

اثرات ضد تکثیری و کشندگی زهر زنبور عسل و D-آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) بر روی رده ی سلول سرطانی پرومیلوسیت انسانی HL-60

محمد نبیونی^{۱*}، Ph.D.، اعظم یاراحمدی^۲، M.Sc.، بهرام دلفان^۳، Ph.D.، سارا میر سپاسی^۴، M.Sc.، سکینه آذری^۵، M.Sc.،
صدیقه غلامی^۶، M.Sc.، طیبه رضمانی^۷، M.Sc.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)، تهران، ایران.
۲- کارشناسی ارشد تکوین جانوری، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم) تهران، ایران.
۳- گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ایران.
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Nabiuni@tmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۲

چکیده

هدف: لوسمی حاد پرومیلوسیتی شایع‌ترین لوسمی حاد در میان بزرگسالان است. امروزه از D-آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) جهت مهار تکثیر و القا مرگ سلولی در درمان لوسمی استفاده می‌شود. با توجه به اینکه غلظت‌های بالای ویتامین E جهت القا مرگ سلولی دارای اثرات جانبی بوده و استفاده از دوزهای بالای آن امکان پذیر نیست، لذا سعی می‌شود با بکار بردن همزمان دوزهای پایین این ویتامین و ترکیباتی که دارای اثر ضد تکثیری هستند، توانایی آن را در مهار تکثیر و القا مرگ سلولی افزایش داد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه رده سلولی 06-LH در محیط IMPR تکثیر داده شد. سپس اثرات ضد تکثیری و کشندگی غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل (VB) و (D-آلفا توکوفرول سوکسینات) SEV (با استفاده از روش شمارش سلولی تریپان بلو و سنجش TTM مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم افزار 3statsni و برنامه آماری AVONA yaw-eno آنالیز شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که اثرات ضد تکثیری و کشندگی سلولی ویتامین E (VES) در حضور زهر زنبور بطور چشمگیری افزایش یافت. به طور کلی، یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که غلظت‌های پایین زهر زنبور عسل می‌تواند اثرات ضد تکثیری و کشندگی سلولی ویتامین E را بر روی سلول‌های سرطانی HL-60 افزایش دهد.

نتیجه گیری: نتایج ما نشان می‌دهند که زهر زنبور عسل اثرات ضد تکثیری و کشندگی ویتامین E را در سلول‌های سرطانی HL-60 افزایش می‌دهد و امید است در آینده بتوان از این ترکیب جهت افزایش اثرات ضد تکثیری ویتامین‌ها در دوزهایی که غیر سمی هستند و فاقد اثرات جانبی می‌باشند، استفاده نمود.

واژگان کلیدی: ضد تکثیری، زهر زنبور عسل، رده‌ی سلولی سرطانی حاد پرومیلوسیتی، ویتامین E

مقدمه

خون سازی نرمال یک فرایند دینامیک است که در آن سلول‌های بنیادی خون ساز تمام سلول‌های خونی از جمله گلبول قرمز، گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها و ... را تولید می‌کنند. این فرایند به هماهنگی بین مسیرهای انتقال سیگنال تنظیمی فراوانی وابسته است که عمل کرد منظم این مسیرها که در آن‌ها پروتئین‌های تنظیمی ایفای نقش می‌کنند، منجر به تولید سلول‌های خونی با عمل کرد مناسب می‌شوند (۱) اختلال و ناهنجاری در هریک از این مسیرها منجر به ایجاد سلول‌های نئوپلاستیک می‌شود که این اختلال به نوبه‌ی خود منجر به اختلال در آپوپتوزیس، تمایز و تکثیر غیر قابل کنترل سلول‌های خونی و پیش‌سازهای آن‌ها می‌شود (۲، ۳، ۴ و ۵). لوسمی حاد پرومیلوسیتی، سرطان خون غالب و بدخیم ترین نوع سرطان خود با خونریزی شدید در میان بزرگسالان است که با تکثیر غیر قابل کنترل و عدم تمایز پیش‌سازهای نابالغ میلوئید (پرومیلوسیت) و تجمع این سلول‌ها در مغز استخوان مشخص می‌شود (۶). سلول‌های پرومیلوسیت (HL-60) در ۹۵ درصد از بیماران مبتلا به سرطان حاد پرومیلوسیت دارای جابجایی کروموزومی مشخصی بین بازوهای بلند کروموزوم ۱۵ و ۱۷ هستند که این جابجایی منجر به ایجاد پروتئین مرکب به نام PML-RAR می‌گردد. این پروتئین مرکب، سبب اختلال در مسیرهای انتقال سیگنال تنظیم کننده‌ی فرایند خون‌سازی و توقف پیش‌سازهای نابالغ میلوئید (پرومیلوسیت) در مراحل اولیه تکوین (عدم تمایز به سمت سلول‌های بالغ از جمله مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل و ...) و تکثیر غیر قابل کنترل این پیش‌سازها می‌شود (۷ و ۸). درمان ایده آلی برای این سرطان تا بحال شناخته نشده است. هدف داروهای ضد سرطان بیشتر سنتز DNA و تقسیم سلولی است، در حالی که سلول‌های سرطانی تنها سلول‌هایی نیستند که نیاز به تقسیم سلولی و سنتز DNA دارند (۹). امروزه روش‌های مختلفی در درمان سرطان خون بکار گرفته می‌شود. از جمله این روش‌ها می‌توان شیمی درمانی را نام برد. اما در این روش به دلیل غیر انتخابی بودن داروهای مورد استفاده، درصد زیادی از سلول‌های سالم خون نیز به همراه سلول‌های سرطانی از بین می‌روند (۱۰ و ۱۱). در سال‌های اخیر تحقیقات قابل توجهی در مورد اثر ضد تکثیری و کشندگی ویتامین‌ها از جمله ویتامین E بر رده‌های مختلف سلول سرطانی در درمان لوسمی حاد انجام شده است. D-آلفا توکوفرول سوکسینات مشتق سنتزی ویتامین E می‌باشد که بیشترین میزان جذب را در بدن به خود اختصاص

داده است. این ترکیب دارای توانایی مهار تکثیر و القا تمایز و القا مرگ سلولی در انواع رده‌های سلول سرطانی است (۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵). غلظت‌های مورد استفاده این ترکیب جهت القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی سمی می‌باشد (۱۶). همچنین این غلظت‌ها مانع جذب ویتامین K (عدم انعقاد خون) و به دنبال آن خونریزی و ایجاد زخم‌های گوارشی... در بیماران مبتلا به سرطان می‌شود. بنابراین این اثرات جانبی عامل محدود کننده در استفاده‌ی بالینی ویتامین E در درمان سرطان می‌باشند (۱۷ و ۱۸).

