مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۷، شماره ۵/ آذر و دی ۱۳۹۴/ ۴۳-۳۳

**مقاله پژوهشی**

# اثر سیتوتوکسیک عصاره دیواره بدن خیار دریایی گونه *(Holothuria arenicola)* بر روی سلول‌های سرطانی ملانومایی

نجمه نیکدل[۱]، جواد بهارآرا[۲*]، خدیجه نژاد شاهرخ‌آبادی[۳]، الهه امینی[۴]

[۱]دانشجو، گروه زیست‌شناسی سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران؛ [۳]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران؛ [۴]دانشجو، گروه زیست‌شناسی تکوین جانوری، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۴

## چکیده:

***زمینه و هدف:*** **خیار دریایی در اغلب اکوسیستم‌های دریایی جزء مهمی از اکوسیستم‌های آبی به شمار می‌آید. ملانوما به‌عنوان خطرناک‌ترین فرم سرطان پوست، مدت‌های مدیدی است که بشر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در پژوهش حاضر اثر سیتوتوکسیک عصاره دیواره‌ی بدن خیار دریایی گونه *Holothuria arenicola* بر روی سلول‌های سرطانی ملانوما بررسی شده است.**

***روش بررسی:*** **در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی رده‌ی سلولی ملانومای موشی در محیط کشت (Roswell Park Memorial Institute= RPMI 1640) ۱۰ درصد FBS در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی در غلظت‌های مختلف (۱۵،۳۱،۶۲،۱۲۵،۲۵۰mg/ml و ۵۰۰) تیمار شدند. اثر سیتوتوکسیک عصاره خیار دریایی توسط روش MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)، رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیوم ایداید، DAPI (4, 6- Diamidino-2-phenylindole)، فلوسیتومتری و آزمون کاسپاز ۳ و ۹ بر سلول‌های سرطانی ملانومای موشی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون آماری ANOVA تست دانکن در سطح P<۰/۰۵ تحلیل شد.**

***یافته‌ها:*** **عصاره دیواره‌ی بدن خیار دریایی پس از ۲۴ ساعت با $IC_{50}$ (Inhibitory Concentration) ۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر به‌طور معنی‌داری از طریق آپوپتوز موجب القاء سمیت سلولی بر سلول‌های سرطان ملانومای موشی شد (P<۰/۰۵) این عصاره در غلظت ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر سمیت بیشتری را موجب شد. طوری که در حدود ۸۰ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز شدند.**

***نتیجه‌گیری:*** **یافته‌های ما نشان داد که عصاره تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی با دارا بودن اثر سیتوتوکسیک و پیش برنده آپوپتوز بر رده سلولی ملانومای موشی، کاندید مناسبی برای تحقیقات ضد سرطان است.**

***واژه های کلیدی:*** **آپوپتوز، خیار دریایی، ملانوما، سرطان.**

## مقدمه:

سرطان ملانوما هجدهمین سرطان شایع در دنیا، خطرناک‌ترین نوع سرطان پوست و همچنین سرطان مقاوم به شیمی‌درمانی محسوب می‌شود (۳-۱). علی‌رغم روش‌های متداول نظیر شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و ایمنی درمانی، تعداد بسیاری از بیماران نیاز به درمان ترکیبی دارند و این امر بیان‌گر اهمیت ابداع روش‌های جدید می باشد (۴).

بیماری‌های با قدرت نامحدود تکثیر، مثل سرطان در نتیجه تغییر در ژنوم ایجاد می‌شوند (۵). مطالعات نشان می‌دهند که حداقل شش تغییر در

***نویسنده مسئول:*** *مشهد- مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری- گروه زیست شناسی- تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۳۷۰۹۲، E-mail:baharara@yahoo.com*



www.SID.ir

فیزیولوژی سلولی موجب رشد بدخیمی می‌شود که شامل خودکفا بودن در تکثیر سلولی، مقاوم بودن به سیگنال‌های بازدارنده تکثیر سلولی، عدم انجام آپوپتوز، عدم محدودیت در پتانسیل تکثیر، تقویت رگ زایی و حمله به سایر جاها هستند. یکی از این تغییرات گریز از آپوپتوز است. بنابراین یکی از اهداف درمانی سرطان القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است (۶).

آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلولی)، فرایندی است که اهمیت اساسی در جلوگیری از ایجاد تومور دارد. این نوع مرگ سلولی، عملکرد هومئوستاتیک دارد (۸،۷). آپوپتوز فرایندی است که توسط ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی خاصی نظیر واکوئله شدن سیتوپلاسم، انقباض هسته، تراکم کروماتین و چروکیده شدن سلول مشخص می‌شود، یکی دیگر از این تغییرات جابجایی فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی غشا به سطح خارجی آن است که موجب شناسایی سلول‌های آپوپتوزی توسط ماکروفاژها میگردد در حالیکه به‌طور طبیعی و در سلول‌های سالم فسفاتیدیل سرین در سمت داخلی غشا به سمت سیتوزول قرار دارد (۷).

