

Cytotoxic effect of the extract of seaweed *Sargassum glaucescens* against breast (MCF-7) and colorectal (HT-29) cancer cell lines

Taheri A^{1*}, Ghaffari M¹, Bavi Z², Soheili F²

1- Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, I. R. Iran.

2- Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, I. R. Iran.

Received: 2017/10/23 | Accepted: 2018/06/18

Abstract:

Background: Seaweed is one of the natural resources with a wide range of secondary metabolites, which has cytotoxic properties. The present study aimed to investigate the cytotoxic effect of seaweed *Sargassum glaucescens* collected from Chabahar seashores against colorectal and breast cancer cells.

Materials and Methods: The cytotoxicity of methanol, chloroform, ethyl-acetate and hexane extracts of the seaweed at different concentrations (125, 250, 500 and 1000 µg/ml) against cancer cells of MCF-7 and HT-29 was evaluated by MTT and trypan blue methods. The DNA fragmentation of cells was also investigated by the electrophoresis method.

Results: The percentage of live cells was decreased by increasing the concentration of the extracts. The concentration of 1000 µg/ml of methanol extract showed the highest effect compared to the control and also lower concentrations of the extract ($P < 0.05$). The LC_{50} of the methanol extracts of colorectal and breast cancer cells were 630.8 ± 16.37 and 774.01 ± 28.07 µg/ml, respectively. Also, the algal methanol extract was able to fragment the DNA of cancer cells and to induce apoptosis compared with the control samples.

Conclusion: The cytotoxic effect of the seaweed extract can be the beginning of further studies to achieve cancer treatment. Also, after pre-clinical and clinical studies, these extracts can be used in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Cytotoxicity, Marine algae *Sargassum glaucescens*, Apoptosis, Breast cancer cell, Colorectal cancer cell

* Corresponding Author.

Email: taherienator@gmail.com

Tel: 0098 912 648 7417

Fax: 0098 543 532 4264

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2018; Vol. 22, No 3, Pages 292-301

Please cite this article as: Taheri A, Ghaffari M, Bavi Z, Soheili F. Cytotoxic effect of seaweed (*Sargassum glaucescens*) extract against breast (MCF-7) and colorectal (HT-29) cancer cell lines. *Feyz* 2018; 22(3): 292-301.

اثر سمیت سلولی عصاره جلبک دریایی *Sargassum glaucescens* علیه رده سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) و کولورکتال (HT-29)

علی طاهری^{۱*}، مصطفی غفاری^۲، زینب باوی^۳، فریبرز سهیلی^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: جلبک‌های دریایی یکی از منابع طبیعی با طیف گسترده از متابولیت‌های ثانویه جدید می‌باشند که خواص سمیت سلولی دارند. پژوهش حاضر با هدف بررسی سمیت سلولی عصاره جلبک دریایی *Sargassum glaucescens* جمع‌آوری شده از سواحل چابهار علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال و پستان انجام شد.

مواد و روش‌ها: بررسی سمیت سلولی عصاره‌های متانولی، کلروفرمی، اتیل استاتی و آن‌هگزانی جلبک دریایی در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به روش‌های MTT و تریپان بلو علیه سلول‌های سرطانی MCF-7 و HT-29 انجام شد. قطعه‌قطعه شدن DNA سلول‌ها نیز با روش الکتروفورز بررسی شد.

نتایج: با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد زنده‌مانی کاهش یافت. غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی بیشترین اثر را نسبت به کنترل و نیز غلظت‌های کمتر عصاره نشان داد ($P < 0.05$). میزان LC_{50} عصاره متانولی سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه به ترتیب 630.18 ± 163.37 و 774.01 ± 28.07 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین، عصاره متانولی جلبک در مقایسه با نمونه کنترل قادر به قطعه‌قطعه کردن DNA سلول‌های سرطانی و القاء آپوپتوز بود.

نتیجه‌گیری: اثر سمیت سلولی عصاره جلبک مشاهده شده می‌تواند آغازی برای انجام مطالعات بعدی به منظور دست‌یابی درمان سرطان باشد. همچنین، پس از انجام مطالعات پیش‌کلینیکی و کلینیکی می‌توان از این عصاره‌ها در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سمیت سلولی، جلبک دریایی *Sargassum glaucescens*، آپوپتوز، سلول سرطانی سینه، سلول سرطانی کولورکتال
دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۷، صفحات ۲۹۱-۲۹۲

مقدمه

روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که از میان آنها می‌توان به جراحی، رادیوتراپی، و شیمی‌درمانی اشاره داشت [۶]. داروهای شیمی‌درمانی اثرات جانبی مانند خون‌ریزی و سرکوب سیستم ایمنی دارند [۳]. بنابراین مطالعه و بررسی عواملی با منشأ طبیعی و اثرات مضر کمتر، یکی از مهم‌ترین اهداف تحقیق در حوزه درمان سرطان است [۷]. تلاش‌های گسترده‌ای جهت یافتن روش‌های درمانی مناسب و اثربخش آغاز شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی اثرات سمیت سلولی ترکیبات استخراج شده از گیاهان اشاره نمود [۸]. جلبک‌های دریایی از جمله غنی‌ترین منابع طبیعی می‌باشند [۹]. جلبک‌ها غنی از فیبرهای غذایی، پروتئین‌ها، مواد معدنی، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، اسید-های چرب غیراشباع، ترکیبات فعال زیستی مانند فیکوسیائین، تریپن‌ها، فوکوسترول‌ها و فنول‌ها می‌باشند [۱۰]. آلکالوئیدها، تریپتوئیدها و فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که دارای اثر ضد سرطانی می‌باشند [۱۱]. شواهد نشان می‌دهد که مواد زیست‌فعال حاصل از جلبک‌ها اثرات ضد سرطان را از طریق مکانیسم‌های عملکردی چندگانه، از جمله مهار رشد سلول سرطانی، تهاجم و متاستاز و القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی ایجاد می‌کنند [۳]. در مطالعات درون‌تنی انجام شده روی مدل‌های حیوانی رژیم غذایی کلب و دیگر جلبک‌های قرمز و سبز