رده‌ی سلولی HL-60 یک رده‌ی سلول سرطانی خون انسانی است که از بیماران مبتلا به سرطان حاد پرومیلوسیت گرفته شده است. این سلول‌ها در مرحله‌ی پرومیلوسیت تکوین سلول‌های خونی متوقف شده و به صورت غیر قابل کنترل به تکثیر ادامه می‌دهند (۱۹). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که D-آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) دارای اثر مهار تکثیر و کشندگی بر رده‌ی سلولی HL-60 دارد. اما از آنجایی که غلظت‌های مورد استفاده ویتامین E در القا مرگ سلولی و القا تمایز دارای اثرات جانبی است، برای مقابله با این محدودیت و حذف اثرات جانبی ویتامین راهکارهای دیگری ارائه شده از جمله اینکه موادی همراه با غلظت‌های پائین ویتامین (غلظت‌هایی که غیر سمی و فاقد اثرات جانبی می‌باشند) به کار برده شوند، تا اثر ضد تکثیری و کشندگی ویتامین را در سلول‌های سرطانی بدون ظهور اثرات جانبی آن افزایش دهند. از جمله این مواد می‌توان به زهر زنبور عسل اشاره نمود که اثرات ضد تکثیری و آپوپتوزی این ترکیب بر رده‌های مختلف سلول سرطانی اثبات شده است (۲۰). زهر زنبور دارای بیش از ۱۸ ترکیب فعال فیزیولوژیکی با خواص دارویی فراوان می‌باشد (۲۱). برای اولین بار Havas در سال ۱۹۵۰ اثر القایی آپوپتوزیس زهر زنبور را بر سلول‌های سرطانی گزارش کرد (۲۱). اصلی‌ترین ترکیبات سمی زهر ملیتین و آنزیم فسفولیپاز A₂ می‌باشند. ملیتین سبب فعال شدن آنزیم فسفولیپاز A₂ موجود در زهر می‌شود که این آنزیم به نوبه‌ی خود دارای اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشد (۲۱). Moon و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که زهر می‌تواند آپوپتوزیس را در سلول‌های لوسمی القا کند، در حالی که هیچ اثر سیتوتوکسیکی بر سلول‌های نرمال خون موش ندارد. پیشنهاد شده که احتمالاً زهر از طریق مکانیسم‌هایی چون آپوپتوزیس، نکروز و لیز سلولی سبب مهار رشد تومور می‌شود (۲۲). با توجه به اثرات ضدسرطانی زهر زنبور

نور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس به هر خانه از پلیت، ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپانول اسیدی (Merck, Germany) افزوده شد. اسید موجود در ایزوپروپانول موجب لیز غشا سلول گردیده و بلورهای نامحلول (که در اثر احیا MTT توسط سلول زنده ایجاد شده‌اند) به محیط بیرون از سلول ریخته شده و ایزوپروپانول بلورهای نامحلول فورمازان را به حالت محلول در آورد. پس از گذشت ۷ تا ۸ ساعت محتوی خانه‌ها پیتاژ شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Milton Roy- Spectronic 21D- USA) اندازه‌گیری گرفته شد. مطابق معادله زیر درصد بقا سلول‌ها (Cell Viability) محاسبه گردید.

$$\text{Viability} = \frac{\text{mean absorbance of sample}}{\text{mean absorbance of control}} \times 100$$

LD50 (دوز کشندگی) زهر زنبور و آلفا توکوفرول سوکسینات از طریق شمارش سلولی با تریپان بلو و سنجش MTT محاسبه گردید. از محیط کشت خالی برای صفر کردن دستگاه و محیط کشت دارای سلول (نمونه کنترل) بدون حضور مواد مورد نظر بعنوان کنترل استفاده شد. تمامی تجربیات حداقل سه بار تکرار شدند.

آنالیز داده‌ها:

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها از نرم افزار InStat3 و آزمون آماری پارامتریک One-way ANOVA استفاده شد. نمودارها از طریق نرم افزار EXCEL رسم شدند.

نتایج

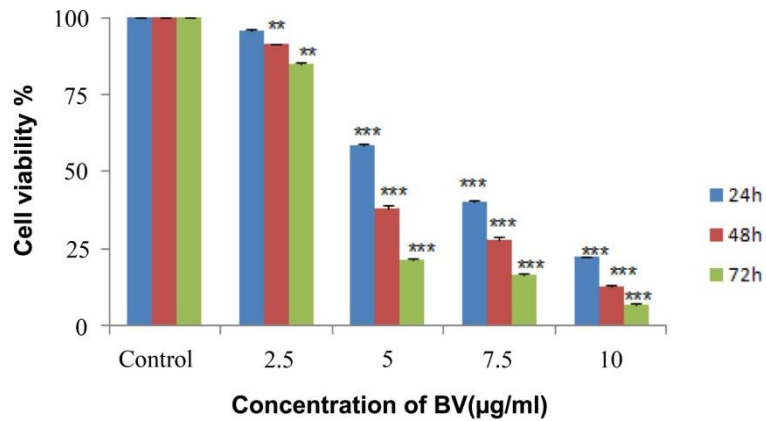
اثر زهر زنبور عسل بر تکثیر رده‌ی سلولی HL-60

نتایج حاصله از شمارش سلول‌های رنگ آمیزی شده با تریپان بلو و سنجش MTT نشان دادند که زهر زنبور در غلظت‌های مختلف در بازه‌ی زمانی مختلف دارای اثرات متفاوتی بر روی میزان تکثیر سلول‌های HL-60 می‌باشد، به طوری‌که زهر در غلظت‌های بالای ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثر کشندگی بسیار شدیدی بود و به محض اضافه نمودن زهر در این غلظت‌ها لیز شدیدی سلولی مشاهده شد. غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور پس از گذشت ۷۲ ساعت تفاوتی در تعداد سلول‌های مرده نسبت به نمونه کنترل ایجاد نکرد و مهار تکثیر نسبت به نمونه کنترل در سطح $P < 0.001$ معنی دار بود (نمودار ۱ و ۲).