محیط دریایی منبعی غنی از فلور و فون دریایی است و فرآورده‌های طبیعی حاصل از آن‌ها دارای خواص و کاربردهای درمانی منحصر به فردی هستند (۱۰،۹). خیار دریایی که به‌عنوان جینسینگ دریایی شناخته می‌شود ازجمله منابع غذایی هستند که به‌طور سنتی در بسیاری از کشورها ازجمله آسیای غربی میانی مصرف دارد (۱۱). خیار دریایی به‌طور بالقوه دارای سوبستراهای فعال بیولوژیکی متعددی مثل پلی ساکارید، پروتئین، لیپید، ویتامین، فیبر محلول و مواد معدنی هستند که کاربردهای پزشکی متعددی در درمان سرطان (۱۲) التهاب، آلرژی، دیابت، ترومبوز، کاهش چاقی توسط پایین آوردن ارزش کالری وعده غذایی، کاهش جذب لیپید و بیماری‌های قلبی عروقی، کاهش فشارخون و سایر بیماری‌های تحلیل برنده و مخرب دارند (۱۳،۹). به‌عنوان مثال Althunibat و همکاران بر روی اثرات آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیسیته عصاره‌های آبی و آلی دو گونه خیار دریایی *Holothuria edulis Lesson* و *Stichopus horrens Selenka* بر روی دو رده سلولی A549 و TE1 مطالعه کردند. این محققین موفق به شناسایی اثر سیتوتوکسیک بالای عصاره آلی *S. horrens* بر روی این دو رده‌ی سلولی شدند (۱۴)؛ همچنین Li و همکاران وی بر روی Echinoside A ماده‌ی مؤثره‌ای که از خیار دریایی استخراج‌شده بود تحقیقی انجام دادند توانستند رشد سرطان نوترکیب پروستات انسانی را در مدل‌های موشی مهار کنند (۱۵). در تحقیقی دیگر بر روی چندین رده‌ی سلولی از قبیل A549، HCT-116، HepG2 و MCF-7 با استفاده از Argusides B,C که یک ساپونین استخراج شده از خیار دریایی بود آزمایشاتی صورت گرفت که در نهایت پی به سمیت این ترکیبات بردند. حتی متوجه شدند که این ترکیبات اثر بهتری بر روی دو لاین سلولی A549 و HCT-116 در مقایسه با داروی ضد سرطانی etoposide دارند (۱۶). با توجه به اینکه اثر سیتوتوکسیک و ضد توموری عصاره دیواره‌ی بدن خیار دریایی بر روی ملانوما به‌عنوان کشنده‌ترین نوع سرطان پوست تاکنون بررسی نشده است، در پژوهش تجربی آزمایشگاهی حاضر اثر سیتوتوکسیک عصاره تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی گونه‌ی خلیج فارس (*Holothuria arenicola*) بر روی سلول‌های سرطان ملانومای B16F10 بررسی شده است.

## روش بررسی:

برای تهیه‌ی عصاره، نمونه‌های خیار دریایی گونه‌ی *H. arenicola* از سواحل جزیره‌ی قشم جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد منتقل و سپس مواد داخل بدن آن‌ها خارج گردید و در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شوند. سپس آن‌ها را کوبیده و به ازای هر گرم وزن خشک بدن، ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و جهت تغلیظ ۳ شبانه‌روز روی شیکر چرخشی قرار داده شد. سپس با کاغذ واتمن صاف شد


Archive of SID
www.SID.ir

و عصاره توسط دستگاه وکیوم تغلیظ شد و به منظور تغلیظ بیشتر درون آون با درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

برای انجام تجربیات رده سلولی B16F10 (تهیه شده از انستیتو پاستور تهران) در محیط کشت RPMI1640 (Bioidea, Iran) حاوی ۱۰درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین استرپتومایسین (Gibco, USA) کشت داده شد. زمانی که تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد رسید، سمیت سلولی عصاره دیواره‌ی بدن خیار دریایی بر روی سلول‌های سرطان ملانوما B16F10 با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. این روش بر اساس فعالیت دهیدروژنازهای میتوکندریایی است که ازجمله مارکرهای مهم در بقاء به شمار می‌روند. برای این منظور سلول‌ها در تراکم $۲\times ۱۰^{۴}$ سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت با غلظت‌های مختلف عصاره (۱۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند (n=۳). پس از این مدت مورفولوژی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس و سمیت سلولی توسط روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸،۱۷). نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون آماری ANOVA جهت مقایسه‌ی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره در مقایسه با گروه کنترل در سطح P<۰/۰۵ تجزیه وتحلیل شد و $IC_{50}$ توسط نرم‌افزار prism3 محاسبه گردید.

از رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج پروپودیوم ایداید جهت ارزیابی نوع مرگ سلولی القا شده توسط عصاره‌ی تام به دست آمده از خیار دریایی گونه‌ی *Arenicola* .H استفاده شد. برای این منظور، ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها با تراکم $۲\times ۱۰^{۵}$ درون پلیت ۲۴ خانه، محیط رویی سلول‌ها تعویض و با غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌های گروه کنترل و تیمار تریپسینه شده و به آن‌ها ۱۰ میکرولیتر اکریدین اورنج و ۱۰ میکرولیتر پروپودیوم ایداید اضافه شد و پس از پیپتاژ توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند (۱۹). جهت انجام تست DAPI، پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار به سلول‌های گروه کنترل و تیمار متانول جهت تثبیت افزوده شده و سپس در معرض رنگ DAPI (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار داده شدند و به کمک میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند (۲۰).

