

بررسی اثر ضد تومور و سیتوتوکسیسیته کلاله و گلبرگ زعفران به روش دیسک سیب زمینی و میگوی آب شور

حسین حسین زاده^{۱*}، جواد بهروان^۲، محمد رضانی^۲، خدیجه اژکان^۳

۱- استاد، گروه فارماکودینامی و سم شناسی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشگاه بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکونوزی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی علوم دارویی و دانشکده داروسازی مشهد

۳- داروساز

*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق پستی ۹۱۷۷۵-۱۳۶۵، تلفن: ۶۶-۸۸۲۳۲۵۵ (۰۵۱۱)

نمابر: ۸۸۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)

پست الکترونیک: hosseinzadehh@mums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۴/۲/۴

تاریخ دریافت: ۸۲/۱۱/۱۴

چکیده

مقدمه: تحقیقات فراوانی اثر ضدسرطانی کلاله زعفران را نشان داده است.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی سمیت و اثر ضدتوموری عصاره‌های خیسانده الکلی کلاله و گلبرگ زعفران به روش‌های ساده میگوی آب شور و سنجش دیسک سیب زمینی با میکروب آگروباکتریوم تومه فشنز بود.

روش بررسی: برای بررسی فعالیت ضدباکتری آگروباکتریوم تومه فشنز توسط عصاره‌ها آزمون MIC به روش میکروپلیت انجام گرفت. در روش بررسی اثر ضد توموری، دیسک‌های سیب زمینی با قطر مشخص زیر هود لامینار به آگار ۱/۵ درصد منتقل شد. ۵۰ میکرولیتر از مخلوط سوسپانسیون آگروباکتریوم و محلول عصاره‌های کلاله و گلبرگ زعفران به روی دیسک‌های سیب زمینی قرار داده شده در پلیت تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۱ روز انکوبه شد تا تومورهای حاصل بر روی دیسک‌ها شمارش شود. در روش میگوی آب شور برای باز کردن تخم‌های میگو محیط مناسب آب دریای مصنوعی تهیه و شرایط لازم برای باز کردن تخم‌ها فراهم شد. پس از انجام آزمون به روش استاندارد با توجه به تعداد مرگ و میر میگوها غلظت‌های مناسب ثانویه نیز تهیه و نتایج بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره گلبرگ در غلظت‌های ۱-۱۶ mg/ml خاصیت ضدباکتری بر علیه آگروباکتریوم تومه فشنز نداشت و MIC عصاره کلاله ۱۰ mg/ml محاسبه شد. IC₅₀ به دست آمده در مهار رشد تومورهای ناشی از آگروباکتریوم تومه فشنز برای عصاره کلاله ۵/۳ mg/ml و عصاره گلبرگ ۱۰/۸ mg/ml تعیین شد. LC₅₀ عصاره‌های الکلی کلاله و گلبرگ در روش میگوی آب شور به ترتیب ۱۶۷۸/۷ ppm و ۱۳۵۶/۸ ppm به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کلاله توانایی بیشتری در مهار رشد توموری نسبت به گلبرگ دارا می‌باشد و کلاله دارای سمیت کمتری نسبت به گلبرگ است.

کل واژگان: کلاله و گلبرگ زعفران، آنتی تومور، میگوی آب شور، دیسک سیب زمینی



مقدمه

سرطان به عنوان بزرگترین عامل مرگ در جهان باقی مانده و متجر به مرگ بیش از ۶ میلیون نفر در هر سال می شود [۱]. شواهد رو به رشدی در دست است که نشان می دهند کاروتنوئیدها^۱ دارای اثرات ضد سرطان زایی، ضد جهش زایی و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی می باشند [۲].

زعفران که از کلاله های خشک شده گیاه زعفران^۲ گرفته می شود از جمله گونه هایی است که سرشار از کاروتنوئیدها می باشد و در مناطق مختلف جهان عموماً مصرف می شود. زعفران (*Crocus sativus* L.) از جمله گیاهان دارویی است که در طب سنتی به کاربردهای متعدد آن از جمله ضد اسپاسم، کمک به هضم طبیعی غذا، تسکین دهنده لته، ضد نفخ، افزایش دهنده تعریق، مقوی معده، محرک تمایلات جنسی، خلط آور، ضد آبریزش و ایجاد قاعدگی زودرس می توان اشاره کرد [۳]. علاوه بر این مطالعات فارماکولوژیکی جدید نشان می دهند که عصاره زعفران دارای اثرات ضدتومور، جمع کنندگی رادیکال های آزاد و پایین آوردگی چربی خون می باشد [۳]. عصاره آبی و الکلی زعفران تشنج ناشی از پتیلن ترازول و الکتروشوک را در موش مهار کرد [۴]. عصاره های کلاله و گلبرگ زعفران همچنین اثرات ضد التهابی، ضد دردی و نیز ضد افسردگی در مدل های حیوانی از خود نشان دادند [۵، ۶].

