



اثرات سیتوتوکسیک ترکیب لانوسترول استخراج شده از خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* از جزیره هنگام، خلیج فارس

ملیکا ناظمی^{۱*}، هادی غفاری^۲، محمد صدیق مرتضوی^۳، محمدعلی احمدی طباطبائی^۴،
محمد رضا آقاصادقی^۵

تاریخ پذیرش: فروردین ۹۶

تاریخ دریافت: دی ۹۵

چکیده

در این مطالعه، به بررسی خواص سیتوتوکسیک ترکیب لانوسترول از تری ترپنوئید، با توجه به فراوانی گونه *Holothuria leucospilota* در خلیج فارس و تولید ترکیبات ترپنوئیدی با خواص سیتوتوکسیک توسط آن‌ها پرداخته شده است. به این ترتیب که نمونه‌های پودر خشک خیار دریایی با استفاده از استون عصاره‌گیری شدند. سپس به منظور جداسازی ترکیب لانوسترول عصاره توسط ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل با حلال‌های آن‌هگزان و اتیل استات شست و شو داده شد. غلظت کشندگی این ترکیب نیز توسط آزمون XTT روی رده سلول سرطانی اپیتلیوم دهانی (KB/C152) و سلول‌های سالم جنینی کلیه انسان (Hek293) مورد سنجش قرار گرفت. ترکیب لانوسترول توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی با درجه خلوص ۹۶ درصد در جزء شماره ۴۹ (اتیل استات ۱۰۰:۰ آن‌هگزان) شناسایی شد. میزان پنجاه درصد کشندگی ترکیب لانوسترول استخراج شده از عضله خیار دریایی نسبت به رده سلولی سرطانی اپیتلیوم دهانی برابر با ۶/۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد، اما این ترکیب هیچ اثر کشندگی روی سلول‌های جنینی کلیه انسان، به عنوان سلول سالم، از خود نشان نداد. مطالعه انجام شده نشان می‌دهد ترکیب لانوسترول استخراج شده از عضله خیار دریایی گونه *H. leucospilota* دارای اثرات سیتوتوکسیک بسیار قوی است.

واژگان کلیدی: خیار دریایی، متابولیت ثانویه، ترپنوئید، خلیج فارس.

- ۱- استادیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
- ۲- استادیار پژوهشی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
- ۳- دانشیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
- ۴- دکتری شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
- ۵- دانشیار گروه هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: melikanazemi@yahoo.com

مقدمه

در پنج دهه اخیر توجه زیست‌شناسان و شیمیدان‌ها به ترکیبات طبیعی با منابع دریایی معطوف شده است. تا کنون نزدیک به ۱۶۰۰۰ ترکیب از منابع دریایی استخراج شده است که در بیش از ۶۸۰۰ گزارش علمی منتشر شده است (Datta et al., 2015). اقیانوس منبع اصلی تولید ترکیبات طبیعی و یا متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی است. اقیانوس‌ها بیش از ۷۰ درصد سطح کره زمین را فرا گرفته‌اند و از ۳۶ شاخه زیستی شناسایی شده، ۳۴ شاخه با بیش از ۳۰۰،۰۰۰ گونه گیاهی و جانوری در محیط‌های دریایی شناسایی شده است (Sima and Vetvicka, 2011).

خارپوستان یکی از شاخه‌های مهم جانوران بی‌مهره محسوب می‌شوند و در بردارنده ۷۰۰۰ گونه زنده هستند (Pawson, 2007). خیارهای دریایی متعلق به شاخه خارپوستان هستند که در تمام دریاها، اقیانوس‌ها و در تمام عرض‌های جغرافیایی، از مناطق ساحلی تا دشت‌های مگاک (Abyssal Plain) یافت می‌شوند. گونه *Holothuria leucospilota* متعلق به خیارهای دریایی، بدنی طویل و کشیده دارد که در انتهای خلفی کمی پهن‌تر شده است و رنگ آن به طور کامل سیاه رنگ است. این گونه از