ارزیابی آپوپتوز توسط کیت تشخیصی انکسین/پروپودیوم ایداید انجام پذیرفت. بدین ترتیب که سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت کشت درون پلیت ۶ خانه با تراکم $۲\times ۱۰^{۵}$ تحت تیمار با غلظت‌های عصاره‌ی تام خیار دریایی (۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند (۲۲،۲۱). سپس محیط رویی گروه کنترل و دو گروه تیمار به اپندورف منتقل و در دور ۴۵۰۰rpm و به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. با خارج کردن محیط رویی، به هر نمونه ۵۰۰ ماکرو لیتر 1X Binding Buffer اضافه کرده و سپس ۵ ماکرو لیتر Annexin V-FITC و ۵ ماکرو لیتر propidium iodide به هر نمونه اضافه شد. سپس در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و برای رسم نمودارهای آن به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری اقدام شد.

با رسم نمودارها درصد سلول‌های زنده در سمت چپ- پایین و درصد سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز قرار دارند در سمت راست– پایین و در صد سلول‌ها در مرحله آپوپتوز ثانویه در سمت راست بالا و درصد سلول‌هایی که به سمت نکروز رفته‌اند در سمت چپ- بالا مشخص می‌شود (۲۴،۲۳).

برای اثبات القاء مرگ سلولی آپوپتوز از روش دیگری نیز استفاده شد به این صورت که ابتدا تعداد $۲\times ۱۰^{۵}$ سلول ملانوما رده‌ی B16F10 را در پلیت ۶ خانه کشت دادیم و بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها را تحت تیمار با غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی قرار دادیم سپس مقدار ۴۰۰ میکرو لیتر PI به سلول‌ها افزودیم و بعد



Archive of SID
www.SID.ir

از ۳۰ دقیقه انکوبه سلول‌ها را با روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار دادیم (۲۳).

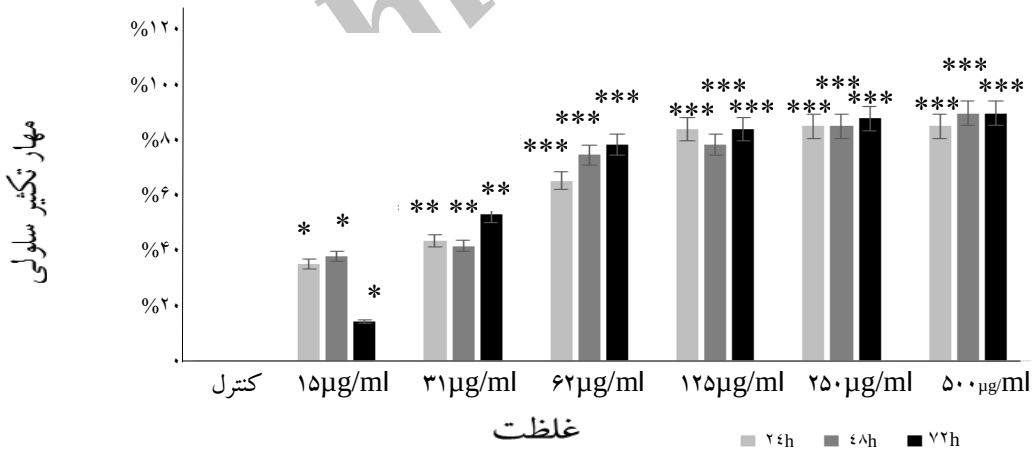
جهت تعیین نوع مرگ سلولی آپوپتوز، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار توسط غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی (n=۳)، سلول‌های گروه کنترل و تیماری از کف چاهک‌های پلیت جدا و سانتریفوژ شد، بعد از اتمام سانتریفوژ، محیط رویی را برداشتیم و به هر نمونه ۵۰ میکرو لیتر از Cell Lysis Buffer افزودیم و نمونه‌ها را به اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل نمودیم و ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار دادیم، سپس در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید و از محیط رویی برای تعیین غلظت پروتئین استفاده گردید.

در این مرحله ۵۰ میکرو لیتر از DDT و 2x buffer و ۵ میکرو لیتر از سوبسترای کاسپاز ۹ (LEHD-p-NA) و سوبسترای کاسپاز ۳ (DEVD-P-NA) به هر نمونه اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت درون انکوباتور انکوبه کرده و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۴۰۰ یا ۴۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۲۶،۲۵).

## یافته‌ها:

بررسی توسط میکروسکوپ اینورت نشان داد که سلول‌ها قبل از تیمار با عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی به صورت سالم و کشیده با هسته کاملاً طبیعی ظاهر شدند لیکن این سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر گرد شدند. البته ذکر این نکته حائز اهمیت است که در غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت تقریباً نیمی از سلول‌ها گرد شده‌اند (تصویر شماره ۱).

بررسی نتایج MTT نشان داد که $IC_{50}$ (غلظت ۵۰ درصد مهاری) عصاره تام خیار دریایی گونه‌ی *Holothuria arenicola* غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر است ($P<0/05$) که در بازه‌ی ۲۴ ساعت بعد از تیمار تقریباً باعث مهار تکثیر نیمی از سلول‌های B16F10 شد. هم‌چنین نشان داده شد که با گذشت زمان و افزایش غلظت عصاره خیار دریایی، بقاء سلولی کاهش یافته و بیشتر سلول‌ها به سمت لیز شدن پیش رفتند (نمودار شماره ۱).




