



مقاله پژوهشی

بررسی خاصیت سمیت سلولی زهر عروس دریایی گونه *Chrysaora hysoscella* علیه سلول‌های سرطانی کولون انسانی

اصغر محمدزاد اصل^{۱*}، حسین ذوالقرنین^۲، سهیلا مطرودی^۲، فاطمه طهوری^۴، زهرا صالحی نجف آبادی^۵

DOI: 10.22124/japb.2024.26396.1523

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۲

چکیده

زهر عروس‌های دریایی حاوی ترکیبات متنوعی بوده که دارای خواص بالقوه درمانی است. مطالعه حاضر با بررسی زهر خام عروس دریایی گونه *Chrysaora hysoscella*، به ارزیابی خاصیت سمیت سلولی آن پرداخته است. محدوده‌های موجود در زهر عروس دریایی *C. hysoscella* با استفاده از روش HPLC تخلیص شدند و وزن مولکولی آن‌ها با روش SDS-PAGE مشخص شد. خاصیت سمیت سلولی محدوده‌ها با استفاده از روش MTT علیه دو رده سلولی سرطانی HCT116 و Caco-2 و همچنین سلول‌های طبیعی رده RAW 264.7 ارزیابی شد. بر اساس نتایج به دست آمده، زهر خام *C. hysoscella* دارای ۱۰ محدوده با وزن مولکولی ۱۵ تا ۱۷۰ کیلودالتون بود که از این بین، محدوده ۲ دارای اثر سمیت سلولی قوی علیه رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه بود. مقدار IC_{50} علیه سلول‌های HCT116 و Caco-2 به ترتیب ۶۳/۲۱ و ۶۴/۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که علیه سلول‌های RAW 264.7 ۱۲۲/۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان دهنده خاصیت سمیت سلولی اختصاصی محدوده ۲ علیه سلول‌های سرطانی رده بود در حالی که اثر سمیت سلولی آن بر روی سلول‌های طبیعی به طور قابل توجهی کمتر بود. این مشاهدات، محدوده ۲ را به عنوان یک عامل ضد رطانی بالقوه برای سرطان کولون معرفی می‌کند.

واژگان کلیدی: عروس دریایی، *Chrysaora hysoscella*، سرطان کولون، خاصیت سمیت سلولی.

- ۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
 - ۲- استاد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
 - ۳- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
 - ۴- استادیار شیمی آلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
 - ۵- استادیار بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
- * نویسنده مسئول: amohammadzade218@gmail.com

مقدمه

بالایی از خود نشان داده‌اند (Jarms et al., 2019). با وجود پژوهش‌های انجام شده، هنوز مشخص نیست که آیا عروس‌های دریایی به دلیل تغییرات آب و هوایی و افزایش عوامل استرس‌زای انسانی در حال افزایش هستند یا این که فراوانی آنها از یک الگوی چرخه‌ای پیروی می‌کند و ما یکی از مراحل فراوانی بالا را تجربه می‌کنیم (Condon et al., 2013). در هر صورت، فراوانی زیاد عروس دریایی احتمالاً با تناوب متغیر و بالقوه در حال افزایش رخ می‌دهد، بنابراین مدیریت آنها در آینده نزدیک یک مساله مهم است (D'Ambra and Merquiol, 2022).

مطالعات اخیر نشان داده است که اعضای رده سیفوزوا (Scyphozoa) حداقل سه دسته اصلی از ترکیبات دارای کاربردهای بیوتکنولوژیک را که شامل کلانز، اسیدهای چرب و اجزای زهر خام است، تولید می‌کنند. سموم موجود در زهر تزریق شده توسط نماتوسیت‌های کیسه‌تنان پلاژیک در گونه‌های متعلق به کوبوزوا و سیفوزوا در مقایسه با هیدروزوا با جزئیات بیشتری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، زیرا آنها شناگران را نیش می‌زنند و گاهی اوقات اثر کشنده دارند (D'Ambra and

امروزه بیماری‌های مزمن و کاهش رفاه در حال تبدیل شدن به چالش‌های عمده بهداشت عمومی جهانی هستند. بیوتکنولوژی دریایی می‌تواند با توسعه محصولات جدید و دانش ناشی از موجودات دریایی، به غلبه بر برخی از این چالش‌ها کمک کند. در حالی که برخی از محصولات موجودات دریایی مانند ریزجلیک‌ها، اسفنج‌ها و ماهی‌ها از قبل کاربردهای بیوتکنولوژیکی پیدا کرده بودند، عروس دریایی به عنوان منبع بالقوه ترکیبات فعال زیستی توجه کمی را به خود جلب کرده است (Merquiol et al., 2019). عروس‌های دریایی، موجودات دریایی متعلق به سه رده از شاخه کیسه‌تنان هستند (Pitt and Lucas, 2014). عروس دریایی برای مدت طولانی به دلیل آسیب رساندن به ادوات شیلاتی و ماهی‌های صید شده در آنها، اختلال در عملکرد صحیح نیروگاه‌ها، صدمه زدن به شناگران در امتداد سواحل و فراوانی فوق‌العاده زیاد، بسیار آزار دهنده تلقی می‌شدند (Kumawat et al., 2023). آنها از زمان کامبرین (Young and Hagadorn, 2010)، از شرایط محیطی متفاوت و اغلب نامطلوب جان سالم به در برده‌اند و با بهره‌برداری از تمام محیط‌های دریایی، واگرایی سازشی

همستر چینی، سرطان روده بزرگ در انسان (Ayed et al., 2011)، گلیوبلاستوما در انسان (Ayed et al., 2012) و سلول های کلیه (Hessinger and Lenhoff, 1976) نشان داد. سم خام *Rhizostoma pulmo* برای فیبروبلاست های ریه در همسترهای چینی اثر سمیت سلولی دارد (Carli et al., 1994). در مجموع، این مطالعات از مناسب بودن زهر استخراج شده از عروس دریایی برای تولید داروهای ضدسرطان حمایت می کنند (D'Ambra and Merquiol, 2022).