سرطان از جمله بیماری‌های مزمن است که در هر فرد و در هر گروه سنی رخ می‌دهد و بر سلامت جامعه اثر دارد [۱]. سرطان سینه علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در میان زنان سراسر جهان است [۲]. سرطان روده بزرگ نیز یکی دیگر از سرطان‌ها در زنان و مردان به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه است و با حدود ۱/۴ میلیون مورد جدید ابتلا در سال ۲۰۱۲، سومین سرطان شایع در جهان بوده است [۳]. آمارها نشان می‌دهند شیوع سرطان روده بزرگ در ایران رو به افزایش است [۴]. علی‌رغم انجام تحقیقات بسیار در مورد سرطان، هنوز هم این بیماری به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات سلامت جوامع انسانی مطرح می‌باشد [۵].

^۱ دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران
^۲ دانشیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
^۳ کارشناس ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
^۴ مربی، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

چابهار، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

دوره‌نویس: ۰۵۴۳۵۳۲۳۱۷۴

تلفن: ۰۹۱۲۶۴۸۷۴۱۷

پست الکترونیکی: taherientor@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۳/۲۸/۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱

مواد و روش‌ها

این مطالعه برون‌تنی در آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انجام شد. میزان ۲۰ کیلوگرم جلبک قهوه‌ای *Sargassum glaucescens* در ماه‌های آبان تا اسفند سال ۱۳۹۴ از مناطق بین جزر و مدی ایستگاه ساحل تیس (با طول جغرافیایی ۶۰ درجه و ۳۶ دقیقه و عرض جغرافیایی ۲۵ درجه و ۲۱ دقیقه) از فواصل ۱۰۰ متری به‌میزان حداقل ۲ کیلوگرم از هر ایستگاه در شهرستان چابهار جمع‌آوری شده و پس از پاک‌سازی و شست‌وشوی اولیه با آب دریا، برای از بین بردن رسوبات اضافی به آزمایشگاه انتقال داده شده و مجدداً با نسبت یک به یک با آب شیرین شست‌وشو شد. نمونه‌ها براساس کلید شناسایی معتبر و توسط متخصص گیاه‌شناسی دانشگاه مورد تأیید قرار گرفتند. در مرحله بعد و به‌منظور تهیه پودر از جلبک، نمونه‌ها به روش هوا-خشک، خشک شد. عصاره‌گیری با استفاده از ۴ حلال متانول، کلروفرم، اتیل‌استات و آن‌هگزان انجام شد. جهت تهیه هریک از عصاره‌ها مقدار ۲۵ گرم از پودر آماده شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال مخلوط گردیده و به‌مدت ۲۴ ساعت در شیکر قرار داده شد. عصاره حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در زیر هود حلال آن به‌طور کامل تبخیر شد. عصاره خالص پس از جمع‌آوری و توزین، تا انجام آزمون‌های سنجشی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۲]. رده‌های سلولی سرطانی سینه (MCF-7) و کولورکتال (HT-29) از بانک سلول-های ایران تهیه گردیده و برای رشد در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی نگهداری شد. مقدار ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین به محیط کشت اضافه شد. رده‌های سلولی سرطانی مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و میزان رطوبت ۸۰ درصد در انکوباتور کشت داده شدند [۲۳]. جهت تعیین فعالیت حیاتی سلول‌ها ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول تریپان بلو (۰/۱ درصد جرمی / حجمی) با ۰/۱۵ مول PBS در یک چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی مخلوط شد. بلافاصله با کمک یک هموسایتمتر (لام نئوبار) تعداد سلول‌های رنگ گرفته (مرده) و سلول‌های رنگ نشده (زنده) تعیین شد. سپس، به کمک فرمول زیر درصد فعالیت حیاتی مورد محاسبه قرار گرفت [۲۴]:

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده} \times 100}{\text{تعداد سلول‌های شمارش شده}}$$

سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه به‌میزان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلول در هر چاهک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵ درصد دی‌اکسید کربن به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس،

اثرات محافظتی را علیه سرطان سینه نشان داده‌اند [۱۲]. عصاره الکی جلبک قرمز (*Gracillaria corticata*)، سبز (*Fasciata*) و قهوه‌ای (*Sargassum ilicifolium*) علیه ۵ رده سلول سرطانی مهم انسانی (MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, HepG2, HT-29) فعالیت ضد تکثیری نشان دادند که وابسته به دوز بود [۱۳]. اثر ضد تکثیری عصاره سه گونه *Kelp setchellii*, *Macrocystis integrifolia*, *Nereocystis leutkeana* روی سلول‌های HeLa با استفاده از روش MTT نشان داده شده است؛ محققین این اثر را به فلوروتائین جلبک‌های فوق نسبت می‌دهند [۱۴]. همچنین، نشان داده شده است که عصاره متانولی *Padina pavoni* علاوه بر داشتن فعالیت سیتوتوکسیک در برابر سلول‌های سرطانی، هیچ‌گونه فعالیت سیتوتوکسیک علیه سلول‌های طبیعی فیروبلست ریه (MRC-5) ندارند [۱۵]. عصاره غنی از فلورو-تائین جلبک قهوه‌ای *Himantothallus grandifolius* نیز سمیت سلولی انتخابی در برابر سلول‌های غیر توموری داشته است [۱۶]. چابهار از شهرستان‌های ساحلی استان سیستان و بلوچستان است [۱۷]. جلبک‌های دریایی در سواحل جزر و مدی آن یافت می‌شوند و در فصول مختلفی از سال قابل بهره‌برداری می‌باشند [۱۸]. با مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۱ صورت گرفت ۱۷ گونه جلبک قهوه‌ای در این منطقه شناسایی شد [۱۹]. سالانه در مناطق مختلف خلیج چابهار از حدود ۵۰۰ تا ۷۰۰ تن گیاه دریایی سارگاسوم به سواحل می‌ریزد [۲۰]. گونه‌های متعدد این جنس در سرتاسر اقیانوس‌های معتدل و گرمسیر جهان پراکنده شده‌اند و معمولاً در آب‌های کم‌عمق و صخره‌های مرجانی زندگی می‌کنند. گونه *Sargassum glaucescens* جزء جلبک‌های قهوه‌ای دسته‌بندی می‌شود. محل رویش جلبک در ایران معمولاً در اعماق ۲ تا ۳ متر روی سطح بسترهای صخره‌ای می‌باشد. پراکنش این جلبک کم‌و-بیش در استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان (مناطق گواتر، رمین، چابهار، پزم و تنگ) در فصول پاییز و زمستان می‌باشد [۲۱]. مطالعه‌های متعددی روی اثر سمیت سلولی عصاره‌های آلی جنس *Sargassum sp*. علیه سلول‌های سرطانی مختلف به ثبت رسیده است [۱۳، ۲۸-۳۱]. اما مطالعه روی سمیت سلولی عصاره جلبک دریایی *Sargassum glaucescens* موجود نیست. باتوجه به- وجود منابع غنی جلبک‌های دریایی در سواحل دریای عمان و اهمیت کار در حوزه زیست‌فناوری فرآورده‌های دریایی و ضرورت دستیابی به داروهای ضد سرطان با منشأ طبیعی، در این مطالعه به بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره‌های آلی جلبک *Sargassum glaucescens* سواحل چابهار پرداخته شد.

