

## The effect of alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane (CAM)

Ataee N(BSc)<sup>1\*</sup>, Khayat Zade J(PhD)<sup>1</sup>, Rakhshandeh H(PhD)<sup>2</sup>, Zafar Balanezhad S(BS)<sup>1</sup>

1- Department of Biology, Islamic Azad University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received 29 May 2010 Accepted 18 Aug 2010

### Abstract

**Background:** Angiogenesis is one of the most important biological processes which is characterized by the formation of new blood vessels in many developmental and pathological stages. Therefore, angiogenesis blockage using anti-angiogenic drugs can be effective in treatment of such diseases as hemorrhages and cancers. *Citrullus colocynthis* (bitter melon) is a medicinal plant with cytotoxicity effects that its anti-angiogenic effects were investigated in this study.

**Materials and Methods:** In an experimental study, at first, *Citrullus colocynthis* alcoholic extract was prepared. Then, 30 Highline fertilized eggs were randomly divided into control, sham-exposed, and treatment groups. On the seventh day of incubation, the sham-exposed group was treated with normal saline and the treatment group was treated with the plant extract. On the 10th day of incubation, CAMs were examined and photographed by research photostereomicroscope. The number and length of vessels around the treated region were measured and analyzed through SPSS and t-test ( $p < 0.05$ ).

**Results:** According to data analysis, the number ( $31.40 \pm 5.87$ ) and length ( $46.60 \pm 7.33$  cm) of vessels in the control group did not reveal a significant difference in comparison to the number ( $27 \pm 5.16$ ) and length ( $42.40 \pm 5.05$  cm) of vessels in the sham-exposed group. However, a significant decrease was observed in the number ( $6.70 \pm 2.05$ ) and length ( $14.79 \pm 3.34$  cm) of vessels in the treatment group in comparison to the control group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* seems to have had a repressive effect on angiogenesis in chick chorioallantoic membrane. Therefore, it decreases the number and length of vessels around the treated area.

**Keywords:** Angiogenesis, Chorioallantoic membrane, *Citrullus colocynthis*

\*Corresponding author:

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University of Mashhad, Mashhad, Iran  
Email: nayereataee@yahoo.com

## اثر عصاره الکلی میوه هندوانه ابوجهل بر رگ زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

نیره عطایی<sup>1\*</sup>، دکتر جینا خیاط زاده<sup>2</sup>، دکتر حسن رخشنده<sup>3</sup>، دکتر سعیده ظفربالانژاد<sup>4</sup>

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
- 2- استادیار، دکترای تخصصی بیولوژی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
- 3- مربی، دکترای تخصصی فارماکولوژی، مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- 4- کارشناس آموزشی، دکترای تخصصی بیولوژی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت 89/3/8، تاریخ پذیرش 89/5/27

### چکیده

**زمینه و هدف:** رگ زایی، از مهمترین وقایع زیستی است که با تولید رگ‌های جدید، در بسیاری از مراحل رشد و نمو جنینی و پاتولوژیک رخ می‌دهد. لذا مهار دارویی رگ‌زایی می‌تواند در درمان برخی بیماری‌ها از جمله خونریزی و سرطان‌ها موثر باشد. هندوانه ابوجهل یک گیاه دارویی با اثرات سیتوتوکسیک است که در این تحقیق اثرات ضد رگ‌زایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در طی یک مطالعه تجربی ابتدا عصاره الکلی میوه هندوانه ابوجهل تهیه شد. سپس تعداد 30 عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد های لین به طور تصادفی در 3 گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار توزیع شدند. در روز هفتم انکوباسیون گروه شاهد آزمایشگاهی با نرمال سالین و گروه تیمار با عصاره گیاه هندوانه ابوجهل تیمار شدند. در روز دهم انکوباسیون از عروق تمام نمونه‌ها به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی عکس‌برداری شد. تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف ناحیه تیمار اندازه‌گیری و داده‌ها به کمک نرم افزار آماری SPSS و آزمون تی ( $p < 0/05$ ) تحلیل شدند. **یافته‌ها:** طبق آنالیز داده‌ها میانگین تعداد  $31/40(5/87)$  و طول  $46/60(7/33)$  سانتی‌متر انشعابات عروقی در نمونه‌های شاهد نسبت به تعداد  $27(5/16)$  و طول  $42/40(5/05)$  سانتی‌متر انشعابات در گروه شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نداشت. در حالی که مقایسه میانگین تعداد  $6/70(2/05)$  و طول  $14/79(3/34)$  سانتی‌متر انشعابات عروقی در نمونه‌های تیمار با شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد عصاره الکلی هندوانه ابوجهل مطابق با روش این مطالعه اثر مهارتی بر رگ‌زایی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه داشته و تعداد و طول انشعابات عروقی را در محل تیمار کاهش می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** رگ‌زایی، پرده کوریوآلانتوئیک، هندوانه ابوجهل

