

بررسی اثر عصاره اتیل استاتی قلم دریایی گونه *Virgularia gustaviana* بر روی زنده ماندن سلولهای سرطانی

شراره شریفی (MSc)^۱، پرگل قوام مصطفوی (PhD)^۲، علی ماشینچیان مرادی (PhD)^۳، محمدهادی گیویان راد (PhD)^۴، رقیه تاراسی (PhD)^۴،
مریم ذوالقدر (MD)^۴، حسن نیک نژاد (PhD)^{۴*}

- ۱- دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران
- ۲- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران
- ۳- گروه شیمی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران
- ۴- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

دریافت: ۹۵/۳/۱۰، اصلاح: ۹۵/۵/۶، پذیرش: ۹۵/۹/۶

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به گسترش سرطان و مقاوم شدن سلول های سرطانی به دارو های شیمیایی و اثرات جانبی آنها، تحقیق جهت یافتن ترکیبات جدید طبیعی دارای اهمیت است. قلم های دریایی با ترکیبات شیمیایی خاص با اثرات ضد سرطانی در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. در این مطالعه استخراج ترکیبات شیمیایی طبیعی قلم های دریایی گونه *Virgularia gustaviana* و تاثیر این ترکیبات روی سلولهای سرطانی بررسی شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی عصاره اتیل استاتی گونه *Virgularia gustaviana* با استفاده از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل جداسازی گردید و شستشوی ستون با حلال های آن هگزان ۱۰۰ درصد و آن-هگزان: اتیل استات به نسبت های ۹:۱ تا ۱:۹ انجام گردید. برای شناسایی کیفی هفت فراکشن جدا شده از ستون (A-G) از روش TLC و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC استفاده شد. میزان زنده بودن سلولهای سرطانی HeLa با استفاده از غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از فراکشن ها به روش MTT بررسی شد.

یافته ها: آزمون MTT نشان داد که فراکشن G به صورت وابسته به دوز باعث کاهش زنده ماندن سلول ها شد و بیشترین پاسخ مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرولیتر است ($6/33 \pm 2/02$ درصد سلول زنده) که نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری ($p < 0/05$) دارد. فراکشن G بر اساس بررسی HPLC دارای زمان ماندگاری مشابه با سمبران دیترین جدا شده از *Sarcophyton* می باشد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که ترکیبات استخراج شده از *Virgularia gustaviana* اثر کاهشی بر رشد سلول های سرطانی دارند که برای بررسی مکانیسم اثرگذاری نیاز به مطالعه بیشتر می باشد.

واژه های کلیدی: سلولهای سرطانی ها، *Virgularia gustaviana*، قلم دریا، اتیل استات، ضد سرطان، سمبران دیترین.

مقدمه

همین دلیل تلاش های زیادی را جهت شناسایی ترکیبات جدید طبیعی و یا سنتزی با خواص ضد سرطانی به کار گرفته اند (۴و۵). از میان تمامی اشکال زنده، جانوران دریایی دارای بیشترین تعداد مولکول های جدید کشف شده در ۲۰ سال گذشته هستند و بسیاری از آنها علیه پاتوژن های انسانی و بیماریزا از نظر زیستی موثر می باشند و از بین تمامی گونه های دریایی، بی مهرگان دریایی کفزی دارای بیشترین فعالیت زیستی علیه عوامل بیماری سرطان هستند. بنابراین شناخت پتانسیل های شیمیایی و کشف ترکیبات طبیعی جدید که عوارض جانبی موجود در داروهای رایج مورد استفاده در شیمی درمانی را نداشته باشند و دارای

سرطان بیماری است که در اثر افزایش فعالیت پروتئوکوزن ها و یا مهار ژنهای دخیل در آپوپتوز ایجاد میشود که نتیجه آن تکثیر و رشد بدون کنترل سلول ها میباشد (۱). سلول های سرطانی تومور را ایجاد می کنند که در بعضی موارد قابلیت تهاجم و متاستاز به سایر نقاط بدن دارند. اکثر انواع تومورها با کمک جراحی، شیمی درمانی و یا پروتو درمانی قابل درمان هستند. اما بیشتر سرطان های متاستاتیک مثل سرطان سینه و مثانه با شیمی درمانی و سایر روش ها قابل درمان نیستند (۲و۳). بزرگترین مانع در راه درمان این نوع سرطان ها این است که بهطور ذاتی به شیمی درمانی مقاوم هستند و یا در طول درمان به دارو مقاوم می شوند. به

این مقاله حاصل پایان نامه شراره شریفی دانشجوی دکتری بیولوژی دریا واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۹۳۹۳۷ مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر حسن نیک نژاد

آدرس: تهران، ولنجک، بلوار دانشجو، خیابان کودکیار، دانشکده پزشکی، طبقه پنجم، گروه فارماکولوژی. تلفن: ۲۲۴۳۹۶۹۶ - ۰۲۱

E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: در این مطالعه تجربی قلم های دریایی با گشت زنی در ساحل منطقه بین جذر و مدی در ساحل خور سورا جمع آوری شد و به صورت فریز شده و در دمای زیر صفر درجه همراه با یخ در ظرفی قرار گرفت و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شد و در دمای 20°C - تا زمان شروع آزمایشات نگهداری گردید.

