

اثر زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید روی القاء تمایز نورونی سلولهای P19

هما محسنی کوچصفهانی*، کاظم پریور، محمد نیونی و سمیه ابراهیمی باروق

تهران، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۳۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱

چکیده

سلولهای P19 جزء سلولهای کارسینومای جنینی موش هستند که می‌توانند تحت القاء با غلظت 5×10^{-7} مولار رتینوئیک اسید به نرون تمایز یابند. این رده سلولی مدل مناسبی برای بررسی اثر عوامل شیمیایی مختلف بر روی رشد و تمایز نورونها به صورت تجربی محسوب می‌شود. زهر زنبور عسل ترکیبات متنوعی دارد که مهمترین آنها ملیتین، فسفولیپاز A2، آپامین و هیالورونیداز است. مطالعات نشان داده است که ملیتین و فسفولیپاز A2 دو ترکیب اصلی زهر زنبور است که نقش مهمی را در تمایز نورونی در سلولهای PC12 داشته و باعث افزایش رشد به بیرون نوریت می‌شود. هدف این تحقیق بررسی اثر توأم زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید در القاء تمایز نورونی در رده سلولی P19 می‌باشد. سلولهای P19 با دانسیته 3×10^4 cell/ml را در محیط کشت α -MEM حاوی سرمهای ۲/۵ درصد FBS و ۷/۵ درصد CS کشت داده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. نتایج اولیه به دست آمده از بررسیهای مورفولوژیکی این تجربیات نشان داد که ۶ روز بعد از تیمار سلولها با رتینوئیک اسید با غلظت 5×10^{-7} مولار در سلولها استتاله‌هایی ایجاد گردید سپس سلولها به تدریج تا روز ۱۰ فوتیپ نورونی را به دست آوردند و در نهایت در روز یازدهم همه سلولها دچار نکروز کامل گردیدند. سلولهای P19 که با زهر زنبور با غلظتهای 3 و $1 \mu\text{g/ml}$ تیمار شده بودند، در روز ششم بعد از تیمار استتاله‌هایی را ایجاد کردند و این سلولها کم‌کم ویژگیهای نورونی پیدا کرده و تا روز دهم بر طول زائده‌ها اضافه گردید و در نهایت در روز ۱۱ همه سلولها دچار نکروز کامل گردیدند. در سلولهایی که رتینوئیک اسید و زهر زنبور با هم اثر داده شده بودند نتایج مشابهی با آزمایشات فوق دیده شد ولی میزان تمایز نسبت به دو گروه قبلی بالاتر بود.

واژه‌های کلیدی: سلولهای p19، نرون، تمایز سلولی، زهر زنبور عسل، رتینوئیک اسید

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۴۸۷۴، پست الکترونیک: kouchesfehani@yahoo.com

مقدمه

کرده است. پروتکل‌های القاء بر اساس کشت این سلولها در حضور عوامل القاء کننده مانند رتینوئیک اسید است. در بررسیهای *in vitro* رتینوئیک اسید یک عامل مورفوژن شناخته شده و در طی دوران جنینی قادر است تکوین بخشهای متعددی از بدن از جمله سیستم عصبی را تحت تأثیر قرار دهد (۲ و ۸). رتینوئیک اسید اثر خود را بر روی سلول هدف از طریق دو رده گیرنده هسته‌ای RARs ($RAR\alpha, \beta, \gamma$) و RXRs ($RXR\alpha, \beta, \gamma$) اعمال می‌کند. پاسخ

کشف روش درمانی جدید برای کاهش اثرات مخرب بیماریهای تحلیل برنده سیستم عصبی مثل پارکینسون و آلزایمر و ترمیم سیستم عصبی بخش وسیعی از تحقیقات پزشکی را به خود اختصاص داده است. در سالهای اخیر استفاده از روشهای *in vitro* برای تولید سلول عصبی از سلولهای چند استعدادی در محیط آزمایشگاه توجه محققین را به خود جلب کرده است. قابلیت تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی رویانی امکان تولید تعداد بی شماری از سلولهای عصبی و استفاده از آنها در پیوند درمانی را فراهم

فعالیت این آنزیم به این صورت است که وقتی به رسپتور خود در سطح سلول عصبی متصل می‌شود باعث رها سازی اسیدهای چرب مثل اسید آراشیدونیک می‌شود. اسید آراشیدونیک توسط آنزیمهایی تبدیل به لکوترینها و پروستاگلاندینها می‌شود که این ترکیبات بر روی کانالهای نوع L,N کلسیمی اثر گذاشته و باعث فعال سازی آنها می‌شود. بر اثر فعال شدن این کانالها یون کلسیم وارد سلول شده و یکسری واکنشهای آبخاری را به راه می‌اندازد که در نهایت منجر به تشکیل مخروط رشد (growth cone) در سلول عصبی می‌شود (۱). در تحقیق حاضر علاوه بر رتینوئیک اسید از زهر زنبورعسل نیز به منظور بررسی اثر القایی آنها بر روی تمایز رده سلولی P19 استفاده شد. زهر زنبور عسل با نام علمی *Apis mellifera* در تحقیق حاضر به صورت کامل برای تمایز سلولهای P19 استفاده گردید. در مطالعات انجام شده قبلی از ترکیبات مهم زهر زنبور مثل فسفولیپاز A2 و ملیتین به صورت جداگانه استفاده شده است ولی در این تحقیق از زهر زنبور عسل به صورت کامل استفاده گردید تا نحوه فعالیت زهر زنبور عسل با تمام اجزاء در تمایز رده سلولی P19 مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

