

فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۷، شماره ۲، صفحه ۳۱۵-۳۰۶ (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

زیبا مقدسی^۱، مژگان امتیازجو^{۲*}، محمد ربانی^۳، مرجان امتیازجو^۴، فرزانه لیبی^۵، اذنه آذرگش^۶ و نریمان مصفا^۷

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، پست الکترونیک: moz_emtyazjoo@yahoo.com

۳- استادیار، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۴- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه USM پینانگ، مالزی

۵- کارشناسی ارشد، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۶- استادیار، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۷- استاد، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۹

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۸۹

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۸۹

چکیده

استفاده از گیاهان آبی به واسطه داشتن ترکیب‌های مختلف در پیشگیری و درمان بیماریها از حدود ۳۰۰۰ سال پیش در چین رایج بوده است. جلبک سبز دونالیلا (*Dunaliella salina*) نیز یکی از میکروجلبک‌های اکوسیستم‌های دریایی است که به واسطه داشتن ترکیب‌هایی نظیر کاروتنوئیدها مخصوصاً بتا-کاروتن، رتینال، آپوکاروتنوئیدها، کتون‌ها، آلدئیدها و اپوکسیدها که با ساختار شیمیایی خاص و روشهای بیوشیمیایی می‌توانند اکسیژن تکی را دفع کنند و جاذب رادیکال‌ها باشند. در مطالعات زیادی خاصیت ضدسرطانی و ضداکسیدانی این ترکیب‌ها ثابت شده است. در این مطالعه بررسی اثر کشندگی عصاره اتانولی جلبک دونالیلا جدا شده از دریاچه حوض سلطان بر روی میزان مرگ و میر رده سلولی سرطان پوست با استفاده از نمک تترازولیوم در شرایط آزمایشگاهی بود. برای این منظور دونالیلا سالینا از دریاچه حوض سلطان در شمال شرقی قم برداشت، شناسایی و خالص‌سازی گردید. جلبک در محیط کشت جانسون کشت داده شد. توده جلبکی پس از برداشت و شستشو با بافر نمکی فسفات (Phosphate Buffered Salts (PBS)) در برودت خشک و برای تهیه عصاره اتانولی آماده شد. رده سلولی A431 از انستیتو پاستور تهیه و در محیط کشت RPMI (Royal Park Memorial Institute) حاوی سرم جنینی گاوی ۱۰٪ کشت داده شد. سلول‌ها در حضور غلظت‌های مختلف ۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره در فواصل زمانی ۶، ۲۴، ۴۸ ساعت در انکوباتور با دی‌اکسیدکربن ۵٪ قرار داده شد. نتایج آماری داده‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت از نظر مرگ و میر سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$)، ولی در زمان ۶ ساعت سطح معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0.05$). LC_{50} عصاره در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی سرطان پوست در فواصل زمانی گرمخانه‌گذاری ۶، ۲۴، ۴۸ ساعت ارزیابی شد. نتیجه LC_{50} پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت ۶/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. عصاره اتانولی جلبک دونالیلا جهت سنجش میزان بتا-کاروتن موجود در آن توسط HPLC آنالیز شد. نتایج بدست آمده از این مطالعه، اثر کشندگی عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا را بر روی رده سلولی A431 نشان می‌دهد. به طوری که با افزایش غلظت عصاره و افزایش انکوباسیون مرگ و میر سلول‌های سرطان پوست نیز افزایش می‌یابد. پس دونالیلا می‌تواند به‌عنوان یک عامل شیمیایی و جلوگیری کننده قوی رشد برای این رده سلولی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: *Dunaliella salina*، LC_{50} ، HPLC، A431.

