

Effect of bee venom on human acute T-cell lymphoblastic leukemia cell line apoptosis

Nabiuni M*, Parivar K, Divsalar A, Safayinejad Z

Department of Biology, Faculty of Sciences, Tarbiat Moallem University, Tehran, I. R. Iran.

Received July 31, 2011; Accepted September 21, 2011

Abstract:

Background: Recent studies indicate the potential role of bee venom (BV) in cancer therapy. Moreover, many evidences suggest that the regulation of apoptosis plays an important role in tumorigenesis. Considering the apoptosis-inducing and anti-tumor effect of BV, this study aimed to determine the type of the cell death induced by BV on MOLT-4 cancer cell line.

Materials and Methods: In this experimental study, MOLT-4 cells were first cultured in RPMI-1640 medium in plate, then the cells were treated with different concentrations (1, 3, 6 and 8 µg/ml) of BV for 24 and 48 h. Morphology of cells, cell viability and type of the cell death were induced by BV were evaluated using inverted microscopy, the MTT assay and flow cytometry, respectively.

Results: Cell survival findings showed the BV CC_{50} values of 6.3 and 0.6 µg/ml for the cell line in 24 and 48 h, respectively. Moreover, Morphological and Annexin-V antibody analyses indicated that the BV-induced cell death might be an apoptosis.

Conclusion: As BV can induce the apoptosis in MOLT-4 cancer cells. Thus, it would bring hope for designing novel drugs for cancer-therapy in future.

Keywords: Bee venom, Apoptosis, MOLT-4 cell line, ALL

*** Corresponding Author.**

Email: Nabiuni@tmu.ac.ir

Tel: 0098 912 660 9337

Fax: 0098 261 451 0005

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences May, 2012; Vol. 16, No 2, Pages 121-127

Please cite this article as: Nabiuni M, Parivar K, Divsalar A, Safayinejad Z. Effect of bee venom on human acute T-cell lymphoblastic leukemia cell line apoptosis. *Feyz* 2012; 16(2): 121-7.

بررسی اثر زهر زنبور عسل بر آپوپتوز رده سلولی سرطانی لوکمی لنفوبلاستی حاد انسانی سلول T

محمد نبیونی^{۱*}، کاظم پریور^۲، عادلہ دیوسالار^۱، زهرا صفایی نژاد^۳

خلاصہ:

سابقه و هدف: مطالعات اخیر تأثیر بالقوه زهر زنبور (BV) Bee Venom در درمان سرطان را اثبات می‌کنند. شواهد زیادی وجود دارند که تنظیم آپوپتوز فرآیند مهمی در ممانعت از پیشرفت تومور می‌باشد. با توجه به اینکه مطالعات اخیر نشان می‌دهند BV دارای توانایی القاء آپوپتوز و در نتیجه سرکوب تومور می‌باشد، لذا هدف از انجام این مطالعه تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط BV در دودمان سرطانی MOLT-4 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا سلول‌های سرطانی MOLT-4 در محیط کشت RPMI-1640 درون پلیت کشت داده شدند. در ادامه، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف BV (۱، ۳، ۶، ۸ $\mu\text{g/ml}$) در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. آنالیز مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس، درصد بقاء سلول‌ها توسط آزمون MTT و نوع مرگ سلولی القاء شده با BV توسط آزمون فلوسیتومتری بررسی شد.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون بقاء سلولی نشان داد که میزان CC_{50} BV برای این رده سلولی در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب $0.6 \mu\text{g/ml}$ و $6.3 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. آنالیز مورفولوژیکی و نتایج حاصل از آنتی‌بادی Annexin V نیز نشان داد که مرگ القاء شده توسط BV از نوع آپوپتوز می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این مطالعه، BV قادر به القاء آپوپتوز در رده MOLT-4 است. لذا، این ترکیب می‌تواند نوید بخش طراحی داروهای جدید برای درمان سرطان در آینده‌ای نزدیک باشد.

