مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۰، ٤۳۳-٤۲۵

تعیین غلظت آپوپتوزی زهر زنبور عسل بر روی سلول‌های سرطانی پرومیلوسیتی انسانی

محمد نبیونی[1*] ، جواد بهارآرا[2]، الهه امینی[3]، هانیه جلالی[3]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ایران و دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ایران
۳- دانشجوی مقطع دکتری تکوین جانوری، دانشگاه خوارزمی، تهران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: nabiuni@tmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۲۲

چکیده

هدف: اخیرا محققین گزارش کردند زهر زنبور عسل دارای اثر قوی ضد التهابی، ضد توموری و ضد سرطانی است. از طرفی از اهداف مهم درمان سرطان، راه اندازی آپوپتوزیس است. هدف این پژوهش، تعیین غلظت آپوپتوزی القا شونده توسط زهر زنبور (پاییزه، از منطقه سمنان) بر سلول‌های HL-60 می باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش تجربی رده‌ی سلولی HL-60 از انستیتو پاستور تهیه و در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سیلین- استرپتومایسین کشت شد. ۲ساعت بعد کشت، سلول‌ها تحت تاثیر غلظت‌های مختلف زهر ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۲ و ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت قرار گرفتند. سپس مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس، درصد بقا توسط سنجش MTT و مرگ سلولی توسط رنگ آمیزی هوخست و فلوسیتومتری بررسی شدند.

نتایج: آنالیز مورفولوژیکی و نتایج حاصل از رنگ آمیزی هوخست و داده‌های فلوسیتومتری آنتی بادی آنکسین۵ نشان داد مرگ القا شده توسط زهر آپوپتوزیس بوده و دوز ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب القا ۵۰ درصد آپوپتوزیس می شود.

نتیجه گیری: داده‌های این تحقیق نشان داد به کارگیری غلظت‌های پایین زهر زنبور طی دوره تیمار ۴۸ ساعت اثر مهار تکثیر وابسته به دوز و زمان داشته و دوزهای بالاتر از ۱۵ میکرو گرم بر میلی لیتر باعث لیز شدن سلول‌ها و نکروزیس می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که دوز ۱۲ میکرو گرم بر میلی‌لیتر القا کننده آپوپتوزیس بر سلول‌های HL-60 است.

واژ گان کلیدی: زهر زنبور عسل، آپوپتوزیس، آنکسین۵

مقدمه

زهر زنبور عسل، در طب سنتی در درمان بیماری هایی مثل آرتریت، روماتیسم، تومورهای سرطانی، بیماری های پوستی و تسکین درد مورد استفاده قرار گرفته است. زهر زنبور حداقل حاوی ۱۸ نوع ترکیب فعال شامل انواع پپتیدها (ملیتین، آپامین، آدولاپین، پپتید MCD)، آنزیم هایی مثل فسفولیپاز A_2 ، آمین های فعال بیولوژیکی (مثل هیستامین، اپی نفرین) و اجزا غیر پپتیدی است که دارای تنوعی از خاصیت دارویی می باشند. زهر زنبور دارای خاصیت ضد التهابی بوده که یکی از ویژگی‌های داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی است (۲و۱).

ملیتین یک پروتئین کوچک، حاوی ۲۶ اسید آمینه و سم اصلی در زهر زنبور است که فعالیت فسفولیپاز A_2 را افزایش داده و با دارا بودن خاصیت همولیتیک موجب از هم گسیختگی غشای سلول می‌شود. در سلول‌های سرطانی نیز، غشای سلولی پتانسیل غشایی بیشتری از سلول‌های سالم داشته و اکثر پپتیدهای لیز کننده، موجب گسیختن غشای این سلول‌ها می‌شوند. همچنین گزارش شده که ملیتین القا کننده آپوپتوزیس بوده و دارای اثرات ضد توموری است (۴و۳). این ترکیب می‌تواند به عنوان یکی از قوی ترین بازدارنده‌های کالمودولینی عمل کرده و با غیر فعال کردن NF_kB (nuclear factor kappaB) اثر ضد التهابی داشته باشد. گزارش شده که اثر ضد التهابی زهر زنبور با آزاد سازی کاتکول آمین‌ها از مدولای فوق کلیه همراه است (۵). Chen و همکاران (۶) پیشنهاد کردند که اثرات سمی زهر زنبور از طریق فعالیت ملیتین بر روی فسفولیپاز A_2 صورت گرفته و الحاق پپتید لیز کننده سلولی ملیتین با گیرنده‌های هورمونی و ژن درمانی می‌تواند نوعی درمان هدفمند و مفید جهت درمان انواع سرطان ها باشد. انواع سلول‌های سرطانی مثل کلیه، ریه، کبد، پروستات، مثانه و سینه همانند سلول‌های لوکمیایی می‌توانند هدف ملیتین باشند. پیشروی مرگ سلولی آپوپتوزیس از طریق چند مکانیسم مرگ سلولی همانند فعالیت کاسپاز۳ و متالوپروتئینازهای ماتریکس در القا اثرات ضد سرطان توسط زهر زنبور و ملیتین حیاتی است (۸و۷).

