Archive of SID

فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره اول، بهار ۱۳۹۵

اثرات ضدسرطانی عصاره جلبک قرمز *Laurencia caspica* بر رده سلولی T47D سرطان پستان

مژده شفقی[۱]، علی صالح‌زاده[۲]، اعظم مشفق[۳]*

تاریخ دریافت: اسفند ۹۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۵

چکیده

برای درمان سرطان استفاده از ترکیباتی گیاهی و جانوری مختلفی در دست بررسی است. در پژوهش حاضر نیز اثر ضدسرطانی جلبک قرمز *Laurencia caspica* که یکی از ماکروجلبک‌های اکوسیستم دریای خزر است، مورد مطالعه قرار گرفته است. از این رو اثر سمیت و تغییر بیان ژن سرکوبگر *nm23* به وسیله تیمار با عصاره جلبک *L. caspica* ارزیابی شد. به این ترتیب که جلبک *L. caspica* از سواحل رامسر جمع‌آوری شد و عصاره هیدروالکلی آن به کمک روش پرکولاسیون با حلال متانول ٪۵۰ تهیه شد. رده سلولی T47D سرطان پستان در حضور غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره کشت داده شد و با تست MTT توان کشندگی عصاره بررسی شد. استخراج RNA انجام و cDNA سنتز شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *nm23* و *B-actin* طراحی و میزان بیان ژن سرکوبگر *nm23* نسبت به ژن مرجع *B-actin* در غلظت IC_{50} با استفاده از روش Real Time PCR کمی، مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از روش MTT نشان داد که عصاره جلبک، رشد سلول‌های T47D را به صورت وابسته به دوز کاهش داد و همچنین در غلظت ۱۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها مهار شد. نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن سرکوبگر *nm23* از نظر آماری به طور معنی‌داری افزایش یافت در صورتی که بیان ژن *B-actin* تغییری حاصل نکرد.

واژگان کلیدی: *رده سلولی T47D*، Laurencia caspica، *سرطان پستان*، *nm23*.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دریا، گروه زیست‌شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
* نویسنده مسئول: moshfeghazam@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان پستان تومور بدخیمی است که از سلول‌های پستان منشا می‌گیرد. ماده ژنتیکی سلول‌های سرطانی پستان تغییرات زیادی می‌یابد، اما تقریبا تمامی سلول‌های سرطانی برخی از ویژگی‌های طبیعی پستان را حفظ می‌کنند. تغییراتی که سبب می‌شود تا سلول‌های طبیعی پستان سرطانی شوند در مدت طولانی و به صورت تصادفی رخ می‌دهند. این بدان معنی است که هرچه سن فرد بیش‌تر باشد، احتمال وقوع این تغییرات در سلول‌های او بیش‌تر است. اغلب سرطان‌های پستان در خانم‌های بالای ۵۰ سال روی می‌دهد (Jemal et al., 2010; Armstrong et al., 2000). در ایلات متحده از هر هشت زن یک نفر در زندگی خود مبتلا به سرطان پستان می‌شود (Hunt, 2016). این رقم در ایران ۲۵ تا ۳۰ نفر در ۱۰ هزار نفر است (Mousavi et al., 2007). با توجه به گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی، سرطان پستان رتبه اول را در بین زنان ایران داشته است و ٪۱۶ از کل سرطان‌ها را به خود اختصاص داده است (گوهری و همکاران، ۱۳۹۲). زنان مبتلا به سرطان پستان گزینه‌های متفاوتی برای درمان دارند از جمله آن‌ها جراحی، رادیو درمانی، شیمی درمانی، هورمون درمانی و درمان‌های زیستی است. با توجه به افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی درمانی در انواع پیشرفته سرطان، نیاز به شیوه‌های جدیدی برای کنترل سرطان احساس می‌شود (Real et al., 2004). یکی از پیامدهای پس از درمان سرطان پستان برگشت بیماری به صورت متاستاز است. متاستاز سرطان پستان یک فرآیند چند مرحله‌ای پیچیده است که از گسترش سلول‌های سرطانی از پستان به مناطق دیگر بدن ایجاد شده، اغلب منجر به مرگ بیمار می‌شود. رایج‌ترین متاستازها در سرطان پستان، متاستاز استخوان، مغز، ریه، غدد لنفاوی و کبد است (Shaffrey et al., 2004; Suva et al., 2009). مطالعات مختلف نشان داده است که بیماران دارای متاستاز طول عمر کوتاه‌تری نسبت به سایر بیماران دارند (Altundag et al., 2007; Lee et al., 2008). در سال‌های اخیر ژن‌های سرکوبگر متعددی شناسایی شده‌اند که در کنترل متاستاز سرطان‌ها نقش دارند. ژن *nm*23 و محصول پروتئینی آن که فعالیت نوکلئوتید دی‌فسفات کینازی دارد از این دسته ژن‌ها است (Boissan and Lacombe., 2012).