مقدمه

جلبک سبز تک سلولی دونالیلا سالیئا از خانواده پلی بلفاریداسه (Polyblepharidacea) می باشد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Raja *et al.*, 2007a) و از تولیدکنندگان مهم در مسیر فتوسنتزی دریا و دریاچه های نمکی فوق اشباع است (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Garcia *et al.*, 2007؛ Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009). از ۲۰۰۰ سال تحقیقات سنتی و مدرن بر روی جانداران دریایی عامل های ضدسرطان کشف شد که بیشتر این عامل ها با ترکیب های ساختاری گوناگون، شامل پلی کتیدها، تریپن ها، استروئیدها و لیپیدها می باشند که آنها را از موجودات دریایی بی مهره، جلبک ها، قارچ ها، باکتری ها و دیگر موجودات استخراج کرده اند. یکی از ترکیب های استخراج شده از جلبک ها بتا-کاروتن می باشد. مواد استخراج شده از این جلبک در تعدادی از مدل های بالینی و در آزمایشگاه ها بر روی رده های سلول سرطان انسانی یا روی مدل های حیوانی خصوصیات عملکردی منحصر به فردی را از خود نشان داده اند (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Mayer & Gustafson, 2003). از ترکیب های مهم درون سلولی دونالیلا می توان به انواع کاروتنوئیدها، گلیسرول، پروتئین و ویتامین ها اشاره نمود. بخش عمده این ترکیب ها دارای خاصیت ضداکسیدانی و ضدسرطانی می باشند (El-Baz *et al.*, 2002؛ Gibbs & Raja *e al.*, 2003؛ Gomez *et al.*, 2003؛ Duffus, 1976؛ Poppel & Goldbohm, 1995). بتا-کاروتن یک رنگدانه ترپنوئیدی است که استفاده از آن به عنوان پیش ماده ویتامین A و داشتن خصوصیات ضداکسیدانی و ضدسرطانی و دافع رادیکال های آزاد در درمان بعضی از بیماریها باارزش می باشد (Raja *et al.*, 2007c؛ Poppel & Goldbohm, 1995؛ Gomez *et al.*, 2003؛ Murthy *et*

al., 2005). بتا-کاروتن دارای ایزومرهای مختلف مانند ۹ سیس و تمام ترانس (All trans) است که ۸۰٪ کل بتا-کاروتن در دونالیلا را تشکیل می دهند. ایزومر ۹ سیس فقط در منابع طبیعی سنتز می شود که خصوصیات ضداکسیدانی بالاتری نسبت به تمام ترانس از خود نشان داده است (Hosseini Tafreshi & Gomez *et al.*, 2003؛ Shariati, 2009). پژوهش های انجام شده توسط مکمل بتا-کاروتن با ویتامین E کاهش ابتلا به سرطان پروستات و سرطان معده را نشان می دهد (Poppel & Goldbohm, 1995؛ Raja *et al.*, 2007c). همچنین اثر بتا-کاروتن که به فراوانی در دونالیلا وجود دارد بر روی کاهش خطر سرطان شش، مری، پانکراس، معده، سینه، پوست، روده و تخمدان اثر چشمگیری دارد. جلوگیری از بیماری های قلبی و عروقی، تومورهای بدخیم، افزایش تقسیم سلولی لنفوسیت ها، افزایش پاسخ ایمنی، تغییر شکل تومور و کنترل رشد آن از ویژگی های دیگر این ماده می باشد (Raja *et al.*, 2007b؛ Murthy *et al.*, 2005؛ Challe, 1997؛ Buiatti, 1997؛ Stryker *et al.*, 1990؛ Wald *et al.*, 1988). در همین ارتباط تحقیقات انجام شده نیز بر روی عصاره دونالیلا نشان داده است که دونالیلا با داشتن ترکیب های ضداکسیدانی باعث مهار قابل توجه فیبروسارکوما القا شده و سرطان شش در موش ها و رده سلولی سرطان شش انسان A549 گردیده است (Raja *et al.*, 2007c؛ Sheu *et al.*, 2008). به طور کلی با توجه به مطالعات ذکر شده می توان این مطلب را بیان کرد که جلبک سبز دونالیلا به دلیل داشتن ترکیب هایی با خاصیت ضداکسیدانی و ضدسرطانی مانند کاروتنوئیدها به خصوص بتا-کاروتن می تواند به عنوان یک داروی غذایی قابل قبول و بالقوه برای پیشگیری و درمان

تغییر یافته با شوری ۱۵٪ و $pH=7/5$ و شدت تابش نور ۱۰۰ لوکس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در یک دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی انجام شد. نمونه‌ها با سانتی‌فوژ (Eppendorf مدل 5810R) در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت مایع برداشت شد و نمک‌زدایی توسط بافر فسفات (PBS) برای تهیه عصاره اتانولی بکار گرفته شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Hosseini, Raja et al., 2007a؛ Garcia et al., 2007؛ Tafreshi & Shariati, 2009). در نهایت توده جلبکی بدست آمده در برودت خشک گردید (Hosseini, Tafreshi & Shariati, 2009؛ Raja et al., 2007a؛ El-Baz et al., 2002؛ Garcia et al., 2007).

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری با استفاده از ۳۰ گرم پودر دونالیلا بدست آمده انجام شد. برای عصاره‌گیری از اتانول خالص استفاده گردید. برای تغلیظ کردن عصاره بدست آمده از تبخیرکننده چرخان (Heidolph WB2000) در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. عصاره بدست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شد (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009؛ Sheu et al., 2008).