کشت و تمایز سلولهای P19: الف) رده سلولی P19 از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران در تهران تهیه شد. جهت رشد و تکثیر این سلولها از محیط کشت α -MEM (Gibco)، سرم CS (Gibco) (۷/۵ درصد) و سرم FBS (Gibco) (۲/۵ درصد) و جهت ساب کالچر سلولها از (Gibco) Trypsin/EDTA (1x) استفاده گردید.

ب) تعیین دوز مناسب تمایزی زهر زنبور عسل: زهر زنبور عسل (*Apis mellifera*) با روش Lariviere به صورت پودر به دست آمد. در این روش زنبورها درون یک توری سیمی قرار گرفته و شوک الکتریکی به آنها وارد می‌گردد. پس از تحریک زنبورها، زهر آنها جمع‌آوری، خشک و در

سلولی به رتینوئیک اسید در *in vitro* بسیار وسیع بوده و طیفی از مرگ سلولی تا تمایز را نشان می‌دهد (۱۹).

رده سلولی P19 یک مدل مناسب و ارزان قیمت برای بررسی اثر عوامل شیمیایی مختلف بر روی رشد و تمایز نورونها به صورت تجربی و نیز سیستم جذابی برای تولید انبوه سلولهای عصبی بوده و از این سلولها برای جایگزین کردن سلولهای عصبی آسیب دیده در سیستم عصبی می‌توان از طریق روشهایی نظیر سلول درمانی و ژن درمانی استفاده کرد (۱۱). این رده سلولی تحت عنوان *mouse embryonic carcinoma P19 cells* پر توان (Totipotent) بوده و می‌تواند تحت القاء به انواع مختلف سلول تمایز پیدا کند (۱۳). کشت سلولهای ترانزژنومای P19 در حضور غلظت مشخص رتینوئیک اسید باعث تمایز این سلولها به نورونها و گلیاها و سلولهای عضلانی قلبی و اسکلتی می‌گردد و تمایز این سلولها به سلولهای مذکور زمانی آغاز می‌شود که این سلولها به مدت چهار روز در شرایط تشکیل تجمع سلولی در معرض دُز خاصی از رتینوئیک اسید واقع شوند (۱۶ و ۱۷). همچنین در محیط کشت حاوی این سلولها استیل کولین ترانسفراز و استیل کولین استراز فعال شده ظاهر می‌گردد، لذا این سلولها جزء نورونهای کولینرژیکی محسوب می‌شوند (۱۶). زهر زنبور عسل ترکیبات متنوعی دارد که مهمترین آنها ملیتین، فسفولیپاز A2، آپامین، هیالورونیداز می‌باشد (۶ و ۱۵). ملیتین و فسفولیپاز A2 دو ترکیب اصلی زهر زنبور است که به ترتیب در حدود ۶۰-۴۰ درصد و ۲۰-۱۵ درصد زهر را تشکیل داده است. مطالعات نشان داده که ملیتین باعث افزایش فعالیت آنزیمی فسفولیپاز A2 می‌گردد (۱۸).

مطالعات نشان داده که فسفولیپاز A2 در تولید اسیدهای چرب مثل فسفاتیدیل کولین، اسید آراشیدونیک و تولید ایکوزانوئیدها نقش دارد که این اسیدهای چرب نقش مهمی را در رشد به بیرون نوریتها در یک روش وابسته به فعال سازی کانالهای کلسیمی نوع L,N دارد (۹). مکانیسم

حاوی ۲/۵ درصد FBS و ۷/۵ درصد CS فاقد رتینوئیک اسید استفاده شد (۱۳ و ۱۷).

A-2: تمایز سلولهای P19 با زهر زنبور عسل: در این گروه تمام شرایط مشابه گروه آزمایش با رتینوئیک اسید بود و به جای رتینوئیک اسید از زهر زنبور با غلظت ۳ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. قابل ذکر است که این دژها به عنوان دژ مناسب تمایزی بعد از انجام آزمایش با MTT assay تعیین گردید.

A-3: تمایز سلولهای P19 با رتینوئیک اسید و زهر زنبور به صورت توأم: در این گروه نیز مطابق روش فوق عمل شد و زهر زنبور با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر همزمان با رتینوئیک اسید با غلظت 5×10^{-7} مولار به صورت توأم استفاده شد.

