Archive of SID

مقاله اصیل پژوهشی

مجله دانشکده
دندانپزشکی اصفهان
۱۳۹۶؛ ۱۳(۲): ۱۵۸ تا ۱۶۹

بررسی اثر زهر زنبور عسل بر سلول‌های بدخیم اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) در مقایسه با سلول‌های فیبروبلاست L929

فائزه خزیمه[۱]
زهرا گلستان‌نژاد[۲]
پوریا دهقان[۳]
شاهین گوانجی[۴]
آرش اسماعیلی[۳]

۱: دانشیار، مرکز تحقیقات ایمپلنت‌های دندانی، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲: استادیار، مرکز تحقیقات ایمپلنت‌های دندانی، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳: دانشجوی دندانپزشکی، کمیته‌ی پژوهش‌های دانشجویی، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۴: **نویسنده مسؤول:** باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران. **Email:** Shahin.gavanji@khuisf.ac.ir

چکیده

مقدمه: میزان زنده ماندن ۵ ساله‌ی مبتلایان به کارسینوم سلول‌های سنگفرشی (squamous cell carcinoma) SCC سر و گردن حدود، ۵۰ درصد است و درمان‌های فعلی تقریباً توانایی ارتقا پروگنوز این بدخیمی را طی چهار دهه‌ی اخیر نداشته‌اند. زهر زنبور با دارا بودن موادی مثل ملیتین، فسفولیپاز و آپامین اثر ضد توموری بر بدخیمی‌های کلیه، کبد، مثانه و پروستات دارد. با توجه به موارد مذکور، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر مهار کنندگی این ماده‌ی طبیعی بر SCC دهانی بود که برای اولین بار خاصیت ضد توموری زهر زنبور را بر این رده‌ی بدخیمی مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها: مطالعه از نوع تجربی- آزمایشگاهی بود. بررسی سمیت سلولی با روش (micro culture tetrazolium test) MTT بر رده‌ی سلولی اسکواموس سل کارسینوم دهانی انجام شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ با آنالیز واریانس یک‌طرفه و مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش Tukey انجام گرفت (α = ۰/۰۵).

یافته‌ها: در غلظت‌های کمتر از µg/ml ۰/۶ زهر زنبور میزان کشندگی سلولی در دو رده‌ی سلولی بدخیم (KB) و نرمال (L929) تفاوت آماری معنی‌دار ندارد (p value > ۰/۰۵)، اما از غلظت µg/ml ۰/۶ به بالا، درصد کشندگی در رده‌ی بدخیم به طور معنی‌داری بالاتر از رده‌ی نرمال است (p value < ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد، زهر زنبور با الگوی وابسته به غلظت و غیر وابسته به زمان، باعث مهار رشد SCC دهانی می‌شود و اثر مهار کنندگی آن بر سلول‌های بدخیم به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های نرمال بود.

کلید واژه‌ها: کشندگی سلولی، زهر زنبور عسل، KB.

تاریخ ارسال: ۹۵/۷/۱ **تاریخ اصلاح: ۹۵/۱۰/۹** **تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۲**

استناد به مقاله: خزیمه فائزه، گلستان‌نژاد زهرا، دهقان پوریا، گوانجی شاهین، اسماعیلی آرش. بررسی اثر زهر زنبور عسل بر سلول‌های بدخیم اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) در مقایسه با سلول‌های فیبروبلاست L929. مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان. ۱۳۹۶؛ ۱۳(۲): ۱۵۸-۱۶۹.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بدخیمی، علت اصلی مرگ در کشورهای توسعه یافته و دومین علت مرگ در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. اسکوآموس سل کارسینومای سر و گردن (head and neck squamous cell carcinoma) ششمین بدخیمی شایع در جهان بوده و در هر سال تقریباً ۶۰۰ هزار مورد جدید از آن گزارش می‌شود (۲-۱).

رژیم‌های استاندارد درمان کارسینوم دهانی شامل جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی است. میزان زنده ماندن ۵ ساله‌ی (survival rate) مبتلایان به SCC سر و گردن حدود ۵۰ درصد است و درمان‌های استاندارد، تقریباً توانایی ارتقای پروگنوز این بیماری را در طی چهار دهه‌ی اخیر نداشته‌اند. این درمان‌ها به دلیل سیتوتوکسیسیتی بالا بر سلول‌های نرمال بدن و القای آپوپتوز در این سلول‌ها، منجر به بروز عوارض جانبی شدیدی از جمله: نوروپاتی، عوارض چشمی، گوارشی، موکوزیت، استئو رادیو نکروز و آلوپسی می‌گردد (۳، ۴).

استفاده از زهر زنبور در طب قدیم برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله دردهای مفصلی، بیماری‌های عفونی و بیماری‌های پوستی رواج داشته است. زهر زنبور عسل حاوی پپتیدهای مختلف از جمله ملیتین، آپامین، آدولاپین، آنزیم‌هایی از جمله فسفولیپاز A2، آمین‌های فعال بیولوژیک نظیر هیستامین، اپی نفرین و اجزای غیر پپتیدی با خواص دارویی فراوان می‌باشد (۴، ۵).

ملیتین از اجزای اصلی زهر زنبور، یک پپتید آمیفیلیک متشکل از ۲۶ آمینو اسید است (۶). مطالعات نشان داده، ملیتین قادر به القای آپوپتوز بوده، دارای اثرات ضد توموری می‌باشد. اثرات این ماده بر مهار رشد انواع مختلفی از سلول‌های بدخیم، مانند کلیه، کبد، ریه، پروستات، مثانه، معده، کارسینومای پستان و لوسمی نشان داده شده است (۹-۷).

نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد زهر زنبور عسل در غلظت‌های مختلف از طریق مکانیسم‌هایی همچون قطعه قطعه کردن DNA، مهار فعالیت فاکتور هسته‌ای kappa-β، کاهش بیان سیکلواکسیژناز A2 (COX-2)، کاهش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزیس از جمله Bcl-1 و Bcl-2 موجب افزایش اثر مهار کنندگی آلفا توکوفرول سوکسینات بر سلول‌های بدخیم پرومیلوسیت انسانی می‌شود (۱۰، ۱۱).

در سال ۲۰۰۲ لویی و همکاران (۱) مطالعه‌ای بر روی رده‌ی سلولی ملانومایی در شرایط in vitro و in vivo انجام دادند که طی آن رشد ملانومای القا شده در موش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که زهر زنبور عسل در یک الگوی وابسته به غلظت و زمان، دارای اثر مهار کنندگی ملانوما است. به طوری که موجب توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G1 شده و در نهایت موجب آپوپتوز سلولی می‌گردد. آنان همچنین دریافتند که زهر زنبور دارای اثر مهار کنندگی بر روی سلول‌های بدخیم ملانوما (B16) پیوندی در موش‌های ماده می‌باشد.

جانگ و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۰۳ اثر زهر زنبور را در مهار سیکلواکسیژناز A2 (COX2) و القا آپوپتوزیس بر روی رده‌ی سلولی NCI-H1299 کارسینوم ریه نشان دادند.

مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۰۶ توسط مون و همکاران (۱۳) بر رده‌ی سلولی لوکمیایی انسانی انجام شد که نتایج آن نشان داد زهر زنبور عسل دارای خاصیت القا کنندگی آپوپتوز از طریق افزایش بیان کاسپاز ۳ و مهار بیان Bcl-2 و Akt/ERK و افزایش سطح FAS/FASL و کاهش سطح HTert و سیکلواکسیژناز ۲ (COX-2) در این رده می‌باشد.

Lee و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۰۷ نشان دادند، زهر زنبور دارای اثر کشندگی سلولی انتخابی بر سلول‌های بدخیم لنفوما در مقایسه با لنفوسیت‌های طبیعی است. در این مطالعه نشان داده شد در غلظت‌های پایین زهر کشندگی سلولی تا ۲۴ ساعت ادامه دارد، ولی پس از آن متوقف می‌شود، در حالی که در غلظت‌های بالاتر اثر کشندگی سلولی تا ۷۲ ساعت باقی می‌ماند. از دلایل این موضوع نیمه‌ی عمر پایین زهر زنبور می‌باشد.

محمودزاده و همکاران (۱۴) در سال ۲۰۱۳ اثر ملیتین موجود در زهر زنبور عسل بر رشد سلول‌های کارسینوم

www.SID.ir

Archive of SID

معده (human gastric carcinoma) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که ملیتین مهار کننده قدرتمند رشد سلول‌های بدخیم معده می‌باشد. همچنین مشاهده گردید این اثر مهاری با افزایش غلظت ملیتین و مدت زمان اثر، افزایش می‌یابد.

در سال ۲۰۱۳، نبیونی و همکاران (۱۵) اثر زهر زنبور را بر روی رده‌ی سلولی پرومیلوسیت انسانی (HL-60) به دو صورت وابسته به زمان و غلظت مورد بررسی قرار دادند که نتایج بررسی‌های آنان نشان داد، که حتی غلظت‌های پایین زهر زنبور عسل دارای اثرات ضد تکثیری و کشندگی سلولی بر سلول‌های بدخیم پرومیلوسیت انسانی می‌باشد، ولی در غلظت‌های بالا اثر مهار کننده شدیدی بر این سلول‌ها دارد.

تاکنون در هیچ مطالعه‌ای اثر ضد توموری زهر زنبور بر اسکواموس سل کارسینوما (SCC) بررسی نشده است. تنها در یک مطالعه که توسط لازو و همکاران (۱۶) در سال ۱۹۸۶ انجام شده اثر ترکیبی ملیتین (یکی از ترکیبات زهر زنبور) با داروی بلئومایسین بر مهار رشد SCC غدد ساب ماگزیلاری مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج نشان داده است که کاربرد همزمان این دو نسبت به کاربرد تنهای بلئومایسین باعث کاهش رشد این بدخیمی نمی‌شود.

با توجه به موارد مذکور شامل عدم ارتقا پروگنوز SCC سر و گردن با رژیم‌های درمانی فعلی در طی چهار دهه‌ی اخیر و بروز عوارض جانبی شدید به دنبال این درمان‌ها و همچنین خواص ضد توموری زهر زنبور عسل، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر مهار کنندگی این ماده‌ی طبیعی بر SCC دهانی بود که برای اولین بار خاصیت ضد توموری زهر زنبور را بر این رده‌ی سلولی بدخیم مورد بررسی قرار داد.