www.SID.ir

Archive of SID

ژن *nm*23 یک ژن سرکوبگر متاستاز است و نقش آن در بسیاری از سرطان‌ها شناسایی شده است (توانگر و همکاران، ۱۳۸۶). با این که هر روز راه‌کارهای جدیدتری در برخورد با سرطان پستان معرفی می‌شود ولی هنوز هم این بیماری جان عده زیادی را در معرض خطر قرار داده است (میرمالک و کنی، ۱۳۸۸).

امروزه یافتن ترکیبات طبیعی از موجودات دریایی به ویژه جلبک‌ها که دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدسرطانی باشند، در پژوهش‌های گوناگون در سرتاسر دنیا مورد توجه قرار گرفته است و هر ساله مطالعات جدیدتری در این راستا انجام و نتایج ارزنده‌ای حاصل می‌شود (بهرامیان، ۱۳۸۸). از جمله این جلبک‌ها می‌توان به اعضای شاخه جلبک‌های قرمز اشاره کرد که اکثر اعضای این شاخه دارای مصارف کاربردی زیادی هستند (Sharma, 1986). جلبک قرمز *L. caspica* از گونه‌های دریازی است. اعضای این گروه پرسلولی هستند و اغلب سلول‌های آن‌ها بیش از یک هسته دارند. این گروه معمولا از طریق جنسی تولیدمثل می‌کنند (دیار کیان‌مهر، ۱۳۷۱). با توجه به فراوانی جلبک *L. caspica* در دریای خزر، در این پژوهش اثر عصاره هیدروالکلی جلبک *L. caspica* جداسازی شده از سواحل رامسر، بر رده سلولی T47D سرطان پستان و رده سلولی نرمال HEK-293، از لحاظ سمیت و تغییرات بیان ژن مهار کننده متاستازی *nm*23 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر جلبک *Laurencia caspica* از سواحل رامسر در بهمن ماه ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. سپس با آب مقطر کاملا شستشو داده شد. جلبک پس از انتقال به آزمایشگاه، با استفاده از دستگاه فریز درایر (Sigma، آلمان) خشک شد.

عصاره‌گیری

عصاره هیدروالکلی جلبک *L. caspica* به روش پرکولاسیون با استفاده از حلال متانول ۵۰ درصد به دست آمد (مهدی‌پور و خانوی، ۱۳۸۸). غلظت عصاره توسط مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران که کار عصاره‌گیری به آنجا سفارش داده شده بود ۶۶/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. سپس از این غلظت، غلظت‌های لازم برای تیمارها که در ادامه ذکر شده است، تهیه شد. عصاره تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری شد (Cos et al., 2006).

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه کشت سلولی از رده سلولی T47D

در این مطالعه رده سلولی سرطانی آدنوکارسینومای پستان T47D و رده نرمال HEK-293 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. جهت کشت این رده‌های سلولی در مراحل بعدی از محیط کشت کامل RPMI-1640 و سرم جنینی گاوی ٪۱۰، ۳/۷ گرم بی‌کربنات، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma-Aldrich، آلمان) استفاده شد و نمونه‌ها در انکوباتور (Memmert، آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتمسفر رطوبت با غلظت پنج درصد CO_2 کشت داده شدند (Mokhtari et al., 2008).