B. گروه کنترل: در این گروه تمام شرایط مشابه گروه تجربی بود، به جز اینکه محیط کشت سلولها فاقد رتینوئیک اسید یا زهر زنبور عسل بود.

د) بررسی مورفولوژی سلولهای تمایز یافته: بررسیهای مورفولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ معکوس در روزهای ۶، ۸ و ۱۰ بعد از تیمار انجام شد. از پنج ناحیه از هرخانه عکس گرفته شد و سپس تعداد سلولهای تمایز یافته شمارش شد و سلولهایی تمایز یافته در نظر گرفته شدند که طول نوریتهای آنها حداقل دو برابر قطر سلول باشد و هر آزمایش سه بار تکرار گردید. (طول نوریتها با استفاده از برنامه نرم افزاری Image J اندازه گیری شد)

ه) اندازه گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE assay) در سلولهای تمایز یافته: یکی از روشهای تشخیص سلولهای عصبی اندازه گیری فعالیت آنزیمی اختصاصی آنهاست. از آنجایی که سلولهای عصبی ایجاد شده از رده سلولی P19 جزء نورونهای کولینرژیک محسوب می شوند اندازه گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز برای شناسایی این نورونها انجام شد. در این روش

دمای انجماد نگهداری می شوند (۷). برای تعیین دژ مناسب از زهر برای القاء نورون در سلولهای P19، ابتدا درصد زنده ماندن (viability) سلولها با غلظتهای $\mu\text{g/ml}$ ۱۱،۹،۷،۵،۳،۱ زهر زنبور با روش MTT assay با دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۵۷۰nm مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۳). غلظت زهری که سبب مرگ ۵۰ درصد از سلولها شد به عنوان LD50 در نظر گرفته شد که در این آزمایش غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل به عنوان غلظت LD50 تعیین گردید. بنابراین برای تمایز سلولها از غلظتهای پایین تر از $5 \mu\text{g/ml}$ شامل غلظتهای $3 \mu\text{g/ml}$ و $1 \mu\text{g/ml}$ استفاده شد.

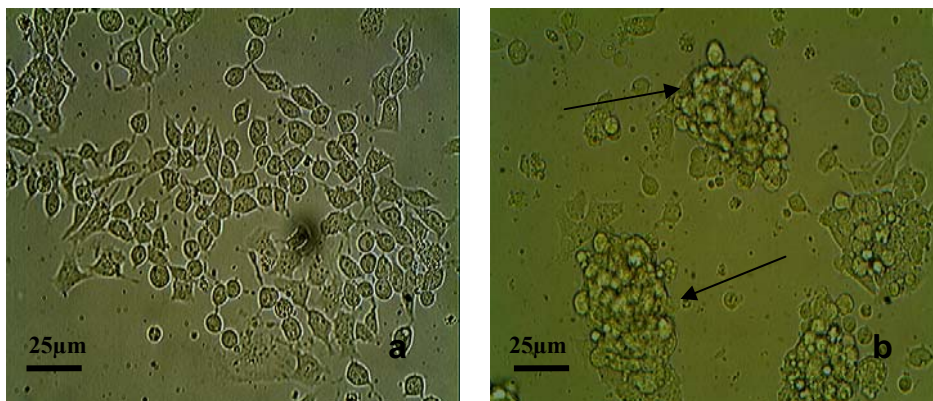
ج) طراحی آزمایشات در این تحقیق: برای انجام این تحقیق دو گروه تجربی و کنترل در نظر گرفته شد:

A: گروه تجربی: که شامل تمایز با رتینوئیک اسید، تمایز با زهر زنبور عسل و تمایز با رتینوئیک اسید و زهر زنبور عسل به صورت توأم بود.

A-1: تمایز سلولهای P19 با رتینوئیک اسید: به منظور القاء تمایز سلولهای P19 به سلولهای عصبی، پس از پاساژ دوم ۵ میلی لیتر از این سلولها با تراکم 3×10^4 سلول در میلی لیتر به ظرفهای باکتریولوژیک (nunc) انتقال داده شد. محیط کشت مورد استفاده α -MEM حاوی رتینوئیک اسید با غلظت 5×10^{-7} مولار و ۲/۵ درصد FBS و ۷/۵ درصد CS بود. در ظرفهای باکتریولوژی سلولها قادر به چسبیدن به کف پتری دیش نبوده و به صورت تجمعات سلولی معلق در محیط کشت رشد می کنند (شکل ۱b). بعد از گذشت دو روز محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید با محیط کشت مشابهی تعویض شد و بعد از گذشت چهار روز، تجمعات سلولی بعد از ترپسینیزه شدن به ظرفهای مخصوص کشت سلولهای چسبنده (پلیتهای ۲۴ خانه ای پوشش شده با پلی - دی لیزین ۰/۰۵ درصد) منتقل شدند. در این مرحله جهت رشد سلولها از محیط کشت α -MEM

تغییر رنگ را با دستگاه اسپکتروفوتومتری با طول موج ۴۱۲nm اندازه گیری کرد که این تغییرات طول موج نشان دهنده میزان فعالیت آنزیمی و آزاد شدن TNB است در این تحقیق از روش اسپکتوفوتومتری Ellman و همکاران استفاده شد (۱۴).