فرضیه‌ی صفر این مطالعه عبارت است از: اولاً زهر زنبور عسل بر هیچ کدام از دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش شامل اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) و سلول‌های نرمال فیبروبلاست موش (L929) اثر مهار رشد و سمیت سلولی ندارد و ثانیاً سمیت سلولی زهر زنبور عسل بر هر دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش مشابه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی- آزمایشگاهی (in vitro) بود. مراحل انجام کار شامل تهیه‌ی زهر زنبور عسل، کشت سلولی و بررسی مهار رشد و سمیت سلولی با روش MTT (micro culture tetrazolium test) بود که به شرح زیر است:

تهیه‌ی زهر زنبور عسل:

در این روش زهر زنبور عسل در مؤسسه‌ی تحقیقات طب سنتی گیاهی ایران به وسیله‌ی دستگاه جمع‌آوری زهر زنبور از طریق روش شوک الکتریکی با به کارگیری ولتاژ ۲۰ ولت که زنبورهای عسل را تحریک می‌کند تا صفحه‌ی جمع‌آوری کننده را نیش بزنند. زهر استحصال شده بر روی صفحه‌ی شیشه‌ای قرار گرفته و به سرعت در معرض هوا خشک می‌شود و برای استفاده‌ی بعدی در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره می‌شود. نکته‌ی قابل توجه این که در این روش هیچ گونه آسیبی به زنبور عسل وارد نمی‌شود.

برای بررسی اثرات دارویی زهر زنبور عسل بر سلول‌ها، غلظت‌های لازم (۱۲، ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲، ۱، ۰/۸، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱ µg/ml) توسط رقیق‌سازی با سرم فیزیولوژی تهیه شد.

کشت سلولی:

رده‌ی سلولی KB اسکواموس سل کارسینومای دهانی (KERATIN-forming Based on Isoenzym Pattern) و L929 (سلول فیبروبلاست موش) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)، (Merck, Germany) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ال-گلوتامین کشت داده شد.

سپس سلول‌ها در انکوباتور ۵ درصد CO2، (HF212UV, Heal Force, China) نگه‌داری شده و محیط کشت هر ۳ روز یکبار کشت مجدد داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT:

جهت بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌ی گیاهی از روش نورسنجی با استفاده از روش MTT استفاده شد. این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول زنده استوار است که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌کند. این کریستال‌های غیر محلول را در حلال دی‌متیل سولفوکساید (Valhoma, Tulsai, USA) حل کرده و سپس به روش الایزا مورد سنجش قرار داد. در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه (Gene Fanavaran, Iran)، ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به چاهک‌ها اضافه شده و حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. یک چاهک حاوی محیط کشت و ۵ درصد DMSO (Dimethyl sulfoxide)، (Sigma, Germany)، بدون زهر به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و یک چاهک حاوی محیط کشت به تنهایی به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۵ درصد CO2 قرار داده شد و دمای آن بر روی ۳۷ تنظیم گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از MTT به هر چاهک اضافه شده و این بار به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به منظور حل کردن دانه‌های فورمازان اضافه شده و در نهایت جذب هر نمونه در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر، (Biotech, USA)، اندازه‌گیری شد. درصد بقاء سلولی در چاهک کنترل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده و درصد بقاء سلولی در چاهک‌های مورد آزمایش از فرمول زیر محاسبه شد (۱۷).

$$\text{درصد بقا سلولی} = \frac{\text{جذب بلانک} - \text{جذب سلولهای تیمار شده}}{\text{جذب بلانک} - \text{جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

تمامی مراحل فوق بر دو رده‌ی سلولی نرمال و کانسری، سه بار تکرار شد.

برای تحلیل داده‌ها از آزمون‌های Kruskal-Wallis (برای مقایسه‌ی غلظت‌های هر گروه)، Mann-Whitney و ضریب همبستگی Spearman (برای مقایسه‌ی دو گروه در هر غلظت)، Friedman و Wilcoxon (برای مقایسه در زمان‌های مختلف) استفاده شد و سطح معنی‌داری (α = ۰/۰۵) در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل بر میزان کشندگی (سیتوتوکسیسیتی) سلول‌های بدخیم اسکواموس سل کارسینومای دهانی (KB) و سلول‌های فیبروبلاست (L929) به عنوان شاهد، آزمون Kruskal-Wallis و به دنبال آن آزمون Mann-Whitney صورت گرفت.

در جدول و نمودار ۱، میانگین درصد سلول‌های زنده‌ی باقیمانده‌ی دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در طی ۲۴ ساعت نمایش داده شده است.

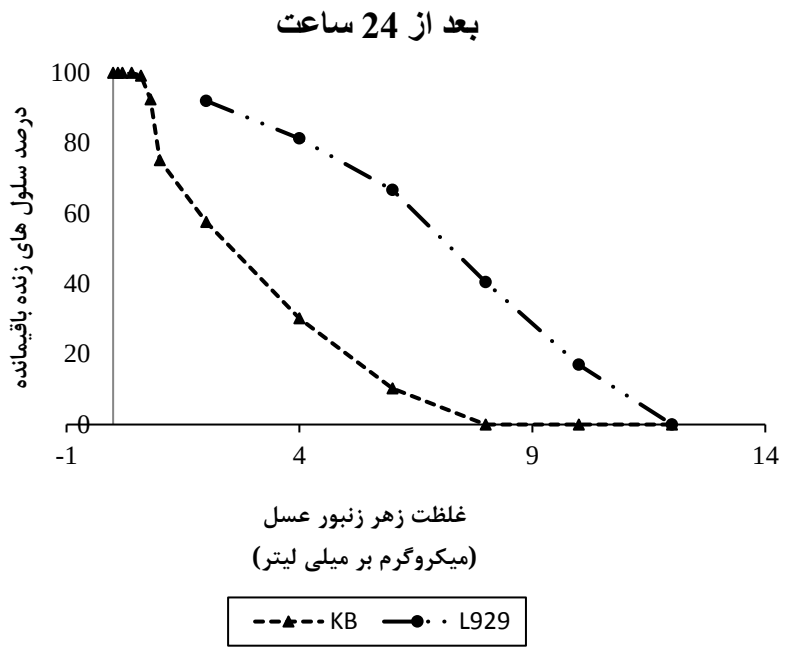
جدول ۱: میانگین و انحراف معیار درصد سلول‌های زنده‌ی باقیمانده دو رده‌ی سلولی بدخیم (KB) و نرمال (L929) در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در ۲۴ ساعت اول

