Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۶، آبان ۱۳۹۶، ۷۶۸-۷۵۷

اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های آلی جلبک دریایی *Gelidiella acerosa* سواحل چابهار بر رده‌های سلولی سرطان سینه (MCF-7) و کولورکتال (HT-29)

زینب باوی[۱]، مصطفی غفاری[۲]، علی طاهری[۳]، فریبرز سهیلی[۴]

دریافت مقاله: ۹۶/۲/۱۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۷/۱۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۶/۷/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۶/۷/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: جلبک‌های دریایی یکی از منابع طبیعی با طیف گسترده از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند که فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوت از جمله فعالیت ضدتومور و ضدسرطانی دارند. پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت سیتوتوکسیک عصاره‌های آلی جلبک دریایی *Gelidiella acerosa* علیه دو رده سلولی سرطان پستان و کولورکتال در شرایط برون سلولی انجام گردید.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع آزمایشگاهی بود. رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) و کولورکتال (HT-29) در محیط کشت RPMI همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت شد. اثر سیتو توکسیسیتی غلظت‌های مختلف جلبک (شامل ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با روش MTT (دی متیل تترازولیوم بروماید) و تریپان بلو سنجش شد. قطعه قطعه شدن DNA سلول‌ها پس از کشت و تیمار شدن با عصاره‌های جلبکی، تریپسینه شدن و رسوب در حضور RNAase با استفاده از ژل آگاروز ۲٪ بررسی شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.

یافته‌ها: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی در هر دو روش با غلظت عصاره‌ها رابطه معکوس داشت. غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی جلبک بیشترین اثر سمیت سلولی را نسبت به کنترل و غلظت‌های کمتر عصاره نشان داد ($p<۰/۰۵$). میزان LC50 (غلظت کشنده ۵۰ درصد) عصاره متانولی سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه به ترتیب برابر با ۲۵/۵۲±۷۲۴/۴۸ و ۴۱/۰۵± ۸۴۵/۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. هم چنین، غلظت بالای عصاره متانولی جلبک به شکل وابسته به دوز در مقایسه با نمونه کنترل قادر به قطعه قطعه کردن DNA سلول‌های سرطانی و القاء آپوپتوز شد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه اثر سیتوتوکسیک جلبک کارآمد بود و می‌تواند مبنایی برای انجام مطالعات بعدی به منظور شناسایی ترکیبات ضدسرطان باشد. هم‌چنین پس از انجام مطالعات درون‌تنی، پیش‌کلینیکی و کلینیکی می‌توان از عصاره این جلبک در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سمیت سلولی، روش MTT، جلبک دریایی، آپوپتوز، سرطان سینه، سرطان کولورکتال

۱- کارشناس ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
۲- دانشیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
۳- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی مهندسی شیلات- فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
تلفن: ۰۵۴۳۱۲۷۲۰۹۵، دورنگار: ۰۵۴۳۵۳۲۳۵۷۷، پست الکترونیکی: taherienator@gmail.com
۴- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

مقدمه

در سال ۲۰۱۳ حدود ۱۴/۹ میلیون مورد سرطان در جهان گزارش شده است و از این میزان، سرطان سینه با ۱/۸ میلیون مورد بیشترین مرگ و میر را در زنان ایجاد کرده است [۱]. سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان و دومین در زنان است که حدود ۱/۴ میلیون مرگ را در جهان به خود اختصاص داده است [۲].

از سویی، امروزه افزایش مقاومت به شیمی‌درمانی در درمان سرطان‌های مختلف دیده می‌شود [۳]. چندین مطالعه درون و برون‌تنی نشان داده است که ترکیبات طبیعی بدست آمده از گیاهان مانند فلاوونوئیدها و فلاون‌ها برای سلول‌های سرطانی سمیت سلولی دارند اما برای سلول‌های طبیعی سمیت ندارند. هم‌چنین می‌توانند پرولیفراسیون سلولی را مهار کنند و باعث القاء آپوپتوز شوند [۳].

جلبک‌های دریایی که از گیاهان می‌باشند منابعی جدید در تحقیقات ترکیبات ضدسرطان هستند و تعدادی از ترکیبات آن‌ها در آزمایشات بالینی به عنوان عوامل ضدتومور مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۵-۴]. از جمله ترکیبات فعال آن‌ها پلی‌ساکاریدها، فلورتانین، کارتنوئیدها مثل فوکوزانتین، مواد معدنی، پپتیدها و سولفولیپیدها می‌باشند [۶]. عصاره جلبک‌های مختلف بسته به دوز و غلظت باعث مهار رشد سلول‌های سرطان معده و روده بزرگ و تومورهای سینه شده است [۶].

درشت جلبک‌های دریایی، بر اساس رنگ دانه‌های خود به سه گروه اصلی جلبک‌های قهوه‌ای، قرمز و سبز تقسیم‌بندی می‌شوند [۷]. شواهد نشان می‌دهند که مواد زیست فعال حاصل از جلبک‌ها اثرات ضدسرطان را از طریق مکانیسم‌های عملکردی چندگانه، از جمله مهار رشد سلول سرطانی، تهاجم و متاستاز و القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی ایجاد می‌کنند [۲]. جلبک‌های موجود در منابع دریایی جنوب کشور یکی از ظرفیت‌های زیستی ارزشمند کشور هستند که کمتر مورد بررسی و مطالعه خواص ضدسرطانی قرار گرفته‌اند [۸].