خیار دریایی ساکن آب‌های ساحلی تا عمیق است که در بسترهای علفی، شن و ماسه‌ای، گلی و صخره‌های مرجانی یافت می‌شوند. گونه *H. leucospilota* در تمامی آب‌های گرم و معتدله پراکنش دارد (Purcell et al., 2012). خیارهای دریایی به ویژه در کشورهای آسیای شرقی کاربرد غذایی و دارویی دارند (Conand and Muthiga, 2007). ترکیبات و عصاره‌های استخراج شده از گونه‌های خیار دریایی دارای اثرات زیستی مانند ضد رگ‌زایی، ضد سرطان، ضد انعقاد، ضد فشار خون بالا، ضد التهاب، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد لخته شدن، ضد تومور و بهبود دهنده زخم است. بیشتر این خواص متعلق به ترکیبات تریپتوفیدی، سولفات کندرویتین، گلیکوز آمینوگلیکان، پلی‌ساکارید سولفات، استرول (گلیکوزیدی و سولفات)، فنول و پیتیدولکتین هستند (Bordbar et al., 2011).

آمار نشان می‌دهد که سرطان عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته است (Jemal et al., 2011)، در سال‌های اخیر دانشمندان برای درمان این بیماری تلاش‌های بسیاری انجام داده‌اند. بررسی‌های شیمیایی و زیست‌شناختی نشان می‌دهد که خیارهای

لحاظ دارویی بسیار ارزشمند است و دارای خواص زیستی، ضدباکتری، ضدقارچ و ضدسرطان است (Sottorff et al., 2013). از این ترکیب به عنوان قطره چشم برای آب مروارید نیز استفاده می‌شود و قیمت پودر لانوسترول با درجه خلوص ۹۸ درصد نزدیک به ۸۷۶ دلار برای هر یک کیلوگرم برآورد شده است (Acimovic and Rozman, 2013). با توجه به خواص سیتوتوکسیک خیار دریایی و وجود ترکیبات ترپنوئیدی در آن‌ها و از طرفی دیگر، فراوانی گونه *H. leucospilota* در آب‌های خلیج فارس در این پژوهش علمی به جداسازی و شناسایی ترکیب لانوسترول و بررسی میزان کشندگی آن بر روی رده سلول سرطانی دهان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خیار دریایی

نمونه‌های خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، به تعداد ۱۵ عدد در مردادماه سال ۱۳۹۴

دریایی منبع غنی از ترکیبات ضدسرطانی هستند (Chludil et al., 2002).

سرطان، یکی از ۵ عامل عمده مرگ و میر در همه جوامع است. در آمریکا، سرطان بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی، دومین علت اصلی مرگ و میر است (Neville et al., 2008). در ایران، سرطان سومین عامل مرگ و میر است و سالانه بیش از ۳۰،۰۰۰ نفر از هموطنان در اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (Aminzadeh et al., 2013).

سرطان دهان در کشور آمریکا و انگلستان در حدود ۳٪ از بدخیمی‌ها را شامل می‌شود و هشتمین سرطان شایع در مردان و پانزدهمین سرطان شایع در زنان به شمار می‌آید (Neville et al., 2008).

این سرطان در افراد سیگاری بالای چهل سال و افراد جوان که از دخانیات و نوشیدنی‌های الکلی استفاده می‌کنند شایع است. به منظور درمان از جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی استفاده می‌شود که متأسفانه به دلیل مقاوم بودن بافت سرطانی امکان بهبود بیمار بسیار کم است (Neville et al., 2008).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد ترکیب لانوسترول^۱ که یک نوع تری‌ترپنوئید است، از



شکل ۱: (الف) محل نمونه برداری که با علامت قرمز مشخص شده است. (ب) نمونه خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*

پس از مدت زمان طی شده، محلول به دست آمده از صافی عبور داده شد و متابولیت‌های ثانویه محلول در استون به دستگاه روتاری (R206D، هیدولف، آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۴۵ تا تبخیر کامل حلال، قرار داده شد. عصاره استونی به وزن ۳/۰۳ گرم از دیواره عضلانی خیار دریایی برای جداسازی لانوسترول به ستون سیلیکاژل با ارتفاع ۷۰ سانتی‌متر و با قطر داخلی ۲ سانتی‌متر منتقل شد. شست و شوی عصاره استونی توسط حلال‌های آن‌هگزان-اتیل استات به عنوان فاز متحرک با نسبت‌های ۱۰:۵۰، ۱۰:۶۰، ۱۰:۷۰، ۱۰:۸۰، ۱۰:۹۰، ۲۰:۸۰، ۳۰:۷۰، ۴۰:۶۰ و ۱۰:۱۰۰ که جزءها در هر ۱۰ میلی‌لیتر جداسازی شدند

توسط غواصی و از عمق ۱۵ تا ۲۰ متر از شمال جزیره هنگام، واقع در خلیج فارس تهیه شدند.