غلظت (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)	سلول‌های بدخیم میانگین ± انحراف معیار	سلول‌های نرمال میانگین ± انحراف معیار
۰/۱	۱۰۰ ± ۰/۰^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۲	۰±۱۰۰/۰^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۴	۰±۱۰۰/۰^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۶	۹۹/۱±۱۶/۴۴^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۸	۹۲/۱±۴۳/۱۵^{b}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۱	۷۵/۲±۱۶/۰۳^{c}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۲	۵۷/۲±۵۳/۹۲^{d}	۱±۹۲/۶۷^{b}
۴	۳۰/۱±۲۱/۴۷^{e}	۸۱/۲±۳۳/۶۷^{c}
۶	۲۶/۲±۱۰/۱۵^{f}	۶۶/۲±۶۳/۰۵^{d}
۸	۰±۰/۰^{h}	۴۰/۲±۴۷/۸۲^{e}
۱۰	۰±۰/۰^{h}	۱۷/۱±۰/۳۷^{f}
۱۲	۰±۰/۰^{h}	۰±۰/۰^{h}

حروف متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی‌داری در سطح (p value < ۰/۰۵) دارد.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱: درصد سلول‌های زنده باقیمانده دو رده‌ی سلولی بدخیم (KB) و نرمال (L929) پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در ۲۴ ساعت اول

نتایج نشان داد در ۲۴ ساعت اول، درصد باقیمانده‌ی هر دو رده‌ی سلول‌های بدخیم (KB) و نرمال (L929) با افزایش غلظت، کاهش می‌یابد. در واقع بین افزایش غلظت و درصد سلول‌های باقیمانده در هر دو رده‌ی سلول بدخیم (p value < ۰/۰۰۱، r_s = −۰/۹۷۷) و نرمال (p value < ۰/۰۰۱، r_s = −۰/۹۳۵) همبستگی معنی‌دار وجود دارد (r_s = ضریب همبستگی Spearman).

از طرفی میزان کشندگی سلولی در غلظت‌های کمتر از ۰/۶ mg/mlµg/ml در هر دو رده‌ی سلولی بدخیم (KB) و نرمال (L929) تفاوت آماری معنی‌دار ندارد (p value > ۰/۰۵).

ولی از غلظت ۰/۶ mg/mlµg/ml به بالای زهر زنبور، درصد کشندگی سلولی در سلول‌های بدخیم (KB) به طور معنی‌داری بالاتر از سلول‌های نرمال (L929) بود (p value < ۰/۰۵).

اما در بالاترین غلظت مورد آزمایش یعنی ۱۲ mg/mlµg/ml دوباره درصد کشندگی هر دو رده‌ی بدخیم و نرمال مساوی می‌شود. حداکثر اختلاف میزان کشندگی سلولی (درصد سایتوتوکسیسیتی) توسط زهر زنبور عسل بین دو رده‌ی بدخیم و نرمال در غلظت $\mu g/ml$ ۶ mg/ml می‌باشد به طوری که در این غلظت، سلول‌های زنده‌ی باقیمانده‌ی نرمال ۶۶/۶ درصد و سلول‌های بدخیم فقط ۱۰/۲۶ درصد می‌باشد. یعنی زهر زنبور عسل در غلظت ۶ mg/mlµg/ml قادر به کشتن حدود ۹۰ درصد سلول‌های بدخیم شده در حالی که فقط ۳۴ درصد سلول‌های نرمال را از بین برده است.

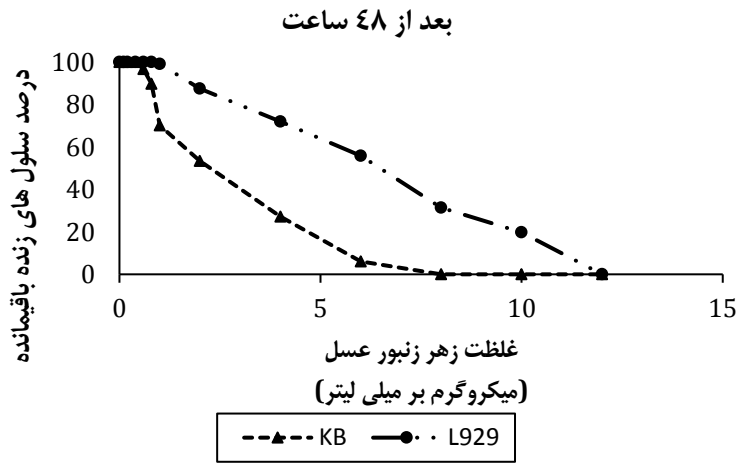
در جدول و نمودار ۲، میانگین درصد سلول‌های زنده‌ی باقیمانده‌ی دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در طی ۴۸ ساعت نمایش داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار درصد سلول‌های زنده‌ی باقیمانده دو رده‌ی سلولی بدخیم (KB) و نرمال (L929) در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در ۴۸ ساعت اول