اثر عصاره جلبک *L. caspica* بر روی زیستایی رده سلولی T47D و HEK-293

در این آزمون مبنای سنجش، قرار دادن سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف عصاره و سنجش تعداد سلول‌های مرده است. بدین منظور از ماده موثر زرد رنگ تترازولیوم (MTT؛ شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان در روش MTT استفاده شد (شکرگزار و همکاران، ۱۳۸۶). به همین دلیل در مرحله نخست، برای سنجش درصد سلول‌های زنده، برای کنترل تعداد سلول‌های انتقال یافته به پلیت‌ها، از روش تریپان بلو استفاده شد. سلول‌ها به تعداد ۱×۱۰^{۴} سلول در میلی‌لیتر به پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با بافر فسفات شستشو و با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی جلبکی شامل ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، در محیط کشت حاوی ٪۱۰ سرم جنینی گاوی (Sigma-Aldrich، آلمان) انکوبه شدند. پس از ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول روی سلول‌ها دور ریخته و به هر چاهک حدود ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفیدکسید (DMSO؛ شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) اضافه شد. بعد از پیپتاژ جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Elisa Reader Anthos 2020، آمریکا) خوانده شد (شکرگزار و همکاران، ۱۳۸۶؛ Sheu et al., 2008). برای محاسبه درصد مرگ سلول‌ها از رابطه ۱ استفاده شد (غضنفری و همکاران، ۱۳۸۵؛ شکرگزار و همکاران، ۱۳۸۶).

www.SID.ir

Archive of SID

رابطه ۱:

درصد توانایی زیستی = $(OD_t / OD_c) \times ۱۰۰$

OD_t: جذب نوری نمونه‌های تیمار شده. OD_c: جذب نوری نمونه‌های تیمار نشده.

غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد به عنوان IC_{50} (The Half Maximal Inhibitory Concentration) در نظر گرفته شد.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از کیت RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen، آلمان) استفاده شد. به این ترتیب که ۲ میلی‌لیتر RNX-Plus به فلاسک‌های حاوی سلول‌های T47D تیمار شده با غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی جلبک *L. caspica* اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس میزان ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Sigma-Aldrich، آلمان) به هر نمونه اضافه شد. نمونه پس از ورتکس و قرار گرفتن در دمای اتاق به مدت سه دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز بالایی با ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Sigma-Aldrich، آلمان) مخلوط شد و پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس اتانول ۷۵ درصد به رسوب RNA اضافه شد و در ادامه سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰g صورت گرفت تا RNA شسته شود. در مرحله آخر، RNA در آب حاوی دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC؛ شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) حل شد. به منظور کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده، کیفیت نمونه‌های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن‌ها توسط اسپکتروفتومتری بررسی شد. سپس cDNA با استفاده از کیت RevertAid (Fermentas، لیتوانی) از روی RNA استخراج شده سنتز شد.

طراحی آغازگرها

توالی ژن *nm23* از پایگاه اینترنتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) به دست آمد و با توجه به آن، توالی آغازگر مورد نظر طراحی شد. آغازگرها توسط نرم افزار Becon Desingner طراحی و توسط NCBI Primer BLAST از اختصاصی بودن محل اتصال آغازگرها اطمینان حاصل شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آماده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

نام آغازگر	۵'-۳'	اندازه محصول (جفت باز)	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)
NM23- F	ATGGCCAACTGTGAGCGTACC	۱۹۰	۶۳
NM23- R	CATGTATTTCACCAGGCCGGC	۱۹۰	۶۵
B-ACTIN- F	TCCTCCTGAGCCAAGTA	۱۵۰	۵۸
B-ACTIN- R	CCTGCTTGCTGATCCACATCT	۱۵۰	۶۰

بررسی بیان ژن‌های *nm23* و *B-actin* به کمک Real-Time PCR

در این مطالعه از دستگاه Real-Time RCR (شرکت Bioneer، کره جنوبی) در حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. این محلول شامل ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشین و پسین، ۱۲/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (شرکت سیناژن، ایران) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر بود. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل برای دناتوراسیون به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه و مرحله Annealing توام به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه بود.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد و داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند. تفاوت بیان ژن‌ها بین نمونه‌های تیمار نشده (شاهد) و تیمار شده، با پس‌آزمون Tukey's HSD بررسی شد. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده‌اند و $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

آنالیز داده‌های Real time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با عصاره) و نمونه‌های شاهد (سلول‌های تیمار نشده) محاسبه و با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن هدف به ژن مرجع (*B-actin*) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (رابطه ۲). پس از انجام واکنش Ct به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Rest 2009، ΔΔCt هر کدام از

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها محاسبه شد و سپس با نرم‌افزارهای Graphpad Prism 6 و SPSS 16 با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون Tukey's HSD میزان تغییر بیان هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد.

