

## بررسی مقایسه‌ای اثر فراکشن کلروفرمی جلبک قرمز (*Gracilaria salicornia* L.) و جلبک قهوه‌ای (*Sargassum angostifolium* L.) بر تکثیر، چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس در رده سلولی سرطان پستان و رده نرمال

پردیس میرزاییان<sup>۱</sup>، محمد شکرزاده لموکی<sup>۲</sup>، ناصر جعفری<sup>۳</sup>، فاطمه رضایی<sup>۴</sup>، طویبی

میرزاپور<sup>۵</sup>، علی صالح‌زاده<sup>۱\*</sup>

- ۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، رشت، ایران
- ۲- دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات دارویی، ساری، ایران
- ۳- دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، بابل، ایران
- ۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، بابل، ایران
- ۵- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، رشت، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۱۸

### چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه مقایسه اثرات عصاره کلروفرمی دو نوع جلبک قرمز و قهوه‌ای بر تکثیر، چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس در رده سلولی سرطان پستان می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ابتدا سلول‌های سرطانی MCF 7 و نرمال MRC 5 کشت داده شده و در ادامه سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از عصاره‌های کلروفرمی جلبک‌ها به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. درصد بقا سلول‌ها به روش MTT و نوع مرگ سلولی القا شده و توقف چرخه سلولی به روش فلوسایتومتری بررسی شدند. نتایج حاصله توسط نرم افزار Prism مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج نشان داد که هر دو جلبک قهوه‌ای و جلبک قرمز، تکثیر سلول‌های سرطانی MCF7 را به صورت یک‌گویی وابسته به غلظت کاهش دادند. غلظت IC<sub>50</sub> برای عصاره کلروفرمی جلبک قهوه‌ای برابر ۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای جلبک قرمز برابر ۱۰۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این مقادیر بیان‌گر اثرات مهاری بیش‌تر جلبک قهوه‌ای (۶۳/۳۱ درصد) نسبت به قرمز (۵۸/۳۳ درصد) بود. هم‌چنین این دو عصاره به‌طور موثری آپوپتوزیس را القا و چرخه سلولی را در مرحله G0/G1 متوقف کردند.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که عصاره کلروفرمی این جلبک‌ها می‌تواند به‌عنوان یک مهارکننده قوی رشد برای سرطان پستان مطرح باشد.

**واژگان کلیدی:** *Gracilaria salicornia*، *Sargassum angostifolium*، سرطان پستان، آپوپتوزیس، چرخه سلولی

## مقدمه

امروزه سرطان‌های گوناگون در سراسر جهان، عامل بخش زیادی از مرگ‌ومیرها می‌باشند. روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، هورمون‌درمانی و ایمونوتراپی اشاره داشت. سرطان پستان شیوع بالایی در بین زنان دارد، به طوری که حدود ۱۰ درصد زنان در طول عمر خود به این بیماری مبتلا می‌شوند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سرطان پستان با رشد روبه‌افزایش خود، به یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در میان زنان ایرانی تبدیل شده است و از هر ۱۰۰۰۰ زن، ۳۳ نفر به این سرطان مبتلا می‌شوند (۱، ۲). غیر از روش‌های رایج ذکر شده، امروزه استفاده از مواد گیاهی در درمان سرطان نسبت به مواد شیمیایی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار می‌باشد، زیرا مواد گیاهی اثرات جانبی کم‌تری دارند. باین‌حال، بسیاری از عصاره‌های گیاهی به‌ویژه در غلظت‌های بالا می‌توانند اثرات سمی داشته باشند (۳، ۴). این اطلاعات نشان دهنده نیازمندی به استراتژی‌های پیش‌گیرانه و درمانی طبیعی در زمینه سرطان است (۵). باین‌حال هنوز تاثیر مثبت بسیاری از مواد طبیعی مانند جلبک‌ها به‌صورت علمی مورد بررسی و تحقیق قرار نگرفته است. بسیاری از جلبک‌ها از منابع عظیم میکروارگانیسم‌های دریایی هستند که مورد توجه بسیاری از صنایع دارویی و درمانی جهت تولید محصولات آینده با گستره کاربردی متنوعی هم‌چون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانسی قرار گرفته‌اند.

جلبک‌های دریایی برای بیماری‌هایی مانند گواتر، تیروئید، اسهال خونی، فشار خون بالا، عفونت دستگاه ادراری و عفونت‌های میکروبی مفید هستند. آن‌ها هم‌چنین به‌عنوان یک داروی گیاهی جهت درمان سرفه، آسم، هموروئید، گواتر، بیماری‌های معده، زخم معده و سردرد استفاده می‌شوند (۶-۹). مطالعات نشان داده است که در مصرف کنندگان جلبک، میزان ابتلا به ایدز به‌طور چشم‌گیری کم‌تر از دیگران بوده است (۱۰). ترکیبات آنتی‌اکسیدانسی که در جلبک‌ها وجود دارد نقش مهمی در برابر بیماری‌های مختلف به‌عنوان مثال تصلب شرایین، التهاب مزمن، اختلالات قلبی و عروقی، سرطان، آلزایمر و فرایند پیری ایفا می‌کنند (۱۱).

موفقیت ترکیبات موثر بر سلول‌های سرطانی تا حد زیادی به توانایی این ترکیبات در فعال‌سازی مسیرهایی بستگی دارد که مرگ سلولی را با واسطه توقف سیکل سلولی و القای آپوپتوزیس سبب می‌شوند (۱۲). آپوپتوزیس فرایند بسیار مهمی در جلوگیری از پیشرفت تومور می‌باشد و نقش بسیار مهمی در درمان انواع تومورها ایفا می‌کند. به بیان دیگر امروزه یکی از بهترین استراتژی‌های به‌کار گرفته شده توسط ترکیبات ضد توموری، القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی است. آپوپتوزیس یکی از اشکال مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌باشد که جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آن به‌خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. آپوپتوزیس بدون این که منجر به ایجاد واکنش‌های خودایمنی و یا پاسخ‌های التهابی شد، موجب هدف‌گیری سلول به سمت مرگ سلولی می‌شد (۱۲).

