, Nakajima M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S, et al. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. Mutagenesis 2005;20:217-28.