آپامین، یکی از ترکیبات موجود در زهر زنبور، کوچکترین نوروتوکسین موجود در زهر زنبور بوده که به عنوان یک بلوکر انتخابی کانال پتاسیم فعال شده توسط کلسیم، استراحت القا شده توسط اسید نیتریک در فعالیت انقباضی خودکار روی میومتر رحم در خانمها را مهار می‌کند. این خصوصیت ساختاری و دارویی آپامین ممکن است نقش مهمی در اثرات سمی بر روی سلول‌های سرطانی داشته باشد (۹).

فسفولیپاز A_2 دیگر سم موجود در زهر زنبور بوده که توسط ملیتین فعال شده، هیدرولیز باندهای اسید چرب غشا فسفولیپیدی را کاتالیز کرده و موجب عدم یکپارچگی غشا و رهایی اسیدچرب شده و اثر سمی از طریق فعالیت این ترکیب و خانواده کاسپاز خاصیت از بین برنده سلول های سرطانی است (۱۰).

بیماری‌های با قدرت نامحدود تکثیر، مثل سرطان در نتیجه تغییر در ژنوم ایجاد می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهند که حداقل شش تغییر در فیزیولوژی سلولی موجب رشد بدخیمی می‌شود که شامل خود کفا بودن در تکثیر سلولی، مقاوم بودن به سیگنال‌های باز دارنده تکثیر سلولی، طفره رفتن از آپوپتوزیس، عدم محدودیت در پتانسیل تکثیر، تقویت آنژیوژنز و حمله به سایر بافت‌ها هستند. یکی از این تغییرات گریز از آپوپتوزیس است. بنابراین یکی از اهداف در درمان سرطان، برگرداندن دوباره مکانیسم آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی است (۱۱).

آپوپتوزیس (مرگ برنامه ریزی شده سلولی)، فرایندی است که اهمیت اساسی در جلوگیری از تکوین تومور دارد. این نوع از مرگ سلولی عملکرد هومئوستاتیک دارد. آپوپتوزیس فرایندی است که توسط ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی خاصی مشخص می‌شود که شامل حباب دار شدن سیتوپلاسم، انقباض هسته، تراکم کروماتین و .... است. یکی از این تغییرات جابجایی فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی غشا به سطح خارجی آن است که در سلول‌های سالم و به طور طبیعی در سمت داخلی غشا به سمت سیتوزول قرار دارد. در معرض قرار گرفتن فسفاتیدیل سرین راه انداز شناسایی سلول‌های آپوپتوزی توسط ماکروفاژها است. شواهد نشان می‌دهند که تنظیم آپوپتوزیس نقش عمده‌ای در پیشرفت تومور و درمان ضد توموری دارد (۱۲).

سرطان حاد پرومیلوسیت، نوعی سرطان خون و مغز استخوان بوده که در نتیجه تجمع غیر طبیعی پرومیلوسیت ها به وجود می‌آید این بیماری در اثر یک جابجایی کروموزومی بین ژن گیرنده آلفا ترانس رتینوئیک اسید (RARα) روی کروموزوم شماره ۱۷ به ژن PML (Promyelocyte Leukemia)، روی کروموزوم شماره ۱۵ به صورت t(15:17) (q22;q12-21) به وجود آمده و پروتئین مرکبی تحت عنوان PML-RARα به وجود می‌آورد (۱۳). رده سلولی HL60 یک دودمان سرطان حاد

پرومیلوسیتی بوده که در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی جهت انجام مطالعات روی سلول‌های خونی کاربرد وسیعی دارد. این رده سلولی منبع مداومی از سلول‌های انسانی را برای بررسی رویدادهای مولکولی که منجر به تمایز و آپوپتوزیس می‌شود، ارائه می‌دهد (۱۴).

Liu و همکاران (۱۵) بیان کردند که زهر زنبور تکثیر سلول‌های ملانومای موش را در شرایط *in vitro* و رشد سلول‌های ملانومای B16 را در شرایط *in vivo* مهار می‌کند. Hu و همکاران (۱۶) نشان دادند که پلی پپتیدهای موجود در زهر زنبور مهار چشمگیری در رشد سلول‌های هپاتوما ایجاد کردند. آنالیز مکانیسم مرگ سلولی در این سلول‌ها نشان داد که زمانی که این سلول ها تحت تاثیر زهر زنبور قرار گرفتند، در غلظت ۱۰ میکرو گرم و دچار آپوپتوزیس شدند. همدانی و همکاران (۱۷) اثرات زهر زنبور از ایران و استرالیا را بر روی میزان فعالیت متالوپروتئیناز ماتریکس بر روی دو رده سلولی K-562 و WEHI-164 بررسی کرده و دریافتند که زهر زنبور از دو منطقه متفاوت بر روی یک رده سلولی تفاوت چشمگیری نداشته، در حالی که واکنش رده های سلولی مختلف متفاوت خواهد بود. از آنجا که نوع منطقه توانسته بر روی نتایج به دست آمده تاثیر گذار باشد، هدف از این پژوهش، تعیین دوز کشنده زهر زنبور (پاییزه، از منطقه سمنان) و نوع مرگ سلولی القا شده توسط این منبع زهر بر روی رده سلولی HL60 می باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش تجربی که در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی صورت گرفت. زهر زنبور عسل (پاییزه و از منطقه سمنان) از گروه حشره شناسی دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات- دکتر ایمانی و با استفاده از روش شوک الکتریکی تهیه شد. استوک زهر زنبور با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر (رقیق شده با PBS:Phosphate Buffer Saline) آماده و در غلظت های مختلف ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۲ و ۱۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های سرطانی HL60 اثر داده شد.