آنالیز عصاره توسط HPLC

۰/۱ گرم از عصاره اتانولی جلبک دونالیلا برای سنجش میزان بتا-کاروتن در یک سی‌سی هگزان (-5501) کاملاً حل گردید. پس از خالص‌سازی و عبور از SPE و فیلتر سلولزی ۰/۴۵ میکرون به مقدار ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC مدل Young Lin Acme 9000 تزریق شد. در این آنالیز از ستون Lichrosphere Rp 100 C18 با

بیماریها و انواع سرطان‌های رایج مورد استفاده قرار گیرد (Murthy et al., 2005؛ Poppel & Goldbohm, 1995). پوست بزرگترین ارگان بدن می‌باشد که به کنترل دمای بدن و ذخیره آب و چربی و ویتامین D کمک می‌کند. سرطان اپیدرموئید، سرطان پوستی است که در سلول‌های پهن و نازک که در لایه بالای اپیدرم سطح پوست قرار دارند تشکیل می‌شود که مشخصه بارز این سرطان شاخی شدن پوست است. از عامل‌های محیطی مؤثر بر این بیماری معرض‌گذاری متناوب با نور خورشید، تابش‌های درمانی با $uv-A$ ، $uv-B$ ، آلودگی با ارسنیک و آفت‌کش‌ها و کشیدن سیگار است. در این پژوهش نیز به بررسی اثر کشندگی عصاره اتانولی جلبک دونالیلا جدا شده از دریاچه حوض سلطان بر روی میزان مرگ و میر رده سلولی سرطان پوست با استفاده از نمک تترازولیوم در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شده است.

مواد و روشها

کشت جلبک

نمونه آب از دریاچه حوض سلطان واقع در قم به همراه رسوبات بستر توسط بطری نمونه‌بردار دهان‌گشاد استریل در بهار سال ۱۳۸۷ برداشت گردید و از لحاظ مورفولوژی شناسایی شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Massyuk, Borowitzka & Siva, Garcia et al., 2007؛ 1973). برای خالص‌سازی دونالیلا از روشهای مختلف نظیر محیط کشت اختصاصی، سانتی‌فوژ، اشعه نوری با طول موج‌های مختلف، کاغذهای صافی با قطر منافذ متفاوت، تغییرات شوری، pH ، حرارت، نور و مواد شیمیایی مختلف استفاده شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Raja et al., 2007b). کشت انبوه جلبک در محیط کشت جانسون

خانه‌ای در محیط کشت کامل منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با بافر فسفات شستشو و با غلظت‌های مختلف از عصاره اتانولی جلبکی (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاوای گرمخانه‌گذاری شدند. غلظت صفر به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از به اتمام رسیدن زمان گرمخانه‌گذاری، محلول رویی سلول‌ها را دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر الکل ایزوپروپانل اسیدی ۴٪ (حجم/حجم) اضافه شد. پلیت‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و بعد با دستگاه خواننده دانش‌گر (Elisa Reader Anthos 2020) در طول موج ۴۹۰ نانومتر و طول موج رفرانس ۶۳۰ شدت جذب اندازه‌گیری شد (شکرگذار و همکاران، ۱۳۸۶؛ Sheu et al., 2008). برای هر آزمایش سه چاهک (triplicate) در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها نیز دو بار تکرار گردید. برای محاسبه درصد مرگ سلول‌ها از فرمول زیر استفاده گردید (غضنفری و همکاران، ۱۳۸۵؛ شکرگذار و همکاران، ۱۳۸۶).

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب تست}}{\text{میانگین جذب کنترل منفی}} = \text{درصد مرگ و میر}$$

سنجش آماری

برای تحلیل داده‌های خام از بسته نرم‌افزاری SPSS 16 استفاده شد. در این خصوص میانگین و انحراف معیار نتایج بدست آمده محاسبه گردید. میزان LC₅₀ عصاره دونالیلا از آزمون probit value تعیین شد (شکرگذار و همکاران، ۱۳۸۶؛ Sheu et al., 2008).

اندازه ذرات ۴ میکرون و قطر ۴/۶ سانتی‌متر و طول ۲۵ سانتی‌متر در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط DAD/UV و در فاز متحرک استو نیتریل: متانول: دی‌کلرومتان (۱۰:۲۰:۷۰) استفاده گردید (Mateos & Garcia-Mesa, 2006). در این سنجش از استاندارد بتا-کاروتن سیگما با کد C4582 استفاده شد.

