مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۳، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۱، ۲۹۶-۲۸۷

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 .Ph.D[1*]، اعظم یاراحمدی .M.Sc[2]، بهرام دلفان .Ph.D[3]، سارا میر سپاسی .M.Sc[2]، سکینه آذری .M.Sc[2]، صدیقه غلامی .M.Sc[2]، طیبه رمضانی .M.Sc[2]

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 دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۳

چکیده

هدف: لوسمی حاد پرومیلوسیتی شایع‌ترین لوسمی حاد درمیان بزرگسالان است. امروزه از D - آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامینE) جهت مهار تکثیر و القا مرگ سلولی در درمان لوسمی استفاده می‌شود. با توجه به اینکه غلظت‌های بالای ویتامین 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 HL-60 در محیط RPMI کشت داده شد. سپس اثرات ضد تکثیری و کشندگی غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل (BV) و D- آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) با استفاده از روش شمارش سلولی تریپان بلو و سنجش MTT مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم افزار instat3 و برنامه آماری one-way ANOVA آنالیز شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که اثرات ضد تکثیری و کشندگی سلولی ویتامینE (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

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

خون سازی نرمال یک فرایند دینامیک است که درآن سلول‌های بنیادی خون ساز تمام سلول‌های خونی از جمله گلبول قرمز، گلبول های سفید، پلاکت‌ها و .... را تولید می‌کنند. این فرایند به هماهنگی بین مسیرهای انتقال سیگنال تنظیمی فراوانی وابسته است که عمل‌کرد منظم این مسیرها که در آن‌ها پروتئین‌های تنظیمی ایفای نقش می‌کنند، منجر به تولید سلول‌های خونی با عمل‌کرد 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 پیش سازهای آن‌ها می‌شود (۲، ۳، ۴ و۵). 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 پیش سازهای 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 کروموزمی مشخصی بین بازوهای بلند کروموزم 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 پیش‌ساز های نابالغ میلوئید (پرومیلوسیت) در مراحل اولیه تکوین (عدم تمایز به سمت سلول‌های بالغ از جمله مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل و ...) وتکثیر غیر قابل کنترل این پیش سازها 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، درحالی 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 وکشندگی ویتامین‌ها ازجمله 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 درانواع رده‌های سلول سرطانی است (۱۲، ۱۳، ۱۴و ۱۵). غلظت‌های مورد استفاده این ترکیب جهت القا آپوپتوزیس درسلول‌های سرطانی سمی می‌باشد (۱۶). همچنین این غلظت‌ها مانع جذب ویتامین K (عدم انعقاد خون) و به دنبال آن خونریزی و ایجاد زخم های 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 می دهند (۱۹). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که D– آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) دارای اثر مهار تکثیر و کشندگی بر رده‌ی سلولیHL-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 رده های مختلف سلول سرطانی اثبات شده است (۲۰). زهر زنبور دارای بیش از ۱۸ ترکیب فعال فیزیولوژیکی با خواص دارویی فراوان می باشد (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 A_2 می‌باشند. ملیتین سبب فعال شدن آنزیم فسفولیپاز A_2 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 سایتوتوکسیکی بر سلول‌های نرمان خون موش ندارد. پیشنهاد شده که احتمالا زهر از طریق مکانیسم‌هایی چون آپوپتوزیس، نکروز و لیز سلولی سبب مهار رشد تومور می‌شود (۲۲). با توجه به اثرات ضدسرطانی زهر زنبور