گونه *Chrysaora hysoscella* یک عروس دریایی متعلق به سیفوزوآ است که در چندین بخش از جهان، از جمله دریای آدریاتیک، در ۲۰۰ سال گذشته دچار شکوفایی شده است (Daryanabard and Dawson, 2008).

اثر سمیت سلولی زهر خام آن بر روی کراتینوسیت های انسانی NCTC 2544 گزارش شده است (Parodi et al., 2009). از این رو، در مطالعه حاضر به بررسی خواص فیزیوکوشیمیایی زهر عروس دریایی گونه *C. hysoscella* و اثرات سمیت سلولی آن علیه رده های سلولی سرطان کولون انسانی پرداخته شد.

(Lauritano, 2020). به طور کلی، زهر عروس دریایی اثرات منفی از جمله اثرات سیتولیتیک، سمیت سلولی، همولیتیک، نوروٹوکسیک و کاردیوتوکسیک بر روی انسان دارد (Ranasinghe et al., 2022). با این حال، برخی از این اثرات می توانند به نفع سلامت انسان مورد استفاده قرار گیرند (Luddecke et al., 2023).

تعداد فزاینده ای از مطالعات، مناسب بودن سم های سیفوزوآ را برای استفاده به عنوان داروهای ضدسرطان بررسی کرده اند. زهر استخراج شده از *Nemopilema nomurai* بر روی میوبلاست های قلب و عضله در موش ها و سلول های خونی جانداران مختلف، از جمله انسان خاصیت سیتولیتیک داشته (Brinkman et al., 2014) و در یک جانور مدل (Lee et al., 2017) و همچنین سلول های سرطان کبدی (HepG2) انسان (Choudhary et al., 2018) خاصیت ضدسرطانی داشته است. زهر خام *Cyanea nozaki* اثر سمیت سلولی بر سلول های سرطانی روده بزرگ و کبد در انسان دارد (Cuiping et al., 2012). زهر خام *Pelagia noctiluca* اثرات سمیت سلولی و سیتولیتیک را بر فیبروبلاست های ریه در

مواد و روش‌ها

نمونه عروس دریایی گونه *Chrysaora hysoscella* از آب‌های اطراف منطقه جوفره بندر بوشهر جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری در زمان بیشینه جزر و با استفاده از تور ماهی‌گیری از عمق حدود ۱۵ متری انجام شد. نمونه‌های عروس دریایی سالم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط استریل، به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج و تخلیص زهر از پودر زهر خام

لبه‌های چتر و تنتاکول‌ها جدا شده و در آب دریا درون شیشه‌های دربسته استریل به مدت چهار روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شیشه‌ها در طول روز چند بار تکان داده می‌شدند. پس از این مدت، لبه‌های چتر و تنتاکول‌ها دور ریخته شده و محلول باقی‌مانده از صافی رد شد. محلول فیلتر شده دارای نماتوسیت‌های عروس دریایی بود که با استفاده از فریزدرایر به صورت پودر لیوفیلیزه درآمد و تا زمان ادامه آزمایش‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از روش‌های انجماد-ذوب و فراصوت برای استخراج زهر عروس دریایی *Chrysaora hysoscella* استفاده شد. در روش انجماد-ذوب، ۰/۱ گرم از پودر لیوفیلیزه

نماتوسیت *C. hysoscella* در ۱ میلی‌لیتر آب به خوبی حل شد. چرخه انجماد-ذوب با استفاده از نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) و آب ولرم (۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد) و طی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه تکرار شد. در فواصل یاد شده، نمونه زیر میکروسکوپ بررسی شد تا زمانی که نماتوسیت‌ها شکسته شده و زهر جدا شود. در این زمان ۲ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه اضافه شد و سانتریفیوژ یخچال‌دار (Universal، 1406، آلمان) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. مایع رویی و رسوب به دست آمده به صورت جداگانه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در روش فراصوت نیز فرآیند سونیکاسیون تا زمانی انجام شد که بررسی میکروسکوپی نشان دهنده پارگی دیواره نماتوسیت و آزادسازی متعاقب زهر بود. سپس نمونه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در این آزمایش از روش دوم استفاده شد چرا که موجب استخراج زهر خام بیشتری شد.

برای جداسازی فراکشن‌های زهر از HPLC استفاده شد. فاز متحرک (A: H₂O) (۱/۰ درصد

درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه انکوبه شدند. نمونه‌های پروتئین دناتوره شده با استفاده از دستگاه SDS-PAGE الکتروفورز شدند. ژل با رنگ کوماسی‌بلو ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شد. از یک مارکر مولکولی ۲۰۰ کیلودالتونی برای تعیین وزن باندها استفاده شد.

کشت سلولی و سنجش سمیت سلولی

دو رده سلولی سرطان کولون انسانی شامل Caco-2 و HCT116 و همچنین رده سلولی ماکروفاژ طبیعی RAW 264.7 از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد (جدول ۱). سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای 37 ± 1 درجه سانتی‌گراد در محیط دارای ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند.