واژگان کلیدی: زهر زنبور عسل، آپوپتوز، رده سلولی MOLT-4، لوکمی لنفوبلاستی حاد

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۱، صفحات ۱۲۷-۱۲۱

مقدمه

ملیتین و فسفولیپاز A₂ به‌عنوان دو جزء اصلی BV در نظر گرفته می‌شوند [۸]. ملیتین که ۶۰-۵۰ درصد زهر خشک را تشکیل می‌دهد، به‌عنوان جزء اصلی سمی زهر شناخته می‌شود. هنگامی که مقداری از مولکول‌های ملیتین در غشاء سلول نفوذ کنند، فسفولیپیدها توسط آن شکسته شده و سلول لیز می‌گردد. در واقع این پلی‌پپتید منجر به از دست رفتن تمامیت دو لایه‌های فسفولیپیدی و سنتزی می‌شود. در کیسه زهر زنبور، ملیتین به صورت تترامر می‌باشد، اما هنگام اثرگذاری بر روی سلول به صورت مونومر عمل می‌نماید [۸]. گزارش شده است که این ماده قادر به القاء آپوپتوز بوده و اثرات ضد توموری دارد. انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی مانند سلول‌های سرطانی کلیوی، کبدی، ریوی، پروستاتی، مثانه‌ای، کارسینومای پستانی و لوکمی می‌توانند توسط ملیتین به‌عنوان یکی از اجزاء فعال BV هدف‌گیری شوند [۷]. فسفولیپاز A₂ که ۲۰-۱۵ درصد BV را تشکیل می‌دهد، باعث فروپاشی ساختار فسفولیپیدهای غشاء سلولی و در نتیجه فروپاشی غشاء سلولی می‌گردد [۹]. شواهد زیادی دال بر این مطلب وجود دارند که آپوپتوز فرآیند مهمی در ممانعت از پیشرفت تومور بوده و نقش مهمی در درمان انواع تومورها بازی می‌کند [۱۰]. به‌بیان دیگر می‌توان گفت که یکی از بهترین

مطالعات گسترده‌ای در مورد مهار رشد سلول‌های توموری و متاستاز و همچنین القاء آپوپتوز توسط مواد طبیعی گزارش شده است که نوید بخش درمان موثرتر انواع تومورهای انسانی می‌باشند [۵-۱]. BV ترکیبی است که به‌صورت سنتی برای تسکین درد و درمان بیماری‌های التهابی مزمن مانند آرتریت‌ها مورد استفاده بوده و تحقیقات متعددی که اخیراً صورت گرفته‌اند تأثیر بالقوه BV در درمان سرطان را اثبات می‌کنند [۶]. BV ترکیب بسیار پیچیده‌ای از پپتیدهای مختلف مانند ملیتین، آپامین، آدولاپین، آنزیم‌هایی از جمله هیالورونیداز و فسفولیپاز A₂، آمین-های فعال بیولوژیکی نظیر هیستامین و اپی‌نفرین و اجزاء غیرپپتیدی با خواص دارویی فراوان می‌باشد [۷].

^۱ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم

^۲ استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم

^۳ دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم،

دانشگاه تربیت معلم

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، دانشگاه تربیت معلم تهران، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۲ ۶۶۰۹۳۳۷ دپو: ۰۲۶۱ ۴۵۱۰۰۰۵

پست الکترونیک: Nabiuni@tmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۹ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۶/۳۰