کشت سلولی: رده‌ی سلولی سرطان حاد پرومیلوسیتی HL60 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 (SIGMA) غنی شده با۱۰ درصد FBS (Fetal (Gibco) Bovine Serum) و ۱ درصد پنی سیلین- استرپتو مایسین (Gibco) کشت داده شدند. زمانی که تراکم سلول ها به ۷۰ درصد رسید، سلول‌ها به تعداد ۴×۱۰^{۴} درون پلیت ۲۴ خانه ای کشت داده شده و درون انکوباتور (Binder) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. ۲ ساعت پس از کشت، سلول‌ها با زهر زنبور با غلظت های ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۲ و ۱۵ میکرو گرم بر میلی لیتر رقیق شده با PBS تیمار شده و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند.

آزمون MTT(3-(4,5dimethyl thiazol2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) جهت ارزیابی بقا سلولی: بعد از گذشت زمان مورد نظر، ۱۰۰ میکرو لیتر از معرف MTT (دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم بروماید) (سیگما) رقیق شده با PBS با غلظت ۰/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر به هر خانه از پلیت افزوده شده و سلول ها برای مدت ۴ ساعت درون انکوباتور و در تاریکی قرار گرفتند. سلول های زنده، MTT را توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی به کریستالهای فرمازان تبدیل می کنند. پس از ۴ ساعت، به هر خانه از پلیت ۹۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپیل الکل اضافه شده و پلیت ۱۲ ساعت در محیط آزمایشگاه در تاریکی قرار گرفت. سپس جذب سلول های زنده (optical density) در ۵۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان درصد سلول های زنده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۸):

Optical density test/optical density control×100

آنالیز مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس و فلورسنت: سلول‌های HL60 به تعداد ۴×۱۰^{۴} درون پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار با دوزهای مختلف زهر زنبور، سلول های گروه کنترل و گروه‌های تحت تیماری مختلف به دقت در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی مورفولوژی با میکروسکوپ فلورسنت، پس از انجام تیمار با غلظت‌ها و زمان‌های مختلف Ic_{50} (غلظت ۵۰ درصد کشنده سلولی- Inhibitory Concentration) تعیین و این گروه و گروه کنترل جهت مشاهده مورفولوژی سلول (مخصوصا هسته سلول) توسط رنگ فلورسنت هوخست ۳۳۴۳۲ (سیگما) با غلظت ۰/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر رنگ آمیزی شدند. به طور خلاصه، بعد از گذشت زمان مورد نظر سلول های گروه کنترل و تیمار با PBS شستشو شده، بر روی لامل کوت شده با پلی دی لیزین قرار گرفته و برای مدت زمان ۱۵ دقیقه در فرمالین سرد ۴ درصد

تثبیت شدند. پس از این مرحله سلول‌ها ۲۰ دقیقه در تاریکی در معرض رنگ هوخست قرار گرفته و در زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند.