**نمودار شماره ۱: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی بر درصد مهار بقای سلولی سلول‌های B16F10**

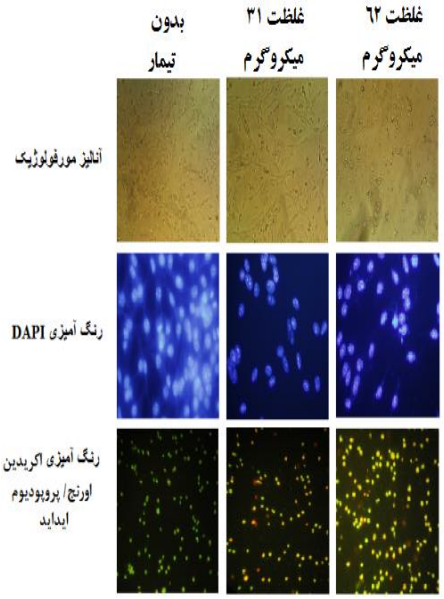
*پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار بر اساس سنجش MTT. (ANOVA ***P<۰/۰۰۱، **P<۰/۰۱، *P<۰/۰۵). غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مورد نظر باعث مهار رشد تقریباً نیمی از سلول ها شده (P<۰/۰۵) و غلظت‌های بالاتر آن اغلب سلول‌ها را از بین برده است.*



www.SID.ir

در روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیوم ایداید با بررسی هسته‌های رنگ‌شده می‌توان به نوع مرگ سلولی پی برد به این صورت که رنگ سبز نشان‌دهنده‌ی سلول‌های زنده و رنگ زرد مایل به نارنجی نشان‌دهنده‌ی آپوپتوز اولیه و رنگ نارنجی تیره و یا قرمز نشان‌دهنده‌ی آپوپتوز ثانویه است. نتایج حاصل از این روش نشان داد که گروه کنترل همه سلول‌ها به رنگ سبز می‌باشند و در دوز ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً نیمی از سلول‌ها سبز و نیمی زرد و در دوز ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشتر سلول‌ها به رنگ نارنجی ملاحظه می‌شوند.

در رنگ‌آمیزی توسط رنگ DAPI که هسته‌ها رنگ‌آمیزی می‌شوند در گروه کنترل هسته‌ها یکدست بودند ولی در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی هسته‌ها یکپارچگی خود را از دست داده و قطعه قطعه شده بودند (تصویر شماره ۱).




**تصویر شماره ۱**: آنالیز مورفولوژیک

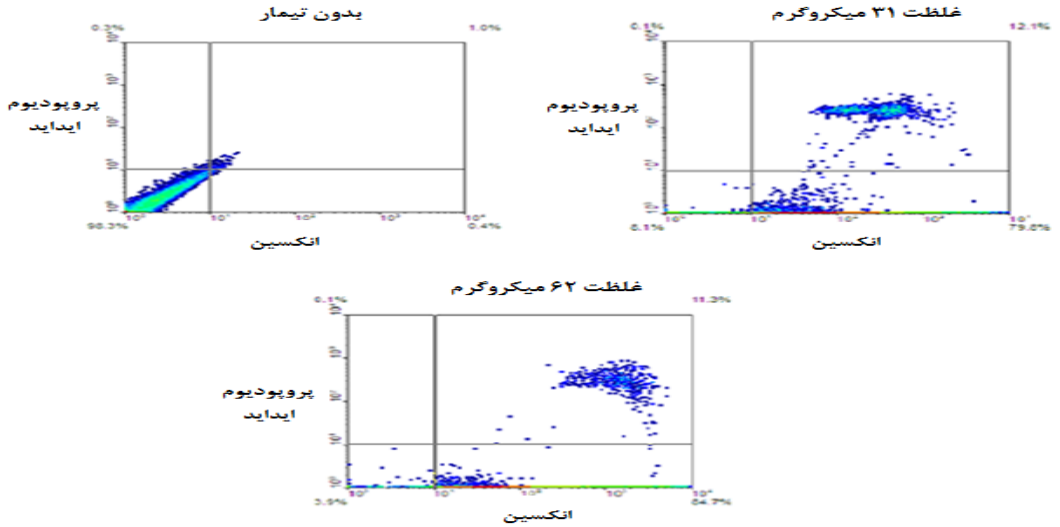
تغییرات مورفولوژیک سلول‌های B16F10 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره تام خیار دریایی. همان‌طور که در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌نمایید سلول‌ها در گروه کنترل کشیده هستند و در گروه ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تقریباً نیمی از سلول‌ها گرد شده‌اند که نشان‌دهنده‌ی آپوپتوز است. در گروه ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تقریباً تمام سلول‌ها گرد شده‌اند. رنگ‌آمیزی DAPI: در گروه کنترل هسته‌ها منسجم و یکدست هستند (بزرگنمایی×۲۰۰). دوز ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره بعد از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره تام خیار دریایی. (بزرگنمایی×۲۰۰) که همان‌طور که مشاهده می‌شود تقریباً نیمی از هسته‌ها قطعه‌قطعه شده‌اند که معرف مرگ برنامه‌ریزی‌شده است. دوز ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بعد از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره تام خیار دریایی که بیش از نیمی از هسته سلول‌های B16F10 قطعه شده‌اند (بزرگنمایی×۲۰۰). رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیوم ایداید: گروه کنترل، سلول‌ها زنده و به رنگ سبز مشاهده می‌شوند. غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تام خیار دریایی بر روی رده‌ی سلولی B16F10، برخی سلول‌ها به رنگ زرد و نارنجی مشاهده می‌شوند که نشان‌دهنده سلول‌ها در مراحل اولیه آپوپتوز هستند. غلظت ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تام خیار دریایی بر رده‌ی سلولی B16F10 که در آن برخی سلول‌ها به رنگ قرمز درآمده‌اند که نشان‌دهنده وجود سلول‌ها در مراحل آخر آپوپتوز هستند (بزرگنمایی×۲۰۰).