این مطالعه به‌صورت *in vitro* انجام شده و هدف آن بررسی مقایسه‌ای تعیین درصد بقا سلول‌ها به‌روش MTT، نوع مرگ سلولی القا شده (آپوپتوزیس یا نکروزیس) و توقف چرخه سلولی به‌روش فلوسایتومتری تحت تاثیر عصاره کلروفومی جلبک قهوه‌ای سارگاسوم انگوستیفولیوم (*Sargassum Angustifolium*) از گروه *Phaeophyceae* و هم‌چنین گونه‌ای از جلبک قرمز به‌نام گراسیلاریا سالیکورنیا (*Gracilaria Salicornia*) از گروه *Florideophyceae* بوده است.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری جلبک و عصاره‌گیری:** نمونه‌های جلبک از سواحل چابهار جمع‌آوری و با استفاده از اطلس جلبک‌های دریایی سواحل خلیج فارس و دریای عمان مطابقت داده شدند (۱۳). سپس جلبک‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد محیط به مدت ۵ روز در سایه خشک شدند و توسط آسیاب برقی پودر شدند. ۱۰۰ گرم از هر نمونه‌ی خشک شده به روش سوکسله با حلال آب- اتانول به نسبت ۸۰:۲۰ عصاره‌گیری شد. سپس عصاره توسط دستگاه روتاری (WB2000, Heidolph, Germany) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد و سپس عصاره حاصل توسط فریز درایر (Lyovapor L-200, BUCHI, USA) خشک شد. به منظور جداسازی اجزا کلروفومی، ابتدا از حلال هگزان به منظور جداسازی ترکیبات چرب گیاه استفاده شد. ۵۰ گرم از پودر عصاره با ۵۰۰ میلی‌لیتر هگزان شست‌وشو داده شد و سه تا چهار روز هر ۲۴ ساعت محلول رویی از صافی گذرانده شد و حلال جدید اضافه شد. این کار تا بی‌رنگ شدن کامل محلول ادامه یافت. سپس محلول خارج شد و پودر باقی‌مانده کاملاً خشک شد. در این مرحله به پودر ۵۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و سه تا چهار روز هر ۲۴ ساعت محلول رویی از صافی گذرانده شد و حلال جدید افزوده شد. این کار را تا بی‌رنگ شدن کامل محلول ادامه یافت. محلول حاصل توسط روتاری تغلیظ و توسط فریز درایر پودر شد. سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و دور از نور نگهداری شد (۱۴). جهت انجام تست 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) پودر به دست آمده در دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد و از آن غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. غلظت صفر به عنوان کنترل در نظر گرفته شد (غلظت DMSO در محیط کشت جهت جلوگیری از سمیت حلال ۰/۱ درصد در نظر گرفته شد و نمونه کنترل هم با غلظت ۰/۱ درصد DMSO انکوبه شد) (۱۵، ۱۷).

## کشت سلولی

رده سلولی سرطانی MCF-7 و سلول نرمال MCR5 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط کشت RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, Germany) غنی شده با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد و محلول پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد به منظور فراهم کردن محیط بهینه برای رشد سلول‌ها استفاده شد. سلول‌ها تحت شرایط کنترل شده دما (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. در زمان برداشت سلولی، بعد از تخلیه محیط کشت حاوی عصاره‌ها، سلول‌ها تریپسینه و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (حدود ۳ تا ۵ دقیقه) از کف فلاسک جدا شدند. سپس با استفاده از بافر فسفات-سالین، سه بار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۲۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآمد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسیتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، سلول‌هایی با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست آماده شدند (۱۷، ۱۸).

## سنجش میزان سمیت سلولی

در این آزمون مبنای سنجش براساس معرض گذاری عصاره کلروفومی با غلظت‌های مختلف در مجاورت رده سلولی سرطانی و نرمال و سنجش تعداد سلول‌های مرده می‌باشد. بدین منظور از ماده موثره زرد رنگ تترازولیوم و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان به روش TTM استفاده شد (۷۱). براساس این آزمون، در هر یک از چاهک‌های یک پلیت ۶۹ خانه‌ای ۰۰۲ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵۰۱ سلول انتقال و کشت داده شد. پس از رسیدن به تراکم ۰۸ درصد، محیط کشت کهنه با محیط کشت جدید جایگزین شد. عصاره کلروفومی جلبک‌ها در غلظت‌های ۰، ۰۱، ۰۰۵، ۰۰۱ و ۰۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر (برای هر غلظت ۳ بار تکرار گذاشته شد) به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از گذشت زمان مورد نظر به هر چاهک ۵۲

میکرولیترا از محلول ذخیره‌ی TTM با غلظت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزوده و پس از گذشت زمان سه ساعت، با افزودن ۰۰۱ میکرولیتر حلال دی‌متیل سولفوکساید (OSMD) میزان محصول فورمازان تولید شده توسط دستگاه الیزا ریدر (XLE 008, keToiB, ASU) در طول موج ۰۹۴ نانومتر و طول موج رفرنس ۰۳۶ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رشد سلولی توسط فرمول زیر محاسبه شد (۹۱).

$$100 \times \left( \frac{\text{جذب نوری تست}}{\text{جذب نوری کنترل}} \right) = \text{درصد بقای سلولی}$$