رابطه ۲:

$$\Delta Ct = Ct_{Target} - Ct_{Reference}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Test\ Sample} - \Delta Ct_{Control\ Sample}$$

$$\text{Relative Expression: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

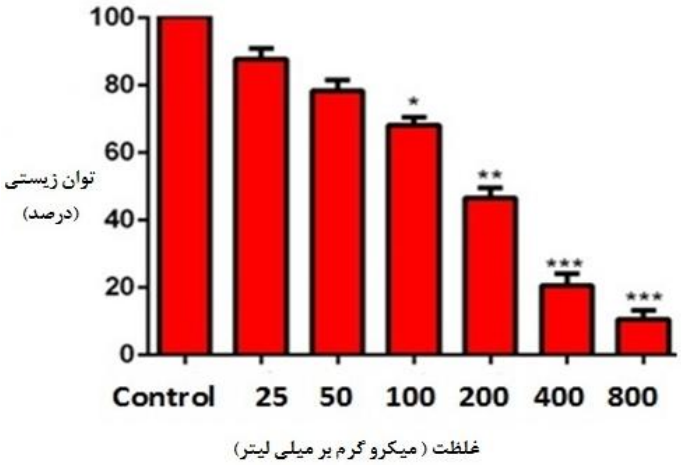
Ct: چرخه آستانه. ΔCt: تفاوت بین چرخه آستانه سلول‌های شاهد و تیمار شده. ΔΔCt: تفاوت بین ΔCtهای سلول‌های شاهد و تیمار شده.

نتایج

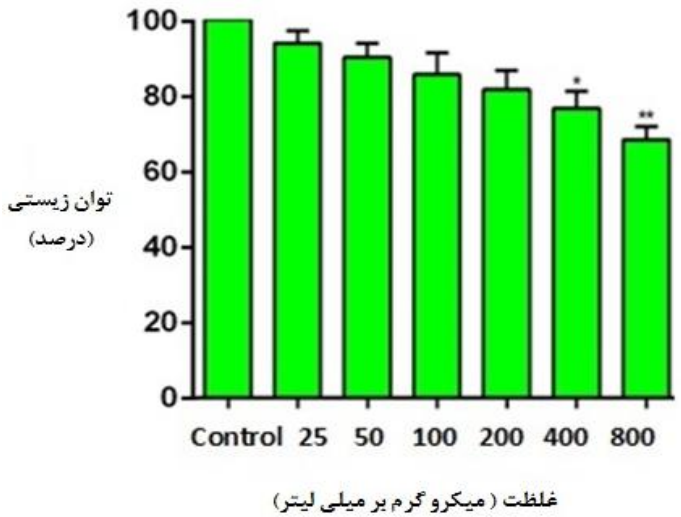
اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی جلبک *L. caspica* بر روی رده‌های سلولی T47D و رده نرمال HEK-293 نشان داد که غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین مهار تکثیر سلولی را داشت که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). در حالی که غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه تیمار نشده با عصاره اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P=۰/۴۵). نتایج محاسبه میزان IC_{50} مربوط به عصاره جلبک *L. caspica* نشان داد که در زمان ۲۴ ساعت، عصاره با غلظت ۱۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر است ۵۰ درصد سلول‌های رده T47D را مهار کند. با توجه به این نتایج عصاره جلبک *L. caspica* در زمان ۲۴ ساعت با غلظت پایین‌تری نسبت به غلظت حداکثر، رشد ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی T47D را مهار می‌کند (شکل‌های ۱ و ۲). نتایج حاصل از بیان ژن *nm23* در سلول‌های تیمار نشده که هیچ عصاره‌ای دریافت نکرده بودند نسبت به سایر سلول‌ها نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *nm23* در گروهی که غلظت IC_{50} از عصاره جلبک *L. caspica* را دریافت کرده بودند در مقایسه با سلول‌های شاهد و سلول‌هایی که غلظت sub-IC_{50} را دریافت کرده بودند، بیش‌ترین مقدار افزایش بیان ژن را نشان دادند (P<۰/۰۰۱، ۳۳/۹۳ برابر). در حالی که این مقدار در مورد غلظت sub-IC_{50}، ۱۰/۳۷ برابر بود (P <۰/۰۱) که نشان دهنده تاثیر مثبت عصاره جلبک *L. caspica* در افزایش بیان ژن *nm23* است (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