همکارانش گزارش کردند که BV در یک مسیر وابسته به کلسیم و غیر وابسته به کاسپاز موجب القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در رده A2058 می‌گردد [۱۹]. هم‌چنین، نشان داده شده است که BV در یک مسیر وابسته به کاسپاز یا غیر وابسته به آن موجب القاء آپوپتوز در رده سلولی Ca Ski می‌گردد [۲۰]. Park و همکارانش اثبات نمودند که BV و ملتین رشد رده‌های سلولی مرتبط با سرطان پروستات را از طریق القاء آپوپتوز مهار می‌کند [۲۱]. باتوجه به این یافته‌ها و با در نظر گرفتن این نکته که تاکنون هیچ‌گونه گزارشی در مورد تأثیر زهر زنبور بر روی لوکمی لنفوبلاستی حاد صورت نگرفته است، هدف از این پژوهش، تعیین دوز کشنده زهر زنبور و نوع مرگ سلولی القاء شده توسط زهر زنبور در رده سلولی MOLT-4 که یک رده سلولی مرتبط با این نوع سرطان است، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول: پس از تهیه رده سلولی MOLT-4 (به- شماره C149) از انستیتو پاستور تهران، سلول‌ها در محیط کشت (SIGMA) PMI-1640 غنی شده با ۱۰ درصد (Gibco) FBS (Fetal Bovine Serum) و ۱۰۰ Unit/ml آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (Gibco) به تعداد 8×10^4 درون پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شده و درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از گذشت ۱ ساعت، یک گروه از سلول‌ها به‌عنوان گروه کنترل هیچ‌یک از غلظت‌های BV را دریافت نکرد و سایر گروه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های ۱، ۳، ۶ و ۸ µg/ml از زهر زنبور (تهیه شده با استفاده از روش شوک الکتریکی با به‌کارگیری ولتاژ ۲۰ ولت بر روی صفحه شیشه‌ای) قرار گرفتند.

آزمون MTT جهت ارزیابی بقاء سلولی: برای بررسی تأثیر BV بر میزان بقاء سلولی از روش رنگ سنجی که به اختصار MTT-3 (5,5-dithiazolomethylDi(4-phenyl-2-yl)-2-tetrazolium bromide) نامیده می‌شود، استفاده شد. این روش بر پایه توانایی تبدیل محلول MTT به بلورهای فوروسازان نامحلول توسط سلول‌های زنده استوار است. به‌منظور انجام این تست سلول‌ها به تعداد مذکور در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. در ادامه سلول‌ها با غلظت‌های مختلف زهر زنبور (۱، ۳، ۶ و ۸ µg/ml) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان‌های مورد نظر به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه کرده و سلول‌ها به مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت این مدت زمان، به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر

استراتژی‌های به‌کار گرفته شده توسط ترکیبات ضد توموری، القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است [۱۱]. آپوپتوز یکی از اشکال مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد که جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آن به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. این نوع مرگ سلولی دارای عملکرد تکوینی و هومئوستاتیک می‌باشد. نقایصی در مسیر وقوع این نوع مرگ منجر به بروز مشکلات متعددی از جمله نامیرایی سلول و تومور زایی می‌گردد [۱۲]. سلول‌های آپوپتوزی با تغییرات مورفولوژیکی خاصی مانند متورم شدن غشا، چروکیدگی سیتوپلاسم و کاهش اندازه سلول (pyknosis)، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته (karyorrhexis) و در نهایت شکل‌گیری اجسام آپوپتوتیک که ویژگی غالب این نوع مرگ سلولی است شناخته می‌شوند. آپوپتوز بدون این که منجر به ایجاد واکنش‌های خود ایمنی و یا پاسخ‌های التهابی گردد، موجب هدف‌گیری سلول به سمت مرگ می‌گردد، زیرا سلول‌های آپوپتوتیک یک سری سیگنال‌هایی تحت عنوان eat-me signal از خود نشان می‌دهند که منجر به شناسایی و بلعیده شدن آنها توسط ماکروفاژها می‌گردد [۱۳]. از جمله این سیگنال‌ها می‌توان به جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین (PS) از سطح داخلی غشاء به سطح خارجی آن اشاره نمود [۱۴]. PS مولکولی است که به‌صورت طبیعی در نیمه داخلی غشاء پلاسمایی قرار دارد. در طی مراحل اولیه آپوپتوز زمانی که هنوز تغییرات مورفولوژیکی هسته مانند قطعه قطعه شدن DNA رخ نداده است و سلول به‌صورت دست نخورده است، این مولکول از نیمه داخلی غشاء سیتوپلاسمی به نیمه خارجی آن منتقل می‌شود [۱۵]. انکسین V (Annexin V) به‌عنوان یک پروتئین اندوژنوس ۳۲ کیلو-دالتونی قادر به اتصال به PS ظهور یافته در غشاء خارجی در یک الگوی وابسته به کلسیم می‌باشد؛ بنابراین می‌توان از انکسین V به- عنوان مارکر مناسبی برای شناسایی مراحل اولیه تا میانی آپوپتوز استفاده نمود [۱۶]. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که BV از طریق القاء آپوپتوز در مهار رشد سلول‌های سرطانی تأثیر گذار است. به-طور مثال نشان داده شده است که BV قادر به القاء آپوپتوز و مهار بیان سیکلو اکسیژناز ۲ (COX-2) در رده سلولی سرطان ریه انسانی NCI-H1299 است [۸]. Lee و همکارانش با بررسی اثرات BV بر روی سلول‌های لنفوسیتی سالم انسانی و رده سلولی سرطانی انسانی HL-60 نشان دادند که BV کامل دارای خصوصیات سیتوتوکسیک انتخابی بر روی سلول‌های نرمال و سرطانی است [۱۷]. BV از طریق افزایش بیان کاسپاز ۳ و مهار بیان ERK و Akt/Bcl-2 موجب القاء آپوپتوز در رده سلولی لوکمی میلوئیدی انسانی U937 نیز شده است [۱۸]. Tu و