ژل آگاروز ۲ درصد در ولتاژ ۱۰۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شد [۲۶]. نتایج آزمایشگاهی به صورت میانگین \pm انحراف معیار در سه تکرار انجام شد. از آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی-داری ۰/۰۵ جهت بررسی‌ها استفاده شد و مقایسه میانگین با آزمون توکی انجام شد. از نرم‌افزار Graphpad Prism 5 استفاده شد.

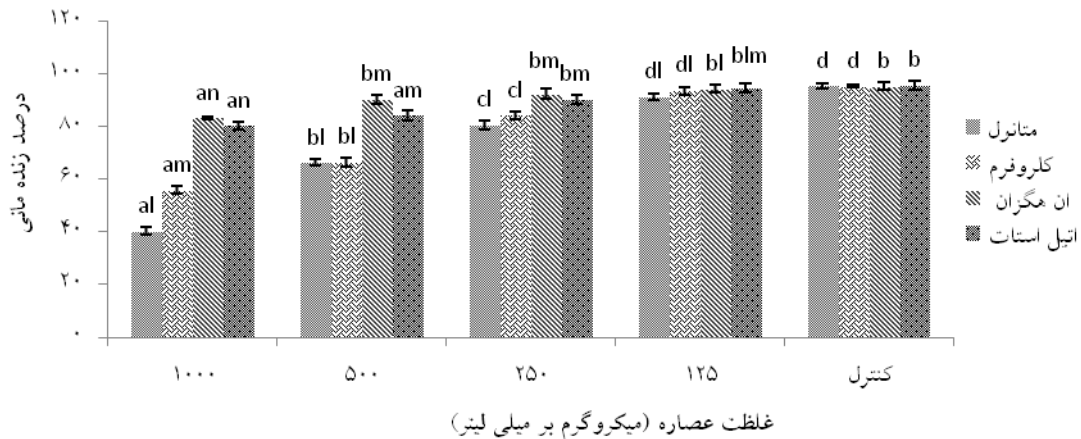
نتایج

باتوجه به نمودار شماره ۱ غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی جلبک *S. glaucescens* با زنده‌مانی $40/22 \pm 1/45$ درصد و نیز در سایر غلظت‌ها در مقایسه با نمونه کنترل، بیشترین تاثیر را بر سلول‌های سرطانی کولورکتال داشت. عصاره کلروفومی با $40/34 \pm 1/49$ درصد زنده‌مانی در مقام بعدی بود. عصاره‌های اتیل‌استاتی و آن‌هگزانی به ترتیب با $80/33 \pm 1/55$ و $83/4 \pm 0/41$ درصد کمترین اثر را بر سلول‌های سرطانی نشان دادند. براساس نمودار شماره ۲ درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سینه نیز در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم عصاره متانولی با $44/78 \pm 1/88$ درصد و در دیگر غلظت‌ها بیشترین تاثیر را بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی داشتند. عصاره کلروفومی و اتیل‌استاتی به ترتیب با $57/22 \pm 1/12$ و $69/21 \pm 1/67$ درصد در مقام‌های بعدی قرار گرفتند و در سایر غلظت‌ها نیز این روند مشاهده شد. عصاره آن‌هگزانی نیز در همه غلظت‌ها کمترین اثر را داشت. جداول شماره ۱ و ۲ درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه را در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره‌های جلبک *S. glaucescens* و نمونه کنترل با استفاده از روش MTT نشان می‌دهند. بر اساس جدول شماره ۱ عصاره متانولی ($27/17 \pm 1/23$ درصد) بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشت و کلروفوم ($41/11 \pm 1/44$ درصد) در مقام بعدی بود. کمترین اثر مربوط به عصاره‌های آن‌هگزانی ($77/9 \pm 1/21$ درصد) و اتیل‌استاتی ($69/44 \pm 1/48$ درصد) بود. درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان سینه نیز در جدول شماره ۲ آورده شده است؛ عصاره متانولی ($39/67 \pm 1/99$ درصد) بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشت و عصاره‌های کلروفومی ($50/66 \pm 3/12$ درصد) و اتیل-استاتی ($60/11 \pm 1/22$ درصد) در مقام بعدی بودند. کمترین اثر مربوط به عصاره آن‌هگزانی ($81/29 \pm 2/11$ درصد) بود.