**بررسی میزان آپوپتوزیس و نکروزیس:** تعداد  $2 \times 10^5$  سلول رده MCF7 در هر چاهک پلیت ۶ خانه کشت داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون سلولی (در غیاب و در حضور غلظت‌های ذکر شده از عصاره کلروفومی جلبک‌های مذکور) محلول روی سلول‌ها برداشته شد. سلول‌ها توسط PBS (Sigma-Aldrich, Germany) شست‌وشو داده شدند. به‌منظور جداسازی سلول‌ها از کف چاهک، به‌هر چاهک محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد و EDTA ۰/۱ درصد اضافه و حدود ۳ دقیقه انکوبه شد. پس از جدایی سلول‌ها از کف چاهک، به‌منظور خنثی‌سازی تریپسین، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰ درصد اضافه و محلول حاصل به محیطی که قبلاً برداشته شده بود اضافه شد. محلول حاصل در ۱۲۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محیط رویی دور ریخته شد. جهت انجام شست‌وشو، به سلول‌ها PBS اضافه شد و سلول‌ها مجدداً سانتریفیوژ شدند. سپس سلول‌ها به‌حالت سوسپانسیون در آمدند و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول بایندینگ بافر ۱ درصد به آن‌ها اضافه شد و مجدداً سانتریفیوژ شد. مرحله قبلی یک‌بار دیگر تکرار شد و تعدادی از سلول‌ها به‌داخل لوله فلوسایتومتری برده شدند و به‌هر لوله ۲ میکرولیتر آنتی‌بادی آنکسین V و ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی PI اضافه شد (BD Biosciences, USA). نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی انکوبه و در پایان این زمان با دستگاه فلوسایتومتری (Sysmex Partec, USA) آنالیز شدند. در منحنی دو بعدی، چهار ناحیه Q1 تا Q4 وجود دارد. به‌نحوی که ناحیه Q1 نمایان‌گر سلول‌های نکروزی، Q3 بیان‌گر سلول‌های دارای آپوپتوزیس اولیه، Q2 بیان‌گر سلول‌های دارای آپوپتوزیس تاخیری و Q4 بیان‌گر سلول‌های سالم می‌باشد. فلئوروکروم‌های مورد استفاده شامل فلئوروسین ایزوتیوسیانات (FITC) کنژوگه با Annexin-V بود که در کانال FL1 ارزیابی قرار گرفت و فیکواریترین (PE) کنژوگه با PI که در کانال FL2 مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور تعیین اثرات آلوئه امودین‌ها (Aloe emodin) در جهت القا آپوپتوزیس و یا نکروزیس، درصد سلول‌های مستقر در هر ناحیه توسط نرم افزار دستگاه فلوسایتومتری محاسبه و گزارش شد (۲۰).

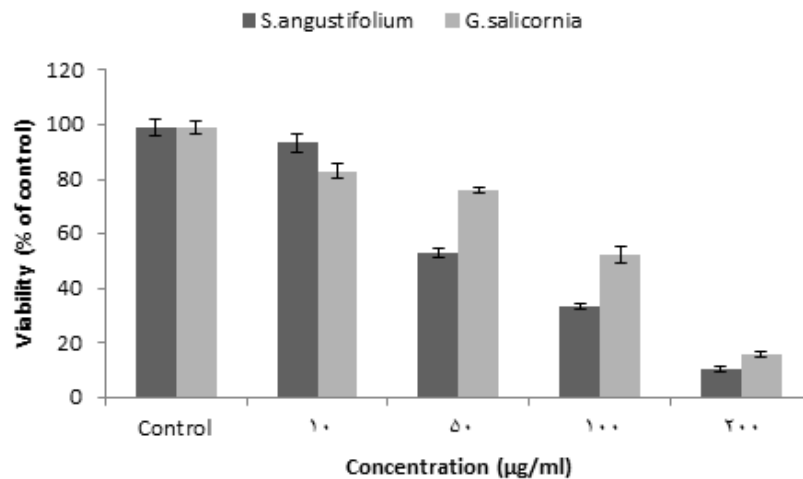
**آنالیز چرخه‌ی سلولی:** سلول‌های سرطانی پستان قبل و بعد از تیمار با عصاره کلروفومی جلبک‌ها، طبق روش ذکر شده در مرحله قبل، از کف پلیت جدا و به‌صورت سوسپانسیون درآمدند. سپس تحت مرحله تثبیت و سپس شست‌وشو با بافر PBS قرار گرفتند. در مرحله بعد افزودن RNase انجام گرفت و هم‌زمان توسط رنگ PI (Sigma-Aldrich, Germany) رنگ‌آمیزی شدند. در مرحله بعدی ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه و در پایان این زمان با دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شدند (۲۱).

### آنالیز آماری

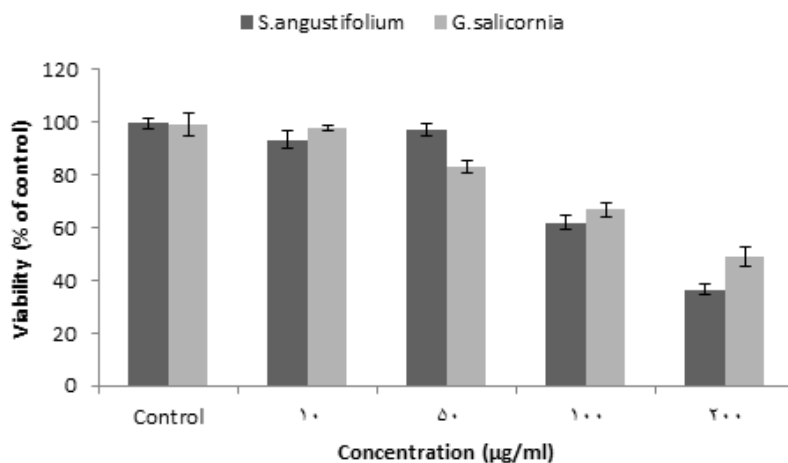
نتایج به‌دست آمده در این تحقیق براساس سه تکرار استوار بود که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار، میزان تغییرات محاسبه شد. تست‌های مقایسه‌ای مورد استفاده نیز شامل t تست با آنالیز واریانس یک طرفه و محاسبه p value بود که با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ انجام شد و  $p < 0.05$  در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته شد (۱۷).

## نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره کلروفومی جلبک قرمز *Gracilaria Salicornia* و جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* بر روی سلول سرطانی پستان و نرمال با روش MTT نشان داد که آن‌ها در یک الگوی وابسته به غلظت سبب کاهش درصد بقای سلولی در هر دو رده می‌شدند. از طرفی تاثیر هر دو عصاره بر روی رده سرطانی بیش‌تر از سلول نرمال می‌باشد. از طرف دیگر عصاره کلروفومی جلبک قهوه‌ای اثر مهاری بیش‌تری را نسبت به جلبک قرمز در هر دو رده نشان داد. درصد بقای سلول‌های رده پستان در غلظت ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای جلبک قهوه‌ای نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۹۳، ۵۲، ۳۳ و ۱۰ درصد و برای جلبک قرمز ۸۲، ۷۵، ۵۲ و ۱۶ درصد بود (نمودار ۱). هم‌چنین درصد بقای سلول‌های نرمال در غلظت ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محیط کشت برای جلبک قهوه‌ای نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۹۳، ۸۷، ۶۱ و ۳۶ درصد و برای جلبک قرمز ۹۸، ۸۲، ۶۶ و ۴۹ درصد تعیین شد. هم‌چنین غلظت  $IC_{50}$  برای عصاره کلروفومی جلبک قهوه‌ای برابر ۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای جلبک قرمز برابر ۱۰۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (نمودار ۲).



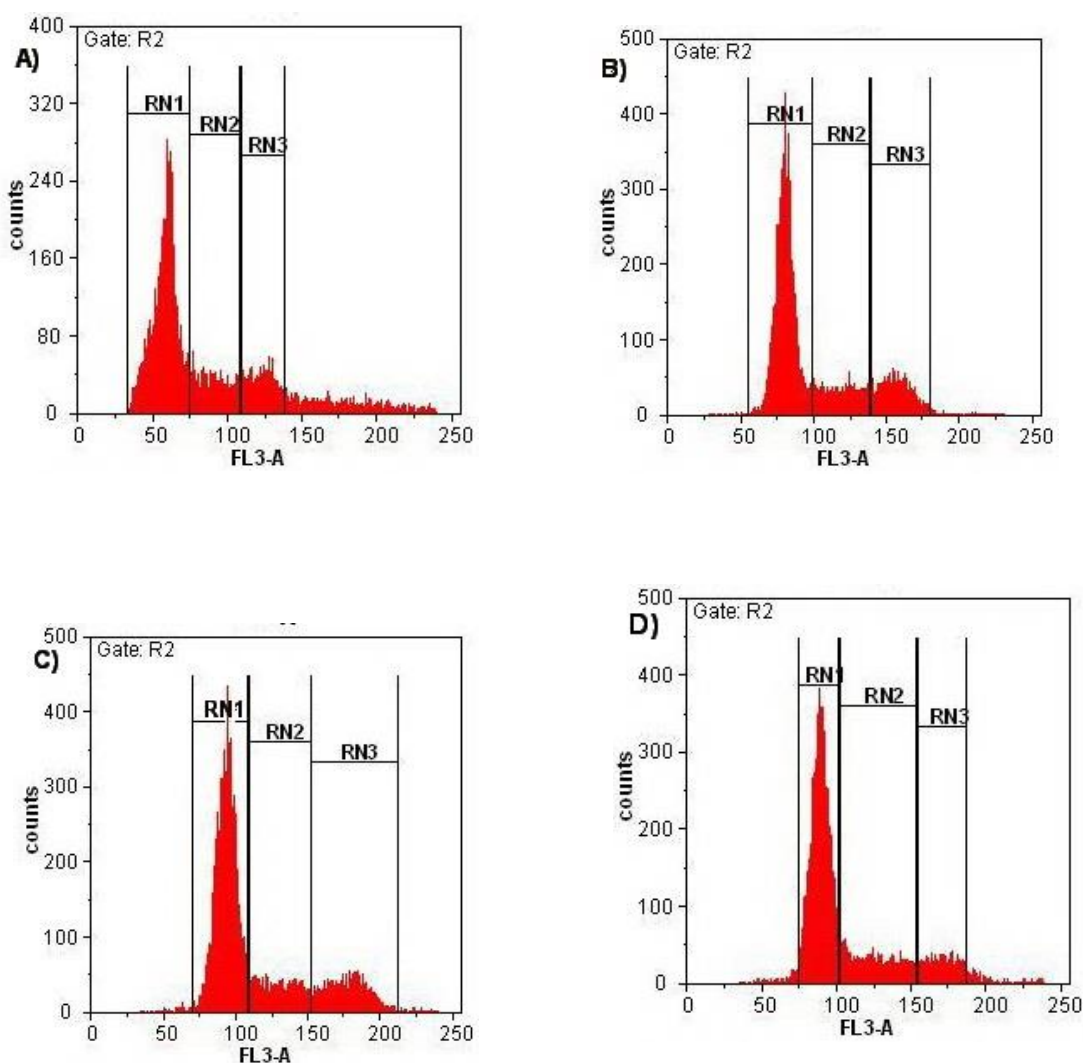
نمودار ۱: مقایسه اثر عصاره کلروفومی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* و جلبک قرمز *Gracilaria salicornia* بر روی سلول سرطانی پستان (MCF7) در زمان ۴۸ ساعت