استخراج و جداسازی: نمونه ها با وزن تر حدود 500 گرم خرد شده و به روش انجماد خشک آبیگری شدند. وزن خشک نمونه ها حدود 40 گرم بود که جهت عصاره گیری با اتیل استات برای مدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سانتی گراد روی شیکر قرار داده شد که این روند 3 بار تکرار گردید (۲۰). عصاره استخراج شده توسط کاغذ صافی واتمن نمبر 1 فیلتر و محلول زیر صافی در دکانتور ریخته شد و توسط آب چندین بار استخراج گردید. فاز آلی توسط سدیم سولفات آبیگری و با استفاده از دستگاه روتاری اواپراتور تحت خلاء در دمای 37 درجه سانتیگراد تا حد ممکن تغلیظ شد و عصاره به صورت مایع روغنی حاصل گردید (۲۲ و ۲۱).

ترکیبات مختلف موجود در عصاره حاصل از مراحل قبل ابتدا توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) شناسایی گردید. کروماتوگرافی با لایه نازک نوعی از کروماتوگرافی جذب سطحی است که در این روش از صفحات با ضخامت نازک استفاده می‌شود و موقعیت اجزای جدا شده روی صفحه مشخص می‌گردد. ذرات روی لایه باید تراکم زیادی داشته باشند و همسان و کوچک باشند. فاز ساکن از جنس سیلیکا بود (۲۳). لکه های بدست آمده با استفاده از مقادیر حاصل از فاکتورهای تاخیر (Retention factor) متفاوت برای ترکیبات مختلف جهت جداسازی ترکیبات استفاده شد. در این مطالعه از صفحات سیلیکا F_{60} 254 با فاز متحرک ان-هگزان و اتیل استات با نسبت $1:100$ استفاده گردید. برای جداسازی ترکیبات از عصاره های مورد نظر از ستون کروماتوگرافی و پودر سیلیکا F_{60} 254 با حلال ان هگزان 100% و ان-هگزان و اتیل استات با نسبت های مختلف $9:1$ تا $19:1$ استفاده گردید (۲۴). هفت فراکشن جداسازی شده توسط ستون کروماتوگرافی با حروف A تا G نامگذاری گردید و توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک برای هر فراکشن و محاسبه مقادیر Rf برای تمامی ترکیبات بدست آمده در نهایت 17 ترکیب شناسایی شد. جهت انجام بررسی های بیشتر از روش کروماتوگرافی مایع (HPLC) استفاده شد. فاز متحرک مورد استفاده شامل آب و استونیتریل با نسبت های $30:70$ بود که برای تنظیم PH فاز متحرک برابر با $3/5$ از اسید فسفوریک استفاده گردید. $0/1$ میلی گرم از فراکشن در 100 میکرولیتر اتیل استات حل گردید و سپس با تزریق 20 میکرولیتر از فراکشن به دستگاه HPLC (Cecil CE4200) مجهز به ستون C18(Hichrom) و دتکتور UV با تنظیم در طول موج 220 نانومتر و با عبور فاز متحرک با سرعت $1/5$ میلی لیتر بر دقیقه در 25°C مورد بررسی و شناسایی کیفی قرار گرفتند (۲۵).

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT: MTT نمک زرد رنگ تترازولیم محلول در آب است که توسط سوکسینات دهیدروناز میتوکندری های سلولهای زنده و فعال، احیاء و به ترکیب رنگی فورمازون نامحلول تبدیل میشود که این رنگ با حلال آلی حل شده و شدت رنگ در طول موج 570 نانومتر متناسب با میزان سلولهای زنده می‌باشد (۲۶). برای بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره اتیل استاتی قلم دریایی گونه *Virgularia gustaviana* از لاین