## مقدمه

رگ‌زایی، تشکیل عروق خونی جدید از عروق قدیمی بافت است که هم در طی تکوین طبیعی و هم در شرایط پاتولوژیکی خاص از جمله رشد تومور شایع است. رگ‌زایی طبیعی به التیام زخم و برگرداندن جریان خون در بافت آسیب دیده کمک کند. در پستانداران ماده رگ‌زایی همچنین در طول سیکل تولید مثلی ماهیانه (ساخت مجدد پوشش رحم، بلوغ تخم در طی تخمک گذاری) و در طول بارداری (برای ساخت جفت و جریان خون بین مادر و جنین) رخ می‌دهد (1).

در بیماری‌هایی مانند سرطان، پسوریازیس و اندومتریوزیس، رگ‌زایی بیش از حد اتفاق می‌افتد. در این شرایط عروق خونی جدید بافت‌های بیمار را تغذیه و بافت‌های نرمال را تخریب می‌کنند. درمان‌های ضد رگ‌زایی که در جهت سرکوبی عروق خونی جدیداند، برای درمان این بیماری‌های مزمن در حال گسترش هستند (2).

مطالعه روند رگ‌زایی و بررسی عوامل موثر بر آن مستلزم به کارگیری روش‌های متعدد در داخل بدن است. مدل‌های داخل بدن رایج شامل لاله گوش خرگوش، حفره گونه هامستر، حفره پوستی پستی، مدل کیسه هوا و پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه هستند (1). سادگی، سرعت و قیمت پایین سنجش‌های مختلف که به کمک جنین جوجه صورت می‌گیرد؛ انگیزه استفاده از این مدل را در پژوهش‌های فارماکولوژی و پزشکی تقویت می‌کند (3). در چند سال اخیر مطالعات فراوانی در زمینه بررسی اثرات عصاره‌های گیاهی مختلف بر روند رگ‌زایی صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به اثرات ضد رگ‌زایی عصاره شبدرد قرمز رد کلور و عصاره سایوروروس چینسنیس بر پرده کوریوآلانتوئیک اشاره کرد (4، 5).

معالجه و درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی از دیرباز معمول بوده است. زیرا منابع طبیعی آنها معمولاً فراوان و سالم می‌باشند. گیاهان دارویی خواص گوناگونی از جمله خواص ضد سرطانی دارند. هندوانه ابوجهل یکی از

گیاهان دارویی متعلق به خانواده خیارها یا کدوها کوریتاسه می‌باشد (6). این گیاه انتشار بیشتری در ایران، در نواحی جنوب کشور و مناطقی همچون جنوب استان خراسان دارد. میوه این گیاه تلخ و لعابدار بوده و دارای خاصیت مسهلی قوی با اثر قاطع است (7). علاوه بر این، میوه این گیاه در درمان دیابت و سرطان مورد استفاده و اثرات ضد باروری میوه آن نیز به اثبات رسیده است (8-10).