جهت ارزیابی آپوپتوز توسط کیت تشخیصی انکسین بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تام خیار دریایی نسبت به گروه کنترل که تحت تیمار قرار نگرفته‌اند. با بررسی سلول‌ها توسط تست انکسین متوجه شدیم سلول‌های گروه کنترل تقریباً همه‌ی آن‌ها در سمت چپ نمودار قرار دارند و دوز ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش از ۸۰ درصد از سلول‌ها به سمت راست نمودار حرکت کرده‌اند که نشان می‌دهد مرگ سلولی القاشده آپوپتوز است (تصویر شماره ۲).

Archive of SID



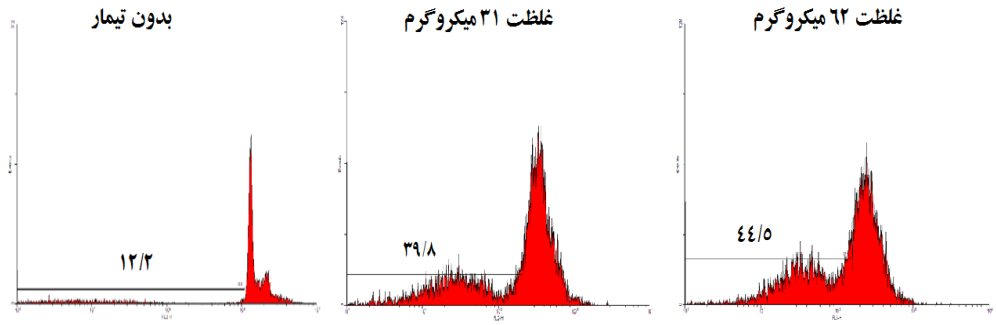
www.SID.ir




**تصویر شماره ۲:** آنالیز فلوسایتومتری عصاره تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی بر روی سلول‌های B16F10

نتایج نشان می‌دهد که با گذشت ۲۴ ساعت از تیمار در دوز ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از کیت تشخیصی Annexin V-FITC بیش از ۸۰ درصد از سلول‌ها دچار آپوپتوز شده‌اند.

آزمون فلوسایتومتری با پروپودیوم ایداید برای بررسی سلول‌ها در فازهای مختلف سیکل سلولی (sub G0/G1، G1، S، G2/M) کاربرد دارد. در این بررسی افزایش فاز sub G0/G1 (پیک آپوپتوز) و کاهش فاز S که نشان‌دهنده القاء آپوپتوز و مهار سنتز DNA است، در غلظت ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی مشاهده شد (تصویر شماره ۳).



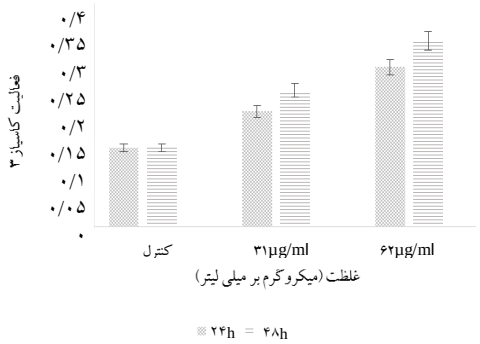

**تصویر شماره ۳:** آنالیز فلوسایتومتری عصاره تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی بر روی سلول‌های B16F10 توسط تست PI

نتایج نشان می‌دهد که با گذشت ۲۴ ساعت از تیمار در دوز ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاز sub G0/G1 افزایش‌یافته که نشانگر القاء آپوپتوز توسط عصاره است و در دوز ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاز S کاهش و فاز sub G0/G1 نسبت به گروه کنترل و حتی گروه تیماری با دوز ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش‌یافته است.

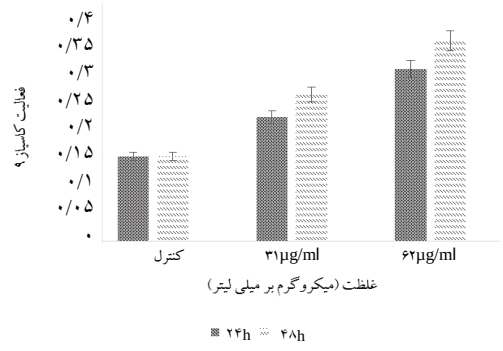
جهت تعیین مسیر آپوپتوزی القا شده توسط غلظت‌های موثره عصاره تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی از فعالیت کاسپاز (۹،۳) استفاده شد. بررسی نتایج سلول‌های رده سلولی B16F10 تحت تیمار با غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی در مقایسه با گروه کنترل افزایش


www.SID.ir

فعالیت کاسپاز ۹ و۳ را نشان داد که معرف این مطلب است که مرگ سلولی القاء شده با عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی بر رده سلولی B16F10 وابسته به کاسپاز بوده است و با توجه به افزایش فعالیت کاسپاز ۹ به احتمال فراوان از مسیر داخلی باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های ملانومایی می‌شوند (تصویر شماره ۴).