شد؛ ۶- در این مرحله $20 \mu\text{l}$ از آنتی‌بادی ثانویه (anti-rabbit IgG) کوئژوگه با رنگ فلورسنت FITC رقیق شده با بافر بلوکه کننده به سلول‌ها افزوده و نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در تاریکی درون یخچال قرار داده شدند؛ ۷- سپس در این مرحله حجم محلول‌ها را با PBS به $1000 \mu\text{l}$ رسانده به مدت ۱۲ دقیقه در 2200 rpm سانتریفیوژ شدند و ۸- در پایان، به هریک از نمونه‌ها $300 \mu\text{l}$ فرمالین ۱ درصد اضافه کرده و با دستگاه فلوسیتومتری آنالیز گردیدند.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط آزمون One-way ANOVA و با استفاده از نرم افزار InStat-3 انجام شد $P < 0.05$ معنی دار تلقی گردید و هر آزمایش حداقل ۳ مرتبه تکرار شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی تأثیر BV بر میزان بقای سلولی رده سلولی MOLT-4 با روش MTT نشان داد که BV در یک الگوی وابسته به دوز و زمان منجر به القاء مرگ سلولی در این رده می‌گردد. همان‌طور که در شکل شماره ۱ نیز نشان داده شده است درصد بقای سلول‌های تحت تیمار با BV در غلظت‌های ۱ و ۳ و ۶ و ۸ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۸۷/۵ درصد ($P=0.05$)، ۸۱/۵ درصد ($P=0.01$)، ۵۴ درصد ($P=0.001$) و ۴۴/۵ درصد ($P=0.001$) و در غلظت‌های ۱، ۳ و ۶ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۳۸، ۲۸ و ۲۵/۶ درصد (همگی با $P=0.001$) بود و غلظتی از این ترکیب که منجر به القاء پنجاه درصد مرگ سلولی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت گردید به ترتیب ۶/۳ و $0.6 \mu\text{g/ml}$ بود.

آنالیز مورفولوژیک سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با زهر زنبور

به منظور بررسی مورفولوژی سلولی، سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با BV به دقت توسط میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. شکل شماره ۲ نشان می‌دهد که سلول‌ها قبل از تیمار با BV به صورت سالم و یکپارچه با هسته کاملاً طبیعی دیده می‌شدند، در صورتی که پس از تیمار با این ترکیب بسته به میزان دوز دریافتی درجات مختلفی از متراکم شدن هسته مشاهده گردید.