از آنجا که برای هندوانه ابوجهل اثرات سیتوتوکسیک و ضد سرطانی پیشنهاد شده است و از طرفی یکی از مکانیسم‌های اصلی درگیر در رشد و متاستاز تومور رشد عروق خونی و رگ‌زایی می‌باشد؛ در این مطالعه تجربی اثرات ضد رگ‌زایی این گیاه را بر پرده کوریوآلانتوئیک جوجه مورد بررسی قرار دادیم (7، 11).

## مواد و روش‌ها

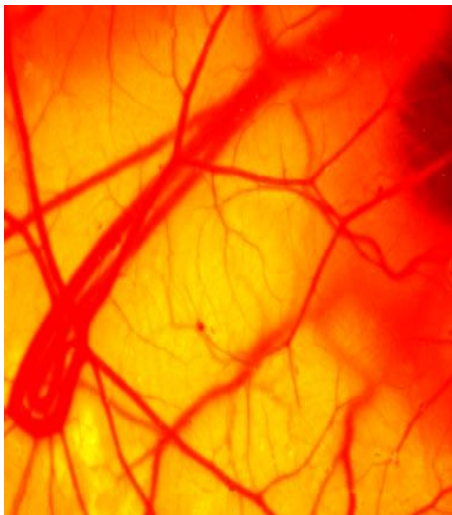
در این پژوهش که یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است مراحل عصاره گیری از گیاه در آزمایشگاه مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و انجام مراحل آزمایش در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی تکوینی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال 88-89 انجام شد.

میوه خشک شده هندوانه ابوجهل تمیز و آسیاب گردید. عصاره گیری به روش سوکسله و به دلیل بهتر حل شدن مواد در الکل، توسط اتانول 70 درصد صورت گرفت. عصاره 25 گرم پودر گیاه با 100 میلی لیتر الکل 70 درصد توسط دستگاه سوکسله به مدت 24 ساعت استخراج شد و پس از آن با حذف حلال توسط آون در دمای 60 درجه سانتیگراد، عصاره خالص به دست آمد (7). پس از تهیه عصاره غلیظ، 100 میلی گرم از آن را در 20 میلی لیتر نرمال سالین و چند قطره حلال دی متیل سولفو کساید (شرکت مرک، آلمان)، برای حلالیت بیشتر، حل کرده و محلول استوک تهیه شد. سپس دوز مورد نظر برای تزریق از محلول استوک آماده گردید.

و آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی  $p < 0/05$  تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته ها

عروق خونی گسترش یافته بر سطح پرده کوریوآلاتوئیک در روز دهم انکوباسیون مشاهده شد (شکل 1). نتایج حاصل از مقایسه میانگین تعداد  $31/40(5/87)$  و طول  $46/60(7/33)$  سانتی متر انشعابات عروقی در نمونه‌های شاهد با میانگین تعداد  $27(5/16)$  و طول  $42/40(5/05)$  سانتی متر انشعابات عروقی در نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نداشت. در حالی که در گروه تیمار، میانگین تعداد  $6/70(2/05)$  و طول  $14/79(3/34)$  سانتی متر انشعابات عروقی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) مشاهده شد (نمودار 1، 2).