استر تیو کولین به عنوان سوبسترای آنزیم کولین استراز به کار می رود. این سوبسترا توسط آنزیم هیدرولیز می شود و تیوکولین آزاد شده با معرف DTNB یا دی تیونیتروبنزوئیک واکنش داده و به صورت تیو کولین - تیونیتروبنزوئیک بی رنگ رسوب می کند و TNB یا تیونیتروبنزوئیک زرد رنگ آزاد می شود که می توان این



شکل ۱- فتومیکروگراف از سلول های P19 در نمونه کنترل (a) سلول های P19 قبل از Aggregation (b) نمونه کنترل بعد از توده شدن در روز ششم کشت. پیکان توده های سلولی را نشان می دهد. (بزرگنمایی X ۴۰۰)

۱۰ cell/well $\times 3$ در پلیتهای ۲۴ خانه ای حاوی محیط کشت α -MEM و ۲/۵ درصد FBS و ۷/۵ درصد CS کشت داده شدند. بعد از یک روز انکوباسیون این سلولها تحت تیمار با زهر زنبور عسل با غلظتهای ۱۱،۹،۷،۵،۳،۱ $\mu\text{g/ml}$ قرار گرفتند. پس از ۵،۳،۱ روز تیمار با دُزهای ذکر شده این سلولها برای MTT assay آماده شدند. نتایج حاصل از MTT assay نشان داد که غلظتهای بالای ۵ $\mu\text{g/ml}$ بعد از ۵ روز تیمار دُز کشنده برای این رده سلولی است. دُزهای پایین ۵ $\mu\text{g/ml}$ دُز مناسب برای بررسی اثر تمایزی زهر زنبور عسل برای این رده سلولی محسوب می شود. نتایج در جدول ۱ و نمودار ۱ ارائه شده است.

(و) آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری جهت مقایسه داده های گروههای کنترل و تجربی از آزمون ANOVA نرم افزار SPSS استفاده شد و P value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد و نمودارهای مربوطه از طریق برنامه نرم افزاری EXCEL رسم گردید. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار گردید (n=۳)

نتایج

الف) نتایج مربوط به بررسی اثر زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید بر درصد بقای (viability) رده سلولی P19 با روش MTT assay: سلولهای P19 با تراکم

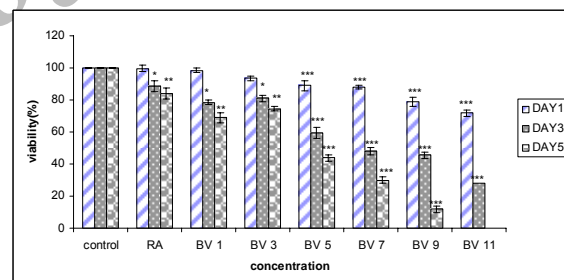
جدول ۱- مقایسه اثر زهر زنبور عسل با غلظتهای مختلف بر درصد بقاء (viability) رده سلولی P19 پس از گذشت ۵،۳،۱ روز تیمار سلولها با روش MTT assay (Mean±SEM)

Cell viability (% of live cell)			
Experimental group	Day1	Day3	Day5
Control	100 ± 0.000	100 ± 0.000	100 ± 0.000
RA	97 ± 2.000	88.5 ± 3.500	83.5 ± 3.500
BV1	98.5 ± 1.500	78.5 ± 1.500	69 ± 3.000
BV3	95.5 ± 1.500	81 ± 2.000	74.5 ± 1.500
BV5	77 ± 3.000	59.5 ± 3.500	44 ± 2.000
BV7	71 ± 1.000	51.5 ± 2.500	30 ± 2.000
BV9	57 ± 3.000	45.5 ± 2.500	12 ± 2.000
BV11	42 ± 2.000	28 ± 2.000	0 ± 0.000

جدول ۲- مقایسه مورفولوژیکی اثر زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید به صورت جداگانه و توأم بر تمایز سلولهای P19 در روزهای ۱۰،۸،۶ بعد از تیمار (Mean ±SEM)

Differentiation (%)			
Experimental groups	Day6	Day8	Day10
Control	1.5 ± 0.5000	1.75 ± 0.2500	2±0.000
RA	66.5±2.500	76.5 ± 6.500	86±4.000
BV1	10 ± 3.000	16.5 ± 1.500	20±2.000
BV3	12.5 ± 2.500	19 ± 2.000	24.5±2.500
RA+BV3	70.5 ± 2.500	79.5 ± 5.500	93.5±3.500