**تصویر شماره ۴–A: مقایسه میزان فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های تیمار شده با عصاره تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی در مقایسه با گروه کنترل**




**تصویر شماره ۴–B: مقایسه میزان فعالیت کاسپاز ۹ در گروه‌های تیمار با عصاره تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی در مقایسه با گروه کنترل**

*داده‌ها نشان‌دهنده افزایش فعالیت کاسپاز ۹ در گروه‌های تیماری در مقایسه با گروه کنترل است که این افزایش وابسته به غلظت است.*

## بحث:

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی موجب القاء اثرات توکسیک بر روی سلول‌های سرطان ملانومایی B16F10 مقاوم به دارو می‌شود. باوجود درمان های رایج در رابطه با سرطان ملانوما، یکی از راهکارها جهت بهبود اثرات داروهای شیمی‌درمانی بکارگیری ترکیباتی نظیر فراورده‌های طبیعی است که ضمن کاهش عوارض جانبی بتواند تأثیر قوی بر روی سلول‌های سرطانی داشته باشد (۲۷،۴).

در طول چندین سال گذشته شاهد افزایش تحقیق بر روی سخت‌پوستان دریایی، نرم‌تنان و خارپوستان، به‌ویژه به دلیل سود جستن از متابولیت های ثانویه آن‌ها با دارا بودن خواص ضد میکروبی مطلوب این مواد هستیم و خارپوستان، به‌عنوان یک منبع ترکیبات فعال بیولوژیکی با کاربردهای پزشکی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۹).

وجود فراورده‌های طبیعی متنوع ازنظر ساختاری همچون ساپونین در خیار دریایی آن را کاندید مناسبی برای کاربردهای زیست پزشکی می‌سازد (۲۸،۱۲).

در تحقیق حاضر $IC_{50}$ که برای سلول‌های ملانوما رده‌ی B16F10 توسط عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی گونه‌ی خلیج‌فارس به دست آمد ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با تحقیقی که Althunibat انجام داد کمی بهتر بود. Althunibat و همکاران بر روی اثرات آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیسیته ی عصاره‌های آبی و آلی دو گونه خیار دریایی *Holothuria edulis Lesson* و *Stichopus horrens Selenka* بر روی دو دودمان A549 سلول‌های سرطان ریه و دودمان TE1 سلول‌های سرطان ازوفاژیال مطالعه کردند و مشاهده نمودند عصاره آلی *S. Horrens* دارای اثرات سیتوتوکسیک بالایی علیه سلول‌های سرطانی A549 و TE1 است و $IC_{50}$ به ترتیب ۱۵/۵ و ۴/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ثبت شد (۱۴). می‌توان علت متفاوت بودن نتایج در میزان سیتوتوکسیک و میزان مهار تکثیر سلولی را به میزان مقاومت و میزان حساسیت



Archive of SID
www.SID.ir

متفاوت هر رده سلولی نسبت به عصاره‌ها و ترکیبات و غلظت‌های مختلف هر عصاره نسبت داد.

Mutee و همکارانش طی مطالعه خود بر روی $IC_{50}$ عصاره‌های متانولی، اتانولی و PBS ستاره دریایی گونه‌ی *Acanthasterplanci* نشان دادند که $IC_{50}$ عصاره PBS بر روی رده‌های سلولی MCF-7 و HCT-116 فعالیت قابل‌توجهی دارد. درحالی‌که غلظت مهاری ($IC_{50}$) عصاره کلروفرمی و عصاره‌ی متانولی آن برای همان رده‌های سلولی، فعالیت متوسطی را نشان می‌دهد (۲۹). نتایجی که از عصاره‌ی PBS بر روی رده‌های MCF-7 و HCT-116 به‌دست آمده تقریباً هم‌راستا با نتایج تحقیق حاضر است که نشان می‌دهد عصاره‌ی تام خیار دریایی دارای فعالیت سیتوتوکسیسیته ی بالایی است.

نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی *Holothuria arenicola* باعث مهار رشد سلول‌های سرطان ملانوما می‌شود و همچنین با گذشت زمان دوز مؤثر جهت کاهش رشد نیز کاهش می‌یابد. Amini و همکارانش اثرات سیتوتوکسیک و همولیتیک ترکیبات شبه ساپونین ستاره شکننده گونه‌ی Ophiocoma erinaceus بر روی رده سلولی HeLa را بررسی کردند که نتایج حاصله نشان داد این ترکیبات باعث مهار رشد سلولی می‌شود و این مهار وابسته به دوز و زمان است (۳۰).

در آزمایش حاضر عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی باعث فعال‌سازی کاسپاز ۳ و درنهایت آپوپتوز شد. Gian Luigi Russo و همکاران نیز نشان دادند که عصاره‌ی متانولی یک بی‌مهره‌ی دریایی به نام *Ciona intestinalis* بر روی چندین دودمان سلولی بدخیم ازجمله Caco2، HPB-ALL، U-937 و HL-60 باعث مهار تکثیر سلولی در این رده‌های سلولی می‌شود و وقایع آپوپتوز اولیه، مانند فعال‌سازی کاسپاز ۳ و تخریب internucleosomal DNA را القا می‌کند (۳۱).