تهیه کشت سلولی از رده سلولی سرطان پوست

رده سلولی سرطان پوست Squamous cell carcinoma A431₃₀₂₀₄ از انستیتو پاستور ایران در محیط کشت کامل تهیه گردید. جهت کشت این رده سلولی در مراحل بعدی از محیط کشت کامل شامل RPMI 1640 و سرم جنینی گاوای به میزان ۱۰٪، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن و میزان رطوبت ۸۰٪ کشت و تکثیر داده شد (خوانساری و همکاران، ۱۳۷۴؛ Sheu et al., 2008).

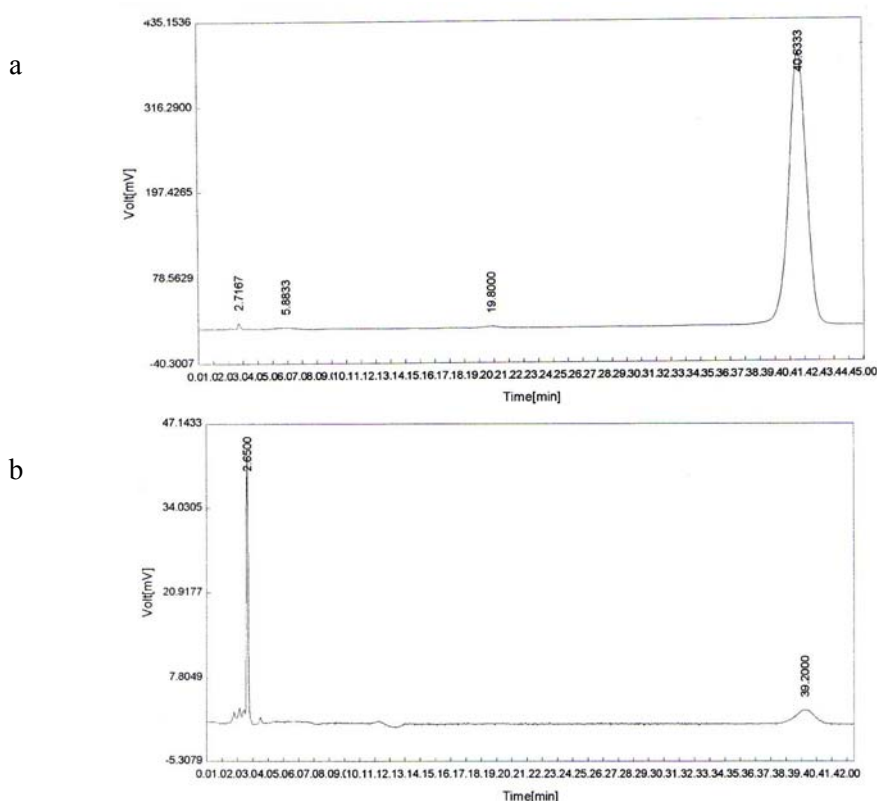
اثر سیتوتوکسیک عصاره دونالیلا بر رده سلولی سرطانی پوست

در این آزمون مبنای سنجش براساس معرض‌گذاری عصاره با غلظت‌های مختلف در مجاورت رده سلولی و سنجش تعداد سلول‌های مرده می‌باشد. بدین منظور از ماده مؤثره زرد رنگ تترازولیوم (MTT) و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان در روش MTT استفاده شد (شکرگذار و همکاران، ۱۳۸۶؛ Sheu et al., 2008). به همین دلیل در مرحله نخست برای سنجش درصد سلول‌های زنده برای کنترل تعداد سلول‌های انتقال یافته به پلیت‌ها از روش تریبان‌بلو استفاده گردید. سلول‌ها به تعداد ۱۰^۴ × ۱ سلول بر میلی‌لیتر به پلیت‌های ۹۶

نتایج

بر اساس اندازه‌گیری سطح زیر منحنی بدست آمده از آنالیز HPLC عصاره اتانولی دونالیلا (شکل ۱) با حلال استونیتریل: متانول: دی‌کلرو متان (۷۰:۲۰:۱۰) مقدار ترکیب بتا-کاروتن در ۱۰۰ گرم از دونالیلا محاسبه گردید. این مقدار ۹۲۰ ppm برآورد شد.