www.SID.ir
Archive of SID

عسل، این مطالعه با هدف بررسی بکارگیری توام غلظت‌های مهارکننده‌ی تکثیر زهر زنبور عسل و ویتامینE 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 میلی لیتر استرپتومایسین در فشار۵ 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 ۱میلی گرم 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 در۲۰ 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، ۵×۱۰^{۴} 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 میکروگرو 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 تعین غلظت‌های مناسب زهر از روش های 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 ۵×۱۰^{۴} سلول به ازای هر میلی لیتر محیط کشت شمارش و در پلیت ۲۴ خانه با غلظت‌های مختلف ویتامینE (۱، ۴، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمارشد و درمدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش‌های ذکر شده بررسی شد. برای رنگ آمیزی تریپان بلو، ۱۰ میکرولیتر محلول سلول با ۱۰میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو 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 پلیت های ۲۴ خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (Sigma, UK) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (حل شده درPBS) در شرایط تاریکی افزوده شد و پلیت ۴ ساعت دور از نور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس به هر خانه از پلیت، ۱میلی‌لیتر 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 نا محلول فورمازان را به حالت محلول در آورد. پس از گذشت ۷ تا ۸ ساعت محتوی خانه‌ها پیپتاژ شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Roy- Spectronic 21D- USA) اندازه‌گیری گرفته شد. مطابق معادله زیر درصد بقا سلول‌ها (Cell Viability) محاسبه گردید.

Viability = mean absorbance of sample/ mean absorbance of control ×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 داده ها:

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.

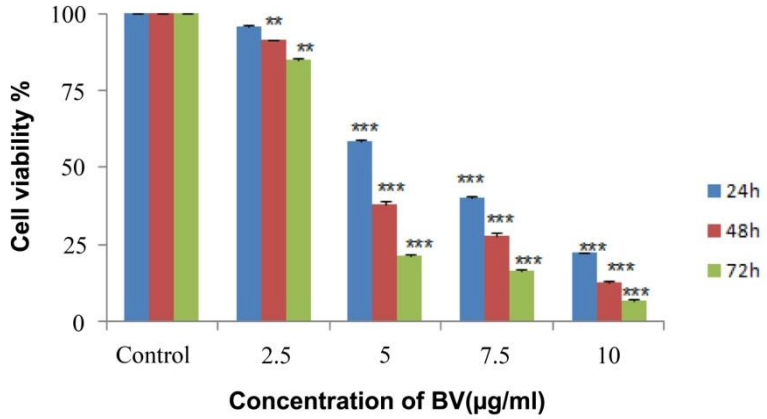
نتایج

اثر زهر زنبور عسل بر تکثیر رده‌ی سلولی HL-60

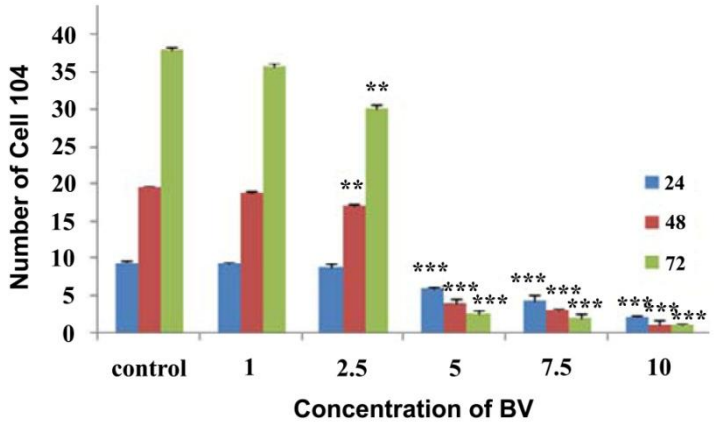
نتایج حاصله از شمارش سلول‌های رنگ آمیزی شده با تریپان بلو و سنجش MTT نشان دادند که زهر زنبور در غلظت های مختلف در بازه‌ی زمانی مختلف دارای اثرات متفاوتی بر روی میزان تکثیر سلول‌های HL-60 می باشد، به طوری‌که زهر در غلظت‌های بالای ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثر کشندگی بسیار شدیدی بود و به محض اضافه نمودن زهر در این غلظت‌ها لیز شدید 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<۰/۰۰۱ معنی دار بود (نمودار ۱ و ۲).