## نتیجه‌گیری:

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌ی تام دیواره‌ی بدن خیار دریایی H. arenicola دارای اثر سمیت وابسته به دوز و زمان بر روی سلول‌های سرطان ملانوما B16F10 است. طوری که از طریق القاء مرگ سلولی آپوپتوز موجب القاء اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطان ملانوما می‌شود. در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش از این ایده که منابع دریایی می‌توانند منابع ارزشمندی از عوامل ضد سرطان باشند، حمایت می‌کند.

## تشکر و قدردانی:

از کارشناسان محترم مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این پژوهش با کد مصوب ۱۱۱۳۰۵۱۷۹۱۲۰۰۲۰ همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزاریم.

## منابع:

1. Dhanamani M, Devi SL, Kannan S. Ethnomedicinsl plants for cancer therapy – A Review. Hygeia J D Med. 2011; 3(1): 1–10.
2. Kannengiesser C, Spatz A, Michiels S, Eychene A, Dessen P, Lazar V, et al. Gene expression signature associated with BRAF mutations in human primary cutaneous melanomas. Mol Oncol. 2008; 1(4): 425-30.
3. Tabolacci C, Lentini A, Mattioli P, Provenzano B, Oliverio S, Carlomosti F, et al. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells. Life Sci. 2010; 87(9-10): 316-24.


www.SID.ir
Archive of SID

4. Park HJ, Han ES, Park DK. The ethyl acetate extract of PGP (Phellinus linteus grown on Panax ginseng) suppresses B16F10 melanoma cell proliferation through inducing cellular differentiation and apoptosis. J Ethnopharmacol. 2010; 132(1): 115-21.
5. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002; 417(6892): 949-54.
6. Zurich ET, Pretto F, Neri D, Detmar M, Giavazzi R. Therapeutic activity of anti-cancer immunocytokines in combination with chemotherapy[dissertation]. Zürich: Eidgenössische Technische Hochschule ETH Zürich, Nr. 21039; 2013.
7. Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Hersey P. Apoptosis: from signalling pathways to therapeutic tools. Iran J Basic Med Sci. 2008; 11(3): 121–42.
8. Sakagami H. Apoptosis-inducing activity and tumor-specificity of antitumor agents against oral squamous cell carcinoma. Jpn Dent Sci Rev. 2010; 46(2): 173–87.
9. Abdallah H, Ibrahim H. Antibacterial carotenoids of three Holothuria species in Hurghada. Egypt J Aquat Res. 2012; 38: 185–94.
10. Natarajan K, Sathish R, Regupathi T, Riyaz A. Antibacterial activity of crude extracts of marine invertebrate Polyclinum madrasensis Sebastian. Indian J Sci Technol. 2010; 3(3): 303–4.
11. Xia Y, Liu Z, Li Z. Effects of High Hydrostatic Pressure Treatment on Physicochemical Characteristics of Sea Cucumber. J Food Sci Eng. 2012; 2: 227–38.
12. Esmat AY, Said MM, Soliman AA, El-Masry KS, Badiea EA. Bioactive compounds, antioxidant potential, and hepatoprotective activity of sea cucumber (Holothuria atra) against thioacetamide intoxication in rats. Nutrition. 2013; 29(1): 258-67.
13. Popov A, Artyukov A, Krivoshapko O, Kozlovskaya E. Biological activities of collagen peptides obtained by en- zymic Hydrolysis from Far-Eastern holothurians. Am J Biomed Life Sci. 2013; 1(1):17–26.
14. Althunibat OY, Ridzwan BH, Taher M, Daud JM, Jauhari Arief Ichwan S, Qaralleh H. Antioxidant and cytotoxic properties of two sea cucumbers, Holothuria edulis lesson and Stichopus horrens Selenka. Acta Biol Hung. 2013; 64(1): 10-20.
15. Li M, Miao ZH, Chen Z, Chen Q, Gui M, Lin LP, et al. Echinoside A, a new marine-derived anticancer saponin, targets topoisomerase2alpha by unique interference with its DNA binding and catalytic cycle. Ann Oncol. 2010; 21(3): 597-607.
16. Liu BS, Yi YH, Li L, Sun P, Yuan WH, Sun GQ, et al. Argusides B and C, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Bohadschia argus Jaeger. Chem Biodivers. 2008; 5(7): 1288-97.
17. Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. Evaluationof anti-cancer effect of Peganum harmala L hydroalcholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(4): 1–8.
18. Thangam R, Sathuvan M, Poongodi A, Suresh V, Pazhanichamy K, Sivasubramanian S, et al. Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by Cymbopogon citratus polysaccharide fractions. Carbohydr Polym. 2014; 107: 138-50.
19. Bakar SAA, Zawawi M, Ali AM, Ideris A. Induction of apoptosis by Newcastle disease virus strains AF220 and V4-UPM in human promyelocytic leukemia (HL60) and human T-lymphoblastic leukemia (CEM-SS) cells. World Acad Sci Eng Technol. 2012; 6: 356–60.
20. Wang XB, Liu QH, Mi N, Wang P, Tang W, Zhao XH, et al. Sonodynamically induced apoptosis by protoporphyrin IX on hepatoma-22 cells in vitro. Ultrasound Med Biol. 2010; 36(4): 667-76.
21. Ali MA, Abul Farah M, Al-Hemaid FM, Abou-Tarboush FM. In vitro cytotoxicity screening of wild plant extracts from Saudi Arabia on human breast adenocarcinoma cells. Genet Mol Res. 2014; 13(2): 3981-90.