غلظت 5×10^{-7} مولار و زهر زنبور عسل با غلظتهای ۳ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر واقع شوند به سلولهای شبه عصبی تمایز می یابند. در روز ششم از شروع آزمایش از حاشیه تجمعات سلولی، سلولهای دوکی شکلی شروع به چسبیدن به کف ظرف نموده و به تدریج شروع به تکثیر و تمایز می کنند (شکل ۲a، ۳ و ۴). در روزهای ششم تا هشتم از شروع آزمایش تقریباً تمامی سلولهای تشکیل دهنده تجمعات سلولی به کف ظرفهای کشت چسبیده و در طی این مدت بر تعداد سلولهای دوکی شکل افزوده می شد. به طور همزمان، از سلولهای دوکی شکل زوائد سلولی شبیه به دندریت و آکسون به اطراف رشد نموده که در اغلب موارد با زوائد سلولهای مجاور ارتباط برقرار می کنند. گاهی دیده می شود که سلولهای پراکنده از فواصل نسبتاً دور از طریق این زوائد با هم مرتبط شده اند به طوری که ممکن است ۴ الی ۵ سلول به طور متوالی از طریق زوائدشان با هم ارتباط برقرار کنند (شکل ۲b و ۳و ۴). به تدریج در شروع آزمایش بر تراکم سلولهای نرونی اضافه

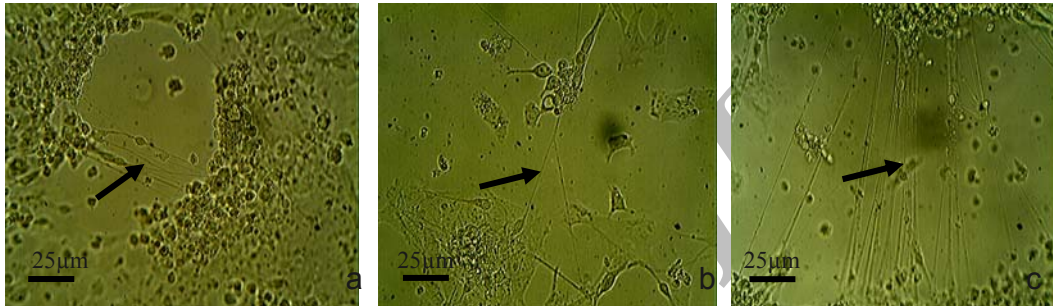


نمودار ۱- مقایسه اثر غلظتهای مختلف زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید نسبت به کنترل بر درصد بقاء (viability) رده سلولی P19 در روزهای ۵،۳،۱ تیمار با روش MTT assay =BV (ANOVA *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) زهر زنبور عسل با غلظتهای $11, 9, 7, 5, 3, 1 \mu\text{g/ml}$ =RA رتینوئیک اسید با غلظت $0.5 \mu\text{M}$

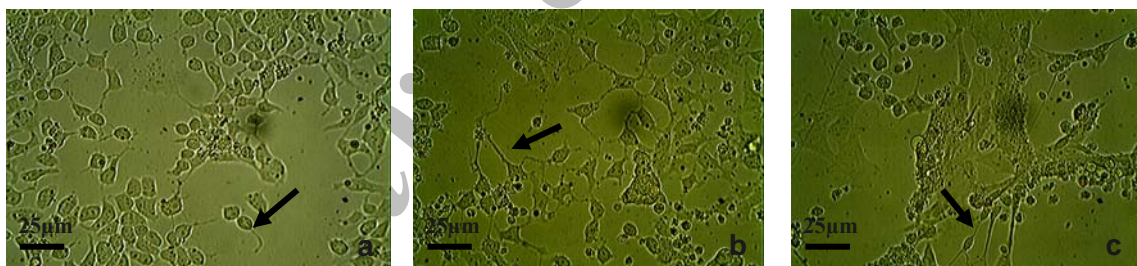
ب) نتایج مربوط به بررسیهای مورفولوژیکی تأثیر رتینوئیک اسید با غلظت 5×10^{-7} مولار و زهر زنبور عسل ($3 \mu\text{g/ml}$ و ۱) به صورت جداگانه و توأم بر تمایز رده سلولی P19: نتایج به دست آمده نشان داد در صورتی که سلولهای P19 به مدت چهار روز به صورت تجمعات سلولی (شکل ۱b) در معرض رتینوئیک اسید با

غلظت $3 \mu\text{g/ml}$ به صورت توأم درصد تمایز بالاتری را نسبت به رتینوئیک اسید و زهر زنبور با غلظتهای $1 \mu\text{g/ml}$ و $3 \mu\text{g/ml}$ به تنهایی نشان می دهد (شکل ۵). همچنین درصد تمایز با زهر زنبور عسل با غلظت $3 \mu\text{g/ml}$ نسبت به غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ بیشتر است. نتایج در جدول ۲ و نمودار ۲ ارائه شده است.