اثرات سمیت سلولی چشمگیری باشد ضروری است و نتایج چنین مطالعاتی میتوانند در پیشبرد تولید دارو های جدید برای سرطان های مقاوم و درمان آن مفید باشد (۶). در سال های اخیر، تعداد زیادی از ترکیبات دریایی کشف شده در داروسازی مورد استفاده محققان قرار گرفته است. بسیاری از این ترکیبات امروزه به عنوان داروی ضد سرطانی در بازار مورد استفاده قرار می‌گیرد مثل سیتارابین که اولین بار از اسفنج گونه *Cryptotethya crypta* به دست آمده و به عنوان داروی ضد سرطان تایید شده (۷)، یا برخی دیگر مثل Ecteinascidin که ترکیبی است که از تونیکیت گونه *Halichodria okadai* استخراج شده و از نظر تجاری قابل دسترس است (۸). حیات کره زمین میلیون ها سال پیش از دریاها آغاز شد و تکامل زیستی، ارگانیسم های دریایی را با مکانیسم های منحصر بفردی برای بقاء در شرایط متغیر از جمله شوری، دما، فشار و عمق تجهیز کرد. بطور کلی از بین 28 شاخه جانوری فقط 2 شاخه در دریاها زندگی نمی‌کنند و گونه های دریایی تقریباً نیمی از تنوع زیستی را به خود اختصاص داده اند. بنابراین ارگانیسم های دریایی یک منبع بزرگ برای کشف داروهای جدید میباشد که در علوم پزشکی با واژه Bioprospecting شناخته می‌شوند (۹).

موجودات دریایی دارای متابولیت های منحصر بفردی هستند و قابلیت فیزیولوژیکی خاصی را در محیط های دریایی از خود نشان میدهند که در مقایسه با موجودات خاکی دارای پتانسیل بالاتری برای تولید مواد فعال زیستی می باشند (۱۰). مرجانهای نرم (Cnidaria, Anthozoa, Octocoralina) یک منبع مهم از ترکیبات شیمیایی با پتانسیل بالای زیستی شناخته میشوند که در این میان ترپنویید ها بیشترین درصد این ترکیبات را به خود اختصاص داده اند (۱۱). مهمترین ترکیب از انواع ترپنویید که تاکنون از این گروه استخراج شده است دیترین ها هستند که خود انواع بسیار متنوعی را شامل میشوند. از نظر اکولوژیکی، ترکیبات زیستی که در غالب متابولیت های ثانویه شناخته میشوند، نقش مهمی را در محیط های آب بازی میکنند (۱۲). ترکیبات قلم دریا *Virgularia gustaviana* دارای خواص ضد سرطانی است (۱۳).

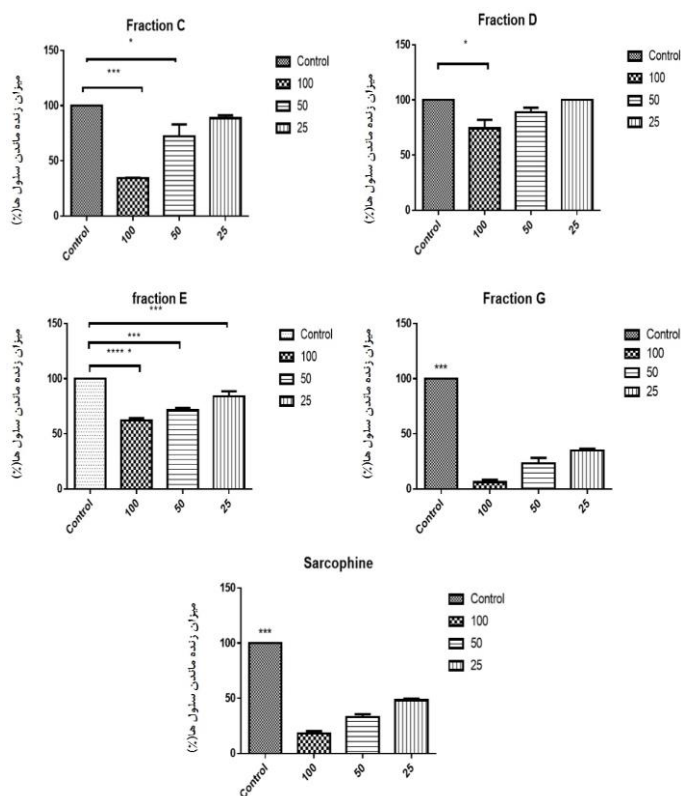
ترکیبات لیپیدی استخراج شده از این گونه دارای اثرات ضد باکتری و ضد التهابی بوده است (۱۴) این موجودات دارای 61 درصد ترین میباشند. اینکه دی ترین های مزبور دارای فعالیت بیولوژیک جدید باشند قابل بحث است (۱۶ و ۱۵). قلم های دریایی گروه منحصر به فردی هستند که از ناحیه بین جذر و مدی تا اعماق 6100 متر یافت میشوند. این گروه به صورت کلنی های منفرد چسبیده به بستر زندگی میکنند. قلم های دریایی معمولاً از لحاظ مورفولوژیکی، ساختار وابسته ای برای دفاع ندارند، بنابراین مشتقات یا ترکیبات این موجودات به عنوان مکانیسم دفاعی در مقابل شکارچیان طبیعی برای موجود عمل میکند (۱۸ و ۱۷). محققان تاکنون ترکیباتی از دیترین ها را از قلم های دریایی استخراج و شناسایی کردند، که این ترکیبات دارای اثرات سیتوتوکسیک هستند (۱۱). در پژوهش های گزارش شده توسط محققان، آنها عصاره های استخراج شده را روی سلولهای سرطانی مختلف از جمله: سرطان سینه، پروستات، خون، روده و.... بررسی کردند و در نتیجه ترکیبات موجود اثرات سمیت سلولی برای سلولهای سرطانی ایجاد کرد (۱۹). هدف از این مطالعه استخراج ترکیبات طبیعی جدید موجود در گونه

Virgularia gustaviana و بررسی اثر این ترکیبات بر روی توان بقاء (Viability) سلولهای سرطانی HeLa با رویکرد دستیابی به داروی جدید و کاربرد آن در بیماری سرطان می‌باشد.