جلبک دریایی *Gelidiella acerosa*، جزء جلبک‌های قرمز است. در ایران پراکنش این جلبک کم و بیش در استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان (گواتر، رمین، چابهار و تنگ) در فصول پاییز، زمستان و بهار می‌باشد [۹]. مطالعه روی اثر سیتوتوکسیک عصاره جلبک *Gelidiella acerosa* تا کنون در ایران گزارش نشده است. لذا با توجه به اهمیت کار در حوزه زیست فناوری فرآورده‌های دریایی و ضرورت مطالعه جهت دست‌یابی به داروهایی با منشاء طبیعی، در این مطالعه به بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره جلبک دریایی *Gelidiella acerosa* سواحل چابهار بر سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی در آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار در سال ۱۳۹۴ انجام شده است. میزان ۲۰ کیلوگرم جلبک *G. acerosa* (کد شناسایی AUDBTGA20100101) از سواحل چابهار جمع‌آوری و پس از پاک‌سازی و شست‌وشوی اولیه با آب دریا، برای از بین بردن رسوبات اضافی به آزمایشگاه دانشگاه علوم دریایی چابهار منتقل و مجدداً با آب شیرین

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

شست‌وشو شد. نمونه‌ها بر اساس کلید شناسایی معتبر و توسط متخصص گیاه‌شناسی دانشگاه مورد تأیید قرار گرفتند [۱۰]. نمونه‌ها به روش هوا خشک، خشک و پودر شدند. عصاره‌گیری با استفاده از چهار حلال متانول، کلروفرم، اتیل استات و هگزان انجام شد. جهت تهیه هر یک از عصاره‌ها مقدار ۲۵ گرم از پودر آماده شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر (FG-KMC65, Tatco lab, Iran,) قرار داده شد. عصاره حاصل از هر حلال به صورت مجزا بعد از عبور از کاغذ صافی (واتمن۴۲، آلمان) و فیلتر شدن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در زیر هود (کیمیاسکوداران، ایران) به طور کامل حلال‌پرانی شد. عصاره خالص خشک شده پس از جمع‌آوری و توزین، تا انجام تست‌های سنجشی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۱]. غلظت‌های نهایی ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با حلال مورد نظر تهیه گردید.

رده‌های سلولی سرطانی سینه (MCF-7) و کولورکتال (HT-29) از مرکز تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز تهیه شد. سلول‌ها برای رشد در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی نگهداری شدند. ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین به محیط کشت اضافه شد. رده‌های سلولی سرطانی مورد نظر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ دی‌اکسیدکربن و میزان رطوبت ۸۰٪ در انکوباتور (فرآیند پردیس سینا، ایران) کشت داده شدند [۱۲].

جهت تعیین فعالیت حیاتی سلول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول تریپان بلو (۰/۱ درصد (جرمی/ حجمی) در ۰/۱۵ مول در PBS) در یک چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی مخلوط شد. بلافاصله با کمک یک هموسایتومتر (لام نئوبار) تعداد سلول‌های رنگ گرفته (مرده) و سلول‌های رنگ نشده (سلول‌های زنده) تعیین شد. سپس به کمک فرمول زیر درصد فعالیت حیاتی مورد محاسبه قرار گرفت [۱۳]:

درصد زنده‌مانی = (تعداد سلول‌های زنده/ تعداد سلول‌های شمارش شده) ×۱۰۰

جهت تعیین درصد زنده‌مانی، سلول‌ها، در پلیت‌های ۹۶ خانه به میزان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلول در هر چاهک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵ درصد CO_2 به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از هر چهار عصاره جلبکی (شامل ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کنترل (تیمار بدون عصاره جلبکی به همراه سلول سرطانی) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از این مدت به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. بعد از گذشت ۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و در دور ۳۰۰۰ با سانتریفیوژ یخچال‌دار (K241R, Centurion Scientific Limited, England) سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن محتویات رویی، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی‌متیل سولفوکساید اضافه شد تا فورمازان

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

حاصل حل گردد. پلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شدند و سپس جذب نوری فورمازان در ۶۳۰-۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Awareness, Stat Fax 3200, USA) خوانده شد [۱۴].

برای هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها نیز دو بار تکرار گردید. برای محاسبه درصد مرگ سلول‌ها از فرمول زیر استفاده گردید [۱۴]:

۱۰۰× (میانگین جذب کنترل/ میانگین جذب تست) =

درصد مرگ و میر

برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA، سلول‌های سرطانی سینه و کولورکتال، با توجه به غلظت کشنده ۵۰ درصد سلولی (LC50) محاسبه شده، در سه غلظت از عصاره متانولی جلبک تیمار شدند و بعد از ۴۸ ساعت با محلول PBS شستشو و سپس تریپسینه گردیدند. سوسپانسیون سلولی با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و به رسوب حاصل ۶۰۰ میکرولیتر بافر (حاوی ۱۰ میلی‌مول HCl–Tris با (pH= ۷/۵)، ۴۰۰ میلی‌مول NaCl و ۱۰۰ میلی‌مول EDTA، سدیم دودسیل سولفات ۰/۶ ٪) و ۱۰ میکرولیتر محلول RNAase اضافه گردید. در مرحله بعد محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول نمک طعام ۶ مولار به عنوان رسوب‌دهنده پروتئین اضافه شد. محلول بدست آمده به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوباسیون و سپس با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جمع‌آوری و به آن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ مجدداً انکوباسیون شد. سپس با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو و در دمای اتاق خشک شد و در ادامه در ۲۰۰ میکرولیتر بافر (۱۰ میلی‌مول Tris–HCl و Tris-EDTA با pH=۸ و ۱ میلی‌مول EDTA حل گردید. DNA با استفاده از ژل آگاروز ۲٪ در ولتاژ ۱۰۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز (زیست فرآیند ارشیا، ایران) شد [۱۵].

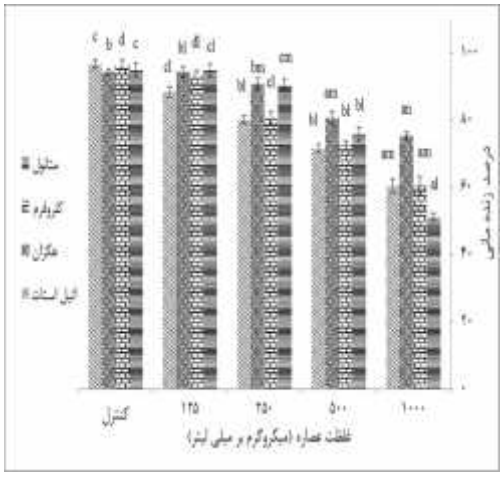
برای تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم‌افزار Graphpad Prism نسخه ۵ استفاده شد. با توجه به کمی بودن متغیرها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف جهت بررسی نرمال بودن توزیع فراوانی داده‌ها استفاده شد ($p>۰/۰۵$). همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene انجام گرفت ($p>۰/۰۵$). نتایج آزمایشگاهی به صورت انحراف معیار ± میانگین (در سه تکرار) گزارش گردید. از آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و آزمون تعقیبی Tukey جهت بررسی اختلاف بین اثر حلال‌های مختلف و غلظت‌های مختلف عصاره بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی استفاده شد.

نتایج

نمودارهای ۱ و ۲، درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره‌های جلبکی *G. acerosa* و کنترل را نشان می‌دهند. براساس نتایج، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با غلظت عصاره‌ها رابطه معکوس دارد و با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد زنده‌مانی کاهش می‌یابد.

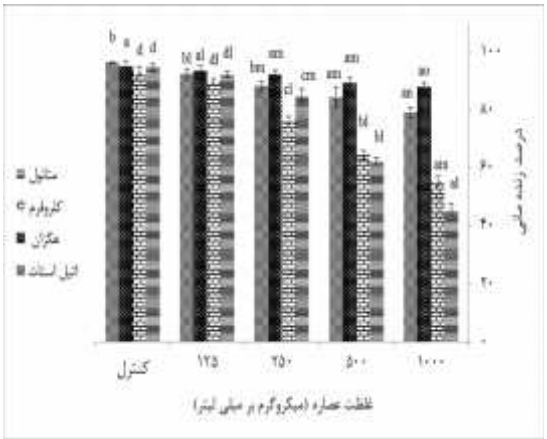
Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

بر طبق نمودار ۱، در بین عصاره‌ها، غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی جلبک *G. acerosa* با کمترین درصد (۵۱/۱۲±۱/۱۱) بیشترین اثر کشندگی را روی سلول‌های سرطانی داشت. عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی به ترتیب با ۶۰/۳۳±۲/۶۶ درصد و ۶۰/۲۲±۱/۹۹ درصد، حداقل تأثیر را داشتند.



نمودار ۱- درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک G. acerosa تعیین شده با تست تریپان بلو. (حروف a, b, c, d اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های هر عصاره و حروف l, m, n, o اختلاف معنی‌دار بین نوع حلال‌ها در هر غلظت را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف هم نام نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ می‌باشد). آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی.

در نمودار ۲ نیز درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سینه در مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی با کمترین درصد زنده مانی ۴۵/۳۷±۲/۴۸، بیشترین اثر کشندگی را بر سلول‌های سرطانی داشت. بیشترین درصد زنده‌مانی نیز مربوط به عصاره هگزانی (۸۸/۹۱±۱/۳۳ درصد) بود. درصد زنده‌مانی نمونه‌های کنترل عصاره‌های متانولی و هگزانی به ترتیب برابر ۹۴/۶۶±۱/۴۵ درصد و ۹۵/۲۱±۱/۵ درصد بود.



نمودار ۲- درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سینه در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک G. acerosa تعیین شده با تست تریپان بلو. (حروف a, b, c, d اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های هر عصاره و حروف l, m, n, o اختلاف معنی‌دار بین نوع حلال‌ها در هر غلظت را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف هم نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ می‌باشد). آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی.