ارزیابی آپوپتوز به روش فلوسیتومتری

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های CC_{50} و $2 CC_{50}$ زهر

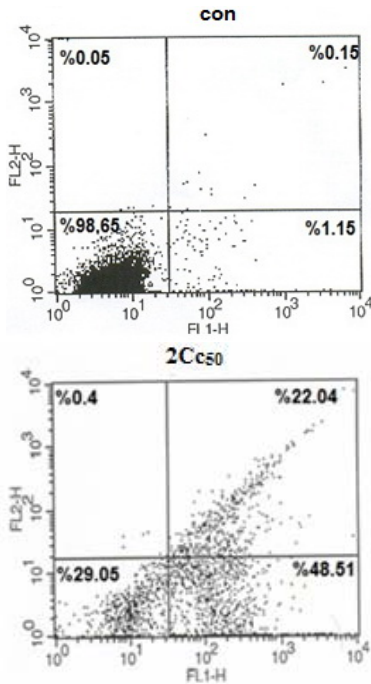
از پروپانول اسیدی اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۱۰-۸ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شده و سپس دانسیته نوری محلول درون هر چاهک در طول موج 570 nm با استفاده از اسپکتروفوتومتر سنجیده شد و درصد بقای سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{Viability percentage} = \frac{\text{Optical density test}}{\text{optical density control}} \times 100$$

ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس: پس از کشت سلول‌های MOLT-4 و تیمار نمودن آنها با غلظت‌های مورد نظر BV و پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی به دقت با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند.

ارزیابی آپوپتوز با استفاده از آزمون فلوسیتومتری: همان‌گونه که شرح آن گذشت انکسین-V، پروتئینی است که در یک رفتار وابسته به کلسیم به PS موجود در غشاء پلاسمایی متصل می‌شود. سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز می‌باشند PS را از نیمه درونی غشاء پلاسمایی به نیمه خارجی آن می‌فرستند و به عنوان علامتی برای سلول‌های فاگوسیتوز کننده تلقی خواهد شد تا پیش از آن که تمامیت غشاء این سلول‌ها از بین برود و مواد التهابی از آنها بیرون بریزد، توسط سلول‌های فاگوسیتوز کننده حذف شوند. بر این اساس سلول‌هایی که در مرحله آغازی آپوپتوز هستند از لحاظ بر همکنش با انکسین V-FITC، که FITC متصل به آن فلورسانس سبز رنگ ایجاد می‌کند مثبت می‌باشند. به منظور مهیا سازی سلول‌ها جهت بررسی مرگ آپوپتوتیک ناشی از تیمار با BV در غلظت‌های CC_{50} (غلظتی از BV که ایجاد ۵۰ درصد سمیت یا مرگ و میر در سلول‌ها می‌نماید) و $2CC_{50}$ با روش فلوسیتومتری مراحل زیر انجام شد: ۱- سلول‌ها به تعداد 2×10^6 در هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه کشت شدند؛ ۲- پس از پایان زمان انکوباسیون سلولی (۲۴ ساعت در غیاب و در حضور غلظت‌های ذکر شده از BV) هر یک از نمونه‌ها به منظور جمع-آوری سلول‌ها، در 2200 rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند، پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته شد؛ ۳- با هدف انجام شست و شو، به پلت‌های سلولی PBS اضافه نموده و پس از پینتاژ نمودن، در 2200 rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند، پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته شد؛ ۴- به هریک از پلت‌های سلولی $100 \mu\text{l}$ آنتی‌بادی انکسین V رقیق شده با بافر بلوکه کننده (BSA-PBS ۳ درصد) اضافه شد و به مدت ۵ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند؛ ۵- پس از طی زمان انکوباسیون، حجم سلول‌ها با PBS به $1000 \mu\text{l}$ رسانیده و در 2200 rpm سانتریفیوژ کرده، پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته

گروه d: تیمار با دوز ۳ μg/ml؛ گروه e: تیمار با دوز ۸ μg/ml و گروه c: تیمار با دوز ۶ μg/ml



شکل شماره ۳- نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری اثر زهر زنبور عسل بر روی سلول‌های MOLT-4 پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار. نتایج به دست آمده از این آزمون نشان می‌دهند که پس از طی ۲۴ ساعت دوز CC_{50} زهر زنبور چندانی بر القاء مرگ آپپتوتیک نداشته، اما دوز $2CC_{50}$ از زهر زنبور موجب القاء بخش مرگ سلولی آپپتوزی در سلول‌های این رده گشته است. در منحنی، جمعیت سلول‌های زنده در سمت چپ پایین (LL)، سلول‌های در مراحل اولیه آپپتوز در سمت راست پایین (LR) و سلول‌های در مراحل انتهایی آپپتوز در سمت راست بالا (UR) قرار دارند.