نمودار ۲: مقایسه اثر عصاره کلروفومی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* و جلبک قرمز *Gracilaria salicornia* بر روی رده سلولی نرمال (MRC5) در زمان ۴۸ ساعت

### ارزیابی تغییر چرخه سلولی به روش فلوسایتومتری

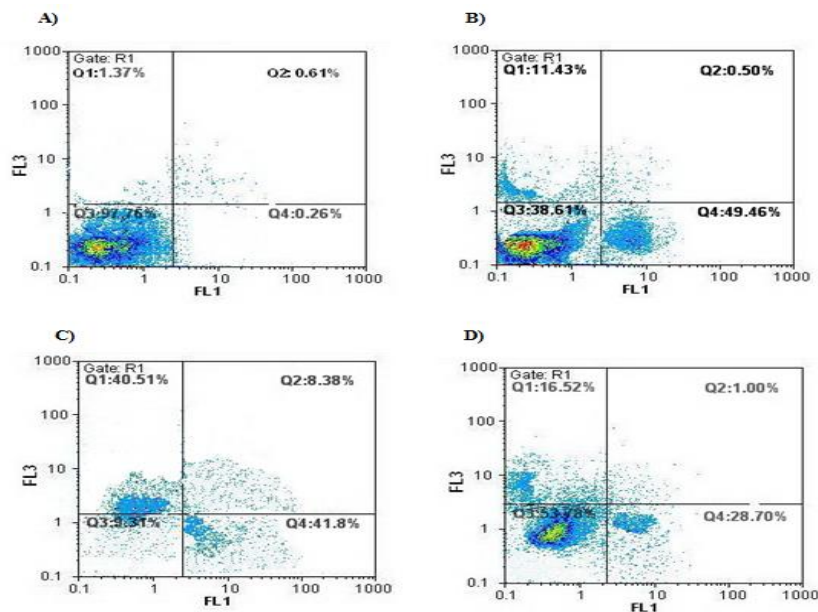
به منظور بررسی چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با عصاره کلروفومی دو جلبک، از روش رنگ‌آمیزی با PI (Propidium iodide) استفاده شد. نمودار به دست آمده از آنالیز چرخه سلولی نشان داد که عصاره کلروفومی جلبک قرمز ۵۸/۳۳ درصد و جلبک قهوه‌ای قادر است ۶۳/۳۱ درصد سلول‌ها را در فاز G1 چرخه سلولی متوقف کند و میزان سلول‌ها در فازهای S و G2 برابر ۱۶/۲۰ درصد و ۱۴/۳۳ درصد در جلبک قرمز و ۱۶/۹۵ درصد و ۱۵/۶۳ درصد در جلبک قهوه‌ای بود. برای کنترل مثبت و منفی، تعداد سلول‌ها در فاز G1 سلول‌های تیمار شده با عصاره جلبک قرمز حدوداً ۶۰/۱۲ درصد و ۵۵/۱۰ درصد بود. این میزان برای جلبک قهوه‌ای برای کنترل منفی (محیط کشت) ۱۶/۸ درصد و برای کنترل مثبت (داروی سیس پلاتین) ۱۷/۶۴ درصد بود (شکل ۱).



شکل ۱: نمودارهای مربوط به چرخه سلولی رده سلولی MCF 7 قبل و پس از تیمار با عصاره های کلروفومی جلبک *S. angustifolium* و *G. salicornia*. محور X نمایانگر شدت فلوروسانس و محور Y نمایانگر تعداد سلول‌ها به صورت درصد می‌باشد. A: کنترل (محیط کشت)، B: داروی سیس پلاتین، C: عصاره کلروفومی جلبک *S. angustifolium* در غلظت  $IC_{50}$  برابر با ۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، D: تیمار با عصاره کلروفومی جلبک *G. salicornia* در غلظت  $IC_{50}$  برابر با ۱۰۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر

## بررسی الگوی آپوپتوزیس یا نکروزیس

به منظور بررسی الگوی مرگ سلولی (آپوپتوزیس یا نکروزیس) در سلول‌های سرطانی MCF 7 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با عصاره کلروفومی دوجلبک، از روش رنگ‌آمیزی سلولی با آنکسین V کونژوگه با فلئورسین ایزوتیوسیانات و PI استفاده شد. در طی مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوزیس، فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشا منتقل می‌شود که آنکسین V به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتمتری تشخیص داده می‌شود. همچنین PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتمتری می‌شود. ارزیابی میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی توسط عصاره جلبکی نشان داد که درصد زیادی از سلول‌ها وارد فاز آپوپتوزیس و نکروزیس می‌شوند که این میزان نسبت به کنترل‌ها دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲: آنالیز مرگ سلولی در رده سلولی MCF7. (A): قبل از تیمار، (B): پس از تیمار با داروی سیس پلاتین، (C): تحت تیمار با عصاره کلروفومی جلبک *S. G. salicornia*، (D): *angustifolium*