برای نخستین بار Nair و همکارانش اثرات ضدسرطانی عصاره زعفران را علیه طیف وسیعی از تومورهای موشی و کشت سلول های لوسمی انسانی گزارش دادند [۲]. نشان داده شده که عصاره زعفران قادر به مهار یا کند کردن روند ایجاد تومور در انواع مختلفی از مدل های آزمایشگاهی به روش داخل بدنی است [۷، ۸]. کاروتنوئیدهای طبیعی گرفته شده از زعفران مانند کروستین و کروستین اثرات مهاری بر روی رشد و القای تمایز سلول ها در لوسمی از خود نشان داده اند [۹].

در این تحقیق اثر ضدتومور عصاره الکلی کلاله و گلبرگ زعفران به روش برون تنی ساده ای یعنی سنجش دیسک سیب زمینی با میکروب اگروباکتیریوم تومه فشنز بررسی شد و

همچنین سمیت سلولی به روش میگوی آب شور مورد تحقیق قرار گرفت. هدف اصلی این تحقیق تثبیت اثر ضدسرطانی کلاله زعفران به یک روش ساده و همچنین برای اولین بار اثر ضدتومور گلبرگ زعفران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه زعفران

گیاه زعفران در آبان ماه ۱۳۸۰ از زمین های کشاورزی مشهد جمع آوری شد (کد هر بار یوم ۱۴۳-۰۳۱۹-۰۱). خشک کردن گیاه تحت شرایط سایه و دور از نور صورت گرفت.

تهیه عصاره

از روش خیساندن استفاده شد. ۴ و ۵ گرم به ترتیب از کلاله و گلبرگ زعفران پودر شد. آنگاه داخل ظرف شیشه ای تیره ریخته و به آن ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درجه افزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت محتویات ظرف به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوبات جدا شد. با کمک دستگاه حذف حلال در خلا و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد اتانول حذف شد.

بررسی فیتوشیمی [۱۰، ۱۱]

الف- تشخیص فلاونوئید

۰/۲۵ گرم از پودر گیاه (کلاله و گلبرگ زعفران) با ۱۲/۵ میلی لیتر متانول به مدت چند دقیقه جوشانده شد و سپس محلول صاف گردید. به محلول صاف شده ۴ میلی لیتر اتر دیپترول (جهت ناخالصی های محلول در چربی) در قیف دکانتور افزوده و عمل استخراج انجام شد. این عمل سه بار تکرار شد. مقدار ۱ تا ۲ میلی لیتر از فاز متانولی را در دو لوله آزمایش ریخته و سپس به هر یک از لوله ها ۰/۰۵ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ اضافه شد. به یکی از لوله ها ۲۰۰ میلی گرم براده منیزیم افزوده و لوله دیگر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ایجاد رنگ نارنجی تا قرمز در کف لوله ای که براده منیزیم افزوده شده نشان دهنده وجود فلاونوئید است.

¹ carotenoids

² *Crocus sativus* L.



به مدت ۲۰ دقیقه غوطه‌ور و ضدعفونی شد و تحت هود لامینار دیسک‌هایی به قطر ۱/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۰/۵ سانتی‌متر از سیب‌زمینی‌ها تهیه شد. دیسک‌های سیب‌زمینی تهیه شده به پلیت حاوی آگار (۱/۵ درصد) منتقل و در هر پلیت پنج دیسک قرار داده شد. برای هر غلظت از عصاره‌های گیاه سه تا پنج پلیت حاوی دیسک تهیه شد.