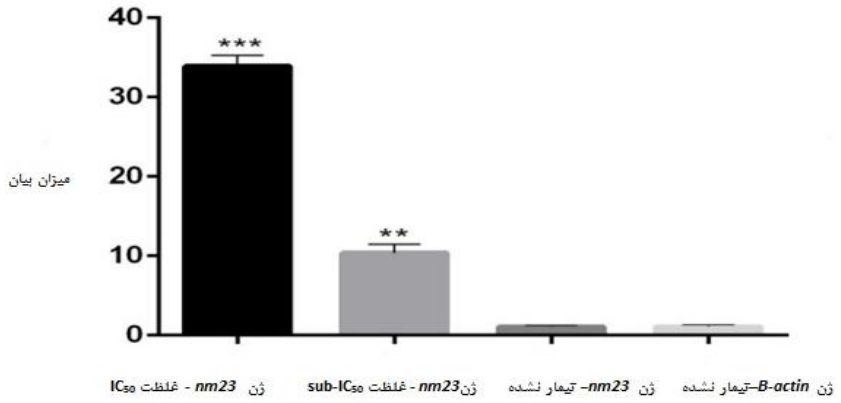
شکل ۱: درصد بقای سلول‌های T47D در برابر غلظت‌های مختلف عصاره *Laurencia caspica* در مدت زمان ۲۴ ساعت (نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه تیمار نشده گزارش شده است). *: P۷۰/۰۵؛ **: P۷۰/۰۱؛ *: P۷۰/۰۰۱.**



شکل ۲: درصد بقای سلول‌های طبیعی (HEK-293) در برابر غلظت‌های مختلف عصاره *Laurencia caspica* در مدت زمان ۲۴ ساعت (نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه تیمار نشده گزارش شده است). *: P۷۰/۰۵؛ **: P۷۰/۰۱ .

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: بیان ژن *nm23* در ۳ گروه شامل گروه تیمار نشده، گروهی که با غلظت IC_{50} و گروهی که با غلظت $sub\text{-}IC_{50}$ تیمار شده است در مقایسه با ژن *B-actin*. **: P۰/۰۱؛ *: P۰/۰۰۱.**

بحث

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های بدخیم زنان در کل دنیا بوده، شیوع ابتلا به آن در اکثر کشورهای دنیا از جمله ایران رو به افزایش است (بشاش و همکاران، ۱۳۹۱). از این رو امروزه یافتن ترکیبات طبیعی از ارگانیسم‌های دریایی به ویژه جلبک‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است (بهرامیان، ۱۳۸۸). در مطالعه‌ای که Dellai و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی عصاره هیدروالکلی جلبک قرمز *Laurencia obtusa* جدا شده از سواحل مدیترانه داشتند نشان دادند که این عصاره دارای فعالیت ضدتکثیری روی سه رده سرطانی A549، HCT15 و MCF7 در انسان است. همچنین آن‌ها بیان داشتند که در این عصاره ترکیبات فنلی و فلاونوییدی وجود دارد که با افزایش دوز این عصاره اثر مهاری بیش‌تر می‌شود (Dellai et al., 2013). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که با افزایش غلظت، اثر مهاری بیش‌تر شد.

در پژوهشی که به منظور کشف ماهیت متابولیت‌های ثانویه در جلبک *Laurencia pacifica* انجام شد نشان داده شد که ترکیبات موجود در این عصاره قادر به مهار تکثیر سلول‌های سرطانی معده، پستان، کولون، تخمدان، ریه، پانکراس، پروستات، پوست و نوروبلاستوما شد. با توجه به این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات موجود در این جلبک دارای تنوعی هستند که باعث مهار

www.SID.ir

Archive of SID

طیف وسیعی از سرطان‌ها می شوند. البته این که چه ترکیباتی و در کدام مرحله از چرخه سلولی تاثیر دارند نیاز به پژوهش‌های بیش‌تری دارد (Zaleta et al., 2014).