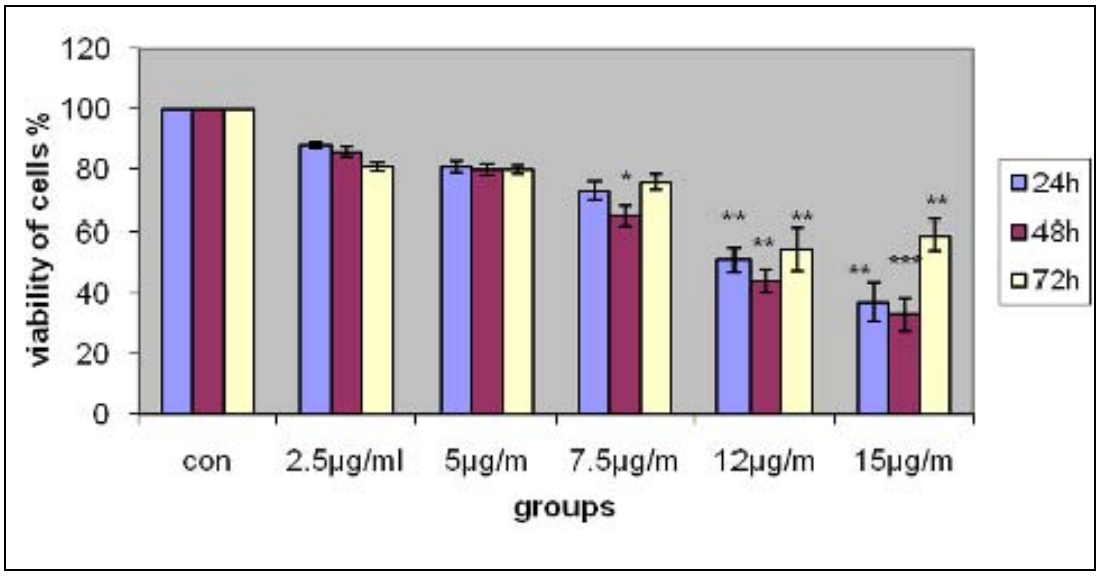
آنالیز آپوپتوزیس با استفاده از آزمون فلوسیتومتری: سلول‌های گروه کنترل و گروه تیمار با زهر زنبور با غلظت ۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر از زهر زنبور (IC_{50}) برای مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، با PBS سرد با pH= ۷/۲ در rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس محیط رویی را دور ریخته و سلول‌ها با ۱۰۰ میکرو لیتر آنتی بادی annexin V(abcam) رقیق شده با ۳ درصد BSA-PBS به مدت ۱ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از زمان انکوباسیون، حجم سلول‌ها با PBS به ۱۰۰۰ میکرو لیتر رسانده و در rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته شد و به سلول‌ها ۲۰ میکرو لیتر از آنتی بادی ثانویه (anti-rabbit IgG) کونژوگه با رنگ فلورسنت FITC رقیق شده با ۳ درصد BSA-PBS افزوده و به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در تاریکی درون یخچال قرار گرفته شد. سپس به سلول‌ها ۳۰۰ میکرو لیتر فرمالین ۱ درصد اضافه شده و با دستگاه FACS Calibur (Beckton Dickinson,USA) با استفاده از نرم افزار cell quess آنالیز شد (۱۹).

آنالیز آماری: جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار INSTAT و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شده و نمودارها از طریق برنامه EXCEL رسم گردیدند. $P<0/05$ (P value کمتر از ۵ درصد) مرز معنی‌دار بودن داده‌ها تلقی گردیده و هر آزمایش حداقل ۳ مرتبه تکرار شد.

نتایج

اثر مهار کنندگی زهر زنبور بر روی میزان تکثیر سلول ها

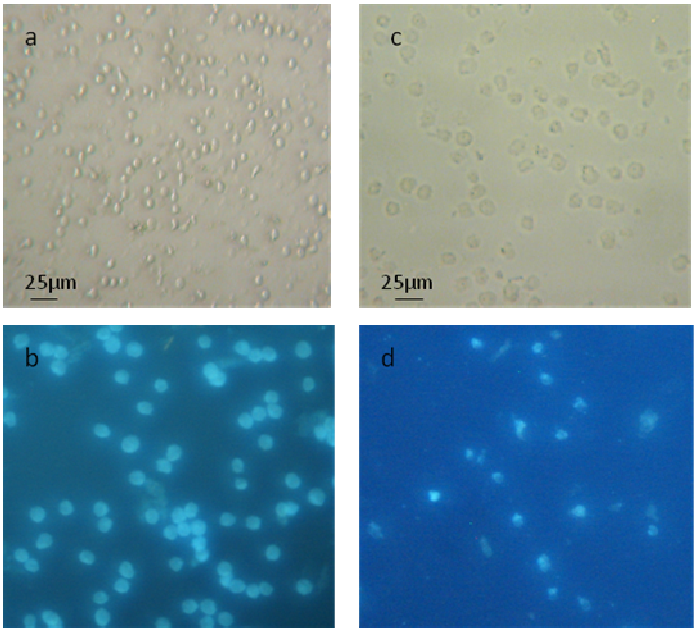
همانطور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده، یافته‌های به دست آمده از سنجش MTT نشان داد که درصد زنده بودن سلول های تحت تیمار با زهر زنبور در غلظت های ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۲ و ۱۵ میکرو گرم بر میلی لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۳۷، ۵۱، ۷۳/۵، ۸۱/۵، ۸۸، در ۴۸ ساعت۳۳/۵، ۴۶، ۶۷/۵، ۸۱، ۸۴/۵ و در ۷۲ ساعت ۵۹، ۵۶/۵، ۷۶، ۸۱، ۸۳/۵ بود. این نتایج نشان داد که اثر کشندگی سلولی زهر در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت وابسته به دوز و زمان بوده و به طور تقریبی با غلظت ۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر از زهر زنبور موجب القای ۵۰ درصد مرگ سلولی می شود. این در حالی است که در ۷۲ ساعت تیمار با دوزهای بالاتر از ۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر وابسته به دوز نمی باشد.