جداول ۱ و ۲ نتایج درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه را در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره‌های جلبک *G. acerosa* و نمونه کنترل با استفاده از روش MTT نشان می‌دهند. در تمامی عصاره‌ها، با کاهش غلظت عصاره در فاز محلول، زنده‌مانی سلول‌های سرطانی افزایش یافت. بر اساس جدول ۱، عصاره متانولی (۳۴/۳۴±۲/۱۱ درصد) بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی کولورکتال داشت و کلروفرم (۴۹/۴۱±۲/۱۵ درصد) در مقام بعدی بود. میزان غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی بیشترین اثر را نسبت به کنترل و غلظت‌های کمتر عصاره نشان دادند. کمترین اثر مربوط به عصاره‌های اتیل استاتی و هگزانی بود.

بر اساس جدول ۲، عصاره‌های متانولی و کلروفرمی به ترتیب با ۴۴/۳۳±۱/۲۲ درصد و ۴۷/۳۳±۱/۳۳ درصد بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشت و این دو عصاره در غلظت مؤثر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

میزان غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی بیشترین اثر را نسبت به کنترل و غلظت‌های کمتر عصاره نشان دادند.

جدول ۱- درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک G. acerosa در روش MTT

غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر) / عصاره	متانولی	کلروفرمی	هگزانی	اتیل استاتی
۱۰۰۰	۳۴/۳۴ ± ۲/۱۱^{al}	۴۹/۴۱ ± ۲/۱۵^{am}	۷۱/۷۱ ± ۱/۰۹^{ao}	۶۰/۱۸ ± ۱/۵۴^{an}
۵۰۰	۶۰/۲۱ ± ۱/۲۲^{bl}	۵۹/۵۵ ± ۲/۱۰^{bl}	۸۰/۷۷ ± ۲/۴۵^{bm}	۶۷/۶۷ ± ۱/۹۰^{al}
۲۵۰	۸۱/۲۲ ± ۱/۱۱^{cl}	۷۷/۳۲ ± ۱/۲۲^{cl}	۸۸/۷۸ ± ۱/۹۹^{cl}	۷۸/۶۱ ± ۲/۱۱^{bl}
۱۲۵	۹۲/۴۴ ± ۱/۳۳^{dl}	۹۰/۸۹ ± ۱/۹^{dl}	۹۲/۱۱ ± ۰/۲۲^{cl}	۸۹/۲۲ ± ۱/۶۹^{cl}
کنترل	۹۵/۳۳ ± ۱/۱۱^{d}	۹۴/۲۵ ± ۰/۸۹^{d}	۹۴/۵۵ ± ۰/۷۶^{c}	۹۵/۲۳ ± ۱/۵۶^{c}

آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی، P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری
نتایج به شکل انحراف معیار± میانگین گزارش شده است. حروف a,b,c,d اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف l,m,n,o اختلاف معنی‌دار در هر ردیف را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف هم نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۲- درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سینه در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک G. acerosa در روش MTT

غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر) / عصاره	متانولی	کلروفرمی	هگزانی	اتیل استاتی
۱۰۰۰	۴۴/۳۳ ± ۱/۲۲^{al}	۴۷/۳۳ ± ۱/۳۳^{al}	۸۰/۰۹ ± ۱/۱۱^{an}	۷۰/۱۸ ± ۱/۵۴^{am}
۵۰۰	۵۸/۳۳ ± ۱/۶۷^{bl}	۵۹/۵۵ ± ۰/۶۷^{bl}	۸۷/۲۲ ± ۱/۱۱^{an}	۷۷/۷۸ ± ۱/۸۱^{abm}
۲۵۰	۷۸/۱۸ ± ۱/۹۹^{cl}	۷۴/۲۲ ± ۱/۰۷^{cl}	۹۱/۰۹ ± ۰/۴۹^{bm}	۸۱/۲۲ ± ۱/۱۲^{bl}
۱۲۵	۹۱/۴۶ ± ۱/۰۲^{dl}	۹۰/۸۹ ± ۲/۱۲^{dl}	۹۲/۶۷ ± ۰/۹۹^{bl}	۹۰/۷۱ ± ۱/۷۸^{cl}
کنترل	۹۵/۳۲ ± ۱/۰۸^{d}	۹۲/۲۲ ± ۱/۲۲^{d}	۹۴/۱۱ ± ۰/۳۷^{b}	۹۵/۸۸ ± ۰/۵۸^{c}

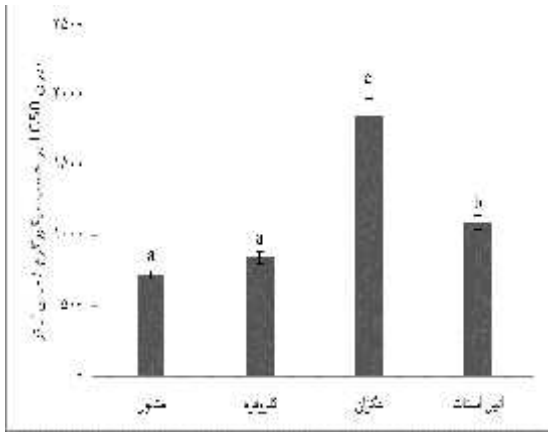
آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی، P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری
نتایج به شکل انحراف معیار± میانگین گزارش شده است. حروف a, b, c, d اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف l, m, n, o اختلاف معنی‌دار در هر ردیف را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف هم نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC50) عصاره‌های جلبک *G. aserosa* برای سلول‌های سرطان کولون و سینه در نمودارهای ۳ و ۴ آورده شده است. کمترین میزان هم برای سلول‌های سرطانی کولورکتال و هم سینه مربوط به عصاره متانولی و کلروفرمی بود و مقادیر هر یک به ترتیب برابر با ۲۵/۵۲±۷۲۴/۴۸، ۴۱/۰۵±۸۴۵/۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۸/۰۲±۷۸۸/۰۸، ۱۶±۸۱۵/۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک *G. aserosa* در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است. سه غلظت زیاد، متوسط و کم با توجه به میزان LC50 تعیین شد که مقادیر مربوطه برای سلول‌های سرطانی کولورکتال به ترتیب برابر با ۹۲۴، ۷۲۴ و ۵۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای سلول‌های سرطانی سینه نیز به ترتیب برابر با ۹۹۸، ۷۸۸، ۵۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