پس از کشت باکتری آگروباکتریوم تومه فشنز (ATCC 23341) در محیط Soybean Casein Digest Agar، توسط سمپلر باکتری (10^8 CFU/ml) بر روی دیسک‌های سیب‌زمینی تلقیح شد. سپس پلیت‌های حاوی دیسک به مدت ۲۱ روز در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت تومورها بر روی دیسک‌های سیب‌زمینی با محلول لوگول آغشته و شمارش شدند. تومورها به دلیل نشاسته خیلی کم در برابر لوگول بی‌رنگ ولی بافت سیب‌زمینی آبی پررنگ می‌شود. درصد مهار رشد نسبت به گروه کنترل منفی (سوسپانسیون میکروبی همراه آب مقطر) سنجیده به صورت IC_{50} محاسبه شد.

آزمون میگوی آب شور [۱۲]

تخم میگو داخل پلیت حاوی آب دریای مصنوعی در انکوباتور ۲۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از تبدیل تخم‌ها به لاروها، ۱۰ عدد لارو زنده به پلیت منتقل و در مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه قرار داده شد. غلظت‌های مختلف از عصاره را در حفره‌های پلیت ریخته و یک حفره بدون عصاره به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. درصد مرگ و میر به صورت LC_{50} بر روی لارو ۲۴ ساعته محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت عصاره‌ها در مهار رشد آگروباکتریوم تومه فشنز

اثر ضد میکروبی احتمالی عصاره‌ها بر روی میکروب آگروباکتریوم به روش میکروپلیت و در محیط کشت Nutrient Broth صورت گرفت. جتتامایسین به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

ب- تشخیص آکالوئید

به ۰/۲۵ گرم از عصاره‌ها ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ درصد اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه جوشانده و سپس حجم به میزان اولیه رسانده شد و محلول اسیدی حاصل صاف گردید. محلول حاصل توسط مقدار مناسب آمونیاک ۱۰ درصد قلیایی و با اتیل اتر استخراج گردید.

محلول اتری تا حد خشک تبخیر و به آن ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ درصد افزوده شد. سپس محلول اسیدی حاصل به سه قسمت تقسیم گردید. یک قسمت به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به دو قسمت دیگر معرف بوشاردا و مایر اضافه گردید.

تشکیل رسوب قهوه‌ای رنگ با افزودن معرف بوشاردا و رسوب سفید مایل به زرد با افزایش معرف مایر نشان‌دهنده وجود آکالوئید است.

ج- تشخیص تانن

۰/۲۵ گرم عصاره کلالة و گلبرگ زعفران در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به محلول عصاره‌ها ۴-۳ میلی‌لیتر سدیم کلراید ۱۰ درصد افزوده شد. دو قطره کلرورفریک ۵ درصد در یک لوله آزمایش به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. سپس چند قطره از محلول عصاره‌ها به لوله آزمایش اضافه گردید. ایجاد رنگ سبز متمایل به آبی نشان‌دهنده وجود تانن است.

د- تشخیص ساپونین

۰/۲۵ گرم عصاره در لوله آزمایش ریخته و در مقداری آب مقطر حل و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شد. ثابت ماندن کف به مدت نیم ساعت نشان‌دهنده حضور ساپونین است.

ه- تشخیص آنتوسیانین

مقداری عصاره در آب مقطر حل نموده و محلول حاصل به وسیله اسید کلریدریک اسید شد. حضور رنگ قرمز در pH ۴-۳ و تغییر رنگ با تغییرات pH نشان‌دهنده وجود آنتوسیانین می‌باشد.

آزمون دیسک سیب‌زمینی [۱۲]

پس از شستشو، سیب‌زمینی در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ w/v



آنالیز آماری

جهت تعیین LC_{50} و IC_{50} از برنامه نرم‌افزاری Pharm. PCS استفاده شد و توسط این برنامه مقایسه شد.

نتایج

آزمایش‌های فیتوشیمی وجود آلكالوئید و ساپونین در کلاله و آنتوسیانین، آلكالوئید، تانن و فلاونوئید را در گلبرگ تایید نمودند (جدول شماره ۱).

عصاره‌های الکلی گلبرگ در محدوده غلظت اثر ضدتوموری، اثر ضد میکروبی بر علیه اگروباکتریوم تومه فشنز از خود نشان ندادند. حداقل غلظت مهار باکتری عصاره کلاله 10 mg/ml بود. چاهک‌های حاوی شاهد مثبت (محلول جنتامایسین 5 mg/ml همراه سوسپانسیون اگروباکتریوم تومه فشنز) شفاف بود.