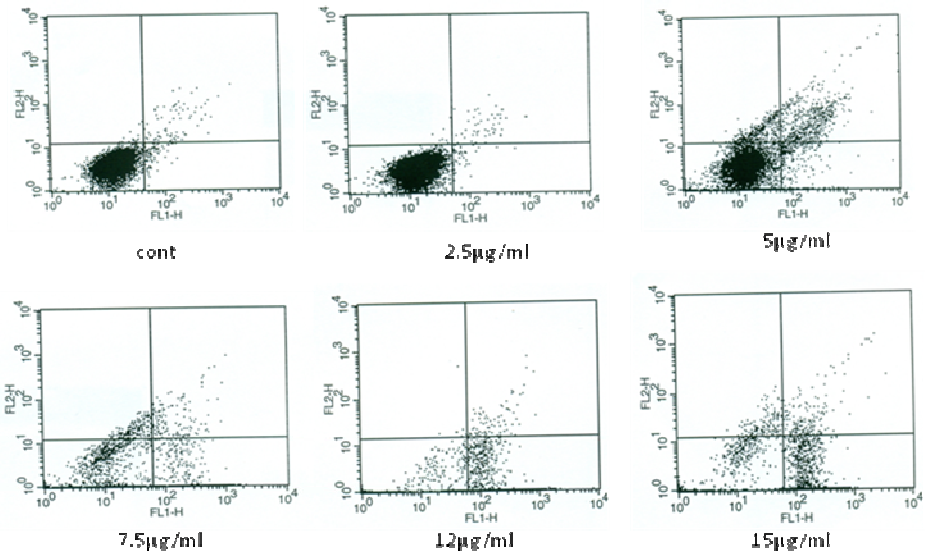
نمودار۱: مقایسه ی اثرغلظت های مختلف زهر زنبور بر درصد بقا (Viability%) سلول های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار بر اساس سنجش MTT. $P<0.05$، $P<0.01$**، $P<0.001$*** (Mean±S.E)*

آنالیز مورفولوژیک سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با زهر زنبور

جهت بررسی مورفولوژی سلولی، سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با زهر زنبور به دقت توسط میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌ها قبل از تیمار با زهر زنبور به صورت سالم و یکپارچه با هسته کاملا طبیعی ظاهر شدند. در این سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های بالاتر، سیتوپلاسم به صورت حباب دار شده و هسته به صورت متراکم و قطعه قطعه مشاهده شد (شکل ۱).



شکل۱: تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های HL-60 (رنگ آمیزی شده با هوخست) گروه کنترل و گروه‌های تیماری مختلف در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت که تحت تاثیر غلظت‌های مختلف زهر قرار گرفته اند. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، در سلول‌های گروه تیمار (غلظت ۱۲میکرو گرم بر میلی لیتر) هسته سلول‌ها به صورت قطعه قطعه در آمده و سیتوپلاسم نیز حالت طبیعی ندارد، در حالی که در گروه کنترل هسته و سیتوپلاسم سلول‌ها به صورت طبیعی دیده می‌شود.



شکل ۲: آنالیز فلوسیتومتری اثر زهر زنبور بر روی سلول‌های HL-60. نتایج به دست آمده از این آزمون نشان می‌دهد که با گذشت ۲۴ ساعت تیمار با غلظت های پایین تر زهر زنبور اثر زیادی روی القای مرگ آپوپتوزیس روی سلولها نداشته اما در غلظت ۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر از زهر زنبور با بکارگیری annexin V ، سلول‌ها حدود ۵۰ درصد مرگ آپوپتوزیس را نشان دادند. در منحنی، جمعیت سلول های زنده در سمت چپ پایین، سلول های در مراحل اولیه آپوپتوزیس در سمت راست پایین، سلول های در مراحل انتهایی آپوپتوزیس در سمت راست بالا و سلول های نکروزه در سمت چپ بالا قرار دارند.

آنالیز مرگ سلولی آپوپتوزیس توسط آزمون فلوسیتومتری

به منظور تعیین مقدار IC_{50} (Inhibitory Concentration) سلول‌ها تحت تاثیر زهر زنبور با دوزهای ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۲ و ۱۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. پس از تیمار، سلول‌ها با آنتی بادی اولیه annexinV و آنتی‌بادی ثانویه نشاندار به رنگ فلورسنت انکوبه شدند. در شکل ۲، سلول‌های زنده در سمت چپ و پایین، سلول‌های در مرحله اولیه آپوپتوزیس در سمت راست پایین، سلول‌های در مرحله انتهایی آپوپتوزیس در سمت راست بالا و سلول‌های نکروز شده در سمت چپ بالای منحنی دیده می‌شوند. داده‌های منحنی فلوسیتومتری نشان داد که زهر زنبور در دوز ۱۲ میکرو گرم بر میلی‌لیتر موجب القای ۵۰ درصد مرگ آپوپتوزی شده است.