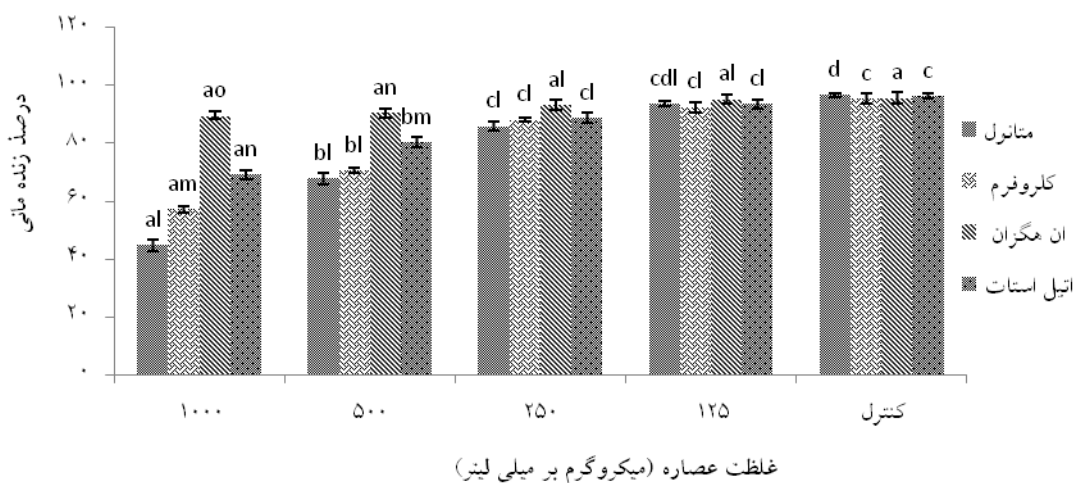
سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از هر ۴ عصاره جلبکی (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کنترل به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از این مدت به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید. سپس، پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. بعد از گذشت ۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن محتویات رویی، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد تا فورمازان حاصل حل گردد. پلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد و سپس جذب نوری فورمازان در ۶۳۰-۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا خوانده شد [۲۵]. برای هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها نیز دو بار تکرار گردید. برای محاسبه درصد مرگ سلول‌ها از فرمول زیر استفاده گردید:

$$\text{درصد مرگ سلول} = \frac{\text{میانگین جذب تست}}{\text{میانگین جذب کنترل}} \times 100$$

برای بررسی قطعه‌قطعه شدن DNA، با توجه به غلظت LC_{50} محاسبه شده، سلول‌های سرطانی سینه و کولورکتال در سه غلظت از عصاره متانولی جلبک تیمار شده و بعد از ۴۸ ساعت با محلول PBS شست‌وشو و سپس تریپسین گردید. سوسپانسیون سلولی در ۴۰۰g سانتریفیوژ شد و به رسوب حاصل ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز-کننده (حاوی ۱۰ میلی‌مول HCl-Tris با pH=۷/۵، ۴۰۰ میلی-مول NaCl، ۱۰۰ میلی‌مول EDTA و ۰/۶ درصد SDS) و ۱۰ میکرولیتر محلول RNAase اضافه گردید. در مرحله بعد محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول نمک طعام ۶ مولار به‌عنوان رسوب-دهنده پروتئین اضافه شد. محلول به‌دست آمده به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شده و سپس در ۱۸۰۰۰g در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جمع‌آوری شده و به آن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ مجدداً انکوبه شد و در نهایت در ۱۸۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل با ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شست‌وشو شده و در دمای اتاق خشک شد. در ادامه در ۲۰۰ میکرولیتر بافر (۱۰ میلی‌مول Tris-HCl و Tris-EDTA با pH=۸ و ۱ میلی‌مول EDTA) حل گردید. DNA با استفاده از



نمودار شماره ۱- مقایسه زنده‌مانی سلول‌های سرطان کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های جلبک *S. glaucescens* تعیین شده با تست تریپان بلو. حروف a,b,c,d اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های هر عصاره و حروف l,m,n اختلاف معنی‌دار بین حلال‌ها را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف هم‌نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد می‌باشد.



نمودار شماره ۲- مقایسه زنده‌مانی سلول‌های سرطان سینه در مواجهه با غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های جلبک *S. glaucescens* تعیین شده با تست تریپان بلو. حروف a,b,c,d اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های هر عصاره و حروف l,m,n اختلاف معنی‌دار بین حلال‌ها را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف هم‌نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد می‌باشد.

جدول شماره ۱- درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک *S. glaucescens* با روش

MTT				
اتیل استاتی	ان هگزانی	کلروفرمی	متانولی	عصاره غلظت
۶۹/۴۴±۱/۴۸ ^{ao}	۷۷/۹±۱/۲۱ ^{ap}	۴۱/۱۱±۱/۴۴ ^{am}	۲۷/۱۷±۱/۲۳ ^{al}	۱۰۰۰
۷۹/۳۴±۲/۲۵ ^{bm}	۸۷/۵۴±۱/۱۱ ^{bn}	۵۸/۳۳±۱/۸۸ ^{bl}	۵۴/۱۹±۰/۸۹ ^{bl}	۵۰۰
۸۸/۱۶±۲/۱۹ ^{cm}	۹۱/۲۳±۱/۷۴ ^{bm}	۷۷/۱۷±۱/۲۷ ^{cl}	۷۵/۷۷±۱/۲۰ ^{cl}	۲۵۰
۹۵/۱۲±۱/۰۹ ^{dlm}	۹۲/۲۵±۲/۱۳ ^{bl}	۸۹/۷۶±۰/۴۳ ^{dl}	۸۷/۹۱±۱ ^{dl}	۱۲۵
۹۶±۱/۸۸ ^d	۹۳/۱۶±۰/۲۳ ^b	۹۵/۱۹±۱/۰۷ ^d	۹۴/۲۸±۲/۱۱ ^d	کنترل