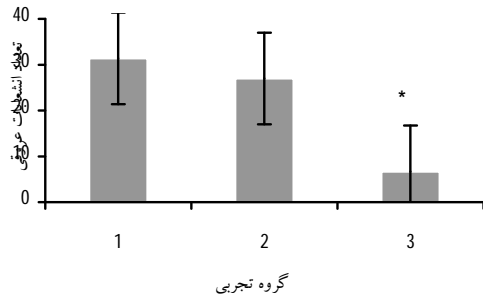


#### الف

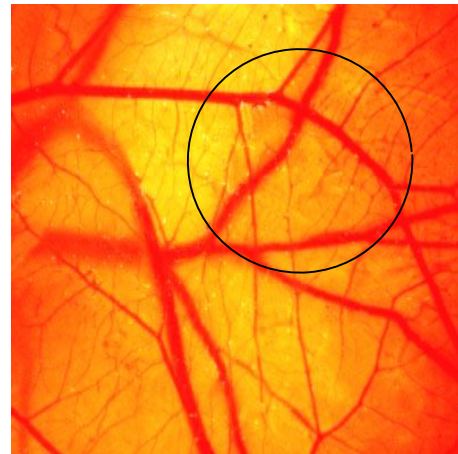
در این پژوهش از تخم مرغ‌های نطفه‌دار یک روزه نژادهای لین به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید، که از شرکت مرعک مشهد تهیه شدند. تعداد 30 عدد تخم (بدون احتساب تلفات) به طور تصادفی در 3 گروه آزمایشگاهی توزیع شدند که شامل گروه شاهد که در شرایط طبیعی نگهداری شد، گروه شاهد آزمایشگاهی که با نرمال سالین تیمار شد و گروه تیمار با عصاره میوه هندوانه ابوجهل با غلظت 100 میکروگرم بر میلی لیتر بودند. تخم مرغ‌ها پس از استریل شدن در دستگاه جوجه کشی تحقیقاتی (300 خانه ساخت شرکت دامدشت، مشهد) در دمای 38 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 65-70 درصد قرار گرفتند و روزانه دو بار چرخانده می‌شدند. در روز هفتم انکوباسیون تزریق ماده با استفاده از سرنگ انسولین که به فیلتر سر سرنگی 0/2 میکرون مجهز شده بود از روی پوسته بر روی پرده کوریوآلاتوئیک در شرایط کاملاً استریل ایجاد شده توسط هود لامینار) مدل آ.وی -100 تل استار، اسپانیا) (AV-100 Telstar, Spain) صورت گرفت (12، 13). حجم تزریقی به هر نمونه 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (3). پس از تزریق، محل آن توسط پارافین استریل (پارافین فارا، ایران) مسدود شد. سپس تخم‌ها به انکوباتور منتقل شدند. در روز دهم انکوباسیون بخشی از پوسته محل تزریق برداشته شد و به کمک فوتواسترونومیکروسکوپ تحقیقاتی (زایس، آلمان) تصاویری با درشتنمایی  $10 \times 0/65 \times 4$  از عروق پرده کوریوآلاتوئیک تهیه شد (12، 14).

تصاویر به دست آمده از تمام نمونه‌ها به کمک نرم افزار فوتوشاپ نسخه 8 مورد بررسی قرار گرفتند و متغیرها (طول و تعداد انشعابات عروقی در پرده کوریوآلاتوئیک)، در یک سطح مقطع یکسان (یک دایره به قطر 5 سانتی‌متر) در محدوده محل تزریق اندازه‌گیری شدند.

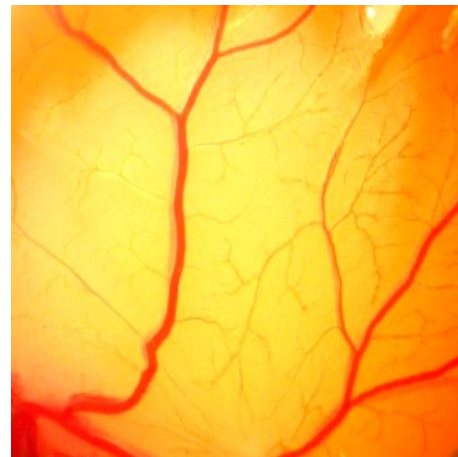
به جهت جلوگیری از خطا، اندازه‌گیری‌ها 3 بار تکرار شد. داده‌های کمی حاصل از شمارش و اندازه‌گیری عروق به کمک نرم افزار آماری SPSS به روش تی - تست