Archive of SID

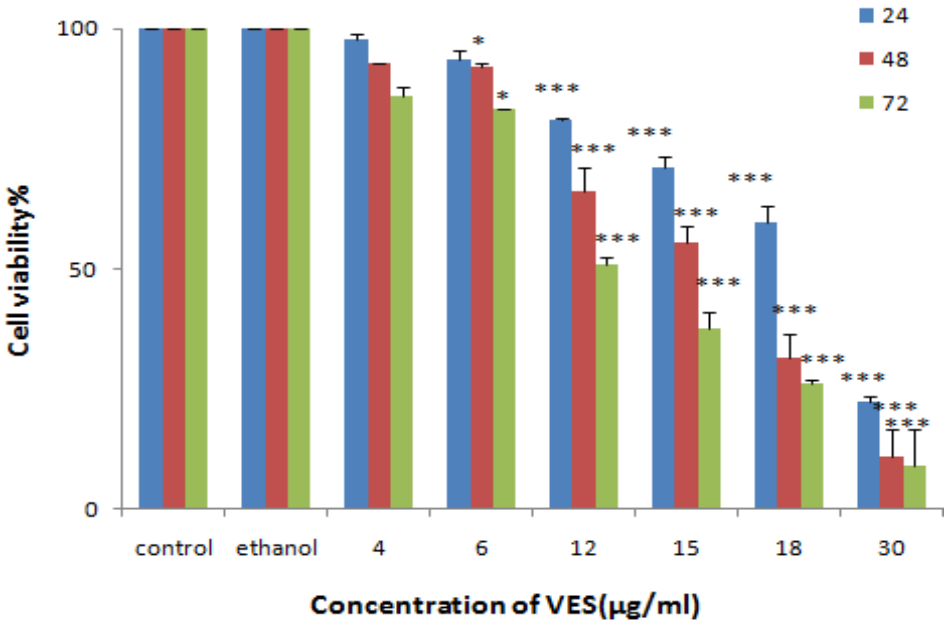
www.SID.ir



نمودار۱: اثرغلظت‌های مختلف زهر زنبورعسل (BV) بر تکثیر سلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT.
*Mean ± SEM، ۰ ** $p < ۰/۰۱$,*** $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل*



*نمودار ۲: اثرغلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل (BV) بر تکثیر سلول‌های HL-60 (تعداد سلول‌ها ×۱۰۴) پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT. ۰ ** $p < ۰/۰۱$,*** $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل، Mean ± SEM*

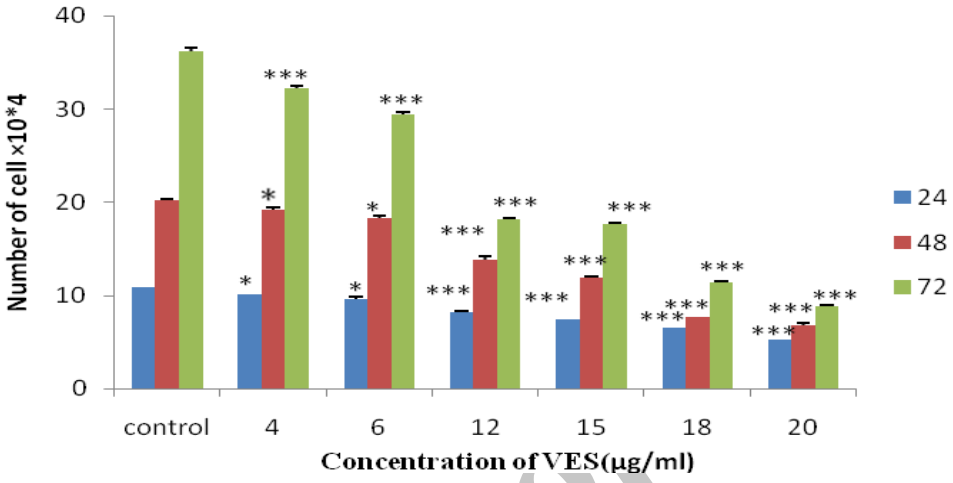


*نمودار ۳: اثرغلظت‌های مختلف D-آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) بر تکثیرسلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT. ۰ ** $p < ۰/۰۱$,*** $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل، Mean ± SEM*