(TFA) و B: Acetonitrile (ACN) (۰/۱) درصد (TFA) بود. از برنامه گرادیانی از ۵ تا ۱۰۰ فاز B در زمان ۶۰ دقیقه و طول موج ۲۸۰ نانومتر برای این منظور استفاده شد. برای این که بتوان پیک‌ها را تقسیم کرده و اجزای سم را به صورت جداگانه جمع‌آوری کرد، نسبت دقیق حلال‌ها برای پیک‌ها برآورد شد و شرایط شستشوی گرادیان بهینه شد.

سنجش پروتئین و آنالیز SDS-PAGE

محتوای پروتئین زهر *C. hysoscella* با استفاده از تکنیک برادفورد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976). علاوه بر این، وزن مولکولی پروتئین زهر خام و زهر تخلیص شده نماتوسیت با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد (Uk, 1970). از ژل حل شونده ۱۲ درصد و ژل انباشته ۵ درصد در مطالعه حاضر استفاده شد. پروتئین‌های نماتوسیت در بافر تریس-HCl ۱ درصد (pH ۶/۸)، گلیسرول ۱۰ درصد و بروموفنل ۰/۰۱ درصد حل و در دمای ۹۵

جدول ۱: مشخصات رده‌های سلولی به کار رفته

منبع	کد NCBI	رده سلولی
https://www.invivogen.com/raw-blue	C660	RAW 264.7
Schroy et al., 1995	C570	HCT116
Nisa et al., 2023b	C139	Caco-2

رابطه ۱:

$$SR (\%) = (A_C / A_T) \times 100$$

A_C: جذب نوری سلول‌های شاهد؛ A_T: جذب

نوری سلول‌های تیمار شده با پروتئین زهر.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.23 بررسی شدند. برای این منظور از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد.

نتایج

جداسازی محدوده از زهر خام *Chrysaora hysocella*

مشخصات کروماتوگرافی اجزای زهر *C. hysocella* با استفاده از HPLC، در یک گرادیان خطی از حلال B (استونیتریل - TFA) ۰/۱ درصد) به دست آمد (شکل ۲). ۱۰ محدوده به صورت دستی جمع‌آوری و لیوفیلیزه شد. شکل ۱ طیف به دست آمده از HPLC را برای زهر خام *C. hysocella* که ۱۰ محدوده در آن قابل مشاهده است، نشان می‌دهد.

قابلیت بازدارندگی رشد محدوده‌های

تخلیص شده از زهر عروس دریایی *C. hysocella* با استفاده از روش استاندارد

MTT تعیین شد (Nisa et al., 2023b).

برای این منظور 1×10^5 سلول در هر چاهک

پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی با ۱۹۰ میکرولیتر

محیط کشت مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت

انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط با

سوسپانسیون‌های پروتئین زهر عروس دریایی

در غلظت‌های ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ میکرولیتر در

میلی‌لیتر پر شد و به مدت ۷۲ ساعت دیگر

انکوبه شد. به منظور ارزیابی سمیت سلولی،

سلول‌ها با بافر فسفات سالین (PBS) شسته و

با ۱۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در

میلی‌لیتر، به مدت ۳-۴ ساعت انکوبه شدند.

بلورهای فورمازان بنفش در ۱۰۰ میلی‌لیتر

DMSO حل شدند و جذب نوری در طول موج

۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزاریدر

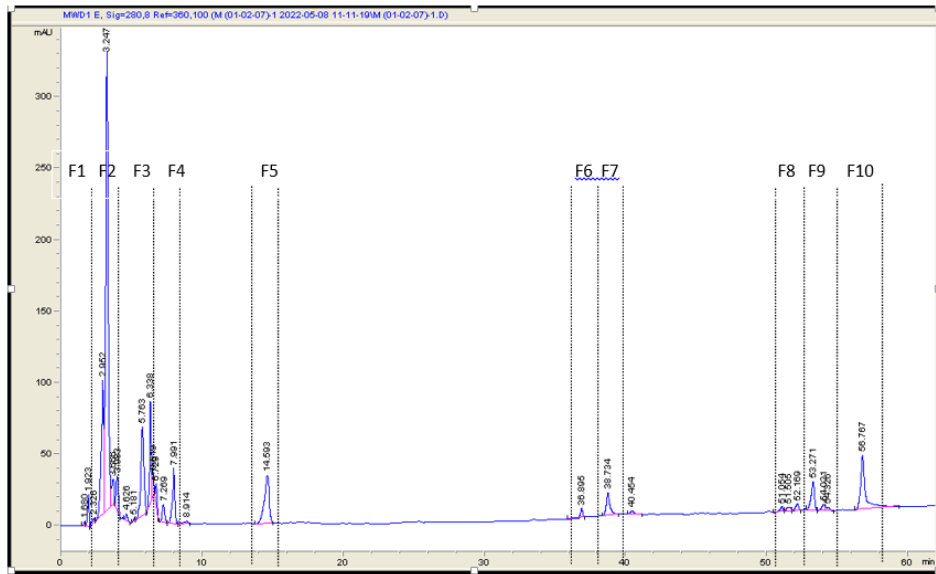
(BioTek, ELX800TS، آمریکا) اندازه‌گیری

شد. آزمایش سه مرتبه تکرار شد. برای محاسبه

زنده‌مانی سلول‌ها (SR) از رابطه ۱ استفاده شد

(Nisa et al., 2023b). مقدار IC_{50} نیز محاسبه

شد.