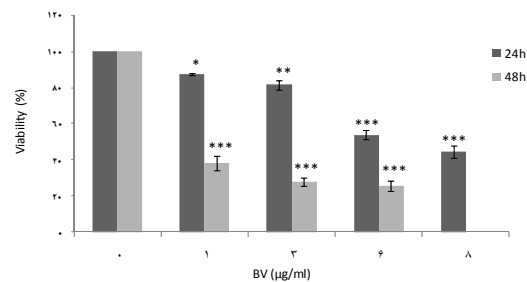
جدول شماره ۱- نتایج حاصل از آزمون فلوسیتومتری اثر زهر زنبور عسل بر روی سلول‌های MOLT-4 در نمونه کنترل و نمونه تیمار شده با دوز $2CC_{50}$ از زهر زنبور عسل.

Cells	UR	LL	LR
Control (No Bee Venom)	0.15%	0.98.68	1.15%
Bee Venom (2CC50)	22.04%	29.05%	48.51%

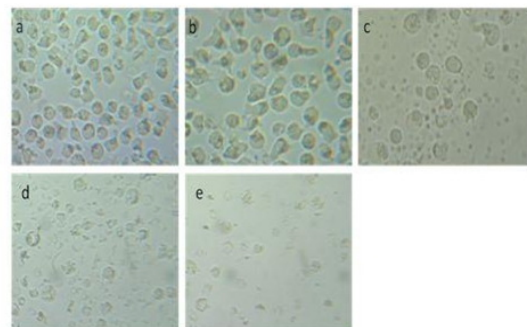
بحث

زهر زنبور عسل مانند سایر داروهای مکمل طی قرن‌هایتمادی در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتريت، مولتیپل اسکلروزیس، ترمیم زخم‌ها، نفرس، سوختگی‌ها و تسکین درد کاربرد داشته است. اخیراً نیز این ماده به‌عنوان ترکیب موثری برای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات متعدد نشان می‌دهند زهر زنبور قادر به القاء آپپتوز در رده‌های سلولی

زنبور، سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده، با آنتی بادی اولیه annexinV و آنتی بادی ثانویه نشان‌دار به رنگ فلورسنت انکوبه شدند. نتایج حاصل از این بررسی در جدول شماره ۱ و شکل شماره ۳ نشان داده شده است. در این شکل، سلول‌های زنده در سمت چپ و پایین، سلول‌های در مرحله اولیه آپپتوز در سمت راست پایین، سلول‌های در مرحله انتهایی آپپتوز در سمت راست بالا و سلول‌های نکروزه در سمت چپ بالای منحنی دیده می‌شوند. داده‌های منحنی فلوسیتومتری نشان داد که پس از طی ۲۴ ساعت دوز CC_{50} زهر زنبور تأثیر چندانی بر القاء مرگ آپپتوتیک نداشته و دوز $2CC_{50}$ زهر زنبور موجب القاء بخش اعظم مرگ آپپتوزی در سلول‌های MOLT-4 گشته است.



شکل شماره ۱- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل بر درصد بقای سلول‌های MOLT-4 پس از طی ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار بر اساس سنجش MTT. درصد بقای سلول‌های تحت تیمار با BV در غلظت‌های ۱ و ۳ و ۶ و ۸ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۵، ۵۴ و ۴۴/۵ درصد و در غلظت‌های ۱، ۳، ۶ و ۸ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۲۸، ۳۸، ۲۵/۶ درصد بود. ($P=0/05$ ، $P=0/01$ ، $P=0/001$)



شکل شماره ۲- فوتومیکروگراف از تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های MOLT-4 نسبت به گروه کنترل که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف زهر زنبور در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفته‌اند. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش دوز زهر زنبور، سیتوپلاسم و هسته سلول‌ها حالت طبیعی خود را از دست داده‌اند و تعداد سلول‌ها به صورت چشم‌گیری کاهش یافته است. بزرگ‌نمایی $\times 400$. گروه a: کنترل؛ گروه b: تیمار با دوز ۱ μg/ml؛ گروه c: تیمار با دوز