عصاره‌گیری، جداسازی و شناسایی ترکیبات ترپنوئیدی از خیار دریایی

عضله‌های خیار دریایی به اندازه‌های ۱ سانتی‌متر قطعه قطعه شدند، سپس در دستگاه فریز درایر (Alph1-4 LSCplus، درسا تک، ایران) در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توسط آسیاب پودر شد. به پودر تهیه شده که به مقدار ۲۵۰ گرم بود، ۵۰۰ میلی‌لیتر استون افزوده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی به منظور تهیه عصاره قرار گرفتند (Citoglu, 2012 and Acikara).

Chrom Tech, MainFrame (آمریکا) تزریق شد.

(جزء) انجام شد (Citoglu and Acikara, 2012).

بررسی خواص سیتوتوکسیک

سلول‌های سرطانی اپیدرموئید دهان انسان (KB/C152) و سلول‌های سالم جنین کلیه انسان (Hek293) از بخش کشت سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت فلاسک تهیه و به محیط کشت RPMI-1640 منتقل شد. به منظور بررسی اثر سیتوتوکسیک نمونه از روش XTT استفاده شد (Roehm et al., 1991). برای آزمون XTT، سلول‌های اپیدرموئید دهان با تراکم 25×10^3 سلول در هر خانه در هر کدام از پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای کشت سلولی، توزیع شدند و بعد از ۴۸ ساعت که سلول‌ها رشد کردند به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب لانوسترول با غلظت‌های ۲، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد و آزمون سه بار تکرار شد. در این آزمون از ترکیب سیکلوسپورین به عنوان شاهد مثبت و از نمونه فاقد ماده افزودنی به عنوان شاهد منفی استفاده شد و میزان IC (میزان ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی) ۵۰ درصد از سلول‌ها

شناسایی ترکیب لانوسترول

برای شناسایی جزءهای حاوی تریپنوئید، جزءهای تهیه شده از ستون کروماتوگرافی شیشه‌ای روی صفحه‌های کروماتوگرافی لایه نازک^۱ لکه‌گذاری شدند و در تانک حاوی متانول-کلروفرم-ان‌بوتانول با نسب ۷۰:۲۰:۱۰ قرار گرفتند. به منظور شناسایی ترکیب لانوسترول از معرف وانیلین-اسید سولفوریک استفاده شد. تغییر رنگ نمونه‌ها به رنگ بنفش کم‌رنگ تا پررنگ نشانه وجود ترکیبات تریپنوئید است (Attaway et al., 1965). پس از ظهور لکه‌ها، R_f هر یک از آن‌ها از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$R_f = \text{فاصله حلال از مبدا} / \text{فاصله لکه از مبدا}$$

لکه‌هایی که به رنگ بنفش در آمدند و R_f آن‌ها در حدود ۰/۴ بود برای شناسایی ترکیب لانوسترول به دستگاه (Agilent) GC/MS 7000 Series Triple Quad GC/MS

1- Thin Layer Chromatography (TCL)

(IC₅₀) بر اساس درصد کشندگی طبق رابطه ۲ محاسبه شد (Roehm et al., 1991).
 لایه نازک

در جدول ۱ میزان R_f جزءهای مختلف توسط کروماتوگرافی لایه نازک، مشاهده می‌شود. همان طور که از این جدول برداشت می‌شود جزء شماره ۴۹ که حاصل شست و شوی ستون سیلیکاژل با اتیل استات خالص است R_f برابر ۰/۴ را داشت که نزدیک‌ترین میزان به ترکیب لانوسترول بود.

رابطه ۲:

$$\text{درصد کشندگی} = \frac{(\text{OD}_{\text{NC}} - \text{OD}_{\text{S}})}{\text{OD}_{\text{NC}}} \times 100$$

 OD_{NC}: جذب شاهد منفی؛ OD_S: جذب نمونه.