غلظت (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)	سلول‌های بدخیم	سلول‌های نرمال
۰/۱	۰±۱۰۰/۰^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۲	۰±۱۰۰/۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰^{a}
۰/۴	۰±۱۰۰/۰^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۶	۹۶/۲±۶۳/۷۲^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۸	۸۹/۱±۷۴/۴۱^{b}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۱	۷۰/۳±۰۶/۵۲^{c}	۰±۹۹/۸۶^{a}
۲	۵۳/۱±۴۳/۸۵^{d}	۸۷/۲±۴/۴۵^{b}
۴	۲۷/۲±۰۸/۷۵^{e}	۷۱/۲±۹۹/۷۶^{c}
۶	۶/۱±۱/۶۸^{f}	۵۵/۴±۸/۳۵^{d}
۸	۰±۰/۰^{h}	۳۱/۱±۳۴/۶۳^{e}
۱۰	۰±۰/۰^{h}	۱۹/۰±۷/۷۵^{f}
۱۲	۰±۰/۰^{h}	۰±۰/۰^{h}



نمودار ۲: درصد سلول‌های زنده‌ی باقیمانده دو رده‌ی سلولی بدخیم (KB) و نرمال (L929) پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در ۴۸ ساعت اول

بررسی نتایج میزان سلول‌های باقیمانده در ۴۸ ساعت نیز مشابه ۲۴ ساعت اول نشان داد که در این زمان هم با افزایش غلظت زهر زنبور میزان سلول‌های باقیمانده در هر دو رده‌ی سلول بدخیم و نرمال به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (نرمال : p value < ۰/۰۰۱، r_s = – ۰/۹۵۳ و بدخیم: p value < ۰/۰۰۱، (r_s = – ۰/۹۸۴) و همچنین از غلظت ۰/۶ mg/ml به بالا درصد کشندگی در سلول‌های بدخیم (KB) به طور معنی‌داری بالاتر از سلول‌های نرمال (L929) است. (p value < ۰/۰۵) و نیز حداکثر اختلاف میزان سیتوتوکسیسیتی رده‌ی بدخیم و نرمال مشابه ۲۴ ساعت اول در غلظت ۶ mg/ml می‌باشد.

در جدول و نمودار ۳، میانگین درصد سلول‌های زنده‌ی باقیمانده‌ی دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در طی ۷۲ ساعت نمایش داده شده است.

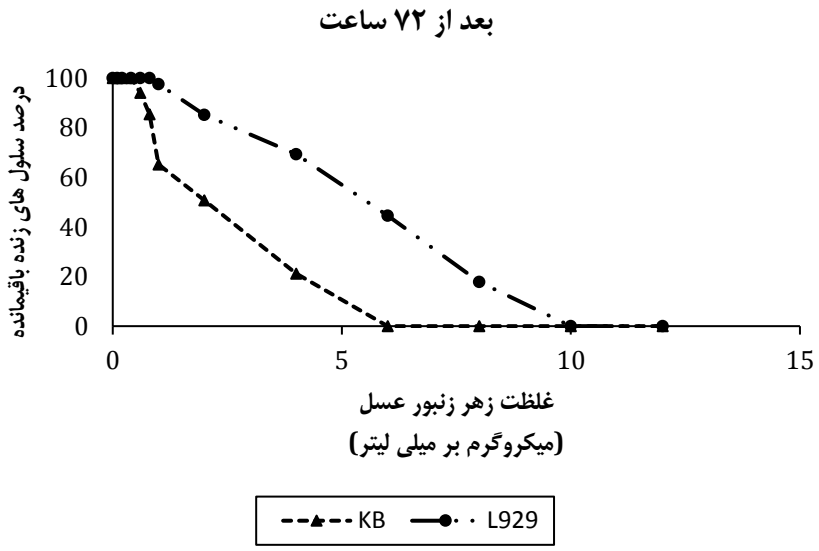
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار درصد سلول‌های زنده‌ی باقیمانده دو رده‌ی سلولی بدخیم (KB) و نرمال (L929) در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در ۷۲ ساعت اول

غلظت (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)	سلول‌های بدخیم	سلول‌های نرمال
۰/۱	۰±۱۰۰/۰^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۲	۰±۱۰۰/۰^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۴	۰±۱۰۰/۰^{a}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۶	۹۴/۲±۱۰/۷۷^{b}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۰/۸	۸۵/۲±۴۹/۴۵^{c}	۰±۱۰۰/۰^{a}
۱	۶۵/۳±۱۷/۲۱^{d}	۹۷.۴۹ ۰±.۸^{a}
۲	۵۰/۲±۷۲/۸۱^{e}	۸۵/۱±۱۲/۴۱^{b}
۴	۲۱/۲±۱۸/۱۹^{f}	۶۹/۱±۳/۱۵^{c}
۶	۰±۰/۰^{h}	۴۴/۵±۴۹/۳۵^{d}
۸	۰±۰/۰^{h}	۱۷/۲±۸۷/۳۷^{e}
۱۰	۰±۰/۰^{h}	۰/۰±۰/۰^{f}
۱۲	۰±۰/۰^{h}	۰/۰±۰/۰^{f}

حروف متفاوت درهر ستون نشان از تفاوت معنی‌داری در سطح (p value < ۰/۰۵) دارد.