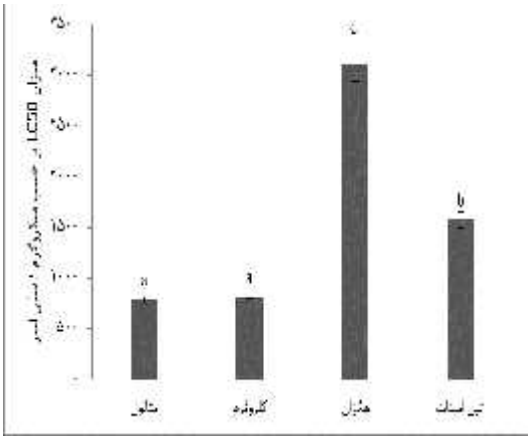
براساس تصاویر، عصاره متانولی جلبک و در هر دو رده سرطانی در مقایسه با نمونه کنترل قادر به قطعه قطعه کردن DNA سلول‌های سرطانی و القاء آپوپتوز شد. با

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

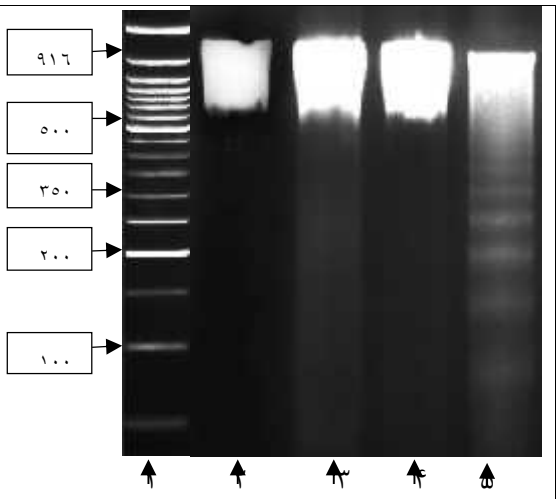
توجه به تصاویر، غلظت زیاد عصاره نسبت به سایر غلظت‌ها در هر دو سلول، توانایی بیشتری را در قطعه قطعه کردن DNA سلول‌های سرطانی داشت.



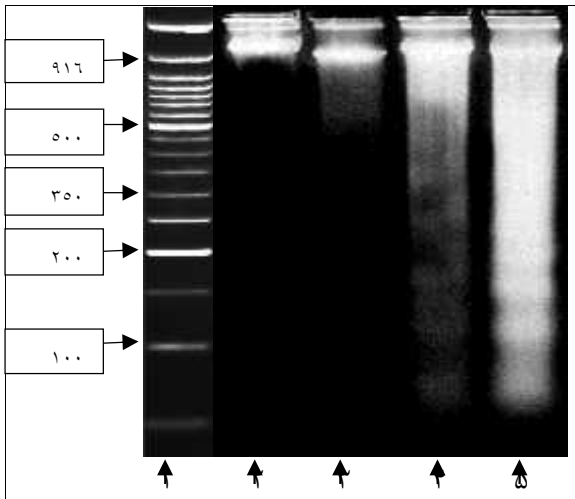
نمودار ۳- میزان LC50 عصاره‌های جلبک G. aserosa روی سلول‌های سرطان کولورکتال، (حروف a, b, c, d اختلاف معنی‌دار بین حلال‌ها را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف هم نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ می‌باشد)، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی.



نمودار ۴- میزان LC50 عصاره‌های جلبک G. aserosa بر روی سلول‌های سرطان سینه، (حروف a, b, c, d اختلاف معنی‌دار بین حلال‌ها را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف هم نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ می‌باشد)، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی.



شکل۱- تصویر الکتروفورز قطعه قطعه شدن DNA سلول سرطانی سینه در مواجهه با عصاره جلبک G. aserosa.
۱: لدر (ladder)، ۲: کنترل، ۳: غلظت کم، ۴: غلظت متوسط و ۵: غلظت زیاد عصاره



شکل۲- تصویر الکتروفورز قطعه قطعه شدن DNA سلول سرطانی کولورکتال در مواجهه با عصاره جلبک G. aserosa.
۱: لدر (ladder)، ۲: کنترل، ۳: غلظت کم، ۴: غلظت متوسط و ۵: غلظت زیاد عصاره

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

بحث

سنجش میزان تکثیر و بقاء سلول‌ها در تعیین میزان اثر داروهای ضدسرطانی بر سلول‌ها امری مهم به نظر می‌رسد. امروزه از روش‌های رنگ‌سنجی به خاطر سهولت در بکارگیری و دقت کافی در حصول نتایج، بیشتر استفاده می‌شود. سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها با تریپان بلو، روشی آسان برای ارزیابی یکپارچگی غشاء سلول‌ها می‌باشد. غشاء سلول‌های زنده اجازه ورود رنگ‌های غیر الکترولیت به درون سلول را نمی‌دهد، اما سلول‌های مرده به خوبی رنگ می‌گیرند [۱۶].