نتایج

جدول ۱: مشخصات لکه‌های ترینوئید جزءهای عصاره استونی عضله خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*

شماره جزء	فاز متحرک ستون (درصد حلال)	رنگ لکه (با معرف وانیلین)	R _f	شماره جزء	فاز متحرک ستون (درصد حلال)	رنگ لکه (با معرف وانیلین)	R _f
۱۸	N۶۰ : E۴۰	بنفش پررنگ	۰/۶۴	۲۵	N۵۰ : E۵۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۴
(۱)۱۹	N۶۰ : E۴۰	بنفش پررنگ	۰/۶۶	۲۶	N۴۰ : E۶۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۴
(۲)۱۹	N۶۰ : E۴۰	بنفش پررنگ	۰/۷۹	۲۷	N۴۰ : E۶۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۴
(۱)۲۰	N۶۰ : E۴۰	بنفش پررنگ	۰/۶۸	۲۸	N۴۰ : E۶۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۴
(۲)۲۰	N۶۰ : E۴۰	بنفش پررنگ	۰/۷۹	۲۹	N۴۰ : E۶۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۴
۲۱	N۵۰ : E۵۰	بنفش پررنگ	۰/۹۳	۳۰	N۴۰ : E۶۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۳
۲۲	N۵۰ : E۵۰	بنفش پررنگ	۰/۹۳	۳۱	N۳۰ : E۷۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۴
۲۳	N۵۰ : E۵۰	بنفش پررنگ	۰/۸۵	۳۲	N۳۰ : E۷۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۶
(۱)۲۴	N۵۰ : E۵۰	بنفش کم رنگ	۰/۸۲	۳۳	N۳۰ : E۷۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۴
(۲)۲۴	N۵۰ : E۵۰	بنفش کم رنگ	۰/۸۷	۳۴	N۳۰ : E۷۰	بنفش کم رنگ	۰/۷۴
۳۵	N۳۰ : E۷۰	بنفش	۰/۷۳	۴۲	N۱۰ : E۹۰	بنفش	۰/۷۱
۳۶	N۲۰ : E۸۰	بنفش	۰/۷۱	۴۳	N۱۰ : E۹۰	بنفش	۰/۷۱
۳۷	N۲۰ : E۸۰	بنفش	۰/۷۱	۴۵	N۱۰ : E۹۰	بنفش پررنگ	۰/۸۵

۰/۱۱	بنفش پررنگ	N۱۰ : E۹۰	۴۶	۰/۷۱	بنفش	N۲۰ : E۸۰	۳۸
۰/۰۷	بنفش پررنگ	N۰ : E۱۰۰	۴۷	۰/۶۹	بنفش	N۲۰ : E۸۰	۳۹
۰/۰۷	بنفش پررنگ	N۰ : E۱۰۰	۴۸	۰/۷۱	بنفش	N۲۰ : E۸۰	۴۰
۰/۴	بنفش پررنگ	N۰ : E۱۰۰	۴۹	۰/۷۱	بنفش	N۱۰ : E۹۰	۴۱

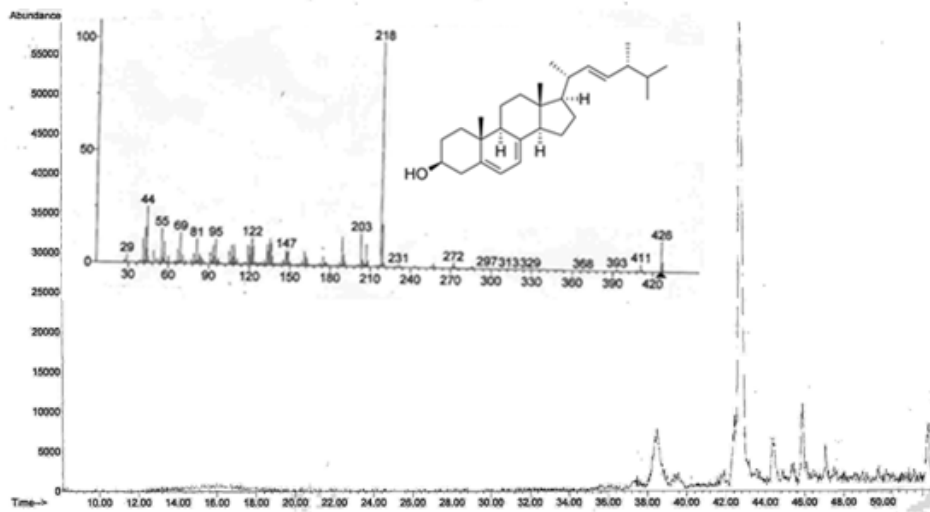
N: حلال ان هگزان؛ E: حلال اتیل استات.