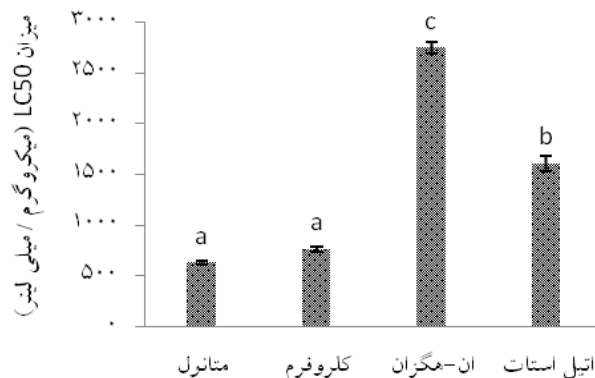
جدول شماره ۲- درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سینه در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک *S. glaucescens* با روش MTT

عصاره غلظت	متانولی	کلروفومی	ان‌هگزانی	اتیل استاتی
۱۰۰۰	۳۹/۶۷±۱/۹۹ ^{al}	۵۰/۶۶±۳/۱۲ ^{am}	۸۱/۲۹±۲/۱۱ ^{ao}	۶۰/۱۱±۱/۲۳ ^{an}
۵۰۰	۶۱/۲۲±۱/۱۱ ^{bl}	۶۷/۳۲±۱/۶۵ ^{bl}	۸۸/۳۳±۲/۲۲ ^{bn}	۷۷/۳۳±۱/۲۲ ^{bm}
۲۵۰	۸۰/۱۱±۱/۷۷ ^{cl}	۷۹/۱۲±۲/۳۳ ^{cl}	۹۰/۲۲±۱/۴۴ ^{bm}	۸۰/۵۵±۱/۲۲ ^{bl}
۱۲۵	۹۰/۹۱±۱/۲۳ ^{dl}	۹۲/۴۴±۱/۲۲ ^{dl}	۹۴/۲۲±۰/۵۵ ^{blm}	۹۰/۹۸±۱/۲۰ ^{cl}
کنترل	۹۵/۲۲±۱/۶۶ ^{cd}	۹۶/۲۲±۱/۴۴ ^{cd}	۹۵/۱۶±۱/۸۸ ^b	۹۶±۰/۷۵ ^c

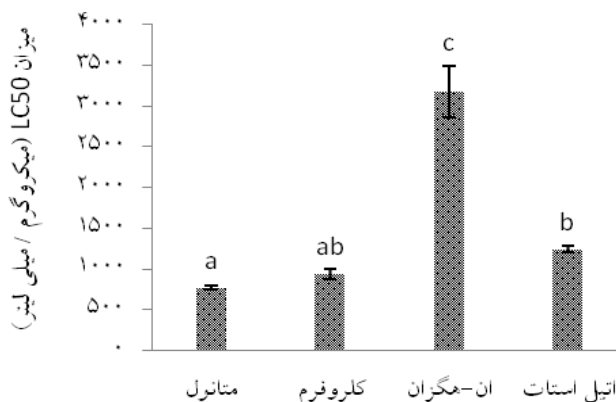
نتایج به صورت انحراف معیار± میانگین نشان داده شده است. حروف a,b,c,d اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف I,II,III,O اختلاف معنی‌دار در هر ردیف را نشان می‌دهند. وجود حداقل یک حرف هم‌نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد می‌باشد.

فرمی (۷۵۹/۵۸±۲۸/۳۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و برای سلول‌های سرطانی سینه نیز مربوط به عصاره‌های متانولی (۷۷۴/۰۱±۲۸/۰۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کلروفومی (۹۳۹±۵۹/۴۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود.

میزان LC₅₀ عصاره‌های جلبک *S. glaucescens* برای سلول‌های سرطان کولون و سینه در نمودارهای شماره ۳ و ۴ آورده شده است. کمترین میزان برای سلول‌های سرطانی کولورکتال مربوط به عصاره متانولی (۶۳۰/۸±۱۶/۳۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کلرو-



نمودار شماره ۳- میزان LC₅₀ عصاره‌های جلبک *S. glaucescens* برای سلول‌های سرطان کولورکتال

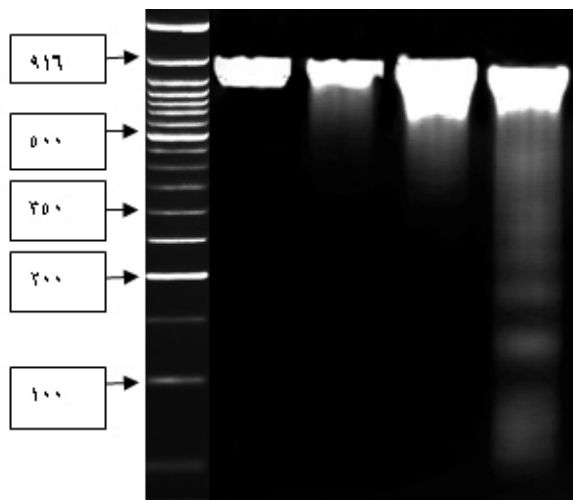


نمودار شماره ۴- میزان LC₅₀ عصاره‌های جلبک *S. glaucescens* برای سلول‌های سرطان سینه

با توجه به میزان LC₅₀ تعیین شد که مقادیر مربوطه برای سلول‌های سرطانی کولورکتال به ترتیب برابر با ۹۷۴، ۷۷۴ و ۵۷۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای سلول‌های سرطانی سینه نیز به ترتیب

نتایج حاصل از تیمار سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک *S. glaucescens* در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است. سه غلظت زیاد، متوسط و کم

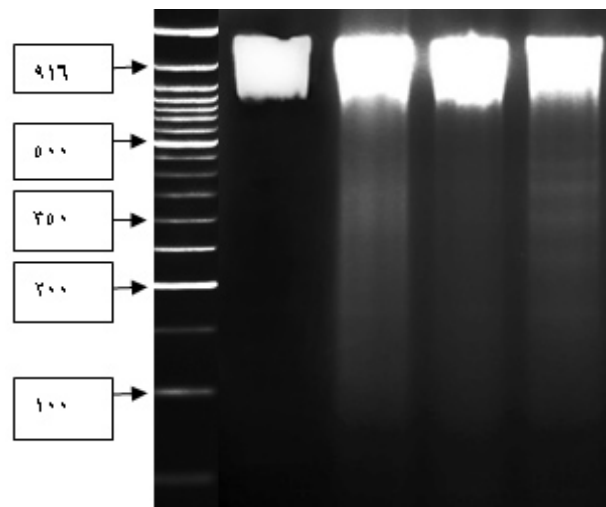
در مقایسه با نمونه کنترل قادر به قطعه‌قطعه کردن DNA سلول-های سرطانی و القاء آپوپتوز شد.