شد و از تراکم سلولهای دوکی شکل کاسته شد. همچنین از روز نهم به بعد بر تعداد و تراکم زوائد سلولی افزوده شده و در اغلب نواحی این زوائد به صورت شبکه ای با همدیگر ارتباط برقرار می کنند (شکل ۲c و ۳و ۴). از روز یازدهم به بعد به تدریج از تعداد سلولهای شبه عصبی کاسته شده و زوائد سلولی این سلولها از دست می رود. میزان تمایز سلولها با رتینوئیک اسید و زهر زنبور عسل با



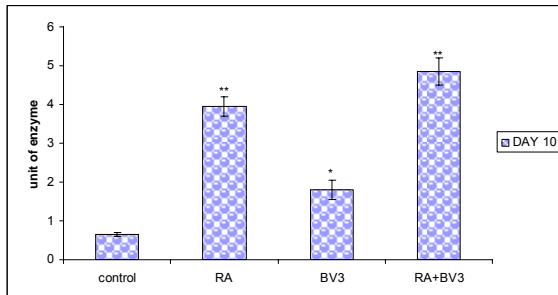
شکل ۲- فتومیکروگراف از سلولهای P19 تمایز یافته به نورون (a) نمونه تیمار شده با RA در روز ششم (b) نمونه تیمار شده با RA در روز هشتم (c) نمونه تیمار شده با RA در روز دهم. پیکان زوائد ایجاد شده در سلولهای تمایز یافته را نشان می دهد (بزرگنمایی $400\times$)



شکل ۳- فتومیکروگراف از سلولهای P19 تمایز یافته به نورون (a) نمونه تیمار شده با bv1 در روز ششم (b) نمونه تیمار شده با bv1 در روز هشتم (c) نمونه تیمار شده با bv1 در روز دهم (بزرگنمایی $400\times$)



شکل ۴- فتومیکروگراف از سلولهای P19 تمایز یافته به نورون (a) نمونه تیمار شده با bv3 در روز ششم (b) نمونه تیمار شده با bv3 در روز هشتم (c) نمونه تیمار شده با bv3 در روز دهم. پیکان زوائد ایجاد شده در سلولهای تمایز یافته را نشان می دهد (بزرگنمایی $400\times$)

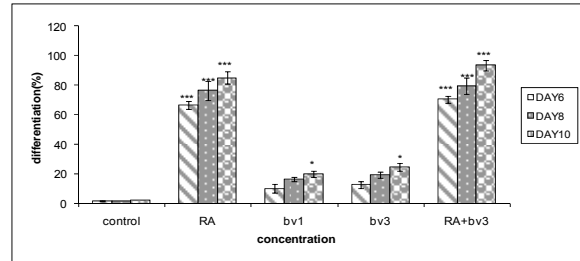


نمودار ۳- مقایسه فعالیت آنزیمی در سلولهای تیمار شده در روز ۱۰ بعد از تیمار که افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد RA (ANOVA * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) = رتینوئیک اسید با غلظت ۰/۵ میکرو مولار BV = زهر زنبور عسل با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر

بحث

در این تحقیق، کشت و تمایز سلولهای P19 به سلولهای نوروئی انجام و فنوتیپ نوروئهای تمایز یافته با مشاهدات مورفولوژیکی و AChE assay بررسی گردید.

McBurney و همکاران در سال ۱۹۸۲ نشان دادند که به کارگیری دژهای مختلفی از رتینوئیک اسید در مدت زمانهای مختلف منجر به تمایز سلولهای P19 به طیف وسیعی از سلولها، از جمله سلولهای عصبی، قلبی، اسکلتی می شود (۱۰). در این تحقیق علاوه بر رتینوئیک اسید برای تمایز این رده سلولی از زهر زنبور عسل با دژ پایین تر از غلظت کشنده به صورت جداگانه و هم افزایی با رتینوئیک اسید استفاده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که زهر زنبور عسل سبب تمایز این رده به سلولهای شبه عصبی می شود ولی میزان تمایز در سطح پایین نسبت به رتینوئیک اسید قرار دارد و حالت هم افزایی درصد بالایی از تمایز را نشان می دهد. مطالعات انجام شده توسط Elizabet و همکاران در سال ۱۹۸۵ که از رتینوئیک اسید برای تمایز این رده سلولی به نوروئ استفاده کرده بودند میزان تمایز را در بیشترین حد خود در حدود ۹۵ درصد نشان دادند (۳) ولی در این تحقیق میزان تمایز با رتینوئیک اسید ۸۶ درصد و در حالت هم افزایی ۹۳/۵ درصد و زهر زنبور با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر در بیشترین حد



نمودار ۲- مقایسه اثر زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید بر تمایز نوروئها در رده سلولی P19 نسبت به کنترل در روزهای ۶، ۸، ۱۰ بعد از تیمار RA (ANOVA * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$) = رتینوئیک اسید با غلظت ۰/۵ میکرو مولار BV = زهر زنبور عسل با غلظتهای ۳ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر

در گروه کنترل بعد از چسبیدن تجمعات سلولی به کف ظرفهای کشت، رشد آنها به صورت تک لایه ای مشاهده شد که اکثر سلولها همان سلولهای P19 هستند (شکل ۱ا)