نمودار ۳: درصد سلول‌های زنده‌ی باقیمانده دو رده‌ی سلولی بدخیم (KB) و نرمال (L929) پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در ۷۲ ساعت اول

در این قسمت نیز آنالیز میزان سیتوتوکسیسیتی سلولی نشان می‌دهد که درصد سلول‌های باقیمانده در ۷۲ ساعت نیز مشابه ۲۴ و ۴۸ ساعت با افزایش غلظت زهر زنبور در هر دو رده‌ی مورد آزمایش، به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (نرمال: p value < ۰/۰۰۱، r_s = – ۰/۹۶۱ و بدخیم: p value < ۰/۰۰۱، r_s = – ۰/۹۷۴). اما در ۷۲ ساعت، حداکثر اختلاف درصد کشندگی دو رده‌ی سلولی مربوط به غلظت ۴$\mu g/ml$ mg/ml می‌باشد. به طوری که در این غلظت، ۸۰

www.SID.ir

Archive of SID

درصد سلول‌های بدخیم (KB) از بین می‌روند، در حالی که فقط حدود ۳۰ درصد سلول‌های نرمال تخریب می‌شود. همچنین طی ۷۲ ساعت در غلظت ۶ mg/ml سلول‌های بدخیم به طور کامل (۱۰۰ درصد) کشته می‌شوند در حالی که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت غلظت ۸mg/ml منجر به کشته شدن ۱۰۰ درصد سلول‌های اسکواموس سل کارسینوما (KB) می‌شود.

برای تأثیر زمان بر میزان اثر کشندگی و مهار کنندگی زهر زنبور عسل بر سلول‌های بدخیم و نرمال، از آزمون (Wilcoxon) استفاده شد که نشان داد بین زمان‌های ۲۴-۷۲، ۲۴-۴۸ و ۴۸-۷۲ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (p valu = ۰/۱۰۹).

بحث

فرضیه‌ی صفر این مطالعه که عبارت بود از: اولاً زهر زنبور عسل بر هیچ کدام از دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش شامل اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) و سلول‌های نرمال فیبروبلاست موش (L929) اثر مهار رشد و سمیت سلولی ندارد و ثانیاً سمیت سلولی زهر زنبور عسل بر هر دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش مشابه می‌باشد، رد شد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد، زهر زنبور عسل دارای خاصیت کشندگی و مهار کنندگی بر رده‌ی سلولی بدخیم SCC دهانی می‌باشد.

در مطالعات قبلی، اثر ضد توموری زهر زنبور عسل بر بدخیمی معده (۹)، پروستات (۱۸)، ریه (۱۲)، پستان (۱۹)، لنفوما (۱۱)، پرومیلوسیت (۱۵)، لوکمی (۱۳) و ملانوما (۱) نشان داده شد.

تنها مطالعه‌ای که اثر مهار کنندگی تومور زهر زنبور بر اسکواموس سل کارسینوما (SCC) انجام داده است، مطالعه‌ی لازو و همکاران (۱۶) بر رده‌ی سلولی A-253 جدا شده از اسکواموس سل کارسینومای غدد ساب ماگزیلاری می‌باشد. در این مطالعه از ملیتین (یکی از ترکیبات زهر زنبور) به همراه داروی بلئومایسین (bleomycin) جهت کنترل رشد سلول‌های بدخیم اسکواموس سل کارسینوما استفاده گردید. نتایج مطالعه‌ی لازو و همکاران (۱۶) برخلاف مطالعه‌ی حاضر، نشان داد استفاده از ملیتین به همراه بلئومایسین باعث کاهش رشد سلول‌های بدخیم نسبت به کاربرد تنهای داروی بلئومایسین (bleomycin) نگردید. از دلایل احتمالی اختلاف نتایج این دو مطالعه، یکی کاربرد زهر زنبور عسل در مطالعه‌ی حاضر به جای ملیتین (از اجزای زهر زنبور) در مطالعه‌ی لازو و همکاران می‌باشد، بطوری که مجموعه‌ی ترکیبات زهر زنبور از جمله آنزیم‌ها، پپتیدها و آمین‌های بیوژنیک در کنار هم، خاصیت کشندگی سلولی بالاتری در مقایسه با کاربرد یکی از ترکیبات به تنهایی دارد. دلیل احتمالی دیگر، تفاوت دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش می‌باشد. بطوری که در مطالعه‌ی لازو و همکاران (۱۶) سلول‌های بدخیم اسکواموس سل کارسینومای غدد ساب ماگزیلاری مورد بررسی قرار گرفته‌اند، در حالی که در این مطالعه، SCC دهانی بررسی شده است.

در مطالعه‌ی حاضر اثر بخشی متفاوت ($p < ۰/۰۵$ value) زهر زنبور عسل بر روی سلول‌های نرمال و بدخیم مشاهده شد. این یافته در مطالعات کلیون و دان (۲۰) در سلول‌های مغز استخوان، زو و همکاران (۲۱) بر سلول‌های لوکمی، پارک و همکاران (۱۸) بر سلول‌های بدخیم پروستات، جانگ و همکاران (۱۲) بر سلول‌های بدخیم ریه و اورسلیک و همکاران (۱۹) بر سلول‌های بدخیم پستان نیز تکرار گردیده است. نتایج این مطالعات نشان داد، غلظت مورد نیاز برای کشندگی سلول‌های طبیعی به مراتب بالاتر از غلظت مورد نیاز برای کشندگی سلول‌های بدخیم می‌باشد. این امر پیشنهاد کننده‌ی وجود مسیرهای سلولی متفاوت به منظور تأثیر بر سلول‌های بدخیم می‌باشد (۲۰، ۲۱).