یک از غلظت های عنوان شده اثری قابل ملاحظه ایی در مقایسه با گروه کنترل بر روی زنده ماندن سلول های سرطانی نداشت (نمودار ۱ و جدول ۲).

جدول ۱. نتایج مربوط به محاسبه Rf برای ترکیبات مختلف در هر فراکشن

نام فراکشن	ترکیبات	Rf	مشخصات فراکشن
A	۱	۶/۰	مایع زرد روغنی
B	۲	۳۶/۰	مایع زرد روغنی
C	۳	۷۱/۰	مایه سبز کمرنگ
	۴	۷۸/۰	روغنی
	۵	۳۸/۰	
	۶	۵۷/۰	مایع نارنجی روغنی
D	۷	۷۶/۰	
	۸	۸۳/۰	
	۹	۱۹/۰	
E	۱۰	۲۶/۰	مایع بی رنگ
	۱۱	۶۹/۰	
	۱۲	۱۴/۰	
	۱۳	۲۴/۰	
F	۱۴	۶۱/۰	مایع زرد نارنجی
	۱۵	۷۶/۰	
	۱۶	۵۸/۰	
G	۱۷	۴۰/۰	مایع نارنجی پررنگ



نمودار ۱. تاثیر فراکشنهای حاصل از عصاره اتیل استاتی قلم دریایی گونه *Virgularia*

gustaviana و ترکیب سارکوفین روی سلولهای سرطانی HeLa

سرطانی HeLa استفاده شد. سلولهای سرطانی به مدت ۲۴ ساعت در پلیت ۲۴ خانه در محیط کشت RPMI (chemicon) حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد پنسیلین-استرپتومایسین در دمای ۳۷°C و تحت ۹۵ درصد هوا و ۵ درصد دی اکسیدکربن نگهداری شدند و عصاره های مربوطه با دوزهای ۲۵ میکرولیتر و ۵۰ میکرولیتر و ۱۰۰ میکرولیتر در RPMI و DMSO به میزان ۰/۳ درصد RPMI حل شده و میزان ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنسیلین-استرپتومایسین نیز به آنها اضافه شد و بعد از برداشتن محیط کشت رویی سلولهای سرطانی، محیط کشت حاوی عصاره ها به سلولهای سرطانی اضافه شدند (۲۷ و ۲۸). آزمایش برای هر غلظت ۳ بار تکرار شد و گروه کنترل حاوی محیط کشت با میزان ۰/۳ درصد DMSO در نظر گرفته شد.

تمامی پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و تحت ۹۵ درصد هوا و ۵ درصد دی اکسیدکربن نگهداری شدند (۲۹). پس از ۲۴ ساعت میزان زنده ماندن سلولهای سرطانی بوسیله آزمون MTT بررسی گردید (۳۰). محلول MTT به میزان ۵ میلی گرم در یک میلی لیتر آب مقطر فیلتر و استریل شد و از این میزان ۴۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس کریستالهای فورمازان با اضافه کردن ۹۰۰ میکرو لیتر DMSO (Sigma Aldrich) در هر چاهک حل شد. بیشترین جذب فورمازان در طول موج ۵۷۰ نانومتر است. با استفاده از اسپکتوفتومتر (Uk,Cecil,۷۵۰۰CE) میزان جذب و در نتیجه میزان زنده ماندن سلولهای سرطانی بدست آمد (۲۶).

آنالیز آماری: نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و پسا آزمون Tukey's تجزیه و تحلیل شدند و $p < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد. جهت انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار graphpad prism ویرایش ۵/۰۴ استفاده شد.

یافته ها

عصاره قلم دریایی *Virgularia vianagusta* توسط ستون کروماتوگرافی لایه نازک TLC مورد بررسی قرار گرفت و باند های حاصل بر روی کاغذ TLC در زیر لامپ UV قابل مشاهده هستند که Rf مربوط به هر ترکیب محاسبه گردید. نتایج مربوط به Rf برای ترکیبات مختلف در هر فراکشن در جدول ۱ نشان داده شده است.