IC_{50} عصاره‌های الکلی گلبرگ و کلاله برای مهار رشد تومورهای تاجی شکل دیسک سیب‌زمینی ناشی از اگروباکتریوم تومه فشنز (شکل شماره ۱) به ترتیب $(9/24-12/14) \text{ mg/ml}$ و $(4/76-5/9) \text{ mg/ml}$ بود. اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی گلبرگ و کلاله در مهار رشد تومور وابسته به دوز بود (شکل شماره ۲). وین‌کرس‌تین به عنوان کنترل مثبت با غلظت $0/08 \text{ mg/ml}$ باعث مهار کامل رشد تومور شد.

LC_{50} عصاره الکلی گلبرگ و کلاله در مرگ و میر لاروها میگو به ترتیب $(1288/0-1429/1) \text{ ppm}$ و 1356 ppm و $(1591/2) \text{ ppm}$ بود (شکل شماره ۳). IC_{50} و LC_{50} عصاره‌های کلاله و گلبرگ زعفران تفاوت معنی‌داری ($p < 0/05$) داشتند.

بحث

براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، عصاره‌های الکلی کلاله و گلبرگ زعفران به روش دیسک سیب‌زمینی باعث کاهش تعداد تومورهای ایجاد شده از اگروباکتریوم تومه فشنز در دیسک‌های سیب‌زمینی شدند و اثر ضدتوموری با این روش نشان دادند. در این مطالعه عصاره کلاله اثر بیشتری در مهار رشد توموری نسبت به عصاره گلبرگ نشان داد و مهار

رشد توموری عصاره‌های کلاله و گلبرگ وابسته به دوز بود. در بررسی سمیت به روش میگوی آب شور، گلبرگ سمیت بیشتری نشان داد ولی در مجموع هر دو عصاره سمیت قابل ملاحظه‌ای بر روی میگوی آب شور ندارند.

مطالعه سمیت حاد

در این مطالعه به منظور اندازه‌گیری سمیت حاد کلاله و گلبرگ زعفران، میزان مرگ و میر لارو میگوی آب شور در تماس با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. هر بار لاروها در شرایط استاندارد از جهت دما، مدت زمان و نیز غلظت نمک آب شور دریا نگهداری شد. LC_{50} به دست آمده با این روش برابر عصاره الکلی کلاله $1678/7 \text{ ppm}$ و در مورد عصاره الکلی گلبرگ $1356/7 \text{ ppm}$ می‌باشد. طبق تحقیقات به عمل آمده سمیت قابل ملاحظه در روش میگوی آب شور وقتی در نظر گرفته می‌شود که LC_{50} آن کمتر از 1000 ppm باشد [۱۲]. با توجه به نتایج که LC_{50} های به دست آمده بالای 1000 ppm است می‌توان گفت این عصاره‌ها در غلظت‌های پایین سمیت قابل ملاحظه‌ای بر روی میگوی آب شور ندارند و جزو مواد دارای سمیت کم به حساب می‌آیند.

بررسی نتایج مهار رشد توموری در سنجش دیسک

سیب‌زمینی

در سنجش دیسک سیب‌زمینی اثر ضدتوموری براساس کاهش ۲۰ درصد و بالاتر از آن در تعداد تومورهای ناشی از اگروباکتریوم تومه فشنز نسبت به دیسک کنترل منفی مشخص می‌شود و برای اینکه نتایج قابل قبول باشد باید در تمام غلظت‌های عصاره‌های تهیه شده تقریباً تعداد مشخص باکتری (10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر) وجود داشته باشد. باید توجه داشت عصاره‌های تهیه شده در غلظت‌های مورد بررسی باعث مرگ باکتری نشود زیرا در غیر این صورت نتایج منفی کاذب ایجاد می‌گردد.

طبق MIC به دست آمده برای عصاره الکلی حداقل غلظت مهار رشد آن 10 mg/ml تعیین شده، بنابراین بررسی کاهش تعداد تومورها در غلظت‌های کمتر از 10 mg/ml مطمئن تر خواهد بود.