آپوپتوتیک کامل یاد نمود [۱۷]. اثر BV بر رده سلولی لوکمیایی انسانی U937 نیز نشان داد که BV القاء کننده آپوپتوز از طریق افزایش بیان کاسپاز ۳ و مهار بیان Bcl-2، Akt/ERK و افزایش سطح FAS/FASL و کاهش سطح HTert و Cox-2 در این رده است [۱۸]. Tu و همکارانش اثرات BV را بر روی رده سلولی A2058 که یک رده سلولی مربوط به ملانوما انسانی است را مورد بررسی قرار دادند. این گروه تحقیقاتی اذعان نمودند که BV در یک مسیر وابسته به کلسیم و غیر وابسته به کاسپاز موجب القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این رده می‌گردد؛ در صورتی که چنین اثری را بر روی سلول‌های فیبروبلاستی نرمال Detroit 551 ندارد [۱۹]. در یک مطالعه‌ی دیگر اثر BV بر رده سلولی Ca Ski مربوط به کارسینوما سرویکس انسان بررسی شد. BV از طریق کاهش بیان Bcl-2 و افزایش بیان p21، Bax، p53 و Fas، اختلال در عملکرد میتوکندری (کاهش پتانسیل غشایی آن) و در نتیجه آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری، تولید ROS و کلسیم و فعال شدن کاسپازهای آغازی ۸ و ۹ و متعاقب آنها کاسپاز عمل کننده ۳ منجر به قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. بر این اساس آپوپتوز القاء شده با BV وابسته به کاسپاز و میتوکندری می‌باشد و از طرف دیگر BV با القاء بیان آپوپتوز هستند، می‌توانند در درمان سرطان مفید باشند؛ لذا، BV می‌تواند گزینه مناسبی برای درمان انواع مختلف سرطان‌ها از جمله لوکمی لنفوبلاستی حاد سلول T باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم پردیس کرج انجام گرفته است. از مدیریت محترم گروه زیست شناسی و ریاست محترم دانشکده علوم که امکانات اجرایی این طرح تحقیقاتی را فراهم نمودند، از جناب آقای دکتر ایمانی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات جهت تأمین زهر زنبور عسل و مرکز سلولی-مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت همکاری‌های لازم در زمینه انجام آزمون فلوسیتومتری صمیمانه سپاسگزاریم.

References:

- [1] Orsolio N, Sver L, Verstovsek S, Terzic S, Basic I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicol* 2003; 41(7): 861-70.
[2] Orsolio N, Sacases F, Basic I. Antimetastatic ability of honey bee products. *Period Biol* 2007;