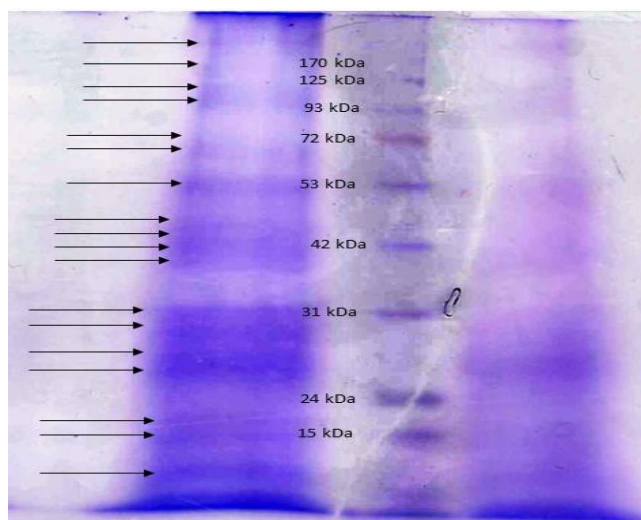
شکل ۱: طیف به دست آمده از HPLC برای زهر خام *Chrysaora hysoscella* که ۱۰ محدوده در آن قابل مشاهده است

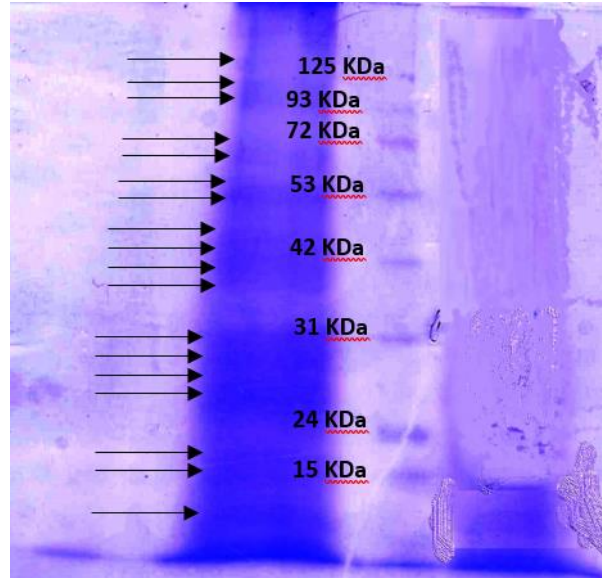
انجام شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، این محدوده دارای جرم مولکولی کمتر از ۱۵ کیلودالتون است. همچنین شکل ۳، تجزیه و تحلیل SDS-PAGE محدوده ۲ به دست آمده از زهر خام *C. hysoscella* را نشان می‌دهد. نتیجه کروماتوگرافی محدوده خالص شده برای تایید جداسازی نیز در شکل ۴ نشان داده شده است.

سنجش پروتئین و تعیین جرم مولکولی
 مقدار پروتئین موجود در زهر خام ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان پروتئین‌های محدوده‌های جداسازی شده در جدول ۱ ارائه شده‌اند. هر یک از این محدوده‌های مورد بررسی بر روی رده‌های سلولی قرار گرفتند و مشخص شد که تنها محدوده اثرگذار، محدوده ۲ بود که برای تعیین جرم مولکولی و در کنار نمونه خام، الکتروفورز

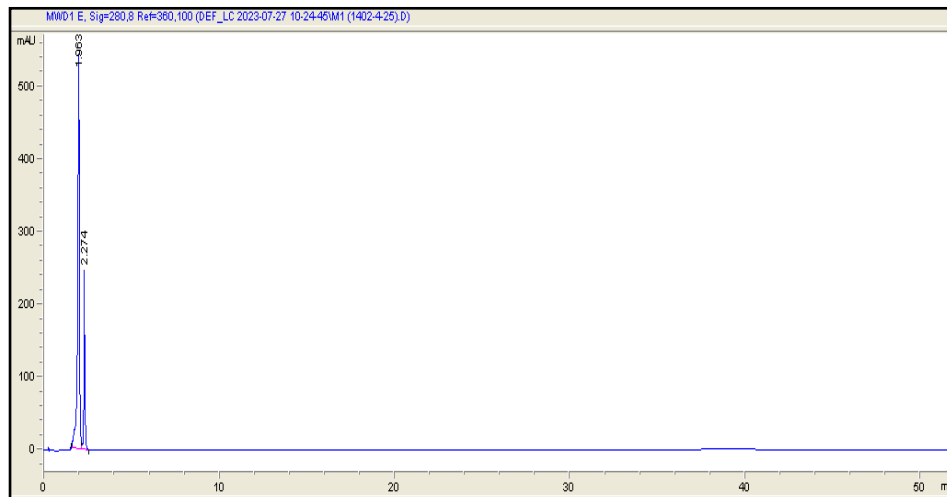
جدول ۱: میزان پروتئین‌های محدوده‌های جداسازی شده از زهر خام *Chrysaora hysoscella*

میزان پروتئین (µg/mL)	میزان جذب	محدوده
۰	۰	F ₁
۰/۸۴	۰/۰۵۲	F ₂
۰/۴۳	۰/۰۴۰	F ₃
۱/۲۱	۰/۰۶۳	F ₄
۱/۳۷	۰/۰۶۸	F ₅
۱/۱۷	۰/۰۶۲	F ₆
۰/۹۴	۰/۰۵۵	F ₇
۱/۴۱	۰/۰۶۹	F ₈
۱/۱۱	۰/۰۶۰	F ₉
۱/۴۴	۰/۰۷۰	F ₁₀

شکل ۲: تجزیه و تحلیل SDS-PAGE محدوده‌های به دست آمده از زهر خام *Chrysaora hysoscella*