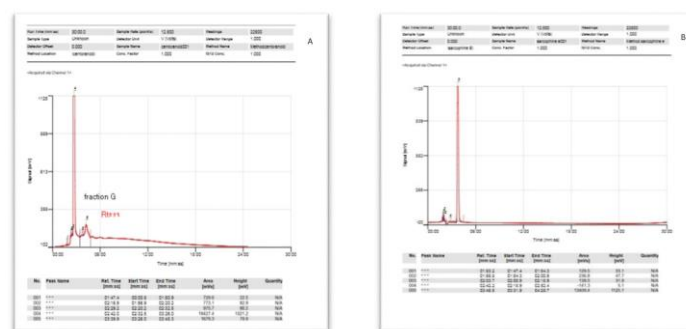
اثر سمیت سلولی فراکشن های A, B, C, D, E, F, G بدست آمده از عصاره قلم دریایی گونه *gustaviana Virgularia* جمع آوری شده از سواحل بین جدر و مدی با غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر بر روی سلول های سرطانی HeLa بررسی شد. نتایج حاصل از تیمار سلول های سرطانی HeLa با فراکشن های A, C, D, F نشان داد که درصد زنده ماندن سلول های سرطانی پس از تیمار با این فراکشن های نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان دادند ولی وابسته به دوز نبودند. میزان زنده ماندن سلول های سرطانی پس از تیمار با فراکشن G نسبت به گروه کنترل نشان می دهد که با افزایش غلظت، درصد زنده ماندن سلول های سرطانی کاهش می یابد، بطوری که کمترین بقاء سلولی در غلظت ۱۰۰ میکرو لیتر مشاهده شد همچنین فراکشن G در دوز های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مقایسه با فراکشن های دیگر کاهش معنی داری بر زنده ماندن سلولهای سرطانی داشته داشته که کاملاً وابسته به دوز بود. فراکشن A, B, F در هیچ

جدول ۲. اثر فراکشن های جدا شده از عصاره قلم دریایی *Virgularia gustavina*

و اثر آن روی سلول های سرطانی HeLa. نتایج بصورت درصد بیان شده است

غلظت	۱۰۰	۵۰	۲۵
فراکشن ها	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM
C	۳۴/۳۳±۰/۳۳	۷۲/۳۳±۱۰/۶۸	۸۶/۶۷±۲/۰۶
D	۷۴/۳۳±۷/۶۸	۸۹±۴/۱۶	۱۰۰±۰۰
E	۶۲/۳۳±۰/۰۲	۷۷/۳۳±۱۲/۲۰	۸۴±۲/۶۴
G	۶/۳۳±۰/۰۲	۲۳/۳۳±۴/۹۷	۳۵±۱/۵۲
Sarcophine	۱/۲۰±۱۸/۳۳	۱/۵۳±۳۳	۴۸±۰/۸۸

از آنجاییکه یکی از ترکیبات مهم جدا شده از مرجان های نرم که دارای اثرات ضد سرطانی می باشد سارکوفین است که یک سمبران دیتیرین با وزن مولکولی ۳۱۶ میباشد، بنابراین با توجه به این که هر دو گونه متعلق به گروه مرجان های نرم میباشد و احتمال وجود ترکیبات مشابه در هر دو گونه وجود دارد ترکیبات جدا شده از قلم دریایی *Virgularia gustavina* با سارکوفین مقایسه گردید. با توجه به نتایج حاصل از بررسی کروماتوگرافی لایه نازک مشخص شد، هفت فراکشن بدست آمده دارای ۱۷ ترکیب میباشد. از آنجاییکه فراکشن G دارای لکه ایی با Rf مشابه به Sarcophine است، جهت بررسی و شناسایی کیفی ترکیبات از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. آنالیز فراکشن G نشان داد که پیک بدست آمده مشابه با پیک حاصل از ماده سارکوفین میباشد که با توجه به مقایسه زمان ماندگاری (Retention time) و تست های سمیت سلولی فراکشن G و مقایسه این فراکشن با ترکیب Sarcophine استخراج شده از یک گونه مرجان نرم، احتمال این که فراکشن G دارای ترکیب سمبران دیتیرین باشد بالاست که مطالعات تکمیلی را طلب مینماید (نمودار ۲).