جهت بدست آوردن پودر خشک دونالیلا، ۱۱۰۰ لیتر کشت داده شد. این جلبک براساس کلید شناسایی (Borowitzka & Siva, 2007) بررسی و شناسایی شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Raja et al., 2007a؛ Massyuk, 1973؛



شکل ۱- آنالیز HPLC (a: استاندارد بتا-کاروتن؛ b: عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالیئا)

مرگ و میر سلول‌های سرطانی A431 افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 گویای آن است که بین غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت از نظر مرگ و میر سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0.005$). شکل ۲، LC_{50} بدست آمده از عصاره جلبکی بر سلول‌های A431 در طی زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد که در زمان ۶ ساعت میزان درصد کشندگی

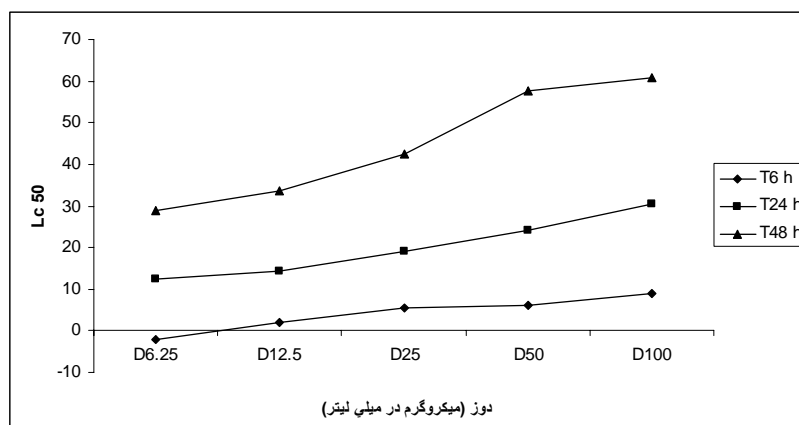
اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی جلبک دونالیلا در زمان‌های مختلف بر روی رده سلولی A431 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی در سه بازه زمانی ۶، ۲۴، ۴۸ ساعت و در ۶ غلظت ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره دونالیلا در جدول ۱ ارائه شده است. روش آزمون مبتنی بر سنجش درصد کشندگی سلول‌ها و به روش MTT بوده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت و زمان‌های مختلف، میزان

زیر ۰.۵٪ بود. بنابراین، براساس آنالیز پروبیت در زمان ۲۴ ساعت، غلظت بیشتری به میزان ۴۷۸/۶ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره لازم است تا بتوان به ۰.۵٪ کشندگی سلولی دست یافت. البته در زمان ۴۸ ساعت این مقدار ۴۶/۶ میکروگرم در میلی لیتر حاصل گردید.

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی دونالیلا سالینا در زمان‌های مختلف بر روی

تعداد مرگ و میر رده سلولی A431

زمان (ساعت)	غلظت ($\mu\text{g/ml}$)				
	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵
۶	$۸۹۷/۵ \pm ۱۰۷/۴$	$۶۲۵/۸ \pm ۵۳۲/۱$	$۵۵۹/۵ \pm ۱۲۰/۶$	$۲۰۴/۳ \pm ۸۶۷/۸$	$-۱۹۷/۸ \pm ۱۶۶/۷$ *
۲۴	$۳۰۵۹/۵ \pm ۱۹۱۳/۱$	$۲۴۱۵ \pm ۹۴۰/۹$	$۱۹۰۲/۱ \pm ۸۹۳/۷$	$۱۴۲۲/۸ \pm ۲۷۰/۷$	$۱۲۴۱/۶ \pm ۱۵۰/۴$
۴۸	$۶۰۷۱/۱ \pm ۲۹۶۷/۷$	$۵۷۷۲/۸ \pm ۱۵۱۲/۵$	$۴۲۵۱/۶ \pm ۱۷۱۵$	$۳۳۶۶/۸ \pm ۳۲۳۸/۳$	$۲۸۷۴/۳ \pm ۵۶۷/۷$

* : اعداد به صورت Means \pm SD می‌باشند.شکل ۲- مقدار LC₅₀ عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا بر روی تعداد مرگ و میر رده سلولی A431

در طی زمان‌ها و غلظت‌های مختلف

D (Dozes) ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۴۸، ۲۴، ۶ T (Time) بر حسب ساعت و LC₅₀ حداقل

دوز کشندگی بر حسب درصد مرگ و میر

بحث

به‌عنوان غذا و دارو صورت گرفته است. از گونه‌های مختلف آن آنزیم‌های با ارزش، ویتامین‌ها و مواد دارویی زیادی استخراج گردیده که از نظر اقتصادی نیز حائز اهمیت می‌باشند. بخش عمده این ترکیب‌ها دارای خاصیت ضداکسیدانی و ضدسرطانی می‌باشند (Hosseini

خواص دارویی ترکیب‌های موجود در دونالیلا مخصوصاً بتا-کاروتن در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. در طی سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای استخراج ترکیب‌های طبیعی از میکروجلبک دونالیلا