در مطالعه حاضر، فعالیت حیاتی سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه مجاور شده با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک *G. acerosa* و کنترل بررسی گردید و درصد زنده‌مانی محاسبه شد. درصد زنده‌مانی نمونه‌های کنترل بین ۹۳ تا ۹۶ درصد بود. براساس نتایج، درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی با غلظت عصاره رابطه معکوس دارد و با افزایش غلظت عصاره، زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد. در نمودار ۱، درصد زنده‌مانی غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر همه عصاره‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها و نمونه کنترل اختلاف معنی‌دار نشان داد. در همه عصاره‌ها غلظت‌های ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاقد اختلاف معنی‌دار با نمونه کنترل بود. براساس نتایج بیان شده، در روش تریپان بلو درصد زنده‌مانی هر دو رده سلول‌های سرطانی از روند زیر پیروی کرد: متانولی> کلروفرمی > اتیل استاتی > هگزانی.

Suganthy و همکاران، درصد زنده‌مانی سلول‌های خونی تک هسته‌ای (Peripheral blood mononuclear cell) را با روش تریپان بلو تحت تأثیر عصاره‌های بنزنی و دی کلرومتانی جلبک *G. acerosa* بررسی کردند. این عصاره‌ها در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل مثبت هیدروژن پروکسید ۲٪ که اثر سیتوتوکسیکی برابر ۱۰۰٪ از خود نشان داده بود، اثر سیتوتوکسیکی قابل ملاحظه‌ای نداشت [۱۷]. اگرچه روش تریپان بلو یک روش آسان است اما کاربرد آن چندان معمول نیست. لذا در مطالعات مختلف بیشتر از روش MTT استفاده می‌شود [۱۶].

روش MTT، روش دقیق دیگری است که با استفاده از نمک زرد رنگ تترازولیوم، بقاء سلول‌ها را بررسی می‌کند. این نمک به وسیله سلول‌های زنده جذب و سبب کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان توسط آنزیم ردوکتاز میتوکندری تشکیل می‌گردد. این کریستال‌ها در خارج از سلول با افزودن یک شوینده حل می‌شوند. این رنگ با روش‌های طیف‌سنجی قابل سنجش و اندازه‌گیری است [۱۶]. با توجه به نتایج مربوط به درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره‌های جلبک *G. acerosa* و نمونه کنترل با استفاده از روش MTT، با کاهش غلظت عصاره در فاز محلول، زنده‌مانی سلول‌های سرطانی افزایش یافت. در روش MTT نیز مانند روش تریپان بلو، همان روند بر عصاره‌ها حاکم بود و عصاره‌های متانولی و هگزانی به ترتیب کمترین و بیشترین درصد زنده مانی را نشان دادند. لذا با توجه به نتایج، می‌توان گفت که دقت روش MTT نسبت به تریپان بلو بیشتر و کاربرد آن راحت‌تر و سریع‌تر می‌باشد.

Namvar و همکاران در مطالعه خود اثر آپوپتوزیس، ضدتکثیر و چرخه سلولی را با روش MTT روی عصاره سه گونه جلبک *G. corticata*، *U. faciata* و *S. ilicifolium*،

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

علیه پنج رده سرطانی مهم (HepG2، Hela، MDA-MB231، MCF7 و HT-29) بررسی کردند که عصاره متانولی *G. corticata* بیشترین فعالیت مهاری علیه رده سلولی MCF-7 را نشان داد و *S. ilicifolium* در مقام بعدی بود [۱۸].

آپوپتوزیس مرگ سلولی برنامه‌ریزی و کاملاً کنترل شده است. از خصوصیات بارز آپوپتوز قطعه قطعه شدن DNA و هسته می‌باشد. لذا به منظور نشان دادن تأثیر عصاره جلبکی بر وقوع آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی در مطالعه حاضر از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه با عصاره متانولی در غلظت‌های زیاد، متوسط و کم به مدت ۴۸ ساعت باعث قطعه قطعه شدن و تغییر در الگوی DNA گردید. بر طبق شکل‌های ۱ و ۲، DNA سلول‌های تیمار شده با عصاره متانولی به صورت لکه (Smear) روی ژل الکتروفورز دیده شد که این حالت در سلول‌های کنترل مشاهده نشد. باندهای حاصل از عصاره متانولی جلبک، بیان‌گر توانایی عصاره در قطعه قطعه کردن DNA می‌باشد. گزارش شده که عصاره‌های اتانولی و متانولی *G. tenuistipitata* در آپوپتوزیس و تخریب DNA سلول‌های سرطانی Ca9-22 درگیر می‌باشند. هم‌چنین آپوپتوز را به وسیله عصاره متانولی جلبک *P. telfairiae* علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال (HT-29) القاء می‌کنند [۱۹].