نمودار ۲. A: کروماتوگرام حاصل از تزریق فراکشن G به روش HPLC با زمان ماندگاری ۳:۳۹. B: کروماتوگرام حاصل از تزریق سارکوفین به روش HPLC

بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان داد که از مجموع هفت فراکشن جدا شده بعضی از فراکشن ها میزان زنده ماندن سلول ها را به شدت کاهش می دهند. یکی از نکات حایز اهمیت در مورد نتایج این مطالعه نوع ترکیبات موجود در قلم دریایی *Virgularia gustavina* می باشد که عامل اصلی اثر ضد سرطانی است. فراکشن G که یک ترکیب نارنجی رنگ و روغنی شکل بود نسبت به دیگر فراکشن ها دارای اثر گذاری بیشتری بود و در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر میزان زنده ماندن سلول های

سرطانی تیمار شده با این ترکیب به حدود سه درصد رسید و این اثر گذاری کاملاً وابسته به دوز بود. میتوان با پی بردن به ترکیبات مؤثره این فراکشن و تخلیص این ترکیبات اثر ممانعت کنندگی بیشتری بر روی سلول های سرطانی به جای گذاشت. ترکیبات دیتیرین زیادی از گونه های مختلف قلم های دریایی استخراج گردیده است. در این راستا یک نوع سمبران دیتیرین از عصاره ۲-پروپانولی از گونه ایی قلم دریایی *Gyrophyllum sibogae* استخراج شده است که دارای اثرات بالا ضد سرطانی روی لاین های سرطانی مختلف بوده است (۱۹). یک ترکیب دیگر از ترپنویید ها A Junceol است که یک نوع سزکویی ترپن میباشد. این ترکیب از قلم دریایی گونه *Virgularia juncea* استخراج شده و اثر این ترکیب روی میزان زنده ماندن سلول های سرطانی P-۳۸۸ بررسی شد و نشان داد که Junceol به طور قابل ملاحظه ایی میزان زنده ماندن این سلول ها را کاهش داده است (۳۱).

این گونه یکی از گونه های نزدیک به گونه مورد مطالعه میباشد. همچنین ترکیب Klysimplixin B and H که جزء دیتیرنویدها است از گونه Plexim klyxum از خانواده Alcyonidea استخراج شده و سمیت برای سلول های سرطانی داشته است (۳۲). فراکشن های استخراج شده در این مطالعه ممکن است دارای ترکیبات ترپنی ذکر شده بالا باشند ولی اینکه ترکیب استخراج شده از این گونه قلم دریایی یک نوع سمبران دیتیرین باشد محتمل است. طبق مطالعات منتشر شده ماده ای به نام Sarcophine از گونه ایی خاص از مرجان نرم *Sarcophyton glaucum* با اثرگذاری قوی سمیت سلولی با روش کروماتوگرافی مایع جداسازی شده است (۳۳ و ۳۴). این ماده با مکانیسم القا آپوپتوز میزان زنده ماندن سلول های سرطانی انسانی را کاهش می دهد (۳۵). همانطور که نتایج نشان داد فراکشن G در هر سه دوز اثرات قوی تری بر روی سلول های HeLa نسبت به ترکیب ضد سرطان Sarcophine داشته و از نظر وابسته به دوز بودن هر دو مشابهت داشتند. با توجه به این که میزان زمان ماندگاری ترکیب موجود در فراکشن G که از طریق HPLC مورد بررسی قرار گرفت برابر با زمان ماندگاری Sarcophine میباشد احتمال وجود این ماده در فراکشن G بالا است که مطالعات بیشتر با NMR ضروری به نظر میرسد. این مطالعه نشان داد که ترکیب استخراج شده از قلم دریایی گونه *Virgularia gustavina* جمع آوری شده از منطقه بین جذر و مدی سواحل بندر عباس دارای اثرات قابل ملاحظه ایی روی سلول های سرطانی HeLa بوده و فراکشنی که به طور معنی داری میزان زنده بودن سلول های سرطانی HeLa را کاهش داد و توان ممانعت از تکثیر سلول های سرطانی در محیط Vitro را دارند؛ فراکشن G بوده که با توجه به مطالعات کروماتوگرافی با کارایی بالا احتمال وجود سمبران دیتیرنهایی مانند سارکوفین را در این فراکشن مطرح می سازد. با توجه به این نتایج، مطالعات مربوط به استخراج و شناسایی بیشتر و بررسی مکانیسم اثرگذاری این ترکیبات بر روی لاین های مختلف سرطانی در آینده ضروری به نظر میرسد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای محمدرضا هاشمی و تمامی پرسنل و دانشجویان مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت همکاری در این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

Effect of Ethyl Acetate Extract of Sea Pen *Virgularia Gustaviana* on Viability of Cancer Cells

Sh. Sharifi (MSc)¹, P. Ghavam Mostafavi (PhD)², A. Mashinchian (PhD)³, M.H. Givianirad (PhD)³,
R. Tarasi (PhD)⁴, M. Zolghadr (MD)⁴, H. Niknejad (PhD)^{*4}

1. Faculty of Marine Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran

2. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran

3. Department of Marine Chemistry, Faculty of Marine Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Teheran, I.R.Iran

4. Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(12); Dec 2016; PP: 19-25

Received: May 30th 2016, Revised: Jul 27th 2016, Accepted: Nov 26th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Due to high cancer incidence rate and become resistant to chemical drugs and their side effects make it necessary to research on new natural compounds. Sea pen with special chemical compounds with anti-cancer effects have been considered in recent years. In this study, extraction of chemical compounds from marine sea pen *Virgularia gustaviana* and their effect on cancer cells were investigated.