سرطان در ارگان‌های مختلف بدن می‌گردد (Buiatti, Poppel & Goldbohm, 1997؛ Murthy *et al.*, 2005؛ Blot و همکاران، 1995). در تحقیق انجام شده توسط Blot و همکاران (۱۹۹۳)، در چین مشخص گردید که بتا-کاروتن می‌تواند خطر سرطان معده را کاهش دهد. تحقیقات دیگری نیز به صورت هم‌سویه نشان داد که بتا-کاروتن با از بین بردن رادیکال‌های آزاد مانع سرطان پوست گردیده است (Challem, 1997؛ Stryker *et al.*, 1990). در تحقیقاتی مشابه در آمریکا نیز مشخص گردید که ۳۰۰ میلی‌گرم در روز بتا-کاروتن به همراه ۲۵۰۰۰ واحد بین‌المللی رتینول پالمیتات باعث کاهش ابتلا به سرطان شش گردیده است (امتیازجو، ۱۳۷۹). Prakash و همکاران (۲۰۰۱) نیز نشان دادند که بتا-کاروتن می‌تواند مورفولوژی سلول‌های سرطان شش NCI-H69 را تغییر دهد و باعث کاهش رشد و تقسیم سلولی در آنها گردد. محققان در آمریکا ثابت کردند که عصاره جلبک دونالیلا، جلبک اسپیرولینا، بتا-کاروتن، آلفا-توکوفرول و کانتازانتین می‌تواند باعث القاء فاکتور نکروز تومور (TNF- α) گردد که منجر به کاهش خطر سرطان اپیدرموئید کیسه‌دهانی در موش می‌گردد (Shaklar & Schwarts, 1988). در مطالعه‌ای درمان سرطان بافت فیبروزی در موش‌ها با عصاره دونالیلا سالینا نشان داد که میزان آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز در سرم خون موش‌های درمان شده افزایش یافته است که نقش مهمی در حذف رادیکال‌های توکسیک نامطلوب را دارند و از سوی دیگر باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در سطح DNA و RNA در بافت کبد و کلیه موش‌ها شده است. این پدیده نقش مهمی در تغییر شکل تومور ایفا می‌کند و نشان‌دهنده درمان موش‌های سرطانی شده می‌باشد (Raja *et al.*, 2007a). عصاره اتانولی دونالیلا

(Tafreshi & Shariati, 2009). در مطالعه‌ای که بر روی عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا انجام شده بود، عصاره بدست آمده با HPLC آنالیز گردید که وجود بتا-کاروتن و کاروتنوئیدهای دیگر از جمله آلفا-کاروتن، لیکوپن، لوتئین، گزانتین و کریپتوزانتین در این عصاره محرز شده است (Sheu *et al.*, 2008). ساختار شیمیایی این کاروتنوئیدها به گونه‌ایست که می‌توانند دفع‌کننده رادیکال‌های آزاد باشند و همچنین با همکاری با همدیگر اثر محافظت‌کننده مفیدی در برابر تخریب اکسیداتیو نشان می‌دهند (Challem, 1997؛ Sheu *et al.*, 2008) و از پدیده سرطان‌زایی و بیماری‌های مختلف ممانعت بعمل می‌آورند. تحقیقات روی خواص دارویی کاروتنوئیدها نشان داده شده که این ترکیب‌ها منجر به مهار رشد سلول‌های نوروبلاستوما و کاهش خطر سرطان کبد و شش، پوست، معده، پروستات در بدن موش شده است، همچنین باعث تغییر و کاهش در تعداد و سایز تومورها و کاهش تخریب ماکولار و کوری در فرد، باعث افزایش سلول‌های کمکی T4 و افزایش ایمنی در بدن می‌شوند (Challem, 1997؛ Reja *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر نیز با استفاده از آنالیز HPLC وجود بتا-کاروتن در عصاره محرز شد. داده‌های حاصل از این تحقیق با نتایج Sheu و همکاران (۲۰۰۸) هم‌خوانی دارد. نتایج بدست آمده در این مطالعه از میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی پوست و اثبات حضور بتا-کاروتن در عصاره اتانولی دونالیلا و گزارش‌های موجود از مطالعات گذشته بر روی این جلبک ناشی از وجود این ترکیب‌های ضدسرطانی و ضداکسیدانی در ساختار سلولی جلبک دونالیلا سالینا است (Sheu *et al.*, 2008). مدارک اپیدمیولوژی نشان دادند که بتا-کاروتن توسط فعالیت ضداکسیدانی مانع