در پژوهشی که بر عصاره آلی جلبک قرمز *Laurencia microcladia* جدا شده از جزیره Chios نزدیک سواحل یونان انجام شد، مشخص شد که متابولیت کوپارن سسکوی ترپن[1] روی دو رده سلولی NSCLC-N6 و A549 سرطان ریه فعالیت سیتوتوکسیک قوی داشت (Kladi et al., 2005). همچنین در مطالعه‌ای که بر روی اثرات ضدسرطانی Elatol مشتق شده از جلبک قرمز *Laurencia microcladia* در شرایط in-vivo و in-vitro انجام شد نشان داد که در هر دو حالت Elatol خواص ضدتوموری داشت (Campos et al., 2012). Manilal و همکاران در سال ۲۰۰۹ با جداسازی جلبک *Laurencia brandenii* از سواحل هند، نشان دادند که عصاره این جلبک روی رده سلولی خون اثر ضدتوموری داشت. در پژوهشی که توسط Campos و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد مشخص شد که عصاره *Laurencia microcladia* جدا شده از سواحل جنوبی برزیل روی رده‌های سلولی ریه، پروستات و ملانوما اثر مهاری داشت. همچنین باعث افزایش بیان ژن‌های *caspase*-9 و *p*53 شد (Campos et al., 2012).

Lee و همکارانش در سال ۲۰۱۳ طی مطالعه‌ای که روی محصولات طبیعی جلبک‌های دریایی داشتند به این نتیجه رسیدند که محصولات طبیعی جلبک‌های دریایی دارای پتانسیلی برای استفاده در داروهای ضدسرطانی و داروهای ضدالتهابی هستند.

مطالعه‌ای که توسط احمدزاده در سال ۱۳۸۸ به منظور بررسی اثر ضدتوموری عصاره جلبک قهوه‌ای *Sargassum oligocystum* بر رشد و تکثیر رده‌های سلولی سرطانی BLL و K562 انجام شد نشان داد که عصاره این جلبک دارای اثرات ضدتوموری قابل توجهی علیه این دو رده سلولی بود.

همچنین در مطالعه اثر ضدسرطانی عصاره اتانولی جلبک سبز *Dunaliella salina* بر روی میزان مرگ و میر رده سلولی سرطان پوست با استفاده از تست MTT، مشخص شد که عصاره اتانولی جلبک *D. salina* بر روی رده سلولی A431 اثر کشندگی داشت و این اثر با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یافت

1- Cuparene Sesquiterpenes

www.SID.ir

Archive of SID

(مقدسی و همکاران، ۱۳۹۰). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد با افزایش غلظت عصاره و در طی ۲۴ ساعت میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی رده T47D افزایش یافت.

تاکنون ترکیبات زیستی متعددی با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و استخراج شده است و بسیاری از متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه این جانداران می‌تواند به مواد زیست‌فعال مورد استفاده در صنایع دارویی تبدیل شود (Choudhury et al., 2005; Tuney et al., 2006).

با توجه به نتایج مطالعات پیشین، می‌توان این طور استنباط کرد که هر چند گونه استفاده شده در این مطالعه متفاوت و مختص دریای خزر است ولی اثرات ضدسرطانی مشابهی با گونه‌های ذکر شده در این بحث دارد. با توجه به این که این جلبک‌ها دارای طیف متنوعی از ترکیبات هستند و ترکیبات جلبک *L. caspica* هنوز شناسایی نشده است، بنابراین شناسایی ترکیبات این جلبک برای بررسی ترکیبات موثر آن سودمند است. با توجه به اثر مناسب این عصاره پیشنهاد می‌شود که ترکیبات موثر آن استخراج شود و اثر آن‌ها جداگانه بررسی شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

احمدزاده س. ۱۳۸۸. بررسی اثر عصاره جلبک قهوه‌ای سارگازوم الیگوسیستو (*Sargassum oligocystom*) بر روی مهار سلول‌های سرطانی BLLو K562 در شرایط In vitro. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای پزشکی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بوشهر. ۱۲۸ص.

بشاش د.، صفا م.، شهبازی ع.، محمدیان م. و شاه‌محمد ن. ۱۳۹۱. اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه خارمریم بر روی سلول سرطان سینه رده T47D. فصلنامه علمی پژوهشی طب مکمل، ۱: ۹۵-۸۵.

بهرامیان پ. ۱۳۸۸. بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره جلبک سبز، گونه کالرپا سرتولاریوایدز (*Caulerp sertularioides*). پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بوشهر. ۸۵ص.