## بحث

باتوجه به این که پیشرفت سرطان ارتباط بسیار نزدیکی با التهاب و استرس اکسیداتیو دارد، ترکیبی که خواص ضد التهابی یا آنتی اکسیدانته داشته باشد، می‌تواند یک عامل ضد بدخیمی سلولی باشد. بسیاری جلبک‌ها دارای خاصیت فارماکولوژیک و بیوشیمیایی شامل خاصیت آنتی اکسیدانته و ضد التهاب می‌باشند. وجود ترکیباتی مثل پلی ساکاریدها خاصیت ضد سرطانی به جلبک‌ها می‌دهد. طبق مطالعات FAO در سال ۲۰۰۳ (۲۲) بر روی جلبک قهوه‌ای سارگاسوم، ثابت شد که این جلبک با داشتن جز پلی ساکاریدی SFPP دارای اثر مهاری بر روی رشد سلول‌های S180 و همچنین ترکیب سولفات‌ها پلی ساکارید آن (skcf) دارای اثرات سایتوتوکسیک روی CCL-219 می‌باشد. وجود ترکیبات فنولی یکی از بیشترین اثرات آنتی اکسیدانته را در جلبک‌ها دارد و حدود ۲۰-۳۰ درصد از وزن خشک جلبک قهوه‌ای را تشکیل می‌دهد. طبق مطالعات Budhiyanti (۲۳)، Cornish (۲۴) و Namvar (۲۵)، این ترکیبات اثرات آنتی اکسیدانته خود را با از بین بردن رادیکال‌های آزاد با DDPH آزاد اعمال می‌کنند.

مطالعات نشان داده است که عصاره جلبک قهوه‌ای دارای اثرات سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی رده HL60 می‌باشد (۲۶). در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۱ روی جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* انجام شد، مشخص شد که عصاره آن با داشتن ماده‌ای به نام دی‌هیدروکسی سارگاکوئینون، بر روی سلول‌های لوسمی لنفوسیتیک موش (P-388) دارای اثرات سایتوتوکسیک بود. وجود این ترکیب در جلبک قهوه‌ای *Sargassum Angustifolium* نیز ثابت شده است. پس می‌توان نتیجه گرفت که این جلبک نیز روی سلول‌های لوسمی لنفوسیتیک موش دارای اثرات سایتوتوکسیک است (۲۷). ترکیبات فعال جلبک‌ها عمدتاً شامل آلکالوئیدها است. بتاکاربولین‌ها نظیر هارمالین و هارمین به‌تنهایی بیش از ۶۰ درصد آلکالوئیدهای موجود در جلبک را تشکیل می‌دهند (۲۸). این آلکالوئیدها اثرات ضد سرطانی داشته و این اثر در چندین رده سلولی سرطانی گزارش شده است. در واقع عصاره جلبک‌ها با تاثیر بر فرآیندهای متابولیکی مختلف در سلول مانند متابولیسم انرژی و سنتز پروتئین ممکن است به‌وسیله‌ی تداخل با مکانیسم‌های ژنتیکی بر فعالیت سلول تاثیر بگذارند. کاهش توانایی زیستی سلول‌ها در تیمار با دوزهای مختلف عصاره هیدرو الکلی جلبک‌ها و در دوره‌های زمانی متفاوت در مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شده نیز نشان داده شده است. برای مثال مطالعه زندی و همکاران (۲۹) در مورد اثر جلبک قهوه‌ای *Sargassum oligocystum* روی رده K562 و BLL نشان داد که دارای اثرات ضد توموری قابل توجهی بر علیه این رده‌های سلولی می‌باشد و با افزایش دوز عصاره و زمان تاثیر تعداد سلول‌ها به‌تدریج کاهش بیش‌تری را نشان می‌دهد. Yende و همکاران (۳۰) اثر عصاره جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* را بر بیان ژن *WT1* در رده سلولی سرطان خون انسانی K562 نشان داد، که عصاره‌های مختلف برگرفته از این جلبک به‌علت دارا بودن فوکوئیدان (Fucoïdan) منجر به مهار تکثیر سلول سرطانی و القا آپوپتوزیس می‌شوند. بر اساس نتایج آزمون MTT، نشانه اولیه در سمیت با عصاره جلبک‌ها بر پایه‌ی اختلال در زنجیره تنفسی میتوکندری می‌باشد که باعث آزاد شدن فاکتورهای القا کننده آپوپتوزیس می‌شد. این فاکتورها در هسته ممکن است باعث قطعه قطعه شدن DNA سلول شوند. افزایش تولید آنزیم‌های پروتئازی نظیر کاسپاز ۸، ۳ و ۹ منجر به تغییرات مختلفی در سلول به‌خصوص در متابولیسم سلول می‌شد. در واقع مشخص شده که آنزیم‌های پروتئازی وظایف مهمی را در مراحل اولیه‌ی آپوپتوزیس بازی می‌کنند. طبق نتایج اربابی و همکاران، عصاره جلبکی فعالیت آنزیم‌های پروتئازی را تحریک می‌کند. زیرا باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌شود و باعث کاهش توانایی زیستی سلول‌ها می‌شد (۳۱). احتمالاً در تحقیق حاضر نیز سمیت با عصاره جلبک‌ها باعث تحریک فعالیت آنزیم‌های پروتئازی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده (Reactive Oxygen Species= ROS) و از طریق فعال کردن کاسپازها باعث آسیب شدید به سلول می‌شود.

طبق مطالعات Stryker (۳۲) و Challem (۳۳) وجود بتا-کاروتن و کاروتنوئیدهای دیگر از جمله آلفا-کاروتن لیکوپن، لوتئین، گزانتین و کریپتوزانتین در عصاره جلبک قرمز محرز شده است. ساختار شیمیایی این کاروتنوئیدها به‌گونه‌ای است که می‌توانند دفع کننده رادیکال‌های آزاد باشند و هم‌چنین با همکاری با هم‌دیگر اثر محافظت کننده مفیدی در برابر تخریب اکسیداتیو نشان می‌دهند و از پدیده سرطان‌زایی ممانعت به‌عمل می‌آورند.