نمودار 2. مقایسه میانگین تعداد انشعابات در گروه های مورد مطالعه  
1- شاهد 2- شاهد آزمایشگاهی 3- تیمار  
\*: اختلاف معنی دار  $p < 0/05$  ،  $n = 10$

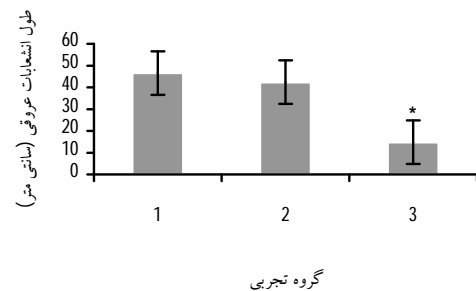


ب



ج

شکل 1. فوتواسترومیو اسکوپ عروق خونی پرده کوریوآلاتوئیک در سه گروه مورد مطالعه:  
الف ( شاهد ب) شاهد آزمایشگاهی ج) تیمار. فلش های سیاه رنگ کاهش محسوس انشعابات عروقی را در نمونه تیمار با هندوانه ابوجهل نشان می دهند. دایره سیاه نشان دهنده سطح اندازه گیری با قطر 5 سانتی متر است.



نمودار 1. مقایسه میانگین طول انشعابات در گروه های مورد مطالعه

### بحث

مطابق نتایج تحقیق حاضر عصاره میوه هندوانه ابوجهل تعداد و طول انشعابات عروقی پرده کوریوآلاتوئیک را در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی در محل تیمار به طور معنی داری ( $p < 0/05$ ) کاهش داد (نمودار 1، 2). لذا به نظر می رسد عصاره الکلی میوه این گیاه اثرات ضد رگ زایی دارد.

علیرغم پیشرفت های فراوان در زمینه کنترل و درمان بیماری های بدخیم از جمله سرطان ها، پژوهش های زیادی در جهت شناخت مکانیسم ها درگیر در رشد آنها (از طریق تکثیر سلولی یا رگ زایی) و ساخت و تولید داروهای موثر صورت می گیرد. از طرفی گیاهان دارویی بخش وسیعی از این پژوهش ها را به خود اختصاص داده اند.

یکی از مکانیسم های ضد سرطانی داروهای ضد سرطان آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلول است. نتایج حاصل از بررسی توکل افشاری و همکاران نشان داد که اثرات سیتوتوکسیک هندوانه ابوجهل بر دو رده سلولی سرطان حنجره و فیبروبلاست نرمال موشی L929 وابسته به غلظت است (7). ممون و همکاران برای عصاره این گیاه اثر بازدارندگی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس پومیلوس، باسیلوس سوبتیلیس مطرح و آن را به عنوان داروی سیتوتوکسیک و آنتی بیوتیکی مقتدر بر علیه میکروب ها برشمردند (15). تورکی و همکاران ماده موثره هندوانه ابوجهل که به عنوان ضد سرطان از آن نامبرده

تحقیق هم راستا با یافته‌های مطالعات قبلی در مورد سیتوتوکسیسیته این گیاه باشد (7). دالاک و همکاران اثرات آنتی اکسیدانتی هندوانه ابوجهل و تاثیر آن بر عملکرد کلیه و کبد را نیز گزارش کرده‌اند؛ که می‌تواند مقدمه‌ای برای تحقیقات آینده روی این گیاه باشد (20). به نظر می‌رسد اثرات مهاری بر تکثیر سلولی (سیتوتوکسیسیته) و ضد رگ‌زایی توسط این گیاه، آن را به عنوان کاندید مناسب داروی ضد سرطان پیشنهاد می‌نماید. امید است که نتیجه این تحقیقات بتواند در زمینه فارماکولوژی و ساخت داروهای جدید با منشاء گیاهی مورد استفاده قرار گیرد. لازم به ذکر است که این نتایج بر پایه روش به کار رفته در این پژوهش حاصل شده است و با توجه به این که بررسی رگ‌زایی پرده کوریوآلاتوتئیک از طرق مختلف از جمله استفاده از اسفنج، تزریق مستقیم به عروق پرده کوریوآلاتوتئیک و غیره نیز امکان پذیر می‌باشد، پیشنهاد می‌شود برای تأیید نتایج این تحقیق، روش‌های دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرد (3).