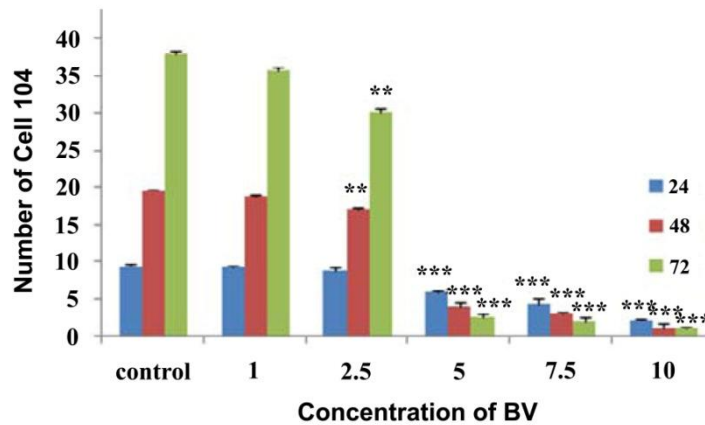
عسل، این مطالعه با هدف بررسی بکارگیری توام غلظت‌های مهارکننده‌ی تکثیر زهر زنبور عسل و ویتامین E به منظور افزایش توان ضد تکثیری ویتامین در غلظت‌های فاقد عوارض جانبی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

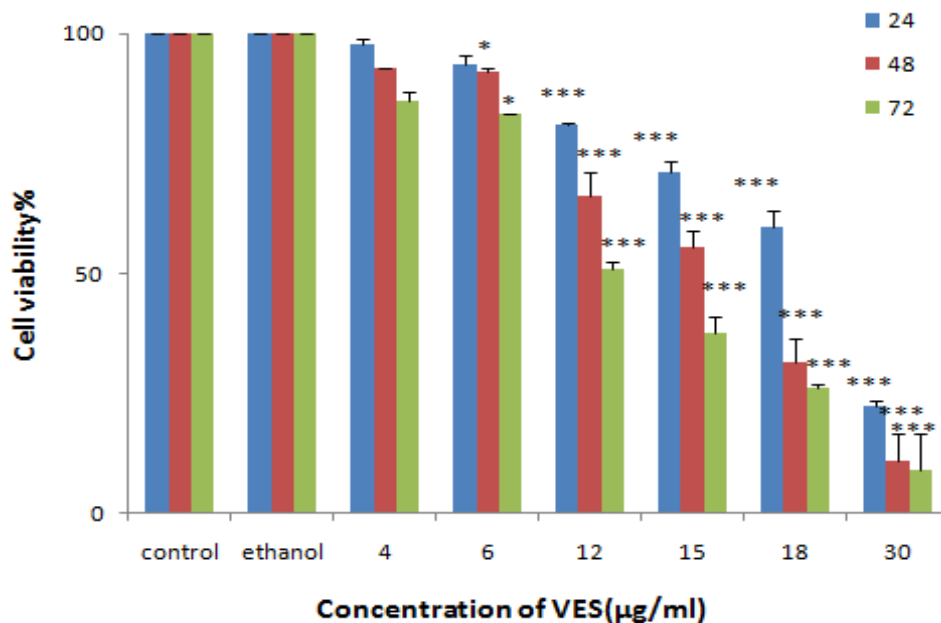
در این پژوهش تجربی رده‌ی سلولی (NCBI Code: HL-60) C217 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI1640 (Gibco, USA) حاوی ۲۰ درصد FBS (Gibco, USA) و ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در فشار ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در فلاسک ۲۵ سانتی متر مکعب کشت داده شدند. زهر زنبور عسل (Sigma, UK) با غلظت اولیه ۱ میلی‌گرم تهیه و در ۱ میلی‌لیتر PBS حل گردید و در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شد. D - آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) (Sigma, USA) با غلظت‌های اولیه ۴ میلی‌گرم تهیه و در ۲۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق حل گردید و در شرایط بدون نور در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه نگه داری شد. به منظور بررسی اثر زهر زنبور عسل، 5×10^4 HL-60 سلول به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت شمارش و در پلیت ۲۴ خانه با غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار شد و بعد از طی بازه‌های زمانی مشخص (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) جهت تعیین اثر زهر بر زیست پذیری سلول‌ها و همچنین جهت تعیین غلظت‌های مناسب زهر از روش‌های رنگ آمیزی تریپان بلو و سنجش MTT استفاده شد. همچنین جهت بررسی اثر ویتامین بر زیست پذیری سلول و تعیین غلظت مناسب ویتامین E، میزان 5×10^4 سلول به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت شمارش و در پلیت ۲۴ خانه با غلظت‌های مختلف ویتامین E (۱، ۴، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار شد و در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش‌های ذکر شده بررسی شد. برای رنگ آمیزی تریپان بلو، ۱۰ میکرولیتر محلول سلول با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو مخلوط گردید. سپس با استفاده از شمارش سلولی با لام هموسیتومتر درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. برای انجام روش سنجش MTT، بعد از گذشت بازه زمانی معین به هر خانه از پلیت‌های ۲۴ خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (Sigma, UK) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (حل شده در PBS) در شرایط تاریکی افزوده شد و پلیت ۴ ساعت دور از