بحث

اثرات زهر زنبور عسل در درمان بیماری‌های التهابی، تسکین درد و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی در چندین دودمان سلولی مورد تایید قرار گرفته است. در این آزمایش اثرات سمی زهر زنبور بر روی میزان تکثیر، مورفولوژی و نوع مرگ القا شده در رده سلولی HL60 بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون MTT در این آزمایش نشان داد که با افزایش دوز در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان بقا سلولی کاهش یافت. این بدان معنی است که افزایش دوز اثر قوی‌تری در مهار تکثیر سلول‌های HL60 داشته است. اما در ۷۲ ساعت با افزایش دوز زهر، اثر مهارکنندگی تکثیر زهر زنبور، به دلیل پایین بودن نیمه عمر زهر و غیر فعال شدن اجزا سازنده آن در محیط کشت رو به افزایش دارد. اثر مهار تکثیر زهر زنبور توسط محققینی که زهر زنبور را بر تعدادی رده‌های سرطانی بررسی کردند، نیز مشاهده شده است. Liu و همکارانش (۱۶) گزارش کردند که زهر زنبور تکثیر سلول‌های ملانومای موشی را در شرایط *in vitro, in vivo* مهار می‌کند. Chu و همکاران (۲۰) گزارش کردند که زهر زنبور عسل موجب مهار رشد سلول‌های کارسینومای کبدی و سلول‌های اوستئوسارکومای MG63 می‌شود. Chen و همکاران (۶) نیز اثبات کردند که زهر زنبور در سلول‌های اوستئوسارکوما موجب مرگ آپتوزی سلول‌های U2 OS از طریق بیان Fas می‌شود.

در این پژوهش به منظور نشان دادن مرگ آپوپتوزی سلول‌های تیمار شده با زهر زنبور از رنگ آمیزی با هوخست و آزمون فلوسیتومتری با annexin V و آنتی بادی ثانویه نشاندار با FITC استفاده شد. مکانیسم عمل annexin V به این صورت است که این ترکیب نوعی پروتئین اتصال یابنده فسفولیپیدی با وزن مولکولی ۳۶ کیلو دالتون بوده و گرایش زیادی برای اتصال به فسفاتیدیل سرین در غلظت‌های فیزیولوژیک کلسیم دارد.

در تائید داده‌های به دست آمده از این آزمایش، نوع مرگ القا شده توسط زهر زنبور در سلول های سرطانی در شرایط *in vitro, in vivo* در پژوهش هایی توسط سایر محققین گزارش شده است. Jang و همکاران (۲۱) در یافتند که زهر زنبور موجب القا آپوپتوزیس در سلول های سرطان ریه NCI-H1299 شده و این عمل از طریق مهار بیان COX_2 صورت می‌گیرد.

Moon و همکارانش (۲۲) نشان دادند که تیمار سلول‌های لوکمیایی u937 با زهر زنبور، باعث القا آپوپتوزیس از طریق کاهش بیان چرخه سیگنالینگ AKt,ERK می‌شود. علاوه بر این آپوپتوزیس القا شده با زهر زنبور همراه با کاهش بیان Bcl2، افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و کلیواژ پلی ADP ریبوز پلیمراز بود. این مطالعات هم چنین نشان داد که زهر زنبور فعالیت P38-MAPK را راه اندازی کرده و باعث کاهش بیان AKt,ERK شده و القا آپوپتوزیس نقش مهمی در فعالیت ضد توموری زهر زنبور دارد. Orsolic و همکارانش (۲۳) زهر زنبور را بر روی سلول‌های کارسینومای پستانی در شرایط *in vitro* اثر داده و با استفاده از آزمون MTT دریافتند که زهر زنبور در زمان ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت در دوزهای ۲/۱۵ و ۱/۴۳ میکرو گرم بر میلی گرم موجب ۵۰ درصد مرگ و میر سلول‌ها می‌شود. همچنین آنالیز فلوسیتومتری annexin نشاندار با فلورسئین و پروپودیوم یداید تکثیر این سلول‌ها را ۳ ساعت بعد از تیمار این سلول‌ها با دوز ۲/۸۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر حدود ۵۰ درصد آپوپتوزیس نشان داد .Hong و همکاران (۲۴) نیز زهر زنبور را بر روی سلول‌های فیبروبلاست سینوویال اثر داده و نشان دادند که زهر زنبور در دوز ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر به صورت وابسته به دوز و زمان موجب القا اثرات سمی و فعال کردن چرخه مرگ آپوپتوزیس با کاهش بیان Bcl2، افزایش بیان bax و کاسپاز ۳ در این سلول‌ها می شود.