در این مطالعه نتایج نشان داد که با افزایش غلظت زهر زنبور، میزان کشندگی سلولی (سیتوتوکسیسیتی) افزایش می‌یابد. مطالعه‌ی لیو و همکاران (۱) در سال ۲۰۰۲ و نیبونی و همکاران (۱۵) نیز نتایج مشابهی مبنی بر افزایش سیتوتوکسیسیتی با افزایش غلظت زهر را نشان دادند، اما در

www.SID.ir

Archive of SID

این مطالعه حداکثر اختلاف درصد کشندگی دو رده‌ی سلولی نرمال و بدخیم، مربوط به غلظت ۶ mg/ml$\mu g/ml$ بود؛ در حالی که در پژوهش نیبونی و همکاران (۱۵) این مقدار ۲/۵ mg/ml$\mu g/ml$ گزارش شده بود. دلیل احتمالی این موضوع، حساسیت بیشتر رده‌ی سلول بدخیم پرومیلوسیت (HL-60) مورد بررسی در مطالعه‌ی نیبونی و همکاران (۱۵) در مقایسه‌ی با رده‌ی سلولی SCC دهانی در مطالعه‌ی حاضر بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد، حداکثر اختلاف میزان کشندگی سلولی (درصد سایتوتوکسیسیتی) توسط زهر زنبور عسل بین دو رده‌ی بدخیم و نرمال در غلظت ۶ mg/ml می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات کلینیکی بعدی از غلظت ۶ mg/ml استفاده شود.

از دیگر نتایج به دست آمده در این مطالعه، عدم تغییر خاصیت کشندگی سلولی (سیتوتوکسیسیتی) در تمامی غلظت‌ها با افزایش زمان از ۲۴ ساعت تا ۷۲ ساعت بود.

مشابه با این نتیجه، مطالعه‌ی نیبونی و همکاران (۱۵) نیز نشان داد که اثر کشندگی سلولی و مهار کنندگی رشد زهر زنبور عسل بر رده‌ی بدخیم پرومیلوسیت انسانی (HL-60) با گذشت زمان از ۲۴ به ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌دار پیدا نمی‌کند. اما برخلاف مطالعه‌ی لی و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۰۷، نشان داد که در غلظت‌های پایین زهر زنبور عسل، کشندگی سلولی تا ۲۴ ساعت ادامه دارد ولی پس از آن متوقف می‌شود، در حالی که در غلظت‌های بالاتر، اثر کشندگی تا ۷۲ ساعت باقی می‌ماند. این در حالی است که در مطالعه‌ی حاضر نتایج نشان داد که در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش، اثر کشندگی سلولی و مهار کنندگی رشد با افزایش زمان از ۲۴ تا ۷۲ ساعت تفاوت نمی‌کند. از دلایل احتمالی کاهش اثر کشندگی در طی زمان، نیمه‌ی عمر پایین زهر زنبور عسل بود (۲۲).

همچنین مطالعه‌ی مون و همکاران (۱۳) در سال ۲۰۰۶ بر سلول‌های لوکمیک نشان داد، زهر زنبور عسل با غلظت ۲ mg/ml پس از ۴۸ ساعت به حداکثر کشندگی سلولی می‌رسد. این در حالی است که در مطالعه‌ی حاضر حداکثر عملکرد زهر زنبور در تمام غلظت‌ها پس از ۲۴ ساعت اول بدست آمد.

از محدودیت پژوهش حاضر این است که، با وجود این‌که روش MTT برای بررسی کشندگی سلولی تحت تأثیر یک ماده به عنوان اولین تست آزمایشگاهی مطرح می‌باشد، اما با این روش فقط کشندگی سلولی را می‌توان مورد بررسی قرار داد و این‌که کدام قسمت سلول از جمله غشاء سیتوپلاسمی، DNA، میتوکندری و ...تحت تأثیر قرار گرفته و منجر به مرگ سلولی شده، قابل بررسی نیست. همچنین با این روش افتراق نکروز از آپوپتوز، امکان‌پذیر نبود. برای رفع محدودیت‌های مذکور استفاده از روش میکروواری (micro array) برای افتراق نکروز از آپوپتوز و همچنین بررسی دلیل مرگ سلولی (تحت تأثیر قرار گرفتن کدام قسمت سلول) تحت تأثیر ماده مورد آزمایش پیشنهاد می‌گردد. البته همان‌طور که ذکر گردید پس از اثبات خاصیت کشندگی سلولی تحت تأثیر یک ماده‌ی خاص با روش MTT روش‌های پیشرفته‌تر از جمله میکروواری (micro array) مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد، زهر زنبور عسل با الگوی وابسته به غلظت و غیر وابسته به زمان، باعث مهار رشد و باعث کشندگی سلول‌های SCC دهانی می‌شود و اثر مهار کنندگی و سیتوتوکسیسیتی آن بر سلول‌های بدخیم به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های نرمال بود.