الف



ب

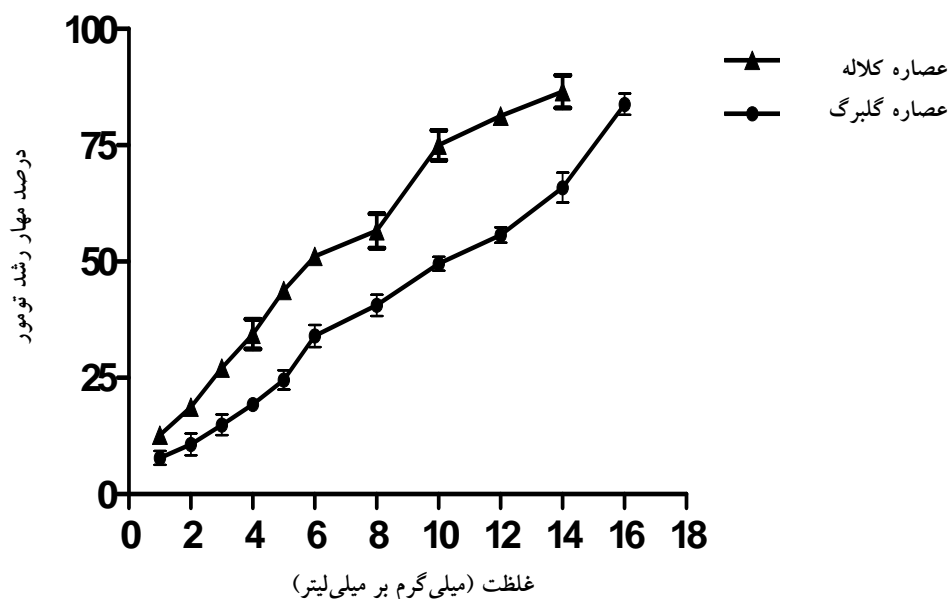
شکل شماره ۱- نمایش تومورهای تاجی شکل حاصل از آگروباکتریوم تومه فشنز بر دیسک سیب‌زمینی قبل (الف) و بعد (ب) از رنگ‌آمیزی با لوگل

جدول شماره ۱- بررسی فیتوشیمی عصاره الکلی کلاله و گلبرگ زعفران

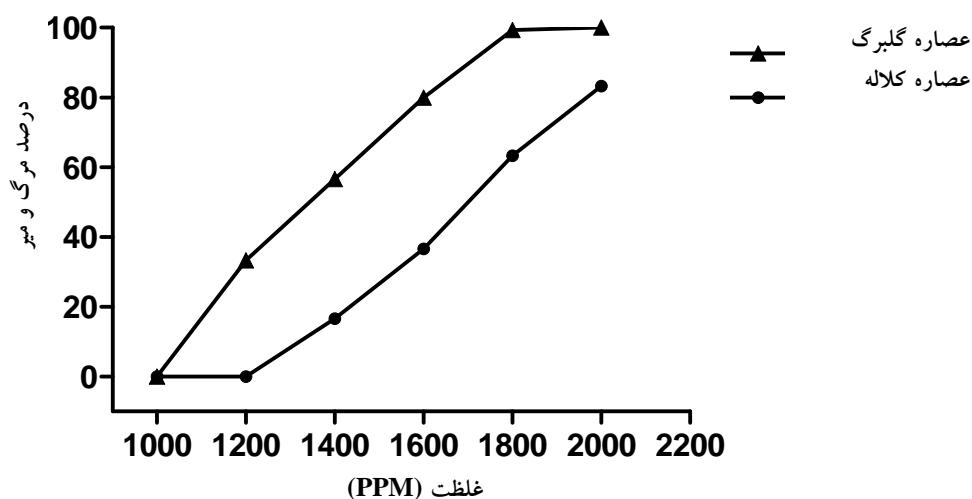
اندام گیاه	آنتوسیانین	آلکالوئید	تانن	ساپونین	فلاونوئید
کلاله	-	+	-	+	-
گلبرگ	+	+	+	-	+

+ و - به ترتیب وجود و عدم وجود ترکیب شیمیایی





شکل شماره ۲- درصد مهار رشد توموری ناشی از آگروباکتریوم تومه فشنز توسط عصاره الکلی کلاله و گلبرگ زعفران. هر نقطه مبین میانگین درصد مهار رشد + SD می باشد. تعداد دیسک های سیب زمینی مورد مطالعه در هر غلظت ۱۲ عدد می باشد که میانگین درصد مهار نسبت به کنترل منفی سنجیده شده است.