### نتیجه گیری

نتیجه این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره هندوانه ابوجهل دارای اثر مهاری بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلاتوتئیک جوجه است و تشکیل رگ‌های خونی را به طور موضعی در محل تیمار را کاهش می‌دهد.

### تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران محترمی که در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند، به ویژه آقای فیض مسئول محترم دفتر گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، آقای قدیری مسئول شرکت مرغک مشهد، خانم آقائی کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و خانم ستاری فرد تشکر و قدردانی می‌شود. در ضمن مقاله حاضر بخشی از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان بررسی اثر رگ‌زایی عصاره الکلی میوه هندوانه ابوجهل سترولوس کولوسیتیس بر پرده کوریوآلاتوتئیک جنین جوجه می‌باشد.

می‌شود را کوکوریبتاسین ها دانست (16). کوکوریبتاسین‌ها ترکیباتی از گیاهان خانواده کوکوریبتاسه هستند که در کشورهایمانند هند و چین به علت طیف وسیع فعالیت‌های فارماکولوژیکی آنها در طب سنتی مورد استفاده بوده‌اند (17). مطالعات لی و همکاران نشان دادند که کوکوریبتاسین E از طریق القای فسفریلاسیون فاکتور آغازین ترجمه یوکاریوتی-2 و القای آپوپتوزیس، از رشد سلول‌های سرطانی و تکثیر آنها جلوگیری می‌کند (18). همچنین لی و همکاران در سال نشان دادند که کوکوریبتاسین B استخراج شده از هندوانه ابوجهل با القای آپوپتوزیس و ممانعت از چرخه سلولی اثر ضد سرطانی بر سلول‌های هیپا-2 دارد (9).

یکی از عوامل اصلی در رشد و پیشرفت تومور تکثیر سلولی و رگ‌زایی است. رگ‌زایی هم برای تغذیه سلول‌های تومور و هم برای ایجاد راهی جهت متاستاز مورد نیاز است (19). فان و همکاران نشان دادند که گونه‌های گیاهی مختلف می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلف اثرات رگ‌زایی و یا ضد رگ‌زایی داشته باشند. برای مثال گونه کامیلیلا سینسیس (جای سبز) دارای ترکیبی با نام اتی گالوکیت چین-3-EGCG است که با ممانعت از بیان فاکتور رشد اند و تلیل ورید و فاکتور رشد فیبرو بلاست-2 و ممانعت از فعالیت گیرنده تیروزین کیناز از رگ‌زدایی جلوگیری می‌کند، و یا گونه گیاهی آلوورا با داشتن ترکیبی بنام بتا-سیتوسترول از طریق مکانیسم‌های تحریک سلول اندوتلیل ورید نافی انسان و تسهیل بیان فاکتور رشد اندوتلیل ورید و گیرنده فاکتور رشد اندوتلیل ورید یک گیاه با خاصیت رگ‌زایی است (2).

از آنجا که اثرات ضد رگ‌زایی هندوانه ابوجهل در این پژوهش مشاهده شد و با توجه به این که در پدیده رگ‌زایی رشد و تکثیر سلولی ضروری است علت کاهش تشکیل عروق در محل تزریق عصاره هندوانه ابوجهل بر پرده کوریوآلاتوتئیک احتمالاً می‌تواند؛ اثر بازدارندگی کوکوریبتاسین‌های موجود در گیاه بر رشد و تکثیر سلول‌های عروقی باشد (شکل 1). لذا به نظر می‌رسد نتایج این