نمودار ۱: اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل (BV) بر تکثیر سلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT
 Mean ± SEM. در مقایسه با گروه کنترل. $p < 0.01$, $p < 0.001$



نمودار ۲: اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل (BV) بر تکثیر سلول‌های HL-60 (تعداد سلول‌ها $\times 10^4$) پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT. $p < 0.01$, $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. Mean ± SEM

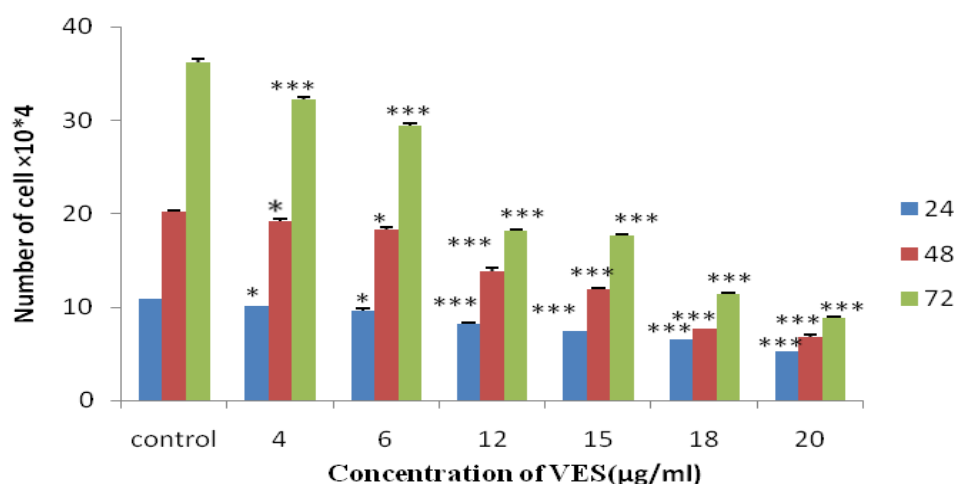


نمودار ۳: اثر غلظت‌های مختلف D-آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) بر تکثیر سلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT. $p < 0.01$, $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. Mean ± SEM

اثر D-آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) بر تکثیر رده ی سلولی HL-60

داده شد. نتایج بدست آمده از سنجش MTT و رنگ آمیزی تریپان بلو نشان دادند که ویتامین در الگوی وابسته به زمان و دوز سبب القاء مرگ سلولی و یا مهار تکثیر می‌گردد. بدین صورت که غلظت ۳۰ و غلظت‌های بالاتر از آن بیشترین میزان القا مرگ سلولی را به خود اختصاص دادند (نمودار ۴).

جهت بررسی اثر D-آلفا توکوفرول سوکسینات بر تکثیر سلول‌ها و بدست آوردن غلظت‌های سمی و غیر سمی، غلظت‌های ۴، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر سلول‌ها اثر

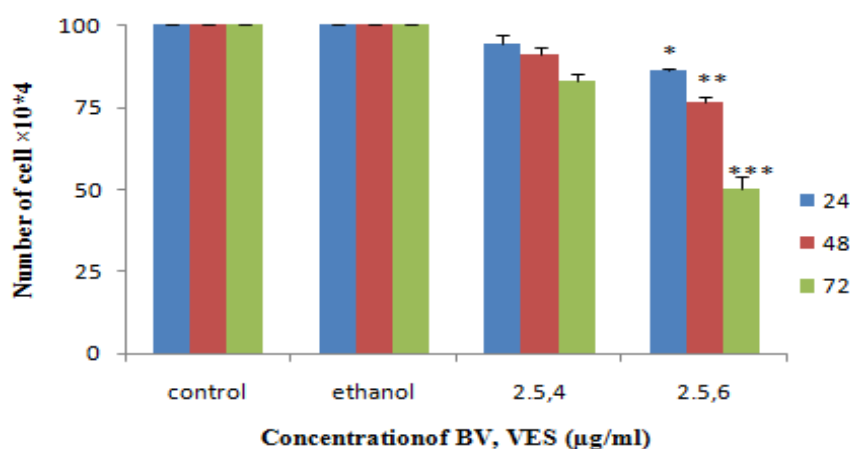


نمودار ۴: اثر غلظت‌های مختلف آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) بر تکثیر سلول‌های HL-60 (تعداد سلول‌ها $\times 10^4$) پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش تریپان بلو. $p < 0.05$, $*** p < 0.001$. Mean \pm SEM.

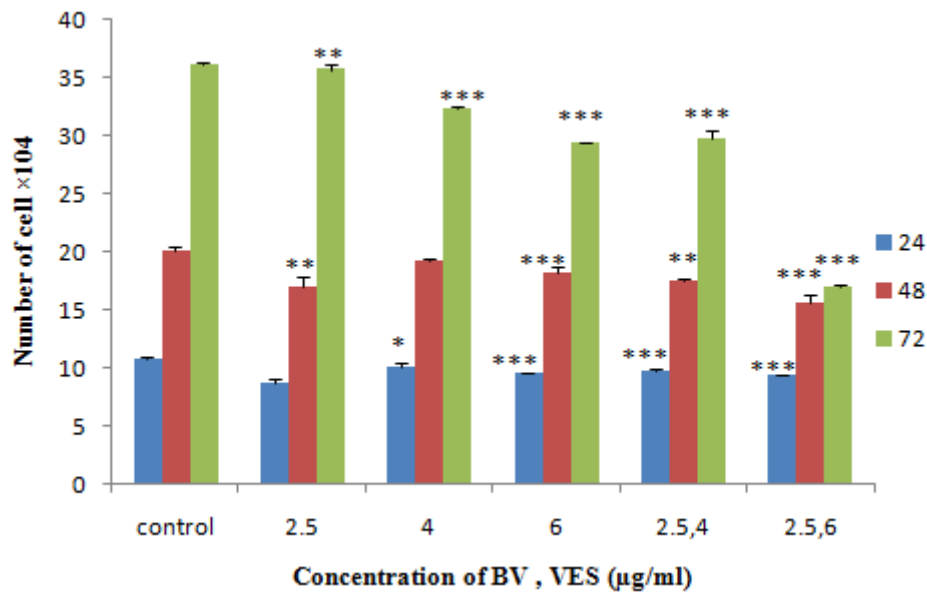
اثر هم افزایی زهر زنبور و D-آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) بر تکثیر و بقا سلول‌های HL-60:

سلول‌ها شده و درعین حال اثرات سمی کمتری نسبت به سلول‌های بالاتر داشتند. بررسی اثر هم‌زمان این دو ماده نشان داد که میزان مهار تکثیر سلولی در زمان هم افزایی بطور معنی داری نسبت به زمان استفاده از هریک از این مواد به تنهایی افزایش یافت (نمودار ۵ و ۶).

جهت بررسی اثر هم افزایی زهر زنبور و D-آلفا توکوفرول سوکسینات بر میزان بقا و تکثیر سلول‌های HL-60، غلظت‌های ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از زهر و ۴ و ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین انتخاب شدند (این غلظت‌ها موجب مهار تکثیر



نمودار ۵: اثر غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور (BV) و غلظت‌های ۴ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) به صورت توأم بر تکثیر سلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT. تعداد اولیه سلول‌ها 5×10^4 در هر میلی‌لیتر محیط کشت. $p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$. Mean \pm SEM.



نمودار ۶: اثر غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور (BV) و غلظت های ۴، ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) به صورت توام بر تکثیر سلول های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از شمارش سلول های رنگ آمیزی شده توسط تریپان بلو. تعداد اولیه سلول ها 5×10^4 در هر میلی لیتر محیط کشت. $p < 0.01$, $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، $Mean \pm SEM$

روی تکثیر رده‌ی سلولی می‌باشند بطوری که در غلظت ۲۰ بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار و در غلظت ۱۵ بعد از گذشت ۴۸ ساعت و در غلظت ۱۲ پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار بقای سلولی به ۵۰ درصد کاهش یافت. در غلظت بالای ۳۰ ویتامین، لیز شدید سلولی مشاهده شد، بطوری که پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریباً هیچ سلول زنده‌ای در محیط مشاهده نشد. با توجه به خاصیت ضد تکثیری زهر زنبور، در این تحقیق زهر به عنوان یک گزینه مناسب جهت کاهش اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های بالای آلفا توکوفرول سوکسینات مورد توجه قرار گرفت. بدین منظور زهر زنبور بصورت توام با غلظت غیر سمی آلفا توکوفرول سوکسینات، جهت افزایش مهار تکثیر سلول‌های HL-60 و کاهش اثرات جانبی غلظت بالای آلفا توکوفرول سوکسینات به کار گرفته شد. نتایج این هم‌افزایی نشان داد که استفاده از زهر زنبور با غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و آلفا توکوفرول سوکسینات با غلظت‌های ۴ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بصورت هم‌زمان بدون داشتن اثر سیتوتوکسیک باعث افزایش مهار تکثیر سلول‌های HL-60 شدند که بیشترین اثر مهار تکثیر در غلظت ۶ ویتامین و ۲/۵ زهر زنبور مشاهده شد. برای اولین بار نقش ضد سرطانی ویتامین E در سال ۱۹۶۰ نشان داده شد و مطالعات قبلی نشان دادند که مشتقات استری ویتامین E (آلفا توکوفرول سوکسینات) مهم‌ترین ترکیب موثر در

بحث

نتایج حاصله از این پژوهش نشان داد که زهر زنبور عسل و آلفا توکوفرول سوکسینات در الگوی وابسته به دوز و زمان در غلظت‌های بالا سبب القا مرگ سلولی و در دوزهای پائین سبب مهار تکثیر می‌شود. به این صورت که زهر زنبور در غلظت‌های بالای ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثر کشندگی شدیدی بر روی سلول‌های HL-60 است. زهر زنبور در دوزهای ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بصورت وابسته به زمان و غلظت باعث کاهش بقا سلولی گردید. زهر زنبور در غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در طی ۷۲ ساعت بدون القا مرگ سلولی باعث کاهش معنی داری در میزان سلول‌های زنده نسبت به نمونه کنترل گردید و بقای سلول‌های مرده در محیط تفاوتی با نمونه کنترل نداشت و به نظر می‌رسد این کاهش بیشتر مرتبط با مهار تکثیر بوده باشد نه مرگ سلولی. در بررسی اثر D-آلفا توکوفرول سوکسینات بر روی سلول‌های HL-60 مشاهده شد که آلفا توکوفرول سوکسینات در غلظت‌های بالاتر از ۳۰ دارای اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های HL-60 می‌باشد به طوری که بعد از ۲۴ ساعت سلول زنده‌ای در محیط مشاهده نشد. غلظت های ۴، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر D-آلفا توکوفرول به صورت وابسته به زمان و دوز دارای اثر بر