METHODS: In this study the ethyl acetate extract of *Virgularia gustaviana* was separated by silica gel column chromatography. The column was washed with N-hexane 100% and N-hexane-ethyl acetate solvent at ratio of 9:1 to 1:9. Thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) was used for qualitative identification of seven fractions. Viability of HeLa cancer cells was investigated using MTT assay at the concentration of 25, 50 and a 100 µl/ml compounds.

FINDINGS: MTT assay showed that G fraction, dose-dependently decreased cell viability of cells and the most effective concentration was 100 µl (with viability 6.33±2.02% of cancer cells) which was significantly less than control group (p<0.05). Retention time of G fraction in HPLC graph was similar to Cembrane Diterpene isolated from Sarcophyton.

CONCLUSION: The results of the study showed that compounds extracted from *Virgularia gustaviana* inhibit the growth of cancer cells and further research will be required to examine the mechanism of effect.

KEY WORDS: *Hela cancer cells, Virgularia gustaviana, Sea pen, Ethyl acetate, Anti-cancer, Cembrane Diterpene.*

Please cite this article as follows:

Sharifi Sh, Ghavam Mostafavi P, Mashinchian A, Givianirad MH, Tarasi R, Zolghadr M, Niknejad H. Effect of Ethyl Acetate Extract of Sea Pen *Virgularia Gustaviana* on Viability of Cancer Cells. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(12):19-25.

*Corresponding author: H. Niknejad (PhD)

Address: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Koodakyar St, Deneshjoo Blvd., Velenjak, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 22439969

E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

References

1. Niknejad H, Yazdanpanah G, Ahmadiani A. Induction of apoptosis, stimulation of cell-cycle arrest and inhibition of angiogenesis make human amnion-derived cells promising sources for cell therapy of cancer. *Cell and tissue research*. 2016;363(3):599-608.
2. Lewandowska M, Hybiak J, Domagala W. Concordance of KRAS mutation status between luminal and peripheral regions of primary colorectal cancer. A laser-capture microdissection-based study. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*. 2016;67(1):13-8.
3. Niknejad H, Deihim T, Peirovi H, Abolghasemi H. Serum-free cryopreservation of human amniotic epithelial cells before and after isolation from their natural scaffold. *Cryobiology*. 2013; 67 (1), 56-63.
4. Li R. Marinopyrroles: Unique Drug Discoveries Based on Marine Natural Products. *Medicinal research reviews*. 2016;36(1):169-89.
5. Niknejad H, Asi Tehrani F, Peirovi H, Abolghasemi H. The Sources of Microbial Contamination of Stem Cells for Application in Cell Therapy. *Journal of Babol University Of Medical Sciences*. 2014;16(3):95-105.
6. Kim KH, Chae JI, Oh H, Cho JH, Lee RH, Yoon G, et al. Manumycin A induces apoptosis in malignant pleural mesothelioma through regulation of Sp1 and activation of the mitochondria-related apoptotic pathway. *Oncology reports*. 2016.
7. Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J Pharm Bioallied Sci*. 2016;8(2):83-91.
8. Peraldo-Neia C, Cavalloni G, Soster M, Gammaitoni L, Marchio S, Sassi F, et al. Anti-cancer effect and gene modulation of ET-743 in human biliary tract carcinoma preclinical models. *BMC Cancer*. 2014;14:918.
9. Indraningrat AA, Smidt H, Sipkema D. Bioprospecting sponge-associated Microbes for antimicrobial compounds. *Marine drugs*. 2016;14(5):87.
10. Lin WY, Chen BW, Huang CY, Wen ZH, Sung PJ, Su JH, et al. Bioactive cembranoids, sarcocrassocolides P-R, from the dongsha atoll soft coral sarcophyton crassocaule. *Marine drugs*. 2014;12(2):840-50.
11. Rocha J, Peixe L, Gomes NC, Calado R. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds--an overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Mar drug*. 2011;9(10):1860-86.
12. Tanaka C, Yamamoto Y, Otsuka M, Tanaka J, Ichiba T, Marriott G, et al. Briarane diterpenes from two species of octocorals, *Ellisella* sp. and *Pteroeides* sp. *J nat pro*. 2004;67(8):1368-73.
13. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*. 2003;8(12):536-44.
14. Sharifi S, Safaeian S. Anti-inflammatory effect of lipid extract of sea pen (*Virgularia Gustaviana*) in mice. *Asian J Pharm Clin Res*. 2015;8(2):332-4.
15. Niknejad H, Yazdanpanah G, Kakavand M. Extract of fetal membrane would inhibit thrombosis and hemolysis. *Med Hypoth*. 2015;85(2):197-202.
16. Zhang C, Li J, Su J, Liang Y, Yang X, Zheng K, et al. Cytotoxic diterpenoids from the soft coral *Sarcophyton crassocaule*. *J Nat Prod*. 2006;69(10):1476-80.
17. Nunez-Pons L, Carbone M, Vazquez J, Gavagnin M, Avila C. Lipophilic defenses from alcyonium soft corals of antarctica. *J Chem Ecol*. 2013;39(5):675-85.
18. Yang B, Liu J, Wang J, Liao S, Liu Y. Cytotoxic Cembrane Diterpenoids. In: Kim SK, editor. *Handbook of anticancer drugs from marine origin*. Cham: Springer International Pub. 2015. p. 649-72.
19. Reyes F, Arda A, Martin R, Fernandez R, Rueda A, Montalvo D, et al. New cytotoxic cembranes from the sea pen *Gyrophyllum sibogae*. *J Nat Product*. 2004;67(7):1190-2.