شکل ۳: تجزیه و تحلیل SDS-PAGE محدودده ۲ به دست آمده از زهر خام *Chrysaora hysoscella*

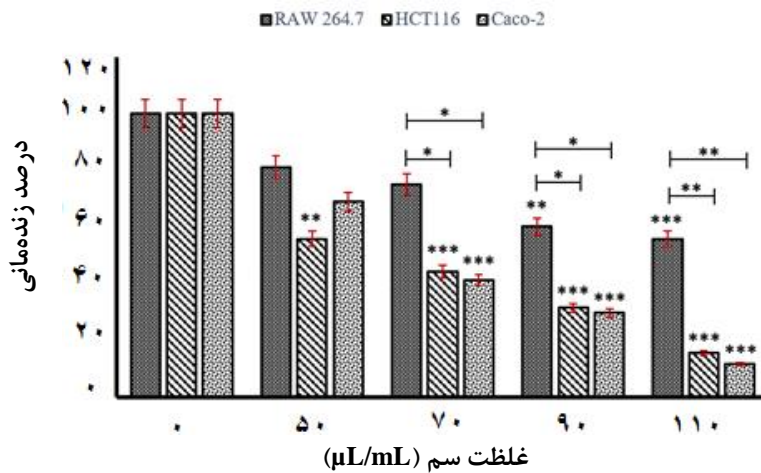


شکل ۴: کروماتوگرافی محدودده خالص شده ۲ به دست آمده از زهر خام *Chrysaora hysoscella* برای تایید جداسازی

سنجش سمیت سلولی محدوده‌ها

با انجام آزمون MTT مشخص شد که تنها محدوده ۲ دارای اثر سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطانی مورد مطالعه بود و محدوده‌های دیگر اثر سمیت سلولی نشان ندادند. در شکل ۵، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی HCT116 و Caco-2 و همچنین سلول‌های طبیعی RAW 264.7 تحت تاثیر محدوده ۲ زهر خام *C. hysoscella* نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود،

سمیت این محدوده وابسته به غلظت بود و با افزایش آن، سمیت آن علیه هر سه رده سلولی به طور معناداری افزایش داشت ($P < 0.05$). از طرفی تا غلظت ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محدوده ۲، اثر معناداری بر زنده‌مانی سلول‌های RAW 264.7 نداشت ($P > 0.05$). در حالی که زنده‌مانی سلول‌های HCT116 و Caco-2 به طور قابل توجهی تحت تاثیر محدوده ۲ زهر *C. hysoscella* کاهش یافته بود.



شکل ۵: زنده‌مانی سلول‌های RAW 264.7 (شاهد)، HCT116 و Caco-2 تیمار شده با غلظت‌های مختلف محدوده ۲ زهر *Chrysaora hysoscella* (میانگین \pm خطای استاندارد). علامت‌های روی هر ستون در مقایسه با شاهد است. تفاوت بین رده‌های سلولی با علائم روی خط افقی مشخص شده است. $P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$.

تلاش برای ارائه راهکارهای درمانی موثر برای سرطان روده همچنان ادامه دارد. در پژوهش حاضر تلاش شد که با استفاده از منابع طبیعی موجود در دریاها، یک ترکیب با اثر سمیت سلولی از زهر عروس دریایی گونه *C. hysoscella* جداسازی شود. برای این منظور محدوده‌های موجود در زهر با استفاده از روش HPLC استخراج شدند و مشخص شد که تنها یکی از محدوده‌ها دارای اثر سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطانی روده است.

ترکیب زهرهای کیسه‌تنان به طور دقیق مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد که عمدتاً حاوی انواع پروتئین‌ها همراه با ترکیبات غیرپروتئینی هستند (Frazao et al., 2012; Mariottini and Pane, 2013; Mariottini, 2015; Jouiaei et al., 2014). بیشترین جرم مولکولی اجزای اصلی زهر شناسایی شده تا به امروز ۲۲۰ کیلودالتون است (Nevalainen et al., 2004). مطالعات بسیاری فعالیت‌های زیستی زهر را ناشی از وزن مولکولی پایین پروتئین‌های موجود در زهر دانسته‌اند (Vincent, 1999; Fernandes et al., 2015; Bhardwaj et al., 2009). به عنوان مثال Mariottini و Pane (۲۰۱۳) چندین ترکیب- عصاره از کیسه‌تنان جداسازی کردند

مقدار IC_{50} برای رده‌های سلولی RAW 264.7، HCT116 و Caco-2 به ترتیب برابر با ۱۲۲/۸۸، ۶۳/۲۱ و ۶۴/۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. مقادیر IC_{50} نیز نشان داد که غلظت مورد نیاز برای از بین بردن نیمی از سلول‌های سالم، تقریباً دو برابر غلظت مورد نیاز برای از بین بردن نیمی از سلول‌های سرطانی مورد مطالعه بود.

بحث

با وجود تلاش‌های همه جانبه کشورهای توسعه یافته، هنوز از هر پنج مورد ابتلا به سرطان، یک نفر منجر به مرگ می‌شود (Kanwal et al., 2015; Siegel et al., 2020). سرطان کولورکتال (CRC) با بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ مورد جدید و ۵۰۰۰۰۰ مرگ در ایالات متحده طی سال ۲۰۲۱، سومین سرطان شایع در جهان است (Siegel et al., 2021). این بیماری سومین سرطان شایع در هر دو جنس و دومین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان است (Wild et al., 2020). پیش‌بینی می‌شود که در دهه‌های بعد موارد CRC با افزایش به حدود ۲/۵ میلیون مورد جدید در سال ۲۰۳۵ در سراسر جهان، دو برابر شود (Dekker et al., 2019; Guren, 2019).

میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد (Cuiping et al., 2012). همچنین مطالعه‌ای بر روی نانوذرات طلای بیوژن با استفاده از پروتئین زهر نماتوسیت عروس دریایی *A. flagellates* به طور قابل توجهی کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های سرطانی MCF-7 را در مقایسه با سلول‌های طبیعی HEK-293 نشان داد (Nisa et al., 2023a).

در مطالعه حاضر زهر عروس دریایی گونه *C. hysoscella* مورد ارزیابی قرار گرفت. اعضای این گونه کمتر مطالعه شده‌اند. در مطالعه Nisa و همکاران (۲۰۲۳a) اثر سمیت سلولی پنج گونه *Chrysaora* ارزیابی شد. زهر خام نماتوسیت با استفاده از روش MTT بر روی دو رده سلولی سرطانی پستان و ریه (سلول‌های MCF-7 و A549) مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمار سلول‌ها با پروتئین‌های زهر خام پنج گونه *Chrysaora* شامل *C. chinensis*، *C. fuscescens*، *C. hysoscella*، *C. kynthia* و *C. quinquecirrha*، رشد هر دو رده سلولی سرطانی را در یک زمان سرکوب کرد. این خاصیت سمیت سلولی، وابسته به زمان و غلظت بود. در این مطالعه تیمارها به صورت ۲۴ و ۴۸ ساعته بودند. برای گونه *C. hysoscella* که مشابه مطالعه حاضر

که فعالیت‌های سمیت سلولی و سیتولیتیک بر روی رده‌های سلولی مختلف موش و انسان دارد. ترکیبات کیسه‌تنان روی سلول‌های طبیعی نیز آزمایش شده و گزینش‌پذیری آنها تایید شده است. ترکیبات-عصاره‌های کیسه‌تنان در برابر لوسمی، کارسینوم کولون، لنفوم، آدنوکارسینوم ریه، گلیوبلاستوما، ملانوما، آدنوکارسینوم تخمدان، آدنوکارسینوم پستان، کارسینوم دهانه رحم، کارسینوم اپیدرموئید، سرطان کلیه و سیستم عصبی مرکزی فعالیت سمیت سلولی دارند (D'Ambra and Lauritano, 2020).

مطالعات اخیر بر روی پروتئین زهر خام عروس دریایی *Acromitus flagellatus* اثر ضدتکثیری بر روی دو رده سلولی سرطانی ریه (A549) و کبد (HepG2) را با مقادیر IC_{50} به ترتیب ۶۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد. همچنین این پروتئین هیچ گونه سمیتی بر روی رده سلولی طبیعی Vero نداشت (Maduraiveeran et al., 2021). مطالعه دیگری، سمیت سلولی سم نماتوسیت عروس دریایی *Cyanea nozaki* را بر روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ انسانی (H630) و سلول‌های کبدی انسانی (Bel-7402، SMMC-7721) نشان داد و مقادیر IC_{50} برای این سلول‌ها به ترتیب ۵/۱، ۱۷/۹ و ۲۴/۳

C. hysoscella دارای خاصیت سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطانی روده است. نتایج پژوهش حاضر به طور کلی نشان داد که زهر عروس دریایی *C. hysoscella* می‌تواند به عنوان یک منبع بالقوه از ترکیبات ضدسرطانی در نظر گرفته شود. محیط دریا منبعی غنی از موجودات دارای ترکیبات طبیعی است که استفاده از آنها، نیازمند بررسی و کشف این ترکیبات است. در مطالعه حاضر مشخص شد که زهر عروس دریایی *C. hysoscella* دارای اثر سمیت سلولی اختصاصی علیه سلول‌های سرطانی است و قابلیت‌پذیری دارد. ترکیبی که کمترین اثر جانبی را بر روی سلول‌های طبیعی داشته باشد، در درمان سرطان اهمیت بسیاری دارد. بنابراین محدوده ۲ زهر *C. hysoscella* با جرم مولکولی کمتر از ۱۵ کیلوالتون به عنوان یک عامل ضدسرطانی بالقوه، نیازمند مطالعات بیشتر برای استفاده به عنوان ترکیب درمانی در سرطان کولون است.

بود، مقادیر IC_{50} علیه سلول‌های MCF-7 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۸۶/۲۰ و ۸۵/۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. همچنین مقدار IC_{50} علیه سلول‌های A549 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۸۲/۲۵ و ۷۲/۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (Nisa et al., 2023b). محدوده تخلیص شده در مطالعه حاضر سمیت بالاتری نسبت به سلول‌های سرطانی روده نشان داد و مقادیر IC_{50} در این مطالعه برای سلول‌های HCT116 و Caco-2 به ترتیب برابر با ۶۳/۲۱ و ۶۴/۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. البته لازم به ذکر است که این سمیت طی تیمار ۷۲ ساعته به دست آمده بود. با توجه به جستجوی انجام شده در پایگاه‌های داده، مطالعه Nisa و همکاران (۲۰۲۳b) تنها مطالعه انجام شده بر روی سمیت سلولی زهر گونه‌های *Chrysaora* است. با این حال نوع سلول‌های سرطانی در مطالعه حاضر متفاوت است و در اینجا برای اولین بار گزارش می‌شود که محدوده تخلیص شده از زهر