استخراج شده از عضله خیار دریایی را نشان می دهد. شکل های ۳ و ۴ نیز نشان می دهند که میزان پنجاه درصد کشندگی ترکیب لانوسترول استخراج شده از عضله خیار دریایی نسبت به رده سلولی سرطانی اپیتلیوم دهانی (KB/C152) برابر با ۶/۳۶ میکروگرم در میلی لیتر بود. ترکیب لانوسترول در غلظت های مورد بررسی، اثر کشندگی روی رده سلولی سالم جنینی کلیه انسان (Hek293) از خود نشان نداد.

شناسایی ترکیب لانوسترول توسط کروماتوگرافی گازی (GC/MS)

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، ترکیب لانوسترول با فرمول شیمیایی $C_{30}H_{50}O$ ، وزن مولکولی $426/71 \text{ g.mol}^{-1}$ به مقدار ۹۶ درصد در جزء شماره ۴۹ (اتیل استات : ان هگزان ۱۰۰:۰) در دقیقه ۳۸ تا ۴۸ شناسایی شد.

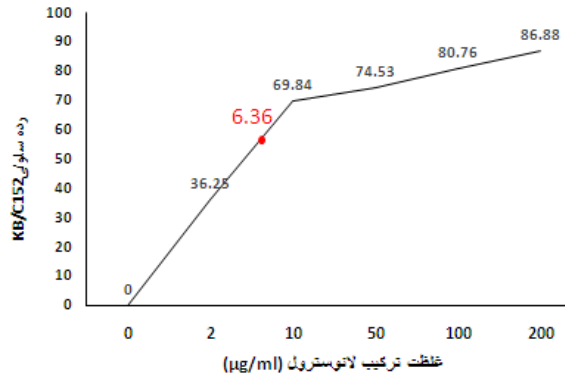
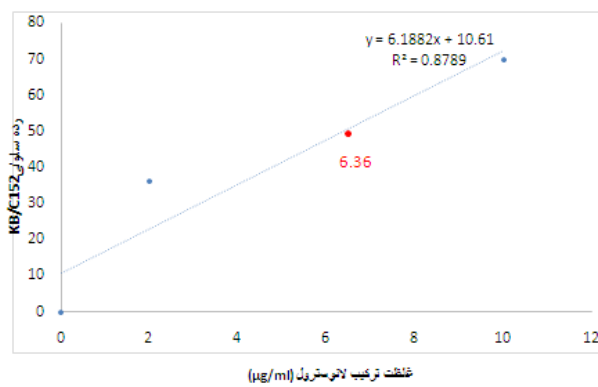
بررسی خواص سیتوتوکسیک ترکیب لانوسترول جدول ۲ درصد کشندگی ترکیب لانوسترول



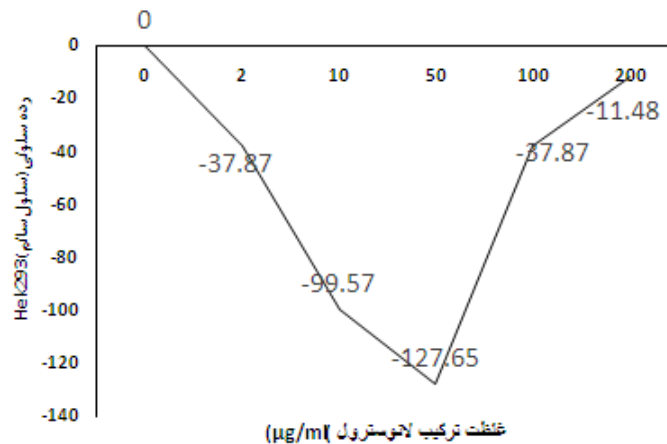
شکل ۲: کروماتوگرافی گازی جزء شماره ۴۹ (اتیل استئات : ان هگزان ۱۰۰۰۰) از عضله خیار دریایی