در بیشتر مطالعات وجود خواص مختلف را در ارتباط با ترکیبات زیست فعال موجود در جلبک‌ها می‌دانند که هر یک قادر به بروز فعالیت‌های سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک می‌باشند. به عنوان مثال گلیکوپروتئین‌های *L. japonica* و فوکویدان *E. cava*، *S. hornery* و *C. costata* اثرات ضدسرطانی علیه سرطان کولورکتال را نشان دادند. فوکوزانتین و کارتنوئید مانع رشد سلول‌های سرطانی پروستات (LNCap) می‌شود [۱۹]. گزارش شده که فوکویدان‌ها موجب القاء آپوپتوز در بسیاری از سلول‌های سرطانی کولورکتال شده است [۲۰].

در این مطالعه نیز می‌توان چنین استنباط کرد که وجود ترکیبات زیست فعال در جلبک مورد مطالعه موجب بروز این فعالیت‌ها شده است. در مطالعه حاضر چنین به نظر می‌رسد که حلال متانولی نسبت به سایر حلال‌ها توانایی بیشتری در استخراج این ترکیبات مؤثر دارد که می‌تواند ناشی از ساختار شیمیایی و میزان قطبیت اجزاء سازنده جلبک‌ها و حلال باشد. در بین چهار حلال استفاده شده، متانول بیشترین قطبیت را دارد و کلروفرم و اتیل استات حلال‌هایی با میزان قطبیت متوسط و هگزان با قطبیت ناچیز گزارش شده‌اند [۲۱]. لازم به ذکر است استفاده از عصاره کل با چندین ترکیب شیمیایی مختلف، در بررسی فعالیت ضدسرطانی محدودیت ایجاد می‌نماید. لذا پیشنهاد می‌گردد با توجه به نتایج تحقیق حاضر بررسی ترکیبات شیمیایی عصاره‌های مؤثر جهت شناسایی ترکیبات زیست فعال آنتی‌اکسیدانی انجام شود و عصاره‌های تحقیق حاضر بر روی یک پستاندار هدف مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان می‌دهد که عصاره جلبک مورد مطالعه دارای اثر سیتوتوکسیک بالایی می‌باشد و می‌تواند مبنایی برای انجام مطالعات بعدی به منظور بررسی بیشتر اثرات دارویی این جلبک در درمان سرطان باشد. هم‌چنین از یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان برای پژوهش‌های بیشتر

جهت شناسایی، جداسازی و مشخص کردن ترکیبات خاص فیتوشیمیایی جلبک استفاده کرد. تأیید اثرات دارویی و ضدسرطانی عصاره‌های جلبکی این تحقیق روی پستانداران، نیاز به مطالعات درون‌تنی، پیش کلینیکی و کلینیکی دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی وزارت علوم تحقیقات و فناوری جهت حمایت مالی در قالب قسمتی از طرح پژوهشی شماره ۳/۸۲۶۰۱ و نیز دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار جهت حمایت از این مطالعه در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجویی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

References

[1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al., The global burden of cancer 2013, *JAMA Oncol* 1, 2015; 505–27, http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.0735.

[2] American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures* 3rd Edition. Atlanta: American Cancer. Society; 2015.

[3] Rais J, Jafri A, Siddiqui S, Tripathi M, Arshad M. Phytochemicals in the treatment of ovarian cancer, *Front Biosci* 2017; 1(9): 67-75.

[4] Guedes ÉA, da Silva TG, Aguiar JS, de Barros LD, Pinotti LM, SantAna AE. Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. *Brazilian J Pharmacognosy* 2013; 23(4): 668-73.

[5] Lin HC, Chou ST, Chuang MY, Liao TY, Tsai WS, Chiu TH. The effects of *Caulerpa microphysa* enzyme-digested extracts on ACE-inhibitory activity and in vitro anti-tumour properties. *Food Chem* 2012; 134(4): 2235-41.

[6] Mohamed S, Hashim S, Hafeedza A. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol* 2012; 23(2): 83-96.

[7] Samarakoon K, Jeon YJ. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae, A review. *Food Research International* 2012; 48(2): 948-60.

[8] Gharanjik BM, Wynne M, Bangmei X, Khajeh S. The biomass of the medicinal red algae (Rhodophyta) in the intertidal zone of the Chabahar coasts. *ISFJ* 2011; 20(3): 103-14. [Farsi]

[9] Gharanjik BM, Rohani Ghadikolaei K. Atlas of the sea algae of Persian Gulf and Oman sea coasts. Tehran: Iran. Ins. Fisheries Research, Scientific Information Management. 2009; pp: 170. [Farsi]

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018

[10] Oza RM, Zaidu A. Revised Checklist of Indian Marine Algae. Bhavnagar, India: Central Salt and Marine Chemicals Research Institute. 2003; pp: 296.

[11] Lim S, Cheung P, Ooi V, Ang P. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. *J Agric Food Chem* 2002; 50(13): 3862–6.

[12] Khanavi M, Nabavi M, Sadat N, Shams ardekhani M, Sohrabipour J, Ghaeli P, et al. Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. *Biol Res* 2010; 43(1): 31-7.