www.SID.ir

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

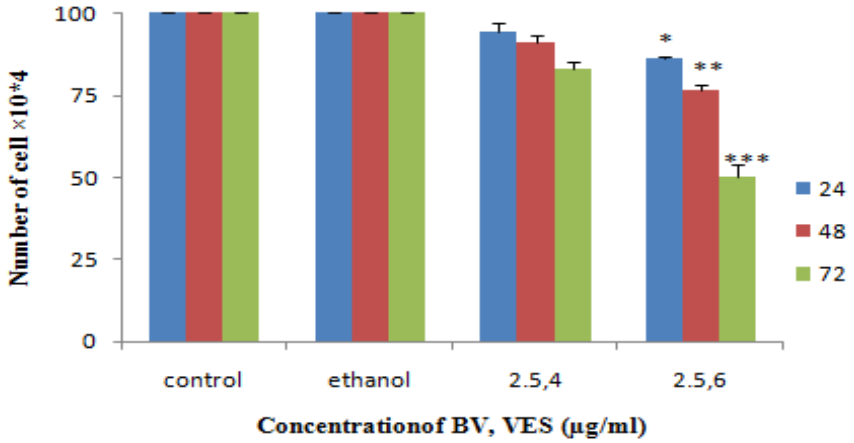
جهت بررسی اثر D-آلفا توکوفرول سوکسینات بر تکثیر سلول‌ها و بدست آوردن غلظت‌های سمی و غیر سمی، غلظت‌های ۴، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۰و۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر سلول‌ها اثر داده شد. نتایج بدست آمده از سنجش MTT و رنگ آمیزی تریپان بلو نشان دادند که ویتامین در الگویی وابسته به زمان و دوز سبب القاء مرگ سلولی و 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).



*نمودار ۴: اثرغلظت‌های مختلف آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) برتکثیرسلول‌های HL-60 (تعداد سلول‌ها ×۱۰^{۴}) پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش‌تریپان بلو . $p < ۰/۰۰۱$ ***, $p < ۰/۰۵$ * ، Mean ± SEM*

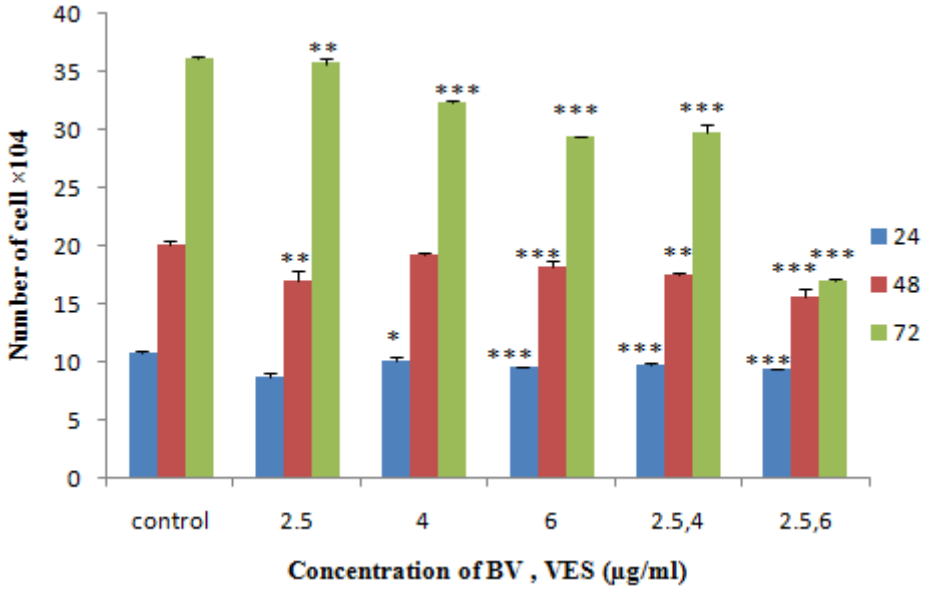
اثر هم افزایی زهر زنبور وD-آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامینE) بر تکثیر و بقا سلول‌های HL-60 :

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 ۴و۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین انتخاب شدند (این غلظت‌ها موجب مهار تکثیر سلول‌ها شده و درعین حال اثرات سمی کمتری نسبت به غلظت‌های 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 (نمودار۵ و ۶).