منابع

- Ayed Y., Bousabbeh M., Mabrouk H.B., Morjen M., Marrakchi N. and Bacha H. 2012.** Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by the Mediterranean jellyfish *Pelagia noctiluca* venom and its fractions in cultured glioblastoma cells. *Lipids in Health and Disease*, 11: 1–9. doi: 10.1186/1476-511X-11-84
- Ayed Y., Boussabbeh M., Zakhama W., Bouaziz C., Abid S. and Bacha H. 2011.** Induction of cytotoxicity of *Pelagia noctiluca* venom causes reactive oxygen species generation, lipid peroxydation induction and DNA damage in human colon cancer cells. *Lipids in Health and Disease*, 10: 1–10. doi: 10.1186/1476-511X-10-232
- Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhiman S. and Sharma P. 2015.** Pyrrole: A resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. *Research Advances*, 5: 15233–15266. doi: 10.1039/C4RA15710A
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Brinkman D.L., Konstantakopoulos N., McInerney B.V., Mulvenna J., Seymour J.E., Isbister G.K. and Hodgson W.C. 2014.** *Chironex fleckeri* (box jellyfish) venom proteins: Expansion of a cnidarian toxin family that elicits variable cytolytic and cardiovascular effects. *Journal of Biological Chemistry*, 289: 4798–4812. doi: 10.1074/jbc.M113.534149
- Carli A., Mariottini G.L. and Pane L. 1994.** Ecological and medical aspects of jellyfish poisoning. *Marine Drugs*, 8(4): 1122–1152. doi: 10.3390/md8041122
- Choudhary I., Lee H., Pyo M.J., Heo Y., Chae J., Yum S.S., Kang C. and Kim E. 2018.** Proteomic investigation to identify anticancer targets of *Nemopilema nomurai* jellyfish venom in human hepatocarcinoma HepG2 cells. *Toxins*, 10(5): 194–201. doi: 10.3390/toxins10050194
- Condon R.H., Duarte C.M., Pitt K.A., Robinson K.L., Lucas C.H., Sutherland K.R., Mianzan H.W., Bogeberg M., Purcell J.E. and Decker M.B. 2013.** Recurrent jellyfish blooms are a consequence of global oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 1000–1005. doi: 10.1073/pnas.1210920110
- Cuiping L., Pengcheng L., Jinhua F., Rongfeng L. and Huahua Y. 2012.** Cytotoxicity of the venom from the nematocysts of jellyfish

- Cyanea nozakii* Kishinouye. Toxicology and Industrial Health, 28: 186–192. doi: 10.1177/0748233711410910
- D'Ambra I. and Lauritano C. 2020.** A review of toxins from Cnidaria. Marine Drugs, 18(10): 507–515. doi: 10.3390/md18100507
- D'Ambra I. and Merquiol L. 2022.** Jellyfish from fisheries by-catches as a sustainable source of high-value compounds with biotechnological applications. Marine Drugs, 20(4): 266–285. doi: 10.3390/md20040266
- Daryanabard R. and Dawson M.N. 2008.** Jellyfish blooms: *Crambionella orsini* (Scyphozoa: Rhizostomeae) in the Gulf of Oman, Iran, 2002–2003. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 88: 477–483. doi: 10.1017/S0025315408000945
- Dekker E., Tanis P.J., Vleugels J.L., Kasi P.M. and Wallace M. 2019.** Pure-AMC. Lancet, 394: 1467–1480. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0
- Fernandes A., Fernandes I., Cruz L., Mateus N., Cabral M. and De Freitas V. 2009.** Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 11154–11160. doi: 10.1021/jf902093m
- Frazao B., Vasconcelos V. and Antunes A. 2012.** Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An overview. Marine Drugs, 10: 1812–1851. doi: 10.3390/md10081812
- Guren M.G. 2019.** The global challenge of colorectal cancer. The Lancet Gastroenterology and Hepatology, 4: 894–895. doi: 10.1016/S2468-1253(19)30329-2
- Hessinger D.A. and Lenhoff H.M. 1976.** Mechanism of hemolysis induced by nematocyst venom: Roles of phospholipase A and direct lytic factor. Archives of Biochemistry and Biophysics, 173: 603–613. doi: 10.1016/0003-9861(76)90297-6
- Jarms G., Morandini A.C., Schmidt-Rhaesa A., Giere O. and Straehler-Pohl I. 2019.** World Atlas of Jellyfish: Scyphozoa Except Stauromedusae. Dölling und Galitz Verlag, Germany. 815P.
- Jouiaei M., Yanagihara A.A., Madio B., Nevalainen T.J., Alewood P.F. and Fry B.G. 2015.** Ancient venom systems: A review on Cnidaria toxins. Toxins, 7: 2251–2271. doi: 10.3390/toxins7062251
- Kanwal R., Gupta K. and Gupta S. 2015.** Cancer Epigenetics: An Introduction. Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis. Humana Press, Brazil. 325P.