* این مقاله حاصل پایان‌نامه شماره ۳۹۴۱۰۱۹ بوده و کلیه حقوق این طرح برای دانشکده دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان محفوظ است.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. 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): 1083-90.
2. Gajski G, Čimbora-Zovko T, Rak S, Rožman M, Osmak M, Garaj-Vrhovac V. Combined antitumor effects of bee venom and cisplatin on human cervical and laryngeal carcinoma cells and their drug resistant sublines. J Appl Toxicol 2014; 34(12): 1332-41.
3. Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, Kim KH, Song HS, et al. Antiarthritic effect of bee venom: Inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-κB through interaction with the p50 subunit. Arthritis Rheum 2004; 50(11): 3504-15.
4. Park HJ, Son DJ, Lee CW, Choi MS, Lee US, Song HS, et al. Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with IκB kinase. Biochem Pharmacol 2007; 73(2): 237-47.
5. 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.
6. Eisenberg D. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. Annu Rev Biochem 1984; 53: 595-623.
7. Dávalos IP, Moran MC, Martínez-Abundis E, González-Ortiz M, Flores-Martínez SE, Machorro V, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Factor V Leiden variant in Mexican women with preeclampsia/eclampsia. Blood Cells Mol Dis 2005; 35(1): 66-9.
8. Kaiser T, Brennecke SP, Moses EK. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Are Not a Risk Factor for Pre-Eclampsia/Eclampsia in Australian Women. Gynecol Obstet Invest 2000; 50: 100-2.
9. Kong GM, Tao WH, Diao YL, Fang PH, Wang JJ, Bo P, Qian F. Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. World J Gastroenterol 2016; 22(11): 3186-95.
10. Pouyanmanesh F, Nabiuni M, Nasri S, Nazari Z, Karimzadeh L. The effect of honey bee venom on levels of lipids and anti-mullerian hormone in a rat with polycystic ovarian syndrome. Feyz 2013; 17(3): 239-46. [In Persian].
11. 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.
12. 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.
13. 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 downregulation of ERK and Akt. Int Immunopharmacol 2006; 6(12): 1796-807.
14. Mahmoodzadeh A, Morady A, Pooshang Bagheri K, Zarrinnahad H, Ghasemi-Dehkordi P, Mahdavi M, et al. Isolation of melittin from bee venom and evaluation of its effect on proliferation of gastric cancer cells. Tehran Univ Med J 2013; 70(12): 760-7. [In Persian].
15. Nabiuni M, Yarahmadi A, Delfan B, Mirsepasi S, Azari S, Gholami S, et al. 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). Journal of Cell and Tissue 2012; 3(4): 287-96. [In Persian].
16. Lazo JS, Chen DL, Gallicchio VS, Hait WN. Increased lethality of calmodulin antagonists and bleomycin to human bone marrow and bleomycin-resistant malignant cells. Cancer Res 1986; 46(5): 2236-40.
17. Morgan DML. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. In: Morgan DML. editor. Polyamine Protocols. New York, NY: Humana Press; 1998. p. 179-84.
18. 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-κB. Prostate 2011; 71(8): 801-12.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Orsolić N, Sver L, Verstovsek S, Terzić S, Basić I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. Toxicon 2003; 41(7): 861-70.
20. Killion JJ, Dunn JD. Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. Biochem Biophys Res Commun 1986; 139(1): 222-7.
21. Zhu H, Tayeh I, Israel L, Castagna M. Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation. J Biol Regul Homeost Agents 1991; 5(2): 52-8.
22. Kim CK, Lee EJ. The controlled release of blue dextran from alginate beads. Int. J Pharm 1992; 79: 11-9.

www.SID.ir

Archive of SID

The Effects of Bee Venom on Squamous Cells Carcinoma (KB) Compared with Fibroblast L929 Cells

Faezeh Khozeimeh[1]
Zahra Golestannejad[2]
Pouria Dehgahn[3]
Shahin Gavanji[4]
Arash Esmaeili[3]

1. Associate Professor, Dental Research Center, Department of Oral and Maxillofacial, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2. Assistant Professor, Dental Research Center, Department of Oral and Maxillofacial, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Dentistry Student, Dental Students' Research Center, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
4. **Corresponding Author:** Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University of Isfahan (Khorasgan), Isfahan, Iran. **Email:** Shahin.gavanji@khuisf.ac.ir

Abstract

Introduction: The 5-year survival interval rate in patients with head and neck SCC is about 50% and the current therapies were not potent to treatment this malignancy in four decades. The melittin, phospholipase and Apamin in bee venom have antitumor effects on cancer cells like kidney, liver, bladder and prostate.this study is the first survey was aimed to investigate the inhibitory effects of natural bee venom on the SCC.

Materials & Methods: This in vitro study was conducted on two cell lines, squamous cells carcinoma (KB) and Fibroblasts (L929) cells. Micro culture Tetrazolium Test (MTT) was used to assess Cytotoxicity. Data was analyzed by means of one-way ANOVA and Tukey in the packages IBM SPSS statistics 22 ($\alpha = 0.05$).

Results: The results showed that malignant cells Cytotoxicity of bee venom in concentrations less than 0.6 mg/ml was not significantly different in both cell lines (p value > 0.05) but at the concentrations up to 0.6 mg/ml this Cytotoxicity is significantly higher in KB cells against to L929 (p value < 0.05).

Conclusion: This study showed that Bee venom has a growth inhibitory effect on SCC cells with a dose-dependent and time-independent pattern that this effect is significantly higher on the malignant cells against to the normal cells.

Key words: Cell Cytotoxicity, Bee venom, KB.

Received: 22.9.2016 **Revised**: 29.12.2016 **Accepted:** 31.1.2017

How to cite: Khozeymeh F, Golestannejad Z, Dehghan P, Gavanji Sh, Esmaeili A. The Effects of Bee Venom on Squamous Cells Carcinoma (KB) Compared with Fibroblast L929 Cells. J Isfahan Dent Sch 2017; 13(2): 158-169.

www.SID.ir