*نمودار ۵: اثرغلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور (BV) و غلظت های ۴و۶ میکروگرم در میلی‌لیتر آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) به صورت توام بر تکثیرسلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT. تعداد اولیه سلول ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی لیتر محیط کشت. $p < ۰/۰۰۱$ ***, $p < ۰/۰۱$ ** , $p < ۰/۰۵$ * ، Mean ± SEM*

www.SID.ir



*نمودار۶ : اثر غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور (BV) و غلظت های ۴و۶ میکروگرم در میلی‌لیتر آلفا توکوفرول سوکسینات (VES) به صورت توام بر تکثیر سلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از شمارش سلول‌های رنگ آمیزی شده توسط تریپان بلو. تعداد اولیه سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی لیتر محیط کشت. $p < ۰/۰۰۱$ ***, $p < ۰/۰۱$ ** $p < ۰/۰۵$ * در مقایسه با گروه کنترل، Mean ± SEM*

بحث

نتایج حاصله از این پژوهش نشان داد که زهر زنبور عسل و آلفا توکوفرول سوکسینات در الگویی وابسته به دوز و زمان در غلظت های بالا سبب القا مرگ سلولی و در دوزهای پائین سبب مهار تکثیر می شود. 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 بقایای 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 های۴، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۵و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر D-آلفا توکوفرول به صورت وابسته به زمان و دوز دارای اثر بر 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 غلظت۱۲ پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار بقای سلولی به ۵۰ درصد کاهش یافت. در غلظت بالای ۳۰ ویتامین، لیز شدید سلولی مشاهده شد، بطوری‌که پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریبا هیچ سلول زنده ای 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 هم افزایی 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 ویتامینE در سال ۱۹۶۰ نشان داده شد و مطالعات قبلی نشان دادند که مشتقات استری ویتامینE (آلفا توکوفرول سوکسینات) مهم‌ترین ترکیب موثر در

Archive of SID

www.SID.ir

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 به۶۰ 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 G_2/M چرخه‌ی سلولی می شود. هم چنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که مشتق آلفا توکوفرول سوکسینات نسبت به سایر مشتقات دارای بیشترین اثر بر تکثیر رده‌ی سلولی HL-60 می باشد (۲۵). به هرحال مکانیسم‌های مولکولی سیگنالینگ سلولی که طی آنها آلفا توکوفرول سوکسینات سبب مهار تکثیر و القا مرگ سلولی در رده‌های مختلف سلولی می شود، 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 می کند. 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 پروآپپتوتیک این ترکیب با کاهش pH افزایش می یابد. در سال۲۰۰۷، Crispen و همکارانش پیشنهاد نمودند که آلفا توکوفرول سوکسینات از طریق مهار فعالیت فاکتور هسته ای kappa-β ($NF\text{-}_k\beta$) 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 می شود و در تکثیر سلولی، پاسخ های التهابی وآپوپتوزیس 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 برابرعوامل القا کننده‌ی آپوپتوزیس می‌شود .Ni و همکارانش (نشان دادند که آلفا توکوفرول سوکسینات از طریق مهار بیان پروتِئین های تنظیمی چرخه ی سلولی از جمله Cyclin D, E CDK 2,4و کاهش فسفوریلاسیون Rb سبب توقف سلول‌ها در فاز G1 /S می شود (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 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 می شود. 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 PKCα 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 آپپتوتیک 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 می باشد (۳۱و۳۲ و ۳۳). kim پیشنهاد می‌کند که ملیتین موجود در زهر زنبور ازطریق فعال کردن فسفولیپاز A_2 سبب القا مرگ در سلول‌های سرطانی می شود (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 مهارکننده های کالمودولین و مهار رشد سلول سرطانی گزارش کردند (۲۰و۳۱). هم چنین نشان داده شده که ملیتین و فسفولیپاز- A_2 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 الگویی 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 سلول‌های سرطانی مهار می‌کند بر روی مهار رشد سلول‌های نرمال موثر نیست(۳۶). SON و همکاران گزارش کردند که Dunn و Killion نشان دادند که حساسیت سلول‌های لوسمی سرطانی L1210 نسبت به سلول‌های سالم DBA/2 طحال موش به اثرات سمی ملیتین ۲تا ۴ بار بیشتر است (۳۴).