شکل شماره ۳- درصد مرگ و میر لاروها آرتمیا در مقابل غلظت های مختلف عصاره الکلی کلاله و گلبرگ زعفران، هر نقطه مبین اثر بر روی ۳۰ میگو می باشد.

در مطالعه ای که اثر ضدسرطانی عصاره الکلی کلاله بر روی سلول های سرطانی انسان^۱ بررسی شده، LC₅₀ بر روی سلول های سرطانی mg/ml ۲/۳ بوده و ۳ میلی مولار برای

عصاره الکلی گلبرگ خاصیت ضدباکتری تومه فشنز نشان نداد در نتیجه در بررسی نتایج محدودیتی ایجاد نمی کند.

¹ Hela cell



روی Hela cell انجام شده (۲/۳ mg/ml) نزدیک تر است که هر دو بر روی عصاره اتانولی کلاله بررسی شده‌اند. احتمال می‌رود محدود دوزهای موثر به دست آمده به نوع سلول‌هایی که روی آن مطالعه می‌شود، بستگی داشته باشد و نتایج به دست آمده از این مطالعه حاکی از توافق و ارتباط بین سنجش دیسک سیب‌زمینی و مطالعه ذکر شده روی Hela cell است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره‌های الکلی کلاله و گلبرگ دارای اثر ضدتومور به روش برون‌تنی می‌باشند و توانایی کلاله در مهار رشد توموری نسبت به گلبرگ بیشتر می‌باشد. همچنین این تحقیق نشان داد که کلاله دارای سمیت کمتری نسبت به گلبرگ است.

کروسین، ۰/۸ میلی‌مولار برای سافرانال و ۳ میلی‌مولار برای پیکروکروسین گزارش شده است. در این تحقیق کروسین به عنوان مهمترین ماده ضدسرطانی معرفی شده است [۱۳]. کروسین جزء گلیکوزیدهای کاروتنوئیدی بوده و محلول در آب و الکل می‌باشد. در مطالعه دیگر اثر کروسین، کروسستین و دی‌متیل کروسستین در مهار رشد و القای تمایز سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک بررسی شده است که IC_{50} به دست آمده کروسستین (۲ میکرومولار) و دی‌متیل کروسستین (۰/۸ میکرومولار) و کروسین (۲ میکرومولار) بوده است [۹]. با مقایسه نتایج ذکر شده دیده می‌شود که محدوده دوزها متغیر است. IC_{50} که در این مطالعه به دست آمده (IC_{50} کلاله ۵/۲ mg/ml) به مقدار LC_{50} به دست آمده از مطالعه‌ای که بر

منابع

1. Abdullaev FI, Rivera Luna R, Roitenburd Belacortu V and Espinosa Aguirre J. Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Arch. Med. Res.* 2000; 31: 526–531.
2. Nair SC, Kurumboor SK and Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. *Cancer Biother.* 1995; 10: 257-264.
3. Ríos JL, Recio MC, Giner RM and Máñez S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother. Res.* 1996; 10: 189-193.
4. Hosseinzadeh H and Khosravan V. Anticonvulsant effects aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. *Arch. Iran. Med.* 2002; 5: 44-7.
5. Hosseinzadeh H and Younesi H. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *BMC Pharmacol.* 2002; 2.
6. Karimi G, Hosseinzadeh H and Khaleghpanah P. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extract of *Crocus sativus* in mice. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2001; 4: 11-15.
7. Nair SC, Pannikar B and Pannikar KR. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett.* 1991; 57: 109–114.
8. Abdullaev FI and Frenkel GD. Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis. *Bio. Factors* 1992; 3: 201–4.
9. Plission M, Morjani H, Manifait M and Tarantilis PA. Inhibition of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Res.* 1994; 14: 1913-8.
10. Brain KR and Turner TD. *The Practical Evaluation of Phytopharmaceuticals*. Wright-Scientific. Bristol. 1975, p: 153.
11. Chhabra SC, Uiso FC and Mshiu EN. Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants. Part 1. *J. Ethnopharmacol.* 1984; 11: 157–179.
12. McLaughlin JL. Crown gall tumors on potato discs and *Brine Shrimp* Lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In Dey PM, Hartorne JB. *Methods in Plant Biochemistry*. 1992; PP. 1-31.
13. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M and Fernandez JA. Crocin, safranin and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cell in vitro. *Cancer Lett.* 1996; 100: 23-30.