- Kumawat T., Saravanan R., Vinod K., Jaiswar A.K., Deshmukhe G., Shenoy L., Divu D., Joshi K.K. and Gopalakrishnan A. 2023.** Jellyfish fisheries along the Gujarat coast, India: Status and challenges. *Marine Policy*, 150: 1–10.
- Lee H., Bae S.K., Kim M., Pyo M.J., Kim M., Yang S., Won C.K., Yoon W.D., Han C.H. and Kang C. 2017.** Anticancer effect of *Nemopilema nomurai* jellyfish venom on HepG2 cells and a tumor xenograft animal model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017: 1–12 (2752716). doi: 10.1155/2017/2752716
- Luddecke T., Paas A., Harris R.J., Talmann L., Kirchhoff K.N., Billion A., Hardes K., Steinbrink A., Gerlach D. and Fry B.G. 2023.** Venom biotechnology: Casting light on nature's deadliest weapons using synthetic biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11: 1–17 (1166601). doi: 10.3389/fbioe.2023.1166601
- Maduraiveeran H., Raja K. and Chinnasamy A. 2021.** Antiproliferative and antioxidant properties of nematocysts crude venom from jellyfish *Acromitus flagellatus* against human cancer cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28: 1954–1961. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.12.047
- Mariottini G.L. 2014.** Hemolytic venoms from marine cnidarian jellyfish— An overview. *Journal of Venom Research*, 5: 22–32.
- Mariottini G.L. and Pane L. 2013.** Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins*, 6: 108–151. doi: 10.3390/toxins6010108
- Merquiol L., Romano G., Ianora A. and D'Ambra I. 2019.** Biotechnological applications of Scyphomedusae. *Marine Drugs*, 17(11): 1–26 (604). doi: 10.3390/md17110604
- Nevalainen T.J., Peuravuori H.J., Quinn R.J., Llewellyn L.E., Benzie J.A., Fenner P.J. and Winkel K.D. 2004.** Phospholipase A2 in cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)*, 139: 731–735. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.09.006
- Nisa S.A., Govindaraju K., Vasantharaja R., Kannan M. and Raja K. 2023a.** Jellyfish *Acromitus flagellatus* (Maas) nematocyst venom-mediated biogenic synthesis of gold nanoparticles and its anti-proliferative effects. *Aquaculture International*, 31(4): 1–10. doi: 10.1007/s10499-023-01081-z
- Nisa S.A., Vasantharaja R. and Govindaraju K. 2023b.** Antioxidant and anticancer activities of nematocyst venom protein of five scyphozoan *Chrysaora* jellyfish's species from

- the coastal waters of Tamil Nadu, India. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1(1): 1–11. doi: 10.1007/s13399-023-04206-9
- Parodi A., Bassi A., Catalano M., Giacco E., Mariottini G. and Pane L. 2009.** Cytotoxic effect on human keratinocytes of crude extracts from planktonic Cnidaria. *Journal of Biological Research-Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 82: 11–23. doi: 10.4081/jbr.2009.4734
- Pitt K.A. and Lucas C.H. 2014.** *Jellyfish Blooms*. Springer, Netherlands. 554P.
- Ranasinghe R., Wijesekara W., Perera P., Senanayake S., Pathmalal M. and Marapana R. 2022.** Nutritional value and potential applications of jellyfish. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 31: 445–482. doi: 10.1080/10498850.2022.2060717
- Schroy P.C., Brown-Shimer S., Kim K., Johnson K.A., Murnane M.J., Yang S., O'Brien M.J., Carney W.P. and Kupchik H.Z. 1995.** Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* 76(2): 201–209. doi: 10.1002/1097-0142(19950715)76:2<201::aid-cnrcr2820760207>3.0.co;2-t
- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E. and Jemal A. 2021.** Cancer statistics, 2021. *Cancer Journal for Clinicians*, 71: 7–33. doi: 10.1007/s13399-023-04556-9
- Siegel R.L., Miller K.D., Goding Sauer A., Fedewa S.A., Butterly L.F., Anderson J.C., Cercek A., Smith R.A. and Jemal A. 2020.** Colorectal cancer statistics, 2020. *Cancer Journal for Clinicians*, 70: 145–164. doi: 10.3322/caac.21601
- Uk L. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Vincent J.B. 1999.** Mechanisms of chromium action: Low-molecular-weight chromium-binding substance. *Journal of the American College of Nutrition*, 18: 6–12. doi: 10.1080/07315724.1999.10718821
- Wild C., Weiderpass E. and Stewart B.W. 2020.** *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. International Agency for Research on Cancer, USA. 212P.
- Young G.A. and Hagadorn J.W. 2010.** The fossil record of cnidarian medusae. *Palaeoworld*, 19: 212–221. doi: 10.1016/j.palwor.2010.09.014



Research Paper

Investigating the cytotoxic properties of *Chrysaora hysoscella* jellyfish venom against human colon cancer cells

Asghar Mohammadzadeasl^{1*}, Hossein Zolgharnain², Soheila Matroodi³, Fatemeh Tahoori⁴, Zahra Salehi-Najafabadi⁵

DOI: 10.22124/japb.2024.26396.1523

Received: January 2024

Accepted: March 2024

Abstract

Jellyfish venom contains a variety of compounds including several potential therapeutic properties. The present study investigates the venom of *Chrysaora hysoscella* jellyfish and analyzes its cytotoxic properties. The fractions of *C. hysoscella* jellyfish venom were purified using HPLC method, and their molecular weight was determined by SDS-PAGE method. The cytotoxic properties of the fractions were evaluated using the MTT method against HCT116 and Caco-2 cancer cell lines as well as RAW 264.7 normal cells. Based on the obtained results, the raw venom of *C. hysoscella* had 10 fractions with a molecular weight of 15 to 170 kilodaltons, of which fraction 2 had a strong cytotoxic effect against the studied cancer cell lines. The value of IC₅₀ against HCT116 and Caco-2 cells was 63.21 and 64.36 µg/mL, respectively, while against RAW 264.7 cells, it was 122.88 µg/mL. The obtained results revealed the specific cytotoxic property of fraction 2 against colon cancer cells, while its cytotoxic effect on normal cells was significantly less. These results introduce the fraction 2 as a potential anticancer agent for colon cancer.

Key words: *Jellyfish, Chrysaora hysoscella, Colon Cancer, Cytotoxicity.*

1- Ph.D. Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

2- Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

4- Assistant Professor in Organic Chemistry, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

5- Assistant Professor in Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

*Corresponding Author: amohammadzade218@gmail.com