سرطانی است [۶]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار سلول‌های MOLT-4 با غلظت‌های بسیار پایین از BV موجب مهار تکثیر و القاء مرگ سلولی در یک الگوی وابسته به دوز و زمان می‌گردد؛ به طوری که غلظت $0.3 \mu\text{g/ml}$ از این ترکیب پس از طی ۲۴ ساعت و غلظت $0.6 \mu\text{g/ml}$ پس از طی ۴۸ ساعت موجب القاء پنجاه درصد مرگ سلولی در این رده شد. در واقع به علت این که غلظت‌های بسیار زیاد BV موجب رسوب این ترکیب در محیط می‌گشتند و در نتیجه داده‌های به دست آمده در تکرارهای متفاوت قابل انطباق نبودند تنها از غلظت‌های پایین BV (غلظت‌های کم‌تر از $10 \mu\text{g/ml}$) استفاده گردید. این امر، دلیل حذف نمونه تیمار شده با دوز $8 \mu\text{g/ml}$ از BV پس از طی ۴۸ ساعت، از نتایج آزمون MTT نیز می‌باشد. بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس یک ویژگی اصلی سلول آپوپتوزی یعنی هسته متراکم شده را نشان داد و آنالیز فلوسیتومتری نیز اثبات نمود که مرگ سلولی القاء شده با زهر زنبور از نوع آپوپتوز می‌باشد. در توافق با نتایج حاصل، Jang و همکارانش گزارش کردند که BV قادر به القاء آپوپتوز و مهار بیان سیکلواکسیژناز (COX-2) در رده سلولی سرطان ریه انسانی NCI-H1299 می‌باشد. آنها نشان دادند که غلظت مشخصی از BV قادر به قطعه قطعه کردن DNA به دنبال فعال شدن اندونوکلازاها، القاء تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با آپوپتوز مانند تشکیل اجسام آپوپتوتیک، افزایش بیان Bax و کاسپاز ۳ و کاهش بیان Bcl-2، مهار انتخابی بیان COX-2 و کاهش تولید پروستاگلاندین‌ها (PGs) می‌باشد [۸]. Lee و همکارانش اثرات BV را بر روی سلول‌های لنفوسیتی سالم انسانی و رده سلولی سرطانی انسانی HL-60 مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند BV کامل دارای خصوصیات سیتوتوکسیک انتخابی بر روی سلول‌های نرمال و سرطانی است. به کارگیری این ماده در یک الگوی وابسته به دوز تا ۲۴ ساعت موجب کاهش بقاء سلول‌های HL-60 می‌شود. آنها نشان دادند که فسفو لیپاز A2 موجود در BV باعث از بین رفتن تمامیت غشاء سلول‌های HL-60 می‌شود؛ در حالی که در سلول‌های لنفوسیتی نرمال انسانی BV موجب القاء تغییرات مورفولوژیکی که تا حدودی شبیه به آپوپتوز می‌باشند، می‌شود اما در واقع نمی‌توان از آن به عنوان مرگ سلولی

109: 173-80.

- [3] Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, et al. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. *Hepatology* 2008; 47(6): 1964-73.

- [4] Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(8): 1083-9.
- [5] Yusuf N, Irby C, Katiyar SK, Elmets CA. Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23(1): 48-56.
- [6] Chen J, Lariviere WR. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Prog Neurobiol* 2010; 92(2): 151-83.
- [7] Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 2007; 115(2): 246-70.
- [8] Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I, et al. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *J Pharmacol Sci* 2003; 91(2): 95-104.
- [9] Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, Chang HC, Chi CC, Su HH, et al. Phospholipase A₂-independent Ca²⁺ entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. *Life Sci* 2007; 80(4): 364-9.
- [10] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013-26.
- [11] Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32: 223-25.
- [12] Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 2007; 6(6): 686-95.
- [13] Giansanti V, Ivana Scovassi A. Cell death: A one-way journey to the graveyard. *Open Biol J* 2008; 1: 27-34.
- [14] Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* 2006; 79(5): 896-903.
- [15] Peker C, Sarda-Mantel L, Loiseau P, Rouzet F, Nazneen L, Martet G, et al. Imaging apoptosis with 99mTc-Annexin-V in experimental subacute myocarditis. *J Nucl Med* 2004; 45(6): 1081-6.
- [16] Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, Blankenberg FG, Kopiwoda S, Tait JF, et al. Technetium-99m hynic-annexin V: a potential radiopharmaceutical for the in-vivo detection of apoptosis. *Eur J Nucl Med* 1999; 26(10): 1251-8.
- [17] Lee YJ, Kang SJ, Kim BM, Kim YJ, Woo HD, Chung HW. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chem Biol Interact* 2007; 169(3): 189-97.
- [18] Moon DO, Park SY, Heo MS, Kim KC, Park C, Ko WS, et al. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through down regulation of ERK and AKT. *Int Immunopharmacol* 2006; 6(12): 1796-807.
- [19] Tu WC, Wu CC, Hsieh HL, Chen CY, Hsu SL. Honey bee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicol* 2008; 52(2): 318-29.
- [20] Ip SW, Wei HC, Lin JP, Kuo HM, Liu KC, Hsu SC, et al. Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. *Anticancer Res* 2008; 28(2A): 833-42.
- [21] Park MH, Choi MS, Kwak DH, Oh KW, Yoon DY, Han SB, et al. Anti cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-kB. *Prostate* 2010. [Epub ahead of print]