فعالیت اسفنگومیلیناز در غشای سلولی می‌شود که در اثر فعال شدن این آنزیم، اسفنگومیلین غشای سلولی به اسپونژیومین هیدرولیز شده و به دنبال آن مرگ سلولی وابسته به اسپونژیومین آغاز می‌گردد. به این صورت که اسپونژیومین سبب راه اندازی آبشاری از کاسپازها و کاهش پایداری غشا میتوکندری، لیزورم و سپس مرگ سلولی می‌شود. هم چنین Neuzil و همکارانش نشان دادند که توکوفرول سوکسینات سبب فعال سازی PP2A (پروتئین فسفاتاز 2A) می‌شود که این ترکیب منجر به دفسفوریلاسیون و غیر فعال شدن PKC α می‌شود که به نوبه خود سبب دفسفوریلاسیون و غیر فعال شدن پروتئین Bcl-2 می‌گردد (۳۰). در نهایت فعال شدن PP2A و غیر فعال شدن PKC سبب آزاد سازی سیتوکروم c از میتوکندری شده که سیتوکروم c به نوبه ی خود با Apaf-1 و کاسپاز ۹ جسم آپتوتیک را تشکیل می‌دهند که این کمپلکس منجر به فعال شدن سایر کاسپازها از جمله کاسپاز ۳ می‌گردد (۳۰). بررسی‌های متعددی خاصیت ضد تکثیری زهر را در رده‌های مختلف سلول سرطانی نشان داده اند. زهر زنبور دارای توانایی القا آپوپتوزیس، نکروز و لیز سلولی در سلول‌های سرطانی می‌باشد (۳۱ و ۳۲). kim پیشنهاد می‌کند که ملیتین موجود در زهر زنبور از طریق فعال کردن فسفولیپاز A₂ سبب القا مرگ در سلول‌های سرطانی می‌شود (۳۲). بررسی دیگری نشان داد که ملیتین بعنوان یک مهار کننده کالمودولین، تکثیر را در سلول‌های لوسمی انسان و موش مهار می‌کند (۳۰). همچنین Orsolic و Liu نتایج جالبی را در مورد ارتباط بین مهار کننده های کالمودولین و مهار رشد سلول سرطانی گزارش کردند (۲۰ و ۳۱). هم چنین نشان داده شده که ملیتین و فسفولیپاز-A₂ موجود در زهر در غلظت های غیر سمی، باعث مهار فعالیت فاکتور هسته‌ای kappa- β و مهار m-RNA سیکلواکسیژناز-۲ می‌شود (۳۳). Park و همکارانش نشان دادند که زهر زنبور با مهار فاکتور هسته‌ای kappa- β باعث کاهش بیان آنزیم COX-2 و سبب مهار تکثیر در سلول‌های Raw 264.7 می‌شود (۳۳). در سال ۲۰۰۶، Son و همکارانش نشان دادند که ملیتین موجود در زهر زنبور در الگوی وابسته به غلظت از طریق مهار فعالیت سیگنال‌های Akt و فاکتور هسته‌ای kappa- β و همچنین بالا بردن بیان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوزیس باعث مهار تکثیر سلول‌های عضله صاف جداره عروق می‌گردد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که زهر زنبور عسل تکثیر را در رده‌ی سلولی HL-60 مهار می‌کند که با

مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌باشند. Jenifer و همکارانش نشان دادند که آلفا توکوفرول سوکسینات در غلظت ۱۵ پس از طی ۴۸ ساعت بقاء سلولی را به ۶۰ درصد می‌رساند که این نیز با یافته‌های این پژوهش هم‌خوانی داشت (۲۳ و ۲۴). این غلظت از آلفا توکوفرول سوکسینات سبب توقف سلول‌ها در فاز G₂/M چرخه‌ی سلولی می‌شود. هم چنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که مشتق آلفا توکوفرول سوکسینات نسبت به سایر مشتقات دارای بیشترین اثر بر تکثیر رده‌ی سلولی HL-60 می‌باشد (۲۵). به هر حال مکانیسم‌های مولکولی سیگنالینگ سلولی که طی آنها آلفا توکوفرول سوکسینات سبب مهار تکثیر و القا مرگ سلولی در رده‌های مختلف سلولی می‌شود، به طور واضح مشخص نیست. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سلول سرطانی به دلیل دارا بودن pH اسیدی تری نسبت به سلول سالم میزان بیشتری از ویتامین را جذب می‌کند. Kozin و همکارانش نشان دادند که توکوفرول سوکسینات می‌تواند بطور قوی به صورت وابسته به pH مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی پستان و خون القا کند (۲۶). هم چنین نشان دادند که فعالیت پروآپتوتیک این ترکیب با کاهش pH افزایش می‌یابد. در سال ۲۰۰۷، Crispen و همکارانش پیشنهاد نمودند که آلفا توکوفرول سوکسینات از طریق مهار فعالیت فاکتور هسته‌ای kappa- β (NF- κ B) و مهار رونویسی AP-1 سبب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۷). فاکتور هسته‌ای kappa- β بعنوان تنظیم کننده بیان بسیاری از ژن‌ها از جمله آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ (هدف بسیاری از داروهای ضد سرطان) شناخته می‌شود و در تکثیر سلولی، پاسخ‌های التهابی و آپوپتوزیس دخیل است (۲۸). بیان بالای این فاکتور در رده‌های مختلف سلول سرطانی دیده شده است. این فاکتور منجر به تکثیر غیر قابل کنترل و مقاوم شدن سلول‌های سرطانی در برابر عوامل القا کننده‌ی آپوپتوزیس می‌شود. Ni و همکارانش (نشان دادند که آلفا توکوفرول سوکسینات از طریق مهار بیان پروتئین‌های تنظیمی چرخه‌ی سلولی از جمله Cyclin D, E و CDK 2,4 و کاهش فسفوریلاسیون Rb سبب توقف سلول‌ها در فاز G₁ / S می‌شود (۲۵). همچنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که توکوفرول سوکسینات سبب تولید رادیکال‌های آزاد در انواع سلول‌های سرطانی می‌شود که به دنبال آن القا مرگ سلول‌های سرطانی را منجر می‌گردد، این در حالی است که این ترکیب در سلول‌های طبیعی نقش آنتی اکسیدانت را ایفا می‌کند. Gu و همکارانش (۲۹) نشان دادند توکوفرول سوکسینات سبب افزایش

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش تأیید کننده اثر مهارری زهر زنبور عسل و آلفا توکوفرول سوکسینات بر تکثیر رده سلولی HL-60 می باشد. مقایسه اثرهم افزایی زهر زنبور و D-آلفا توکوفرول سوکسینات با اثر منفرد هر یک از این مواد نشان می دهد که زهر زنبور موجب افزایش اثر مهار تکثیری آلفا توکوفرول سوکسینات می شود. افزایش اثر مهار تکثیری ویتامین E بر رده ی سلول سرطانی HL-60 توسط زهر زنبور تاکنون در هیچ مطالعه ای بررسی نشده و برای اولین بار در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته است. لازم به ذکر است که نتایج این مطالعه حاصل کار در محیط آزمایشگاهی است و لزوم انجام تحقیقات بیشتر مورد تاکید می باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه زیست شناسی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی انجام شد. مولفین بر خود لازم می دانند از پرسنل آزمایشگاه و ریاست دانشکده علوم زیستی، سپاسگزاری نمایند.