جدول ۲: درصد کشندگی ترکیب لانوسترول استخراج شده از عضله خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*

غلظت ترکیب لانوسترول (µg/mL)	رده سلولی KB/C152 (درصد کشندگی)	رده سلولی Hek293 (سلول سالم) (درصد کشندگی)
۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۲	۳۶/۲۵	-۳۷/۸۷
۱۰	۶۹/۸۴	-۹۹/۵۷
۵۰	۷۴/۵۳	-۱۲۷/۶۵
۱۰۰	۸۰/۷۶	-۳۷/۸۷
۲۰۰	۸۶/۸۸	-۱۱/۴۸



شکل ۳: میزان IC_{50} ترکیب لانوسترول استخراج شده از عضله خیار دریایی *Holothuria leucospilota* روی رده سلولی KB/C152



شکل ۴: میزان IC_{50} ترکیب لانوسترول استخراج شده از عضله خیار دریایی *Holothuria leucospilota* روی رده سلولی Hek293

بحث

تقویت کننده سیستم ایمنی، مهمترین متابولیت ثانویه در خیارهای دریایی شناخته شده است (Zhang et al., 2014). بیش از ۱۰۰ ترکیب طبیعی از خیارهای دریایی جداسازی و شناسایی شده است. اغلب گلیکوزیدهای دارای لانوستان (هیدروکربن چند حلقه‌ای) اگلیکون^۱ (ترکیباتی که در گلوکوزید جایگزین اتم هیدروژن می‌شوند) با ۱۸ تا ۲۰ لاکتون و یک زنجیره قندی متشکل از شش مونوساکارید در کربن شماره ۳ اگلیکون هستند. ترکیب لانوسترول از گونه‌های مختلف خانواده Holothuroidea شناسایی و جداسازی شده است (Makarieva et al., 1993). این

در سال‌های اخیر کشف ترکیبات طبیعی از منابع دریایی با کاربرد دارویی رو به افزایش است. نتایج مطالعات نشان می‌دهد از سال ۲۰۰۸ تا کنون سالانه بیش از ۱۰۰۰ ترکیب طبیعی که مختص آبزیان است، از منابع دریایی شناسایی شده است (Hu et al., 2015). تا کنون بیش از ۲۰۰،۰۰۰ تری‌ترپنوئید از منابع طبیعی مانند اسکوالین، لانوسترون، لوپان، اوراسان، اولنان و هوپان، استخراج و شناسایی شده است (Chludil et al., 2002). تری‌ترین گلوکوزید با داشتن بیشترین فعالیت زیستی مانند ضدقارچ، سیتوتوکسیک، همولیتیک و

^۱ Lanostane Aglycone

مطالعات انجام شده توسط موسسه ملی سرطان ایالات متحده آمریکا (U.S.NCI) در رابطه با خواص زیستی متابولیت‌های ثانویه آبزیان دریایی نشان می‌دهد که ۴ درصد از گونه‌های دریایی (بیشتر گونه‌های جانوری) دارای خواص ضدسرطان هستند. یکی از این شاخه‌های جانوری خارپوستان و خانواده خیارهای دریایی است (Janakiram et al., 2015).

در این پژوهش، مشخص شده است که ترکیب لانوسترول استخراج شده از عضله خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* دارای خواص سیتوتوکسیک بر رده‌های سلولی سرطانی اپیتلیوم دهانی در غلظت ۶/۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که اثر کشندگی روی سلول‌های کلیه جنین انسان از خود نشان نداد. با توجه به این که این ترکیب تنها روی سلول‌های سرطانی اثر می‌گذارد و روی سلول سالم مورد مطالعه اثر کشندگی از خود نشان نداد با انجام مطالعات تکمیلی به منظور تولید داروهای ضد سرطان می‌تواند مورد بررسی قرار بگیرد. در مطالعه انجام شده توسط Sun و همکاران (۲۰۰۷)، ترکیب لانوستان به دست آمده از *impatiens Holothuria* که از مشتقات لانوسترول است، در غلظت‌های ۰/۳۷-

ترکیب که نوعی تری‌ترپنوئید است از خیار دریایی گونه *Stichopus californicus* (Sheikh and Djerassi, 1976) و خیار دریایی گونه *Holothuria scabra* (Stonik and Elyakov, 1988). با R_f های ۰/۴ و ۰/۶۷ شناسایی شده است. در این مطالعه نیز در جزء شماره ۴۹ میزان R_f برابر ۰/۴ سنجیده شد. بر اساس جدول شماره ۱ و شکل ۲، کروماتوگرافی گازی ترکیب لانوسترول از خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* از جزیره هنگام شناسایی و جداسازی شد.