هم‌راستا با تحقیق حاضر، مطالعات Murthy (۳۴)، Poppel (۳۵) و Buiatti (۳۶) نیز نشان داد که عصاره جلبک قرمز *Gracilaria* موجب کاهش معنی‌داری در توانایی زیستی سلول‌های نوروبلاستوما و کاهش خطر سرطان کبد، ریه و پروستات در بدن موش شده است.



**نتیجه‌گیری**

بانظر اجمالی به نمودارها و مطالب ارائه شده در نتایج می‌توان ادعا کرد که این عصاره‌ها با اثرات سایتوتوکسیک وابسته به دوز بر سلول‌های سرطان پستان، سبب مرگ این سلول‌ها می‌شوند. به طوری که با افزایش دوز عصاره، رشد سلول‌های سرطانی، بیشتر مهار شد (۳۴-۳۶). همچنین باتوجه به وجود ترکیبات غیرقطبی در عصاره کلروفومی، به نظر می‌رسد این ترکیبات در مدت زمان کوتاه‌تر و غلظت پایین‌تری اثرات ضدتکثیری و آپوپتوزی اولیه را القا می‌کنند. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، پیشنهاد می‌شد که مطالعات بیشتر جهت به دست آوردن دوز داروی موثر از این جلبک‌ها برای درمان سرطان پستان انجام شود. همچنین تحقیقات بیشتر به منظور جداسازی ترکیبات موثر موجود در این عصاره‌ها، بررسی دقیق مکانیسم مولکولی، تاثیر آپوپتوتیک آن‌ها و اثر آن‌ها بر حیوانات مدل و پس از آن کارآزمایی بالینی توصیه می‌شود.

**تشکر و قدر دانی**

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کارکنان آزمایشگاه‌های دانشکده داروسازی دانشگاه پیامبر اعظم ساری که ما را در انجام و ارتقا کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند.

**منابع**

1. Nafissi N, Khayamzadeh M, Zeinali Z, Pazooki D, et al. Epidemiology and histopathology of breast cancer in Iran versus other Middle Eastern countries. *Middle East J Cancer*. 2018; 9(3):243-51.
2. Mohammadi M, Salehzadeh A, Talesh Sasani S, Tarang A. rs6426881 in the 3'-UTR of PBX1 is involved in breast and gastric cancers via altering the binding potential of miR-522-3p. *Mol. Biol. Rep*. 2021;48(11):7405-14.
3. Mahady G. global harmonisation of herbal health claims. *J. Nutr*. 2001, 131(3): 1120-1123.
4. Tavakoli J, Miari S, Zadehzare MM, Akbari H. Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care: A Review Study. *Iran J Cancer Prev*. 2012; 5(3): 144-156.
5. Bar Sade RB, Chetritb A, Figerd A, Moshe Z. Hormone replacement therapy is more prevalent among Jewish BRCA1/2 mutation carriers. *Eur J Cancer*. 2006; 42(5): 650-655.
6. Woelkerling WJ. An introduction. *Biology of the red algae* (K.M. Cole and R.G. Sheath, eds.). Cambridge University Press, Cambridge. 1990.
7. Kandale A, Meena MM, Rao P, Panda Mangal AK, et al. Marine algae: An Introduction, Food value and Medicinal uses. *J Pharm Res*. 2011; 4(1):123-127
8. Yeh ST, Lee CS, Chen JC. Administration of hot water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunol*. 2006; 20(3): 332-345.
9. Zhuang C, Itoh H, Mizuno T, Ito H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed *Umitoranoo* (*Sargassum thunbergii*). *Bio sci Biotechnol*. 1995; 59(4): 563- 567.
10. Tanaka K, Yamada A, Noda K, Shoyama Y, et al. Oral Administration of a Unicellular Green Algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. *Planta Med*. 1997; 3(05):465-466.
11. Kohen R, Nyska A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002; 30(6):620-650.

12. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11): 876-885.
13. Mashjoor S, Yousefzadi M, Esmaili MA, Rafiee R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (Dictyotaceae and Ulvaceae) from the Persian Gulf. *Cytotechnology*. 2016; 68(5):1717-1726.
14. Ismail M, Bagalkotkar G, Iqbal S, Adamu HA. Anticancer Properties and Phenolic Contents of Sequentially Prepared Extracts from Different Parts of Selected Medicinal Plants Indigenous to Malaysia. *Molecules*. 2012; 17(5): 5745-5756.
15. Hajimehdipoor H, Esmaili S, Ramezani A, Jafari M, Mosaddegh M. The Cytotoxic Effects of *Ferula Persica* var. *Persica* and *Ferula Hezarlalehzarica* against HepG2, A549, HT29, MCF7 and MDBK Cell Lines. *Iran J Pharm Sci*. 2012; 8(2):113-117.
16. Moshfegh A, Salehzadeh A, Shandiz SA, Shafaghi M, et al. Phytochemical analysis, antioxidant, anticancer and antibacterial properties of the Caspian Sea red macroalgae, *Laurencia caspica*. *Iran J Sci Technol Trans A: Sci*. 2019, 43(1):49-56.
17. Rezaei F, Shokrzadeh M, Majd A, Nezhadsattari T. Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of *Cornus mas* L. fruit on MCF7, HepG2 and CHO cell line by MTT Assay. *J Maz Univ Med Sci*. 2014, 24(113):130-138.
18. Yazdani J, Amiri Z, Omidi M. Investigating the Cytotoxic Effects of *Penicillium Citrinum* on Cancer Cell Lines (HepG2),(A549),(SKOV3),(MCF7) and Normal Cell Lines (LLCPK1),(CHO) by MTT Assay. *J Maz Univ Med Sci*. 2012; 22(92):9-17.
19. Moshfegh A, Jalali A, Salehzadeh A, Jozani AS. Biological synthesis of silver nanoparticles by cell-free extract of *Polysiphonia* algae and their anticancer activity against breast cancer MCF-7 cell lines. *Micro & Nano Lett*. 2019; 4(5): 581-584.
20. Kim HJ, Kim JC, Min JS, Kim MJ, et al. Aqueous extract of *Tribulus terrestris* Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF- $\kappa$ B signaling in liver cancer cells. *J ethnopharmacol*. 2011, 136(1):197-203.
21. Robinson JP. Overview of flow cytometry and microbiology. *Curr Protoc Cytom*. 2018; 84(1):e37.
22. McHugh DJ. A guide to the seaweed industry. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2003:1-118.
23. Budhiyanti SA, Sri R, Djagal WM, Iwan YL. Free radical scavenging, metal chelating and singlet oxygen quenching activity of fractionated brown seaweed *Sargassum hystrix* Extract. *J Biol Sci*. 2011; 11(4):288-98.
24. Cornish ML, Garbary DJ. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *Algae*. 2010; 25(4):155–171.
25. Namvar F, Baharara J, Mahdi AA. Antioxidant and anticancer activities of selected Persian Gulf algae. *Indian J Clin Biochem*. 2014; 29(1):13-20.
26. Vaseghi G, Sharifi M, Dana N, Ghasemi A, et al. Cytotoxicity of *Sargassum angustifolium* partitions against breast and cervical cancer cell lines. *Adv Biomed Res*. 2018; 7: 43.
27. Asirvatham R, Antonysamy A, Rajkumar P, Narayanan L. Anticancer activity of *Jasminum angustifolium* Linn against Ehrlich ascites carcinoma cells bearing mice. *J Integr Med*. 2012; 2(3):271-275.

28. Khedim Z, Benyahia B, Mairet F, Steyer JP, et al. Reduction of a complex biotechnological process model using state-variable association method-Application to the anaerobic digestion of micro-algae. In 2017 International Conference on Control, Automation and Diagnosis (ICCAD) 2017; 19:135-140.
29. Zandi K, Ahmadzadeh S, Tajbakhsh S, Rastian Z, Yousefi F, Farshadpour F, Sartavi K. Anticancer activity of Sargassum oligocystum water extract against human cancer cell lines. European review for medical and pharmacological sciences. 2010;14:669-73.
30. Yende SR, Harle UN, Chaugule BB. Therapeutic potential and health benefits of Sargassum species. Pharmacognosy reviews. 2014;8(15):1.
31. Arbabi MS, Vazifehdoust H, Hamdi K. Investigating the Effect of Commercial and Operational Factors on Competitiveness Improvement of Shahid Beheshti Port in Chabahar in Attracting Shipping Lines. J Syst Manag. 2019; 5(3):69-80.
32. Stryker WS, Stampfer MJ, Stein EA, Kaplan L, et al. Diet, plasma levels of beta-carotene and alphanatocopherol, and risk of malignant melanoma. Am. J. Epidemiol. 1990; 131(4): 597-611.
33. Challem JJ. Beta-carotene and other carotenoids: promises failures, and a new vision. J Orthomol Med. 1997; 12(1): 11-19.
34. Murthy KNC, Vanitha A, Rajesha J, Swamy MM, et al. In vivo antioxidant activity of carotenoids from Dunaliella salina-a green microalga. Life Sci. 2005, 76(12): 1381-1390.
35. Poppel GV, Goldbohm RA. Epidemiologic evidence for beta-caroten and cancer prevention. Am J Clin Nutr. 1995; 62(6 Suppl): 1393-1402.
36. Buiatti E. The role of chemoprevention in cancer control. Salud Publica de Mexico. 1997; 39(4): 310- 317.

## Comparative analysis of the effect of chloroform extract of *Gracilaria salicornia* and *Sargassum angostifolium* on the MCF7 and MRC5 cell lines

Mirzaeian P<sup>1</sup> Ph.D., Shokrzadeh Lamouki M<sup>2</sup> Ph.D., Jafari N<sup>3</sup> Ph.D., Rezaei F<sup>4</sup> Ph.D., Mirzapour T<sup>5</sup> Ph.D., Salehzadeh A<sup>3\*</sup> Ph.D.

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran
2. Pharmaceutical Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences Sari, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
4. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran
5. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

\* Email corresponding author: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

Received: 9 Jul. 2021

Accepted: 19 Jan. 2022

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to compare the effects of chloroform extract of two types of red and brown algae on proliferation, cell cycle and induction of apoptosis in breast cancer cell line.

**Material and Methods:** In this experimental study, MCF7 cancer cell line and normal MRC5 cell line were cultured and then the cells were treated with different concentrations of chloroform extract of algae for 48 hours. Cell survival percentage was calculated by MTT method and type of cell death and cell cycle arrest was assessed by flow cytometry. The results were evaluated by Prism software.

**Results:** The results showed that both brown and red algae reduced the proliferation of MCF7 cancer line as a concentration-dependent pattern. The IC<sub>50</sub> concentration was 88 µg/ml for brown algae chloroform extract and 107 µg/ml for red algae. These values indicated more inhibitory effects of brown algae (63.31%) than red (58.33%). Also, these two extracts effectively induced apoptosis and stopped the cell cycle in G0/G1 stage.

**Conclusion:** This study showed that the chloroform extract of these algae can be considered as a strong inhibitor for breast cancer.

**Keywords:** Apoptosis; Breast cancer; Cell cycle; *Gracilaria Salicornia*; *Sargassum angostifolium*