توانگر س.م.، مرادی تبریز ه.، رجبیانی ا.، لاریجانی ب.، حشمت ر.، لشکری آ.، ادبی خ. و عظیمی پ.س. ۱۳۸۶. بررسی بروز مارکر سلولی nm23 در نئوپلاسم‌های خوش‌خیم و بدخیم تیروئید به روش ایمونوهیستوشیمی. مجله غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران، ۹(۴): ۳۴۴-۳۳۹.

دیار کیان‌مهر ه. ۱۳۷۱. مبانی جلبک‌شناسی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۵۲ص.

شکرگزار م،ع.، زالی ح.، رضایی طاویرانی م.، امان زاده ا. ۱۳۸۶. مقایسه دو روش رنگ‌سنجی MTT و تریبان بلو در تعیین سیتوتوکسیسیتی کال پروتکتین بر سلول‌های سرطانی معده انسان در شرایط آزمایشگاهی. پزشکی کوثر، ۱۲(۲): ۱۳۷-۱۲۷.

غضنفری ط.، شاهرخی س.، ناصری م.، جلالی ندوشن م.ر.، یارایی ر. و کاردر م. ۱۳۸۵. بررسی سمیت فراورده گیاهی ACAI بر روی رده سلول سرطانی ملانومی انسانی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۶(۵۵): ۴۹-۴۲.

گوهری م.ر.، مقدمی فرد ز.، ابوالقاسمی ج.، محمدی م. و مختاری پ. ۱۳۹۲. عوامل پیش آگهی دهنده بروز متاستاز در بیماران سرطان پستان با استفاده از مدل بازگردنده اندرسن-گیل. کومش، ۱۴(۴): ۴۸۹-۴۸۳.

مقدسی ز.، امتیازجو م.، ربانی م.، امتیازجو م.، لبیبی ف.، آذرگشب ا.ا. و مصفا ن. ۱۳۹۰. مطالعه اثر ضدسرطانی عصاره اتانولی جلبک سبز *Dunaliella salina* جدا شده از دریاچه حوض سلطان بر رده سلولی Squamous Cell Carcinoma در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲: ۳۱۵-۳۰۶.

مهدی‌پور ه. و خانوی م. ۱۳۸۸. بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل. فصلنامه گیاهان دارویی، ۸(۴): ۱۵۲-۱۴۵.

میرمالک س.ع. و کنی ف. ۱۳۸۸. کاربرد بالینی بیولوژی سرطان پستان. نشریه جراحی ایران، ۱۷(۱): ۱۷-۱.

www.SID.ir

Archive of SID

Altundag K., Bondy M.L., Mirza N.Q., Kau S.W., Broglio K., Hortobagyi G.N. and Rivera E. 2007. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 420 metastatic breast cancer patients with central nervous system metastasis. Cancer, 110: 2640–2647.

Armstrong K., Eisen A. and Weber B. 2000. Assessing the risk of breast cancer. The New England Journal of Medicine, 342: 564–571.

Boissan M. and Lacombe M.L. 2012. NM23, an example of a metastasis suppressor gene. Bulletin du Cancer. 99(4): 431–440.

Campos A., Souza C.B., Lhullierb C., Falkenbergb M., Schenkel E.P., Ribeiro-do-Valle R.M. and Siqueira J.M. 2012. Anti-tumour effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae *Laurencia microcladia* . Journal of Pharmacy and Pharmacology, 64(8): 1146–1154.

Choudhury S., Sree A., Mukherjee S.C., Pattnaik P. and Bapuji M. 2005. In vitro antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. Asian Fisheries Science, 18: 285–94.

Cos P., Vlietinck A. and Berghe D. 2006. Antiinfective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof of concept. Journal of Ethnopharmacology, 106: 290–302.

Dellai A., Laajili S., Le Morvan V., Robert J. and Bouraoui A. 2013. Antiproliferative activity and phenolics of the Mediterranean seaweed *Laurencia obusta*. Elsevier Industrial Crops and Products, 47: 252– 255.

Hunt B.R. 2016. Breast cancer prevalence and mortality among Hispanic subgroups in the United States, 2009-2013. Journal of Cancer Epidemiology, 2016: 1–5 (8784040).

Jemal A., Siegel R., Xu J. and Ward E. 2010. Cancer statistics, 2010. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 60(5): 277–300.