۱ ۲ ۳ ۴ ۵

شکل شماره ۲- تصویر الکتروفورز قطعه‌قطعه شدن DNA سلول سرطانی کولورکتال در مواجهه با عصاره متانولی جلبک *Sargassum glaucescens*: ۱: Ladder، ۲: کنترل، ۳: غلظت کم عصاره، ۴: غلظت متوسط، ۵: غلظت زیاد

برابر با ۸۳۰، ۶۳۰ و ۴۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. براساس تصاویر غلظت زیاد عصاره متانولی جلبک در هر دو رده سرطانی



۱ ۲ ۳ ۴ ۵

شکل شماره ۱: تصویر الکتروفورز قطعه‌قطعه شدن DNA سلول سرطانی سینه در مواجهه با عصاره متانولی جلبک *Sargassum glaucescens*: ۱: Ladder، ۲: کنترل، ۳: غلظت کم عصاره، ۴: غلظت متوسط، ۵: غلظت زیاد

بیشترین تاثیر را بر سلول‌های سرطانی کولورکتال داشت. عصاره-های کلروفومی و اتیل‌استاتی در مقام بعدی بودند. عصاره ان-هگزانی کمترین اثر را بر سلول‌های سرطانی از خود نشان داد. درصد زنده‌مانی برای سرطان سینه در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای عصاره متانولی، $44/78 \pm 1/88$ درصد، عصاره کلرو-فرمی $57/22 \pm 1/12$ درصد، اتیل‌استاتی $69/21 \pm 1/67$ درصد، و عصاره ان‌هگزانی $89/56 \pm 1/34$ درصد بود. براساس نتایج بیان شده در روش تریپان بلو، درصد زنده‌مانی هر دو رده سرطانی براساس بیشترین اثر بر سلول‌ها از روند زیر پیروی کرد: متانولی < کلروفومی < اتیل‌استاتی < ان‌هگزانی. نتایج تریپان بلو حاصل بیان‌گر وجود خواص سمیت سلولی در همه عصاره‌ها بود، اما میزان اثر هر عصاره متفاوت بود. این روش نشان داد که جلبک *Sargassum glaucescens* اثر سمیت سلولی مشخصی دارد. روش MTT روش دقیق دیگری است که با استفاده از نمک زرد رنگ ترازولیوم بقاء سلول‌ها را بررسی می‌کند [۲۷]. نتایج حاصل از روش MTT نشان دادند که درصد زنده‌مانی کنترل بین ۹۲ تا ۹۶ درصد است. در این روش نیز با کاهش غلظت عصاره در فاز محلول زنده‌مانی سلول‌های سرطانی افزایش یافت. تاثیر غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های جلبک روی هر دو سلول

بحث

کشف محصولات طبیعی و متابولیت‌های جدید استخراج شده از میکروارگانیسم‌ها، حیوانات و گیاهان با اثربخشی بالا در برابر سلول‌های توموری بدون هرگونه سمیت روی سلول‌های طبیعی یک جهش بزرگ در پژوهش‌های علمی به‌شمار می‌آید [۲۲]. از طرفی سنجش میزان تکثیر و بقاء سلول‌های سالم و سرطانی در تعیین میزان اثر داروهای ضد سرطان طبیعی امری مهم به‌نظر می‌رسد و در این خصوص روش‌های متعددی معرفی شده است. امروزه از روش‌های رنگ‌سنجی به‌خاطر سهولت در به-کارگیری و دقت کافی در حصول نتایج بیشتر استفاده می‌کنند [۱۵]. در این مطالعه فعالیت حیاتی سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک *Sargassum glaucescens* و تیمار بدون عصاره بررسی و درصد زنده‌مانی محاسبه گردید. درصد زنده‌مانی نمونه‌های کنترل بین ۹۳ تا ۹۶ درصد بود. براساس نتایج، درصد زنده‌مانی سلول-های سرطانی با غلظت عصاره‌ها رابطه معکوس داشته و با افزایش غلظت عصاره‌ها زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد. غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی با سایر عصاره-ها دارای اختلاف معنی‌دار بود و با زنده‌مانی $40/22 \pm 1/45$ درصد

داده‌اند که سارگاسوم می‌تواند منبع ترکیبات متعدد زیست‌فعال از جمله استروئیدها، فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدها، تریپتوئیدها، اسید-های چرب، پلاستوکوئینون و تانین‌ها باشند که برای هریک فعالیت‌های زیستی مختلفی گزارش شده است [۳۱]. آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی و کاملاً کنترل شده موضوعی است که برای درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۰]. از خصوصیات بارز آپوپتوز، قطعه‌قطعه شدن DNA و هسته می‌باشد. لذا به‌منظور اثبات تاثیر عصاره جلبکی بر وقوع آپوپتوز در سلول‌های سرطانی در این مطالعه از آزمون قطعه‌قطعه شدن DNA استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه با عصاره متانولی در غلظت‌های زیاد، متوسط و کم به مدت ۴۸ ساعت باعث قطعه‌قطعه شدن و تغییر در الگوی DNA گردید. طبق شکل‌های شماره ۱ و ۲ DNA سلول‌های تیمار شده با عصاره متانولی به‌صورت لکه (smear) روی ژل الکتروفورز دیده می‌شود که این حالت در سلول‌های کنترل مشاهده نشد. باند های حاصل از عصاره جلبک بیان‌گر توانایی عصاره‌ها در قطعه‌قطعه کردن DNA می‌باشد. در بسیاری از پژوهش‌ها تنوعی از حلال‌ها برای عصاره‌گیری به‌منظور انجام فعالیت‌های پژوهشی در جلبک‌ها استفاده می‌شود. باین وجود، هنوز مشخص نیست که کدام نوع حلال برای عصاره‌گیری موثرتر است [۳۲]. در مطالعه حاضر چنین به‌نظر می‌رسد که حلال متانولی نسبت به سایر حلال‌ها توانایی بیشتری در استخراج این ترکیبات موثر دارد و این می‌تواند ناشی از ساختار شیمیایی و میزان قطبیت اجزاء سازنده جلبک‌ها و حلال باشد. در بین چهار حلال استفاده شده، متانول بیشترین قطبیت را داشته، کلروفورم و اتیل‌استات حلال‌هایی با میزان قطبیت متوسط و آن‌هاگزان با قطبیت ناچیز گزارش شده‌اند [۳۲].