20. Wang SK, Hsieh MK, Duh CY. New diterpenoids from soft coral *Sarcophyton ehrenbergi*. *Mar Drugs*. 2013;11(11):4318-27.
21. Zhang CX, Yan SJ, Zhang GW, Lu WG, Su JY, Zeng LM, et al. Cytotoxic diterpenoids from the soft coral *sinularia microclavata*. *J Nat Product*. 2005;68(7):1087-9.
22. Zhang J, Liu LL, Zhong BL, Liao XJ, Xu SH. 9,11-Secosteroids with cytotoxic activity from the South China Sea gorgonian coral *Subergorgia suberosa*. *Steroids*. 2015;98:100-6.
23. Huang HC, Chao CH, Kuo YH, Sheu JH. Crassocolides G-M, cembranoids from the Formosan soft coral *Sarcophyton crassocaule*. *Chem Biodivers*. 2009;6(8):1232-42.
24. Hu LC, Su JH, Chiang MY, Lu MC, Hwang TL, Chen YH, et al. Flexibilins A-C, new cembrane-type diterpenoids from the formosan soft coral, *sinularia flexibilis*. *Mar Drugs*. 2013;11(6):1999-2012.
25. Bilasy Sel S, Khalifa SI, Saleh SM, Abou El-Ela SH. HPLC method for the quantitative determination of sarcophine, a source of cembranoids with cancer chemopreventive activity. *J Pharma Biomed Anal*. 2008;46(4):784-7.
26. Niknejad H, Yazdanpanah G. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. *Med Hypoth*. 2014;82(4):488-9.
27. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy*. 2014;16(1):33-40.
28. Shirzad, H, Taji F, Raisi S, Pourgheysari B, Rafieian-Kopaei M. Comparison of antitumour activities of heated and raw garlic extracts on fibrosarcoma in mice. *J Babol Univ Med Sci*. 2012;14(6):77-83.[In Persian].
29. Mahdinejadani K, Shirzad H, Fakhari S, Jalili A. An evaluation the effect of glycyrrhetic and glycyrrhizic acids derived from licorice extract on gastric cancer cell lines. *J Babol Univ Med Sci*. 2015;17(9):52-8.[In Persian].
30. Niknejad H, Yazdanpanah G, Mirmasoumi M, Abolghasemi H, Peirovi H, Ahmadiani A. Inhibition of HSP90 could be possible mechanism for anti-cancer property of amniotic membrane. *Med Hypotheses*. 2013;81(5):862-5.
31. Chen SP, Sung PJ, Duh CY, Dai CF, Sheu JH. Junceol A, a new sesquiterpenoid from the sea pen *Virgularia juncea*. *J Natural Product*. 2001;64(9):1241-2.
32. Chen BW, Chao CH, Su JH, Tsai CW, Wang WH, Wen ZH, et al. Klysimplexins I-T, eunicellin-based diterpenoids from the cultured soft coral *Klyxum simplex*. *Org Biomol Chem*. 2011;9(3):834-44.
33. Hegazy ME, El-Beih AA, Moustafa AY, Hamdy AA, Alhammady MA, Selim RM, et al. Cytotoxic cembranoids from the Red Sea soft coral *Sarcophyton glaucum*. *Nat Pro Com*. 2011;6(12):1809-12.
34. Szymanski PT, Ahmed SA, Radwan MM, Khalifa SI, Fahmy H. Evaluation of the anti-melanoma activities of sarcophine, (+)-7 α ,8 β -dihydroxydeopoxysarcophine and sarcophytolide from the Red Sea soft coral *Sarcophyton glaucum*. *Nat Product Communicat*. 2014;9(2):151-4.
35. Al-Lihaibi SS, Alarif WM, Abdel-Lateff A, Ayyad SE, Abdel-Naim AB, El-Senduny FF, et al. Three new cembranoid-type diterpenes from Red Sea soft coral *Sarcophyton glaucum*: isolation and antiproliferative activity against HepG2 cells. *Eur J Med Chem*. 2014;81:314-22.