Jang و همکارانش اثر زهر را در مهار COX2 و القا آپوپتوزیس در رده‌ی سلولیNCI-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 ضدآپوپتوزیس از جمله, Bcl-x1 , Bcl-2 و سبب فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۹ در این رده سلول سرطانی می شود (۲۳). مطالعات اخیر فعالیت ضد توموری زهر زنبور را در محیط *in vivo* و *in vitro* نشان داده‌اند و بیان می‌کنند که زهر زنبور می‌تواند بعنوان یک عامل در درمان سرطان استفاده شود (۳۷). با توجه به مسیرهای مولکولی دخیل در مهار تکثیر سلولی و القا آپوپتوز توسط زهر زنبور و آلفا توکوفرول سوکسینات می‌توان گفت که عمل‌کرد 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 غلظت‌های غیر سمی و مهاری می‌تواند از طریق مهار فعالیت فاکتور هسته‌ای kappa-β و کاهش بیان COX-2، کاهش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزیس از جمله Bcl-x1 , Bcl-2 موجب افزایش اثر مهار تکثیری آلفا توکوفرول سوکسینات بر روی سلول‌های سرطانی HL-60 شود (۳۸).

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

۱- بررسی فعالیت فاکتور هسته‌ای kappa-β و بیان آنزیم COX-2 در هم افزایی دو ترکیب ذکر شده.

۲- با توجه به موفق بودن درمان ترکیبی در درمان لوسمی‌حاد بررسی اثر هم‌افزایی زهر زنبور ویتامین E در سطح *in-vivo*.

۳- بررسی بیان فاکتورهایی چون Bcl-x1 , Bcl-2 در هم افزایی دو ترکیب ذکر شده.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش تائید کننده اثر مهاری زهر زنبور عسل وآلفا توکوفرول سوکسینات بر تکثیر رده سلولی HL-60 می‌باشد. مقایسه اثرهم افزایی زهر زنبور وD- آلفا توکوفرول سوکسینات با اثر منفرد هر یک از این مواد نشان می‌دهد که زهر زنبور موجب افزایش اثر مهار تکثیری آلفا توکوفرول سوکسینات می‌شود. افزایش اثر مهار تکثیری ویتامینE بر رده‌ی سلول سرطانی HL-60 توسط زهر زنبور تاکنون درهیچ مطالعه‌ای 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 می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه زیست شناسی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی انجام شد. مولفین بر خود لازم می‌دانند 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 ofCellular Signaling Pathways:Prospects forTargeted Therapy in Hematological Malignancies. 2003; 9: 535-550.

3. KL Rice KL, Hormaeche I, LichtJD. 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 ofPML-RARA gene in patient with (15:17) gene Chromosome .Cancer.1993; 6: 133-139.

Archive of SID

www.SID.ir

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 differentation 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. Choromosomal 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 transmembrance 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. Orsolic 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 squmous cell carcinoma In vitro and invivo.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 strutural reqirement .FASEB J . 2001; 15: 403-415.

31. Orsolic 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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 mRNAin Human Lung Cancer Cell Line NCI-H1299.J Pharmacol. 2003; 91(2): 95-104.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Winter 2013; 3(4): 287-296

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

Archive of SID

www.SID.ir