www.SID.ir

22. Nair SV, Hettihewa M, Rupasinghe HP. Apoptotic and inhibitory effects on cell proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by methanol leaf extract of Costus speciosus. Biomed Res Int. 2014; 2014: 637098.
23. Lu X, Liu W, Wu J, Li M, Wang J, Wu J, et al. A polysaccharide fraction of adlay seed (Coixlachryma-jobi L.) induces apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 430(2): 846-51.
24. Massaoka MH, Matsuo AL, Figueiredo CR, Farias CF, Girola N, Arruda DC, et al. Jacaranone induces apoptosis in melanoma cells via ROS-mediated downregulation of Akt and p38 MAPK activation and displays antitumor activity in vivo. PLoS One. 2012; 7(6): e38698.
25. Roya S, Besra SE, De T, Banerjee B, Mukherjee J, Vedasiromoni JR. Induction of apoptosis in human leukemic cell lines U937, K562 and HL-60 by Litchi chinensis leaf extract via activation of mitochondria mediated caspase cascades. Open Leuk J. 2008; 1: 1–14.
26. Chen G, Zhang P, Huang T, Yu W, Lin J, Li P, et al. Polysaccharides from Rhizopus nigricans mycelia induced apoptosis and G2/M arrest in BGC-823 cells. Carbohydr Polym. 2013; 97(2): 800-8.
27. Hamm C, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M, Melanoma Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based C. Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a systematic review. Cancer Treat Rev. 2008; 34(2): 145-56.
28. Hu XQ, Wang YM, Wang JF, Xue Y, Li ZJ, Nagao K, et al. Dietary saponins of sea cucumber alleviate orotic acid-induced fatty liver in rats via PPARalpha and SREBP-1c signaling. Lipids Health Dis. 2010; 9: 25.
29. Mutee AF, Salhimi SM, Ghazali FC, Aisha AF, Lim CP, Ibrahim K, et al. Evaluation of anti-cancer activity of Acanthester planci extracts obtained by different methods of extraction. Pak J Pharm Sci. 2012; 25(4): 697-703.
30. Amini E, Nabiuni M, Baharara J, Parivar K, Asili J. Hemolytic and cytotoxic effects of saponin like P ersian G ulf brittle star (Ophiocoma erinaceus). J Coast Life Med. 2014; 2(10):762–8.
31. Russo G, Ciarcia G, Presidente E, Siciliano R, Tosti E. Cytotoxic and apoptogenic activity of a methanolic extract from the marine invertebrate Ciona intestinalis on malignant cell lines. Med Chem. 2008; 4: 106–9.

Archive of SID



www.SID.ir

*Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*
*(J Shahrekord Univ Med Sci) 2015 Dec, Jun; 17(5): 33-43.* ***Original article***

# The cytotoxic effect of sea cucumber body wall extract, species of *Holothuria arenicola* on melanoma cancer cells

Nikdel N[1], Baharara J[2*], Nejad Shahrokhabadi Kh[3], Amini E[4]
[1]Student, Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran; [2]Research Center for Animal Development Applied Biology, Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran; [3]Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran; [4]Student, Animal Biology Dept., Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran.
Received: 4/Feb/2015 Accepted: 5/Mar/2015

**Background and aims:** The sea cucumbers were considered as an important component of aquatic ecosystems in more marine ecosystems. Melanoma as the most dangerous form of skin cancer, has long been influenced the human health. The present study was aimed to examine the cytotoxic effect of sea cucumber body wall extract, species of Holothuria arenicola on melanoma cancer cells.
**Methods:** In this in vitro experimental study, melanoma cancer cells were cultured in 10% RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium and incubated at 37˚C with 5% $CO_2$. After 24 h, the cells were treated by sea cucumber body wall extract with different concentrations (15, 31, 62, 125, 250, 500 µg/ml). The cytotoxic effect of sea cucumber body wall extract were examined by using MTT assay, Acridine Orange/ Propodium Iodide, DAPI (4, 6- Diamidino-2-phenylindole) staining, flow cytometry and caspase 3, 9 assay on melanoma cancer cells. Data were analyzed using SPSS software, one way ANOVA and Duncan test.
**Results:** Sea cucumber body wall extract induced cytotoxic effect through apoptosis induction on B16F10 melanoma cancer cells after 24 h treatment with $IC_{50}$ (Inhibitory Concentration)= 31 µg/ml significantly($P<0.05$). This extract were exerted more toxicity in concentration of 62 µg/ml as a result around 80% of the cells were apoptotic.
**Conclusion:** Findings showed that the sea cucumber body wall extract with cytotoxic effect and pro apoptosis promoter in B16F10 melanoma cell line can be a suitable candidate for anti-cancer researches.

***Keywords:*** **Apoptosis, Sea cucumber, Melanoma, Cancer.**

Arc

**Cite this article as:** Nikdel N, Baharara J, Nejad Shahrokhabadi Kh, Amini E. The cytotoxic effect of sea cucumber body wall extract, species of Holothuria arenicola on melanoma cancer cells. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(5): 33-43.

[*]**Corresponding author:**
*Research Center for Animal Development Applied Biology, Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran; Tel: 00985138437092, E-mail:baharara@yahoo.com*


www.SID.ir