Putz و همکارانش (۲۵) اثبات کردند که همکاری بین اثر هم افزایی زهر زنبور بر روی فسفولیپاز A_2 و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳و۴ بیس فسفات در مهار تکثیر تومور کاراتر از تاثیر هر یک به تنهایی است. Cho و همکاران (۲۶) سلول های MCF-7 القا

شده توسط PMA را در معرض زهر زنبور قرار داده و دریافتند که زهر زنبور با غلظت ۵ -۳ میکرو گرم بر میلی‌لیتر، تهاجم و مهاجرت سلول‌ها را مهار و بیان متالوپروتئیناز ۹ را که مرتبط با متاستاز است از طریق مهار چرخه های سیگنال رسانی p38MAPK,JNK سرکوب نموده است. محسنی کوچصفهانی و همکاران (۲۷) اثر القا کننده تمایز توام زهر زنبور و ۱و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3 را بر روی سلول‌های HL60 بررسی کرده و نشان دادند که زهر زنبور به تنهایی و با غلظت ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر مهار کننده تکثیر بوده اما در ترکیب با ۱و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3 تمایز به سمت مونوسیت را در این سلول‌ها القا خواهد کرد. پریور و همکاران (۲۸) نیز اثر هم افزایی زهر زنبور و ال ترانس رتینوئیک اسید را بر روی مهار تکثیر و القای تمایز سلول های HL60 بررسی کرده و دریافتند که زهر زنبور به صورت وابسته به غلظت و زمان در غلظت‌های بالاتر از ۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر موجب القا مرگ سلولی می‌شود اما نوع مرگ سلولی را در این سلول‌ها مشخص نکردند.

داده‌های حاصل از فلوسیتومتری با استفاده از annexinV به عنوان یک مارکر آپوپتوزیس در این آزمایش نشان داد که نوع مرگ سلولی القا شده توسط زهر زنبور بر روی سلول‌های HL60 آپوپتوزیس بوده و۵۰ درصد این سلول‌ها در دوز ۱۲ میکرو گرم بر میلی‌لیتر از زهر زنبور در زمان ۲۴ ساعت دچار مرگ سلولی آپوپتوزیس شدند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که زهر پاییزه سمنان در غلظت های بالاتر اثر مهار تکثیر بر روی سلول‌های HL60 داشت. رنگ آمیزی هوخست نیز تغییر مورفولوژیک آپوپتوزیس (اجسام آپوپتوزی) را در گروه تیماری با دوزهای بالاتر نشان داد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این آزمایش، زهر زنبوری که در فصل پاییز و از منطقه سمنان تهیه شده است، در غلظت‌های پایین تر از ۱۲ میکرو گرم بر میلی‌لیتر در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار اثر مهارکننده تکثیر وابسته به غلظت و زمان داشته و در غلظت ۱۲ میکرو گرم بر میلی‌لیتر (۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار) موجب ۵۰ درصد مهار تکثیر سلول‌های سرطانیHL60 و القای مرگ از نوع آپوپتوزیس در این سلول‌ها می‌شود. در نتیجه اثر القا کنندگی آپوپتوزی زهر زنبور بر روی این رده سلولی می‌تواند نوید دهنده باشد که از آن به عنوان دارو در درمان سرطان استفاده شود. لذا پیشنهاد می شود که با شناسایی مسیر راه اندازی آپوپتوزیس تحت تاثیر زهر زنبور بتوان آن را به تنهایی یا در کنار سایر داروها در درمان سرطان به کار برد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی و آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی به انجام رسیده است. از این رو از ریاست محترم دانشکده علوم زیستی ، مدیر محترم گروه زیست شناسی دانشگاه خوارزمی، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد جهت تحقق این طرح و از همکاری جناب آقای دکتر ایمانی جهت تامین زهر زنبور عسل و از مرکز سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت مساعدت در انجام فلوسیتومتری صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1. Peiren N, Vanrobaeys F, Graf DC, Devreese B, et al. The protein composition of honey bee venom reconsidered by a proteomic approach. Biochemical Biophysical. 2005; 1752:1-5.

2. Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, et al. Antiarthritic effect of bee venom:inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. Arthiritis and Rheumatism. 2004; 50: 3504-3515.

3. Holle L, Song W, Holle E, Wen Y, et al. Amatrix metalloproteinase 2 cleavable melittin/avidin conjugates specifically targets tumor cells in vitro and in vivo. International Journal of Oncology. 2003; 22(1): 93-98.

4. Terra RM, Guimaraes JA, Verli H. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. Molecular graphics and modeling. 2007; 25(6): 767-72.

5. 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-κB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006; 317(2): 627-34.

6. Chen YQ, Zhu ZA, Hao YQ, Dai KR, et al. Effect of melittin on apoptosis and necrosis of U2 OS cells.Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2004; 2(3): 208-209.

7. Rahman KM, Sarkar FH, Banerjee S, Wang Z, et al. Therapeutic intervention of experimental breast cancer bone metastasis by indole-3-carbinolin SCID-

human mouse model. Molecular Cancer Therapeutics. 2006; 5:2747-2756.

8. Bhupathi P, Chetty C, Kunigal S, Vanamala SK, et al. Blockade of tumor growth due to matrix metalloproteinase-9 inhibition is mediated by sequential activation of beta-1 integrin,ERK and NF-kappaB. Journal of Biological Chemistry. 2008; 283: 1545-1552.

9. Russell PJ, Hewish D, Carter T, Sterling LK, et al. Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melitin-like peptide aganst prostat cancer:in vitro and in vivo studies.Cancer Immunology. 2004; 53(5): 411-421.