منابع

- 1 Rane SG, Reddy EP. JAKSTATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*. 2002; 21(21): 3334–3358.
- 2 Ravandi F, Talpaz M, Estrov Z. Targeted Therapy in Hematological Malignancies Modulation of Cellular Signaling Pathways: Prospects for Targeted Therapy in Hematological Malignancies. 2003; 9: 535-550.
3. KL Rice KL, Hormaeche I, Licht JD. Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. 2007; 26: 6697-6714.
4. James SY, Williams MA, Newland AC, Colston KWL. 4. differentiation of Leukemia cell. *Gene Pharmacol*. 1999; 32(1): 143-54.
5. Waxman S. Differentiation therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2000; 14: 491-496.
6. Altucci L, Wilhelm E, Gronemeyer H. Leukemia: beneficial actions of retinoids and rexinoids. *Biochemistry and Cell Biology J*. 2003; 36(2): 178-182.
7. Dong S, Geng J, Tong J, Wu Y, et al. Breakpoint clusters of PML gene in acute promyelocytic leukemia: primary structure of the reciprocal products of PML-RARA gene in patient with (15:17) gene Chromosome. *Cancer*. 1993; 6: 133-139.

تحقیقات انجام گرفته در رابطه با توانایی مهار تکثیر زهر زنبور مطابقت دارد (۳۴). Zhu و همکارانش گزارش کردند که ملیتین در غلظتی که تکثیر را در سلول های سرطانی مهار می کند بر روی مهار رشد سلول های نرمال موثر نیست (۳۶). SON و همکاران گزارش کردند که Killion و Dunn نشان دادند که حساسیت سلول های لوسمی سرطانی L1210 نسبت به سلول های سالم DBA/2 طحال موش به اثرات سمی ملیتین ۴ تا ۲ بار بیشتر است (۳۴).

Jang و همکارانش اثر زهر را در مهار COX2 و القا آپوپتوزیس در رده ی سلولی NCI-H1299 مربوط به سرطان ریه گزارش کردند (۳۷). هم چنین Moon و همکارانش با بررسی اثر زهر زنبور بر رده ی سلولی میلوئیدی U937 به این نتیجه رسیدند که زهر زنبور سبب کاهش بیان پروتئین های ضد آپوپتوزیس از جمله Bcl-2 , Bcl-x1 و سبب فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۹ در این رده سلول سرطانی می شود (۲۲). مطالعات اخیر فعالیت ضد توموری زهر زنبور را در محیط *in vivo* و *in vitro* نشان داده اند و بیان می کنند که زهر زنبور می تواند بعنوان یک عامل در درمان سرطان استفاده شود (۳۷). با توجه به مسیرهای مولکولی دخیل در مهار تکثیر سلولی و القا آپوپتوزیس توسط زهر زنبور و آلفا توکوفرول سوکسینات می توان گفت که عمل کرد زهر زنبور و آلفا توکوفرول سوکسینات در چندین مسیر در طول مهار تکثیر و القا آپوپتوزیس مشابه می باشد. بنابراین می توان بیان نمود که زهر زنبور در غلظت های غیر سمی و مهارری می تواند از طریق مهار فعالیت فاکتور هسته ای β -kappa و کاهش بیان COX-2، کاهش بیان پروتئین های ضد آپوپتوزیس از جمله Bcl-2 , Bcl-x1 موجب افزایش اثر مهار تکثیری آلفا توکوفرول سوکسینات بر روی سلول های سرطانی HL-60 شود (۳۸).

با توجه به اینکه نتایج این پژوهش همسو با نتایج سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه می باشد، به منظور تکمیل نتایج و جامع تر شدن ابعاد این بررسی، پیگیری موضوعات زیر پیشنهاد می شود:

- ۱- بررسی فعالیت فاکتور هسته ای β -kappa و بیان آنزیم COX-2 در هم افزایی دو ترکیب ذکر شده.
- ۲- با توجه به موفق بودن درمان ترکیبی در درمان لوسمی حاد بررسی اثر هم افزایی زهر زنبور ویتامین E در سطح *in-vivo*
- ۳- بررسی بیان فاکتورهای چون Bcl-2 , Bcl-x1 در هم افزایی دو ترکیب ذکر شده.