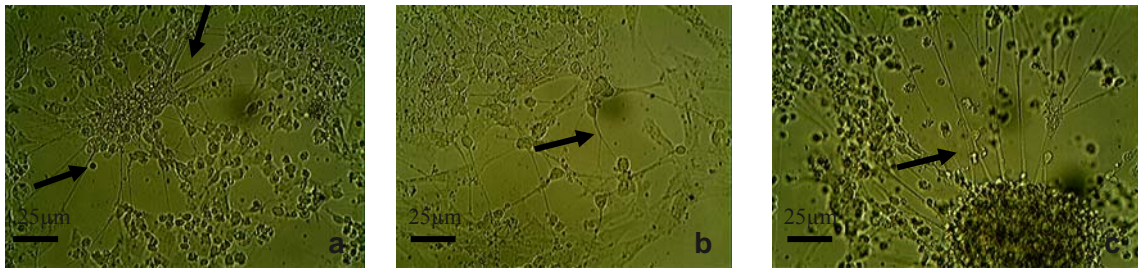
ج) AChE assay : این بررسی ده روز پس از تیمار بر روی سلولها انجام شد. نتایج آزمایش نشان داد که سلولهای تمایز یافته با RA ، زهر زنبور عسل با غلظت ۳ μg/ml و هم افزایی آنها دارای فعالیت آنزیمی هستند که در سطح $P < 0.05$ (درمورد زهر زنبور عسل) و در سطح $P < 0.01$ (در مورد رتینوئیک اسید به تنهایی و تیمار توأم رتینوئیک اسید و زهر زنبور عسل) افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد. به علاوه افزایش معنی داری ($P < 0.05$) بین تیمار توأم در مقایسه با RA به تنهایی و افزایش معنی داری ($P < 0.01$) بین تیمار توأم در مقایسه با BV3 در فعالیت آنزیمی مشاهده شد، که با نتایج به دست آمده از بررسیهای مورفولوژیکی سلولها کاملاً مطابقت دارد. نتایج در جدول ۳ و نمودار آورده شده است.

جدول ۳- مقایسه فعالیت آنزیمی در سلولهای تیمار شده در روز ۱۰ بعد

از تیمار (Mean±SEM)

Experimental groups	Unit of enzyme (day 10)
control	1.2 ± 0.05
RA	4 ± 0.25
BV3	1.9 ± 0.25
RA+BV3	5 ± 0.35

خود که در روز دهم تیمار بود در حدود ۲۰ درصد و با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر ۲۴/۵ درصد به دست آمد.



شکل ۵- فتومیکروگراف از سلولهای P19 تمایز یافته به نرون (a) نمونه تیمار شده با bv3+RA در روز ششم (b) نمونه تیمار شده با bv3+RA در روز هشتم (c) نمونه تیمار شده با RA+bv3 در روز دهم. پیکان زوائد ایجاد شده در سلولهای تمایز یافته را نشان می دهد (بزرگنمایی ۴۰۰x)

را در تکثیر سلولی، تمایز و آپاپتوز دارند. در بافت مغز آراشیدونیک اسید بر اثر فعالیت فسفولیپاز A2 و فسفولیپاز C از غشای سلولها آزاد می شود و این ترکیب نقش مهمی را در رشد به بیرون نوریت و رها سازی نوروترانسمیترها در سلولهای عصبی و گلیالی ایفا می کند. مطالعات نشان داده است که رسپتورهای رتینوئیک اسید جفت شده با فسفولیپاز A2, C, D در غشای هسته سلولهای عصبی نقش مهمی را در انتشار آراشیدونیک اسید در طی تمایز و رشد سلول عصبی دارد (۴).

تشکر و قدردانی: از مدیریت محترم گروه زیست شناسی و ریاست محترم دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم که امکانات اجرای این طرح تحقیقاتی را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

اگرچه میزان تمایز با زهر زنبور پایین است ولی هدف اصلی از این آزمایش بررسی اثرات تمایزی زهر زنبور عسل بود که آیا زهر زنبور به صورت کامل دارای اثرات تمایزی در این رده سلولی می باشد یا نه؟ مطالعاتی که توسط گروه Nakashima در سالهای ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ و Ikeno در سال ۲۰۰۵ روی رده سلولی PC12 انجام گرفته بود نشان داده بود که فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل (bvPLA2) با غلظتهای بین ۱/۱ تا ۱۰۰ نانومولار با رها سازی آراشیدونیک اسید سبب تولید مخروط رشد در این سلولها شده و در نتیجه تمایز آنها را به سمت نرون پیش می برد (۵ و ۱۲). بنابراین در این مطالعه از زهر زنبور عسل به طور کامل استفاده شد و ملاحظه گردید که زهر زنبور عسل دارای اثرات تمایزی است. RA القاء کننده رها سازی اسید آراشیدونیک از غشای سلولی است و متابولیتهای حاصل از تجزیه آراشیدونیک اسید نقش مهمی