Kladi M., Vagias C., Furnari G. and Roussis V. 2005. Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*. Tetrahedron Letters, 46: 5723–5726.

Lee J.C., Hou M.F., Huang H.W., Chang F.R., Yeh C.C., Tang J.Y. and Chang H.W. 2013. Marine algal natural products with antioxidative, anti-inflammatory and anti-cancer properties. Cancer Cell International, 13: (55) 2–7.

Lee S.S., Ahn J.H., Kim M.K., Sym S.J., Gong G. and Ahn S.D. 2008. Brain metastases in breast cancer: Prognostic factors and

www.SID.ir

Archive of SID

management. Breast Cancer Research and Treatment, 111: 523–530.

Manilal A., Sujith S., Kiran G.S., Selvin J. and Shakir C. 2009. Cytotoxic potentials of red alga, *Laurencia brandenii*, collected from the Indian coast. Global Journal of Pharmacology, 3(2): 90–94.

Mokhtari M.J., Motamed N. and Shokrgozar M.A. 2008. Evaluation of silibinin on the viability, migration and adhesion of the human prostate adenocarcinoma (PC-3) cell line. Cell Biology International, 32(8): 888–892.

Mousavi S.M., Montazeri A., Mohagheghi M.A., Jarrahi A., Harirchi I., Najafi M. and Ebrahimi M. 2007. Breast cancer in Iran: An epidemiological review. The Breast Journal, 13(4): 383–391.

Real P.J., Cao Y. and Wang R. 2004. Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. Cancer Research, 23: 7947-7953.

Shaffrey M.E., Mut M., Asher A.L., Burri S.H., Chahlavi A. and Chang S.M. 2004. Brain metastases. Current Problems in Surgery, 41: 665–741.

Sharma O.P. 1986. Text Book of Algae. McGraw Hill, New Delhi. 396P.

Sheu M.J., Huang G.J., Wu C.H., Chen J.S., Chang H.Y., Chang S.J. and Chung J.G. 2008. Ethanol extract of *Dunaliella salina* induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 Human nonsmall cell lung cancer. In vivo, 22(3): 369–378.

Suva L.J., Griffin R.J. and Makhoul I. 2009. Mechanisms of bone metastases of breast cancer. Endocrine-Related Cancer, 16: 703–713.

Tuney I., Cadirci B.H., Unal D. and Sukatar A. 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). Turkish Journal of Biology, 30: 171–175.

Zaleta D.A., Holland L.P., Munoz-ochoa M. and Mccluskey A. 2014. Cytotoxic compounds from *Laurencia pacifica*. Organic and Medicinal Chemistry Letters, 4(1): 4–8.

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 1, Spring 2016

Anticancer effects of *Laurencia caspica* extract on breast cancer T47D cell line

Mojdeh Shafaghi[1], Ali Salehzadeh[2], Azam Moshfegh[3]*

Received: March 2016 Accepted: May 2016

Abstract

In order to treat cancer many drugs and natural products from different plants and animals are used. *Laurencia caspica* is one of the macroalgae of the Caspian Sea ecosystem. In the present study the toxicity effect and changes in *nm*23 metastatic gene expression treated with *L. caspica* extract was evaluated. *L. caspica* alga was collected from the Ramsar beach and its hydroalcholic extracts were prepared via percolation method in 50% methanol. The breast cancer T47D cell line was treated with concentrations of 25, 50, 100, 200, 400 and 800µg/ml of extract. MTT assay was used to analyze extracts lethality. RNA was extracted and cDNA was synthesized. The specific primers were designed for *nm*23 and *B-actin* genes. Level of nm23 gene expression was compared to *B-actin* reference gene in the presence of the estimated IC_{50} concentration using Quantitative Real Time PCR. Evaluation of cell survival using MTT assay indicated that *L. caspica* extract reduced the T47D cell growth in a dose dependent manner and also the 175µg/mL concentration of extract had inhibitory effect on 50% of cells. Real Time PCR showed that the level of *nm*23 metastatic gene expression had a significant increase, while the *B-actin* gene expression had not changed.

Key words: Laurencia caspica, *nm23, Breast Cancer, T47D Cell Line*.

1- M.Sc. Student in Marine Biotechnology, Department of Biology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Biology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
*Corresponding Author: moshfeghazam@gmail.com

www.SID.ir