[13] Moldeus T, Hogberg J, Orrhenius S, Fleischer S, Packer L. Trypan blue dye exclusion method. *Meth Enzy* 1978; 52(3): 60-71.

[14] Li Y, Huang W, Huang S, Du J, Huang C. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay. *Biochem Biophys Research Communication* 2012; 422(1): 85–90.

[15] Nath M, Vats M, Roy P. Tri- and diorganotin (IV) complexes of biologically important orotic acid synthesis, spectroscopic studies, in vitro anticancer, DNA fragmentation, enzyme assays and in vivo anti-inflammatory activities. *Europ J Medical Chem* 2012; 59: 310-21.

[16] Shokrgozar MA, Zali H, Amanzadeh A, Rezaei-Tavirani M, Amanzadeh A, Trauma Mon. Comparison of Two Staining Assays Trypan Blue and MTT in vitro Evaluation of Human Calprotectin Proliferation Inhibition on Human Gastric Cancer Cells. *Kowsar Medical Journal* 2007; 12(2): 127-37. [Farsi]

[17] Suganthy N, Arif Nisha S, Karutha S. Evaluation of *Gelidiella acerosa*, the red algae inhabiting South Indian coastal area for antioxidant and metal chelating potential. *Biomed Prev Nutr* 2013; 3(4): 399-406.

[18] Namvar F, Baharara J, Mahdi A. Antioxidant and Anticancer Activities of Selected Persian Gulf Algae. *Ind J Clin Biochem* 2014; 29(1): 13-20.

[19] Lee JC, Hou MF, Hua HW, Chang FR, Yeh CC, Tang JY, et al. Marine algal natural products with anti-oxidative,anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International* 2013; 13(55):1-7.

[20] Thinh PD, Menshova RV, Ermakova SP, Anastyuk SD, Ly BM, Zvyagintseva TN. Structural Characteristics and Anticancer Activity of Fucoidan from the Brown Alga *Sargassum mcclurei*. *Mar Drugs* 2013; 11(5): 1456-76.

[21] Zheng Y, Chen Y, LU H. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. *Chin J Oceanol Limnol* 2001; 19(4): 327-31.

The Cytotoxic Effect of Chabahar Coast Marine Algae *Gelidiella Acerosa* Organic Extracts on Breast (MCF-7) and Colorectal (HT-29) Cancer Cell Lines

Z. Bavi[1], M. Ghaffari[2], A. Taheri[3], F. Soheili[4]

Received:08/05/2017 Sent for Revision: 09/10/2017 Received Revised Manuscript: 18/10/2017 Accepted: 21/10/2017

Background and Objectives: Marine algae are one of the natural resources which produce a wide range of new secondary metabolites with various biological activities such as antitumor and anticancer properties. The present study was conducted in order to evaluate the *invitro* cytotoxic effect of marine algae *Gelidiella acerosa* organic extracts against breast (MCF-7) and colorectal (HT-29) cancer cell lines.

Materials and Methods: In this laboratory study, cell lines of breast (MCF-7) and colorectal (HT-29) were cultured in RPMI medium with 10% fetal bovine serum (FBS). The cytotoxic effect of different concentrations (125, 250, 500 ,and 1000 µg/ml) of algae extracts cultured cells were evaluated by MTT (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) and trypan blue assay. DNA fragmentation activity of the cells was evaluated by the 2% agarose gel after cell culturing by the different concentration of the algae extracts, trypsination ,and precipitation by RNAase. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

Results: Survival of cancer cells in both methods was inversely correlated with the concentration and the percentage of survival decreased with increasing concentration. Concentration of 1000 µg/ml of methanol extract showed the greatest effect compared with the controls ($p<0.05$). The methanolic extract LC50 (Lethal Concentration 50) on colorectal and breast cancer cells was 724.48±25.52 and 845.36±41.05 µg/ml, respectively. Also, methanolic extract of algae was able to fragment the DNA of cancer cells and induce apoptosis dose dependent ($p<0.05$).

Conclusion: In this study, results showed seaweed extract can be the basis for further studies in order to recognize the chemical compounds of the extracts. Also, after *invivo*, preclinical, and clinical studies the extract can be used in food and pharmaceutical industries.

Key words: Cytotoxicity, MTT assay, Marine algae, Apoptosis, Breast cancer, Colorectal cancer

Funding: This study was funded by the Iranian Science, Research ,and Technology Ministry for Research number 3.82601.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Chabahar Maritime University approved the study.

How to cite this article: Bavi Z, Ghaffari M, Taheri A, Soheili F. The Cytotoxic Effect of Chabahar Coast Marine Algae *Gelidiella Acerosa* Organic Extracts on Breast (MCF-7) and Colorectal (HT-29) Cancer Cell Lines. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2017; 16(8): 757-68. [Farsi]

1 ***MSc in Fish Processing Technology, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran***
2 ***Associated Prof. of Aquatic Organisms Health and Diseases, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran***
3 ***Associate Prof., Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University Chabahar, Iran***
(Corresponding Author) TEL: (054)31272095, Fax: (054)35323577, Email: taherienator@gmail.com
4 ***MSc in Genetics, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran***

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 9:24 +0430 on Saturday August 18th 2018