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان می‌دهد که عصاره جلبک مورد مطالعه در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیر معنی‌داری بر کاهش زنده‌مانی هر دو رده سلول سرطانی کولورکتال و پستان داشت. از یافته‌های این تحقیق می‌توان برای پژوهش‌های بیشتر جهت شناسایی، جداسازی و مشخص کردن ترکیبات مسئول فعالیت‌های سمیت سلولی استفاده کرد. همچنین، می‌توان از آن در مطالعات پیش-کلینیکی و کلینیکی و بررسی اثرات جانبی احتمالی بهره گرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی وزارت علوم تحقیقات و فناوری جهت حمایت در قالب طرح پژوهشی شماره ۳/۸۲۶۰۱ و

سرطانی با سایر غلظت‌ها و نمونه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت. همچنین، در همه موارد تاثیر عصاره متانولی روی سلول سرطانی سینه در مقایسه با سایر عصاره‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). در روش MTT نیز مانند روش تریپان بلو همان روند بر عصاره‌ها حاکم بود و عصاره‌های متانولی و آن‌هاگزان به‌ترتیب کمترین و بیشترین درصد زنده‌مانی را نشان دادند. علاوه براین روش MTT درصد زنده‌مانی کمتری را برای همه عصاره‌ها ثبت کرد. لذا با توجه به نتایج می‌توان گفت که دقت روش MTT نسبت به تریپان بلو بیشتر و کاربرد آن راحت‌تر و سریع‌تر می‌باشد. تحقیقات فراوانی در مورد گونه‌های مختلف جنس سارگاسوم صورت گرفته، ولی از آنجا که تا زمان انجام این بررسی مطالعه‌ای که به‌طور ویژه به بررسی خواص سمیت سلولی جلبک *Sarga-ssum glaucescens* پرداخته باشد، یافت نشد لذا امکان مقایسه وجود ندارد و تنها می‌توان به نتایج حاصل از مطالعات انجام شده روی گونه‌های هم‌جنس جلبک اشاره کرد. نتایج حاصل از بررسی عصاره متانولی جلبک *Sargassum muticum* علیه رده‌های سلول سرطانی MCF-7 و MDA-MB-231 نشان داد که عصاره دارای اثر سمیت سلولی بوده و کارایی فعالیت ضد تکثیر عصاره جلبک با محتوای پلی‌فنول کل ارتباط مثبت دارد [۱۳]. در تحقیقی دیگر روی سه گونه از این جلبک گزارش شد که گونه *Sargassum swartzii* بیشترین محتوای فنولی را دارد [۲۸]. هتروفوکان‌های استخراج شده از *Sargassum filipendula* اثر ضد تکثیر علیه رده‌های سلولی سرطان‌های پروستات، رحم و کبد نشان داده‌اند. بر اساس گزارش محققین فوکوزانتین و کارتنوئید مانع رشد سلول‌های سرطانی پروستات LNCap می‌شود [۲۹]. فوکویدان‌ها نیز فعالیت‌های مختلفی از جمله ضد فشارخون، ضد تکثیر، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی را نشان داده‌اند. گزارش شده است که فوکویدان‌ها موجب القا آپوپتوز در بسیاری از سلول‌های سرطانی کولون می‌شود [۳۰]. لذا، می‌توان چنین بیان داشت که نتایج حاصل از این مطالعه هم‌راستا با مطالعات قبلی بوده و تایید کننده این مطلب است که ترکیبات موجود در جلبک مورد مطالعه در بروز خواص سمیت سلولی موثر است. ترکیبات اصلی جداسازی شده از جلبک *Sargassum glaucescens* شامل فوکوسترول، ستیگماسترول، بتا-سیتوسترول و کلسترول می‌باشد. کلسترول و فوکوسترول از اصلی‌ترین و بارزترین استرول‌های موجود در جلبک-های قهوه‌ای‌اند. فوکوسترول به‌دلیل اثرات ضد دیابتی و ضد اکسیدانی به‌خوبی شناخته شده است. سیتوسترول نیز ترکیبی است که فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف از جمله ضد سرطان و ضد اکسیدان را نشان داده است [۳۱]. همچنین، مطالعات دیگر نشان

دانشجویی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

نیز دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار جهت حمایت‌های مادی و معنوی از این مطالعه در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد

References:

- [1] Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: An Epidemiological Review. *Breast J* 2007; 13(4): 383–91.
- [2] Moghadaskho F, Ghaffari SH, Ghadami M, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Study of DNA methylation pattern at the tumor suppressor gene RASSF1A promoter in two breast cancer cell lines. *Iran J Breast Dis* 2015; 8(1): 25-33. [in Persian]
- [3] Moussavou G, Kwak DH, Obiang-Obonou BW, Maranguy CA, Dinzouna-Boutamba SD, Lee DH, et al. Anticancer effects of different seaweeds on human colon and breast cancers. *Mar Drugs* 2014; 12(9): 4898-911.
- [4] Azadeh S, Moghimi Dehkordi B, Fatem SR, Pourhoseingholi MA, Ghiasi S, Zali MR. Colorectal cancer in Iran: an epidemiological study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008; 9(1): 123-26.
- [5] Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharm Res* 2010; 27(6): 950–61.
- [6] Shahneh FZ, Valiyari S, Azadmehr A, Hajiaghvae R, Yaripour S, Bandehagh A, et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in fibrosarcoma cell lines by *Echinophora platyloba* DC: In Vitro Analysis. *Adv Pharmacol Sci* 2013; 2013: 512931.
- [7] Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Current Sci* 2001; 80(11): 1387–96.
- [8] Real PJ, Cao Y, Wang R, Nikolovska-Coleska Z, Sanz-Ortiz J, Wang S. Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7947-53.
- [9] Senthilkumara K, Manivasagana P, Venkatesana J, Kima SK. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *Int J Biol Macromol* 2013; 60: 366–74.
- [10] Zorofchian Moghadamtousi S, Karimian H, Khanabdali R, Razavi M, Firoozinia M, Zandi K, et al. Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae. *Sci World J* 2014; 2014.
- [11] Kawashty SA, Mosharrata SA, El-Gibali M, Saleh NA. The flavonoids of four Pistacia species in Egypt. *Biochem Syst Ecol* 2000; 28(9): 915-917.
- [12] Pangestuti R., Kim SK. Biological activities and health benefit effects of natural Biological activities and health benefit effects of natural. *J Functional Foods* 2011; 3(4): 255 –66.
- [13] Namvar F, Baharara J, Mahdi AA. Antioxidant and anticancer activities of selected Persian Gulf algae. *Ind J Clin Biochem* 2014; 29(1): 13-20.
- [14] Yuan YV, Walsh N. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(7):1144–50.
- [15] Stanojković TP, Šavikin K, Zdunić G, Kljajić Z, Grozdanić N, Antić J. In vitro antitumoral activities of *Padina pavonia* on human cervix and breast cancer cell lines. *J Med Plants Res* 2013; 7(8): 419-24.
- [16] Gambato G, Baroni ÉG, Garcia CS, Frassini R, Frozza CO, Moura S, et al. Brown algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) suppresses proliferation and promotes apoptosis mediated cell death in tumor cells. *Advances Biological Chemistry* 2014; 4(02): 98.
- [17] Gharanjik BM, Wynne M, Bangmei X, Khajeh S, Hosseini MR. The biomass of the medicinal red algae (Rhodophyta) in the intertidal zone of the Chabahar coasts. *Iran Sci Fisheries J* 2011; 20(3): 103-14. [in Persian]
- [18] Peymani J, Gharaei A, Ghaffari M, Taheri A. Antibacterial activity of the brown algae (*Sargassum glaucescens*) ethanolic and aqueous extracts from Chabahar coasts, Oman Sea, Iran. *Iran Fish Sci J* 2013; 22(4): 13-20. [in Persian]
- [19] Gharanjik BM. Identification and determination of distribution of marine plants in sub-tidal areas on the Sistan and Baluchestan provinces. *Iran Sci Fisheries J* 2003; 12(3): 127-40. [in Persian]
- [20] Hafezieh M. The nutritional value of the *Sargassum lentifolium* of the Chabahar Bay (Oman Sea) before and after the Manson. *Iran Scientific Fisheries J* 2013; 23(1): 31-41. [in Persian]
- [21] Gharanjik BM, Rohani Ghadikolaei K. Atlas of the sea algae of Persian Gulf and Oman sea coasts. 1th ed. Tehran: Ins. Fisheries Research. 2009: 47-77. [in Persian]
- [22] Lim SN, Cheung PC, Ooi VE, Ang PO. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. *J Agric Food Chem* 2002; 50(13): 3862–6.
- [23] Khanavi M, Nabavi M, Sadati N, Shams ardekhani M, Sohrabipour J, Nabavi, SMB, et al. Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. *J Biological Res-Thessaloniki* 2010; 43(1): 31-7.

- [24] Moldeus T, Hogberg J, Orrhenius S, Fleischer S, Packer L. Trypan blue dye exclusion method. *Meth Enzym* 1978; 52: 60-71.
- [25] Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Lagenhijzen MM. A tetra-zolium-based colorimetric MTT assay to quantitat human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods* 1994; 174(1-2): 311-20.
- [26] Chang LW, Yen WJ, Huang SC, Duh PD. Antioxidant activity of sesame oat. *Food Chem* 2002; 78(3): 347-54.
- [27] Shokrgozar MA, Zali H, Rezaei Tavirani M, Amanzadeh A. Comparison of Two Staining Assays Trypan Blue and MTT in vitro Evaluation of Human Calprotectin Proliferation Inhibition on Human Gastric Cancer Cells. *Kowsar Medic J* 2007; 12: 127-37. [in Persian]
- [28] Sadati N, Khanavi M, Mahrokh A, Nabavi SM, Sohrabipour J, Hadjiakhoondi A. Comparison of antioxidant activity and total phenolic contents of some Persian Gulf marine algae. *J Med Plants* 2011; 1(37): 73-9.
- [29] Lee JC, Hou MF, Huo MF, Huang HW, Chang FR, Yeh CC, et al. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int* 2013; 13(55): 1-7.
- [30] Thinh PD, Menshova RV, Ermakova SP, Anastyuk SD, Ly BM, Zvyagintseva TN. Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*. *Mar Drugs* 2013; 11(5): 1456-76.
- [31] Payghami N, Jamili S, Rustaiyan A, Saeidnia S, Nikan M, Gohari AR. Alpha-amylase inhibitory activity and sterols from *Sargassum glaucescens*. *Pharmacognosy Res* 2015; 7(4): 314-21.
- [32] Yi Z, Yin Shan C, Hi Sheng L. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. *Chin J Oceanol Limnol* 2001; 19(4): 327-31.