منابع

- 1- Arioka, M., Cheon, S., Ikeno, Y., Nakashima, S., Kitamoto, K., 2005. A novel neurotrophic role of secretory phospholipases A2 for cerebellar granule neurons. *FEBS letters* 579, 2693-2701
- 2- Bastien, J., Rochette-Egly, C., 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16
- 3- Elizabet, M.V., McBurney, M.W., Rogers, K.A., Kalnins, V.I., 1982. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J.Cell Biology* 94, 253-262
- 4- Farooqui, A.A., Antony, P., Ong, W., Freysz, L., 2004. Retinoic acid – mediated phospholipase A2 signaling in the nucleus. *Brain Research Review* 45, 179-195
- 5- Ikeno, Y., Konno, N., Cheon, S.H., Bolchi, A., Ottonello, S., Kitamoto, K., Arioka, M., 2005. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells through lysophosphalidylcholine generation and

- activation of G2A receptor. *Biol.chem2* 80, 28044-28052
- 6- Kwon, Y.B., Han, H.J., Beitz, A.J., Lee, J.H., 2004. Bee venom acupoint stimulation increases for expression in catecholnergic neurons in the rat brain. *Mol. cells* 17, 329-333
- 7- Lariviere, W.R., Melzack, R., 1996. The bee venom test: A new tonic-pain test. *Pain* 66(2-3), 271-277
- 8- Malaspina, A., Turkheimer, F., 2007. A review of the functional role and of the expression profile of retinoid signaling and of nuclear receptors in human spinal cord. *Brain Research Bulletin* 71, 437-446
- 9- Martin, G., Damjanovic, I., Fraichard, A., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78, 7634-7638
- 10- McBurney, M.W., Jones, V., 1982. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* 299, 165-168
- 11- Morassutti, D.J., Staines, W.A., 1994. Murine embryonal carcinoma derived neurons survive and mature following transplantation into adult rat striatum. *neuroscience* 58, 753-763
- 12- Nakashima, S., Kitamoto, K., Arioka, M., 2004. The catalytic activity, but not receptor binding, of sPLA2 plays a critical role for neurite outgrowth induction in PC12 cells. *Brain Research* 1015, 207-211
- 13- Pachernik, J., Bryja, v., Esner, M., Kubala, L., Dvopak, P., Hampl, A., 2005. Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma cells by retinoic acid: inhibitory effect of serum. *physiol. Res.* 54, 115-122
- 14- Parnas, D., Linial, M., 1995. Cholinergic properties of neurons differentiated from an embryonal carcinoma cell line (P19). *International Journal of Developmental Neuroscience* 13, 767-781
- 15- Peiren, N., Vanrobaeys, F., Graf, D.C., Devreese, B., Jacobs, F., 2005. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica-Acta* 1752, 1-5
- 16- Resende, R.R., Majumder, P., Gomes, K.N., Britto, L.R.G., Ulrich, H., 2007. P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience* 146, 1169-1181
- 17- Soprano, D., Teets, B., Soprano, K., 2007. Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Vitamin & Hormones* 75, 69-95
- 18- Yue, H.Y., Fujita, T., Kumamoto, E., 2005. Phospholipase A2 activation by melittin enhances spontaneous glutamatergic excitatory transmission in rat substantial gelatinosa neurons. *Neuroscience* 135, 485-495
- 19- Ziouzenkova, O., Plutzky, J., 2008. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses. *FEBS Letters* 582, 32-38

Effect of honey bee venom and RA on induction of neuronal differentiation of mouse embryonic carcinoma P19 cells

Mohseni Kouchesfahani H., Parivar K., Nabiuni M. and Ebrahimi barough S.

Biology Dept., School of Basic science, Tarbiat Moalem University Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Mouse P19 embryonic carcinoma (EC) cells are pluripotent and can be differentiated into a population consisting largely of neurons and glia cells using a concentration of 5×10^{-7} M of retinoic acid (RA). Thus, P19 EC cells are a good model system to study events occurring during the critical phase of neuronal differentiation in vitro. Honey bee venom (BV) from consists of mellitin, phospholipase A2, apamin and several other bioactive substances. Studies have shown that mellitin and phospholipase A2, two major components of BV, play an important role in differentiation of neurons and enhance neurite outgrowth in PC12 cell line. The purpose of this experiment was to examine effects of bee venom and RA on the induction of neuronal differentiation in P19 cell line. The cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/ml in α -MEM containing 2.5% FBS and 7.5% calf serum, and incubated at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO₂. Primary results obtained from morphological examination showed that six days after treatment with 5×10^{-7} M RA, P19 cells produced processes and gradually obtained neuronal phenotype until day 10 of culture and then all cells died on day 11. P19 cells treated with 1, 3 μ g/ml bee venom produced processes on day 6 and neurons appeared. Then they exceeded to total size until day 10 and produced elongated processes but all cells died on day 11. Using bee venom and RA together had the same but more pronounced differentiating results. It can be concluded that applying bee venom with RA have an additive effect on cell differentiation and proliferation.

Keywords: p19 cells, neuron, differentiation, honey bee venom, retinoic acid