تقریباً ۶۰ درصد از داروهای ضدسرطان مورد استفاده از منابع طبیعی، آبزیان دریایی و گیاهان تولید می‌شود (Newman and Cragg, 2004). این ترکیبات با خواص ضدجهش‌زا و ضدسرطان از رشد توده سرطانی ممانعت می‌کند و یا رشد آن را به تاخیر می‌اندازد (Rajasekaran et al., 2008). مطالعات نشان می‌دهد که بیش از ۱۴۰۰۰ ترکیب با خواص زیستی از گیاهان و جانوران دریایی استخراج شده است که این ترکیبات می‌توانند به عنوان منبع تولید داروهای ضدسرطان و پیشگیری کننده سرطان مورد استفاده قرار گیرند (Adrian, 2007).

۲/۷۵ میکروگرم در میلی لیتر اثر سیتوتوکسیک روی هفت رده سلولی بافت نرم انسانی از خود نشان داد. در پژوهشی دیگر که روی عصاره های متانولی ستاره دریایی *Goniaster tessellatus* انجام شد، ترکیب لانوسترول در این عصاره شناسایی شد و نتایج نشان داد که عصاره حاوی لانوسترول در غلظت ۰/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر اثر سیتوتوکسیک روی لاور بارناکل ها و بریوزوآها داشت (Bryan et al., 1996). مطالعات انجام شده نشان می دهد ترکیب لانوسترول استخراج شده از عضله خیار دریایی *Holothuria leucospilota* مانند سایر بررسی های انجام شده دارای اثرات سیتوتوکسیک بسیار قوی است که می تواند به عنوان داروی ضدسرطان مورد استفاده قرار بگیرد.

منابع

- Acimovic J. and Rozman D. 2013.** Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis. *Molecules*, 18(4): 4002–4017.
- Adrian T.E. 2007.** Novel marine-derived anti-cancer agents. *Current Pharmaceutical Design*, 13(33): 3417–3426.
- Aminzadeh A, Motaghi A, Mohammadi E. 2013.** Epidemiologic study of oral and paraoral malignancies in one cancer referral center in Isfahan during a 5-year period. *Journal of Isfahan Dental School*, 8(6): 560–566.
- Attaway J., Barabas L. and Wolford R. 1965.** Analysis of terpene hydrocarbons by thin layer chromatography. *Analytical Chemistry*, 37(10): 1289–1290.
- Bordbar S., Anwar F. and Saari N. 2011.** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods- A review. *Marine Drugs*, 9(10): 1761–1805.
- Bryan P.J., Rittschof D. and McClintock J.B. 1996.** Bioactivity of echinoderm ethanolic body-wall extracts: An assessment of marine bacterial attachment and macroinvertebrate larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 196(1): 79–96.
- Chludil H.D., Muniain C.C., Seldes A.M. and Maier M.S. 2002.** Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the Patagonian sea cucumber *Hemoiedema spectabilis*. *Journal of Natural Products*, 65(6): 860–865.
- Citoglu G.S. and Acikara O.B. 2012.** Column chromatography for terpenoids and flavonoids. P: 13–49. In: Sasikumar D. (Ed.). *Chromatography and Its Applications*. INTECH, Croatia.
- Conand C. and Muthiga N. 2007.** Commercial sea cucumbers: A review for the Western Indian Ocean. *WIOMSA Book Series, Tanzania*. 66P.
- Datta D., Talapatra S. and Swarnakar S. 2015.** Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines- An overview. *International Letters of Natural Sciences*, 7: 42–61.
- Hu Y., Chen J., Hu G., Yu J., Zhu X., Lin Y., Chen S. and Yuan J. 2015.** Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine Drugs*, 13(1): 202–221.
- Janakiram N.B., Mohammed A. and Rao C.V. 2015.** Sea cucumbers metabolites as potent anti-cancer