- humane acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor PML.CELL .1991 ; 66(4) :663-674.
9. Gocek E, Marcinkowaka E. Differentiation Therapy of acute Myeloid Leukemia. *Cancera*. 2011; 3(2): 2402-2420.
10. Chen Z, Wang ZY, Chen SJ. Acute promyelocytic leukemia: Cellular and Molecular basis of differentiation and apoptosis. *Pharmacol Ther* 1997; 76(1-3): 141-9.
11. Burnett AK, Eden OB. The treatment of acute leukemia. *Lancet* 1997; 349(9047): 270-5.
12. Kedar N. Prasad, Kumar B, Yan XD, et al. α -Tocopheryl succinate , the most Effective from of Vitamin E for Adjuvante Cancer Treatment :A Review.2003; 22(2): 108-117.
13. Kline K, Yu w, Sanders BG. Vitamin E: mechanisms of action as tumor cell growth inhibitors .*J Nutr* .2001; 131(2): 161S -163S.
14. Prasad KN, Edwards-Prasad J. "Effects of Tocopherol (Vitamin E) Acid Succinate on Morphological Alterations and Growth Inhibition in Melanoma Cells in Culture. *Cancer Res*. 1982; 42(2): 550-555.
15. Kline K, Cochran GS, Sanders BG. "Growth-Inhibitory Effects of Vitamin E Succinate on Retrovirus- Transformed Tumor Cells In Vitro." *Nutr Cancer*. 1990; 14(1): 27-41.
16. Alexander G, Suttic J. The effect of vitamin E on vitamin K activity .*FASEB J* .1999; 13: A535(abstr).
17. March BE, Wong F, Seier L, Sim J, et al. Hypervitaminosis E, in the chick .*J Nutr* .1973; 103 :317-327.
18. Corrigan JJ, Ulfers LL. Effect of vitamin E on prothrombine levels in warfarin –induced vitamin K deficiency .*AM J* .1981; 34(9): 1701-1705.
19. Gallaghe R, Collins r, Trujillo SJ, KAhearn M, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood J*. 1979; 54(3): 713-733.
20. Liu X, Chen D. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Pharmacy and Pharmacology J*. 2002; 54:1083-1089.
21. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, et al. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics J*. 2007; 115: 246-270.
8. Kakizuka A, Miller WJ, Umesono K, Warrell RJ, et al. Chromosomal translocation t(15 , 17) in 22. Moon DO, Park SY, Heo MS, Kim KC, et al. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int Immunopharmacol J*. 2006; 6(12): 1796-1807.
23. Jennifer M, Bob G, Kimberly K. RRR- α -tocopheryl succinate modulation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cell proliferation and differentiation. 1992; 18: 201-213.
24. Neuzil J, Weber T, Gellert N, et al .Selective cancer cell killing by alpha –tocopheryl succinate .*Br J Cancer* .2001 ;84(1) :87-89.
25. Ni J, Chen M, Zhang Y, Li R , et al. Vitamin E succinate inhibits human prostate cancer cell growth via modulating cell cycle regulation machinery .*Biochem Biophys Res Commun* .2003 ;300:357-363.
26. Kozin SV, Shkarin P, Gerweck LE. The cell transmembrane Ph gradient in tumors enhances cytotoxicity of specific weak acid chemotherapeutics. *Cancer Res* .2001; 61(12): 4740-4743.
27. Crispen PL, Uzzo RG, Golovine K, et al. Vitamin E succinate inhibitis NF –kappaB and prevents the development of metastatic phenotype in prostate cancer calls: implication for chemoprevention .*Prostate* . 2007 ; 67(6): 582-590.
28. Orsolich CN, Sever L, Verstovsek S, Terzic S. Basic I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon J*. 2003; 41(7): 861-870.
29. Gu X, Song X, et al .Vitamin E succinate induces ceramid –mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma In vitro and in vivo.*Clin Cancer Res* .2008; 14(6): 1840-1848.
30. Neuzil J, Weber T, Schroder A, et al. Induction of cancer cell apoptosis by alpha tocopheryle succinate : molecular pathways and strutral requirement .*FASEB J* . 2001; 15: 403-415.
31. Orsolich N, Sver L, Bendelja K. Basic antitumor activity of bee venom. *Periodicum Biologorum J*. 2001; 103: 49-54.
32. Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, et al. General pharmacological profiles of bee venom and its water soluble fractions in rodent models. *Vet Sci J*. 2004; 5: 309-318.
33. Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, et al. Anti-arthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappa β through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum J*. 2004; 50: 3504-3515.

34. Son DJ, Ha SJ, Song HS, Lim Y, et al. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappa β and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *Pharmacol Experimental Therapeutics J.* 2006; 317: 627-634.
35. Huh J, Baek Y. Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice. *Cancer Lett J.* 2010; 292: 98-110.
36. Zhu H, Tayeh I, Israel L, Castagna M. Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation. *Biol Regul Homeost Agents J.* 1991; 5: 52-58.
37. Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, et al. Bee Venom Induces Apoptosis and Inhibits Expression of Cyclooxygenase-2 mRNA in Human Lung Cancer Cell Line NCI-H1299. *J Pharmacol.* 2003; 91(2): 95-104.

The Anti- Proliferative and Lethal Effects of D-alpha Tocopheryl Succinate (Vitamin E Succinate) and Honey Bee Venom(BV) on Human Promyelocyte Leukemia Cell Line (HL-60)

Nabiuni M. Ph.D.^{1*}, Yarahmadi A. M.Sc.², Delfan B. Ph.D.³, Mirsepasi S. M.Sc.²,
Azari S. M.Sc.², Gholami S. M.Sc.², Ramezani T. M.Sc.²

1. Department of Biology, Faculty of Science, Kharazmi (Tarbiat Moallem) University, Tehran, Iran

2. M.Sc., Kharazmi (Tarbiat Moallem) University, Tehran, Iran

3. Medical Sciences University, Lorestan, Iran

* Email corresponding author: Nabiuni@tmu.ac.ir

Received: 11 Jun. 2012

Accepted: 3 Sep. 2012

Abstract

Aim: Acute promyelocytic leukemia is the most common leukemia among adults. Nowadays vitamin E has been used for cancer treatment in research and clinical approach. Application of high concentrations of vitamin E to induce apoptosis have side effects so in this study we examined the effect of bee venom or vitamin E or both together on the induction of apoptosis in HL-60 cell line in order to increase anti-proliferative ability and reduce side effect of vitamin E.

Material and Methods: HL-60 cell line were cultured in RPMI medium and then treated with different concentrations of vitamin E and bee venom. The effect of bee venom and vitamin E on cell viability and proliferation were measured by MTT assay and cell counting trypan blue staining. Data were analyzed using one-way ANOVA test and Instate 3 software.

Result: Our results show that inhibitory effect of vitamin E increased dramatically in the presence of bee venom. On this basis we suggest that non- toxic concentration of bee venom can increase anti – proliferative activity of vitamin E on HL-60 cancer cells.

Conclusion: Our result show that non-toxic concentration of BV can increase inhibitory effects of vitamin E and it make hope that BV can increases the anti-proliferative potential of vitamins in non-toxic concentration and concentration without side effects in the future.

Keywords: Anti- proliferative, Bee venom, HL-60 cell line, Vitamin E