10. Son DJ, Leea JW, Leea YH, Songb HS, et al. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. Pharmacology and Therapeutics. 2007; 115 (2): 246-70.

11. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer.Cell. 2000; 100: 57-70.

12. Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in yhe development and treatment of cancer. Oxford journal carcinogenesis. 2004; 26(2): 263-270.

13. Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, et al. Translocations of the RARa gene in acute promyelocytic leukemia. Oncogene. 2001; 20: 7186 –7203.

14. Ratanachoo K, Gascoyne PRC, Ruchirawat M. Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis. . Biochim Biophys Acta. 2002; 1564 (2): 449–458.

15. Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in vitro. Pharm Pharmacological. 2002; 54 (8): 1083-1089.

16. Hu H, Chen D, Li Y, Zhang X. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2006; 58 (1): 83-89.

17. Hamedani M, MirshafieyA, Vatanpour H, Khorramizadeh MR, et al. In vitro assessment of Bee Venom effects on Matrix Metelloproteinase Activity and Interferon Production. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology. 2005; 4:1-6.

18. Romijn JC, Verkoelen CF, Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines invitro. The prostate. 2006; 5;12(1): 99-110.

19. Wilkins RC, Kutzner BC, Troung M, Sanchez-Dardon J, et al. Analysis of radiation –induced apoptosis in human lymphocyte:Flowcytometery using Annexin V and propodium iodide versus the neutral commet assay. Cytometery. 2002; 48(1):14-19.

20. Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, Chang HC, et al. Phospholipase A2-independent Ca entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. Life Science. 2007; 80: 364-369.

21. Jang MH, Shin MC, Sabina LS, Han SM, et al. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. Pharmacology Science. 2003; 91: 95 –104.

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. Immunopharmacology. 2006; 6(12): 1796–1807.

23. Orsolić N, Sver L, Verstovsek S, Terzić S, et al. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. Toxicon. 2003; 41(7): 861-70.

24. Hong SJ, Rim GS,Yang HI,Yin CS, et al. Bee venom induces apoptosis through caspase3 activation in synovial fibroblast of patient with rheumatoid arthritis.Toxicon. 2005; 46(1): 39-45.

25. Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, et al. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phosoholipase A2 and phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate. Cancer Immunological Immunotherapy. 2006; 55(11): 1374-1383.

26. Cho HJ, Jeong YJ, Park KK,ParkYY, et al. Bee Venom suppressPMA-mediated MMP-9 gene activation via JNK/p38 and NF-kB dependent mechanism. Journal of Ethnopharmacology. 2010; 127: 662-668.

27. Mohseni Kouchesfehani H, Parivar K, Nabiuni M, Rahimi M. Effect of Honey Bee Venom and 1,25 di hidroxy D3 on Differentiation induction of promyelocytic HL-60 Cell Line. Hamedan medical science. 2009; 16(4):5-12.[Persian]

28. Parivar K, Nabiuni M, Jalali H, Nadali F. Effect of Honey Bee Venom and All-trans Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of HL-60 Cell Line. Rafsanjan Medical Science, 2010; 10(2): 112-126. [Persian]

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Winter 2012; 2(4): 425-433

Determination of Apoptotic Doses of Bee Venom on Human Promyelocytic Leukemia Cells

Nabiuni M[1 *], Bahar Ara J[2], Amini E[3], Jalali H[3]

1. Animal Developmental Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Iran & Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran
2. Animal Developmental Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Iran
3. Ph.D. Student in Developmental Biology, Kharazmi University, Tehran

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

Received: 13 Dec. 2011 Accepted: 10 Apr. 2012

Abstract

Aim: Recently, researchers have reported that BV (Bee Venom) has a potent anti inflammatory, anti tumor and anticancer effects. Besides, one of the essential aim in cancer therapy is restoring apoptosis. The Objective in this study was determination of apoptotic concentration induced by BV (Autumn, Semnan) on HL60 cancer cells.

Material & Methods: In this study, HL60 cells were purchased from the Pasteur Institute in Tehran and were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics (including penicillin and streptomycin) in the plate. After 2 hours, the cells were exposed by BV concentrations (2.5, 5, 7.5,12,15 µg/ml) for 24, 48, 72 hours. After passing desired time, the morphology of cells was determined under inverted microscope and cell viability was studied by MTT assay and determination of cell death was evaluated by flow cytometery assay and Hoescht staining.

Result: The morphological analysis and the results from Hoescht staining & flowcytometery Annexin V antibody exhibited that the cell death induced by BV was significantly apoptosis and bee venom by concentration of 12 µg/ml results in %50 of apoptosis cell death.

Conclusion: Our findings from this study showed that using lower dosage of BV during 48h treatment period cause inhibition of proliferation in time and dose dependent manner and higher dosage of 15 µg/ml cause cell lysis and necrosis. Experimental data showed that 12 µg/ml is inducer of apoptosis in HL60 cells.

Keywords: Bee Venom, Apoptosis, Annexin V