- agents. *Marine Drugs*, 13(5): 2909–2923.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E. and Forman D. 2011.** Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2): 69–90.
- Makarieva T.N., Stonik V.A., Kapustina I.I., Boguslavsky V.M., Dmitrenko A.S., Kalinin V.I., Cordeiro M.L. and Djerassi C. 1993.** Biosynthetic studies of marine lipids. 42. Biosynthesis of steroid and triterpenoid metabolites in the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *Steroids*, 58(11): 508–517.
- Neville B., Dam D.D., Allen C.M., Bouquet J.B. 2008.** *Oral and Maxillofacial Pathology*. Elsevier, New York. 984P.
- Newman D.J. and Cragg G.M. 2004.** Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of Natural Products*, 67(8): 1216–1238.
- Pawson D.L. 2007.** Phylum echinodermata. *Zootaxa*, 1668: 749–764.
- Purcell S.W., Samyn Y. and Conand C. 2012.** Commercially important sea cucumbers of the world. *FAO species catalogue for fishery purpose*, No: 6.
- Rajasekaran A., Sivagnanam G. and Xavier R. 2008.** Nutraceuticals as therapeutic agents: A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 1(4): 328–340.
- Roehm N.W., Rodgers G.H., Hatfield S.M. and Glasebrook A.L. 1991.** An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142(2): 257–265.
- Sheikh Y.M. and Djerassi C. 1976.** Bioconversion of lanosterol into holotoxingonin, a triterpenoid from the sea cucumber *Stichopus californicus*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 4(24): 1057–1058.
- Sima P. and Vetvicka V. 2011.** Bioactive substances with anti-neoplastic efficacy from marine invertebrates: Porifera and Coelenterata. *World Journal of Clinical Oncology*, 2(11): 355–361.
- Sottorff I., Aballay A., Hernandez V., Roa L., Munoz L.X., Silva M., Becerra J. and Astuya A. 2013.** Characterization of bio-active molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48: 23–35.
- Stonik V.A. and Elyakov G.B. 1988.** Secondary metabolites from echinoderms as chemotaxonomic markers. P: 43–86. In: Scheuer P.J.

(Ed.). Bioorganic Marine Chemistry, Vol. 2. Springer, Germany.

Sun P., Liu B.S., Yi Y.H., Li L., Gui M., Tang H.F., Zhang D.Z. and Zhang S.L. 2007. A new cytotoxic lanostane-type triterpene glycoside from the sea cucumber *Holothuria impatiens*. Chemistry and Biodiversity, 4(3): 450–457.

Zhang X.Y., Xu X.Y., Peng J., Ma C.F., Nong X.H., Bao J., Zhang G.Z. and Qi S.H. 2014. Antifouling potentials of eight deep-sea-derived fungi from the South China Sea. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 41(4): 741–748.



The cytotoxic activity of lanosterol isolated from sea cucumber *Holothuria leucospilota* from Hengam island, Persian Gulf

Melika Nazemi^{1*}, Hadi Ghafari², Mohammad Seddiq Mortazavi³,
Mohammad Ali Ahmaditaba⁴, Mohammad Reza Aghasadeghi⁵

Received: January 2017

Accepted: April 2017

Abstract

In this study, the cytotoxic effect of lanosterol from triterpenoids were investigated due to the abundance of *Holothuria leucospilota* in the Persian Gulf and cytotoxic properties of their synthesized terpenoid compounds. The sea cucumber muscle samples were dried and extracted with acetone. The extract was semi purified by silica gel column chromatography using n-hexane and ethyl acetate to get lanosterol. The cytotoxic effect of lanosterol checked by using XTT assay on oral epithelial cancer cell (KB/C152) and human embryonic kidney cells (Hek293) cell lines. The IC₅₀ value of lanosterol extracted from sea cucumber muscle in KB/C152 cell line was 6.36 μg/mL but it was not toxic on Hek293 cell lines. The study demonstrated that extracted lanosterol from *H. leucospilota* muscle had strong cytotoxic effects that can be used as an anticancer drug.

Key words: *Sea Cucumber, Secondary Metabolite, Terpenoid, Persian Gulf.*

1- Assistant Professor in Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

2- Assistant Professor in Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

3- Associate Professor in Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

4- Ph.D. in Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5- Associate Professor in Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: melikanazemi@yahoo.com