## منابع

12. Seidlitz E, Korbie D, Marien L, Richardson M, Singh G. Quantification of anti-angiogenesis using the capillaries of the chick chorioallantoic membrane demonstrates that the effect of human angiostatin is age-dependent. *Microvasc Res.* 2004 Mar;67(2):105-16.
13. Hirsh D, Maclachlan N, Walker R. *Veterinary microbiology.* 2<sup>nd</sup> ed: Wiley-Blackwell; 2004.
14. Zafar Balanejad M, Parivar K, Baharara J, Mohseni Kouchesfahani MH. [The effect of rapamycin on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane]. *AMUJ* 2009; 12(1 (46)): 73-80.
15. Memon U, Brohi A, Ahmed S, Azhar I, Bano H. Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*. *Pak J Pharm Sci.* 2003 Jan;16(1):1-6.
16. Torkey H, Abou-Yousef H, Abdel Azeiz A, Hoda E. Insecticidal Effect of Cucurbitacin E Glycoside Isolated from *Citrullus colocynthis* Against *Aphis craccivora*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 2009;3(4):4060-6.
17. Dallak M, Bashir N, Abbas M, Haidara R, Khalil M, AL-Khateeb M, et al. Concomitant Down Regulation of Glycolytic Enzymes, Upregulation of Gluconeogenic Enzymes and Potential Hepato-Nephro-Protective Effects Following the Chronic Administration of the Hypoglycemic, Insulinotropic *Citrullus colocynthis* Pulp Extract. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 2009; 5(4): 153-61.
18. Li Y, Wang R, Ma E, Deng Y, Wang X, Xiao J, et al. The induction of G2/M cell-cycle arrest and apoptosis by cucurbitacin E is associated with increased phosphorylation of eIF2alpha in leukemia cells. *Anticancer Drugs.* 2010 Apr;21(4):389-400.
19. Harris A. Angiogenesis as a new target for cancer control. *European journal of cancer Supplement.* 2003;1(2):1-12.
20. Dallak M, Al-Khateeb M, Abbas M, Elessa R, Al-Hashem F, Bashir N. In vivo, Acute, Normo-hypoglycemic, Antihyperglycemic, Insulinotropic Actions of Orally Administered Ethanol Extract of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrab Pulp. *Am J Biochem Biotechnol.* 2009; 5(3): 119-26.
1. Clifford Murray J. *Angiogenesis protocols.* 2<sup>nd</sup> ed. New jersey: Humana Press; 2001.
2. Fan T, Yeh J, Leung K, Yue P, Wong R. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Jun;27(6):297-309.
3. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Sep; 59(11):1162-76.
4. Krenn L, Paper D. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine.* 2009 Dec;16(12):1083-8.
5. Yoo H, Kang H, Jung H, Kim K, Lim C, Park E. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Saururus chinensis* extract. *J Ethnopharmacol.* 2008 Nov; 120(2): 282-6.
6. Tannin-Spitz T, Grossman S, Dovrat S, Gottlieb H, Bergman M. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2007 Jan;73(1):56-67.
7. Tavakol afshari J, Rakhshandeh H, Zamani A, Mahdavi Shahri N, Ghazizadeh L, Nourouzi M, et al. [Cytotoxicity effects of *citrullus colocynthis* on hep2 and 1929 cell lines]. *Hakim.* 2005;8(2):47-54.
8. Sebbagh N, Cruciani-Guglielmacci C, Ouali F, Berthault M, Rouch C, Sari D, et al. Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes Metab.* 2009 Jun;35(3):178-84.
9. Liu T, Zhang M, Zhang H, Sun C, Deng Y. Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008 Oct; 265(10): 1225-32.
10. Gupta R, Sharma R. A review on medicinal plants exhibiting antifertility activity in males. *NPR.* 2006; 5(5): 389-410.
11. Liu T, Peng H, Zhang M, Deng Y, Wu Z. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *Eur J Pharmacol.* 2010 Sep; 641(1):15-22.