- خوانساری، ن.، توکلی، م.ع. و شمشیری، م.، ۱۳۷۴. روشهای بنیادی کشت یاخته‌های جانوری. انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران، ۲۸۱ صفحه.
- شکرگذار، م.ع.، زالی، ح.، رضایی طاویرانی، م. و امان‌زاده، ا.، ۱۳۸۶. مقایسه دو روش رنگ‌سنجی MTT و تریبان‌بلو در تعیین سیتوتوکسیسیته‌ی 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 کاردرد، م.، ۱۳۸۵. بررسی سمیت فراورده گیاهی ACA1 بر روی رده سلول سرطانی ملانوما ی انسانی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۶(۵۵): ۴۹-۴۲.
- Blot, W.J., Li, J.Y., Taylor, P.R., Guo, W., Dawsey, S., Wang, G.Q., Yang, C.S., Zheng, S.F., Gail, M. and Li, G.Y., 1993. Nutrition intervention trials in Linxian China: supplementation with specific vitamin/mineral combination, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(18): 1483-1492.
- Borowitzka, M.A. and Siva, C.J., 2007: The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, *Dunaliellales*) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5): 567-590.
- Buiatti, E., 1997. The role of chemoprevention in cancer control. *Salud Publica de Mexico*, 39(4): 310-317.
- Challem, J.J., 1997. Beta-carotene and other carotenoids: promises failures, and a new vision. *Journal of Orthomolecular Medicine*, 12(1): 11-19.
- El-Baz, F.K., Abul-Enein, A.M., El-Baroty, G.M., Youssef, A.M. and Abdel-Baky, H.H., 2002. Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. *Journal of Biological Science*, 2(4):220-223.
- Garcia, F., Freile-pelegrin, Y. and Robledo, D., 2007. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *BioresourceTechnology*, 98(7): 1359-1365.
- Gibbs, N. and Duffus, C.M., 1976. Natural protoplast *Dunaliella* as a source of protein. *Applide and Environmental Microbioloy*, 31(4): 602-604.
- Gomez, P.I., Barriga, A., Cifuentes, A.S. and Gonzalez, M.A., 2003. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* accumulated (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (ATCC30861) chlorophyta. *Biological Research*, 36(2): 185-192.
- Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M., 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1): 14-35.

سالی‌نا می‌تواند باعث مرگ سلولی در رده سلولی اپی‌تلیوم غده‌ای سرطان شش انسان توسط تغییر در بیان پروتئین‌هایی که تنظیم‌کننده چرخه سلولی هستند شوند، در نتیجه باعث توقف چرخه سلولی گردد. بنابراین با افزایش غلظت عصاره و افزایش زمان معرض‌گذاری، میزان درصد مرگ و میر سلول‌های سرطانی نیز افزایش پیدا می‌کند (Sheu *et al.*, 2008). در تحقیق حاضر نیز مشخص گردید که با افزایش غلظت عصاره و در طی زمان‌های مختلف معرض‌گذاری میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی A431 افزایش می‌یابد. به‌طوری که میزان ۶/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره در طی زمان ۴۸ ساعت می‌تواند باعث ۵۰٪ کشندگی سلول‌های سرطان گردد. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالی‌نا می‌تواند به‌عنوان یک عامل جلوگیری‌کننده در برابر سرطان پوست باشد.

سپاسگزاری

در پایان از مسئولان محترم دانشکده علوم و فنون دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و از گروه ایمنولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی به‌خصوص آقای بابک فرخی که ما را در انجام این طرح تحقیقاتی یاری و مساعدت کردند کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

- امتیازجو، م.، ۱۳۷۹. شناسایی جلبک تک‌سلولی دونالیلا از خلیج فارس و استخراج بتا-کاروتن از این ارگانیزم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

- Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. and Rengasamy, R., 2007a. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on Wistar rats. *Microbiological Research*, 162(2): 177-184.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. and Rengasamy, R., 2007b. PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiological Research*, 162(2): 168-176.
- Raja, R., Hemaiswarya, S. and Rengasamy, R., 2007c. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3): 517-523.
- 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 non-small cell lung cancer. *In vivo*, 22(3): 369-378.
- Shaklar, G. and Schwarts, J., 1988. Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alphanatocopherol, beta-caroten, canthaxanthin and algae extract. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 24(5): 839-850.
- Stryker, W.S., Stampfer, M.J., Stein, E.A., Kaplan, L., Louis, T.A., Sober, A. and Wellett, W.C., 1990. Diet, plasma levels of beta-carotene and alphanatocopherol, and risk of malignant melanoma. *American Journal of Epidemiology*, 131(4): 597-611.
- Wald, N.J., Thompson, S.G., Densem, J.W., Boreham, J. and Bailey, A., 1988. Serum beta-carotene and subsequent risk of cancer: results from the BUPA study. *British Journal of Cancer*, 57(4): 428-433.
- Knekt, P., Aromaa, A., Maatela, J., Aaran, P.K., Nikkari, T., Hakama, M., Hakulinen, T., Peto, R. and Teppo, L., 1990. Serum vitamin a and subsequent risk of cancer: cancer incidence follow-up of the finnish mobile clinic health examination survey. *American Journal of Epidemiology*, 132(5): 857-870.
- Massyuk, N.P., 1973. Morphology, Taxonomy, Ecology and Geographic Distribution of the Genus *Dunaliella* Teod. and Prospects for its Potential Utilization. *Naukova Dumka, Kiev*, 312p.
- Mateos, R. and García-Mesa, J.A., 2006. Rapid and quantitative extraction method for the determination of chlorophylls and carotenoids in olive oil by high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(7): 1247-1254.
- Mayer, A.M.S. and Gustafson, K.R., 2003. Marine pharmacology in 2000: Antitumor and cytotoxic compounds. *International Journal of Cancer*, 105: 291-299.
- Murthy, K.N.C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M.M., Sowmya, P.R. and Ravishankar, G.A., 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*-a green microalga. *Life Sciences*, 76(12): 1381-1390.
- Poppel, G.V. and Goldbohm, R.A., 1995. Epidemiologic evidence for beta-caroten and cancer prevention. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1393-1402.
- Prakash, P., Manfredi, T.G., Jackson, C.L. and Gerber, L.E., 2001. Beta carotene alters the morphology of NCI-H69 Small cell lung cancer cells. *The Journal of Nutrition*, 132(1): 121-124.

Study effect of anti cancer ethanol extract *Dunaliella salina* isolated from Hoz-Soltan against Squamous cell carcinoma in vitro

Z. Moghadassi¹, M. Emtiazjoo*², M. Rabanie¹, M. Emtiazjoo³, F. Labibie⁴,
E. Azarghashb⁵ and N. Mosaffa⁵

1- MSc. Student, Marine Science and Technology Faculty, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Marine Science and Technology, Islamic Azad University, Tehran, Iran

E-mail: moz_emtiazjoo@yahoo.com

3- Ph.D. Student, Biotechnology Department, USM University, Pinang, Malaysia

4- Immunology Group, Medicine Faculty, Shahid Beheshtie University, Tehran, Iran

5- Medicine Faculty, Shahid Beheshtie University, Tehran, Iran

Received: April 2010

Revised: August 2010

Accepted: August 2010

Abstract

Aquatic plants have been used prevalently in China since 3000 years ago due to having various chemical compounds for diseases prevention and cure. *Dunaliella salina* is one of the micro algae in marine ecosystems containing beta-carotene, retinal, apocarotenoides, ketones, aldehydes and epoxides which enable it to absorb free radicals and produce singlet oxygen. In many studies, the anti-cancer and anti-oxidant effects of these chemical compounds have been confirmed. In this study, squamous cell skin cancer was used. The main goal of this research was to study the killing effects of the ethanol extract from the mentioned alga against *Squamous cell carcinoma* in vitro through using tetrazolium salt under in vitro conditions. *Dunaliella Salina* was collected from Hoz-Soltan Salt Lake located in the northeast of Qom. Algae were cultured on Johnson Medium. Algae mass were purified with PBS and then freeze dried. A431 cell line obtained from Pasteur Institution was cultured in RPMI medium containing FBS 10%. Cells were incubated with 5% CO₂ in presence of different concentrations 0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml of extracts in time periods of 6, 24, and 48 hours. Results of the statistical analysis showed that there was a significant difference among various extract concentrations on death cells in 24 h and 48 h incubation ($P < 0.05$). LC₅₀ of different concentrations of extract against skin carcinoma cell line were evaluated in incubation period of 6, 24, and 48 hours. LC₅₀ results after 48 hours showed value of 46.6 µg/ml. The ethanol extract of *Dunaliella* algae was analyzed by HPLC in order to evaluate the available beta carotene in algae. Our results confirm the killing effect of ethanol extract of *Dunaliella* against line Squamous cell carcinoma. With increasing extract concentration and incubation time, death of cells on the skin cancer cell line increased. Therefore, *Dunaliella* can be considered as a strong chemopreventive agent and anti cancer against this cell line.

Key words: *Dunaliella salina*, LC₅₀, HPLC, A431.