Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 13:58 IRDT on Tuesday September 10th 2013



# جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل و بررسی تاثیر آن بر رشد سلول‌های سرطان معده

امیر محمودزاده[۱و۲]
علی مرادی[۱*]، حنانه زرین نهاد[۱و۲]
کامران پوشنگ باقری[۲]
پوریا قاسمی دهکردی[۳]
مهدی مهدوی[۴]، دلاور شهباززاده[۲]
حمیدرضا شاهمرادی[۱]

۱- گروه بیوشیمی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲- گروه ونوم و توکسین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران.
۳- گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۴- گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: یزد، خیابان شهدای گمنام، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی. تلفن: ۸۲۰۲۶۳۳-۰۳۵۱
E-mail: morady2008@gmail.com

## چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۹/۲۵

***زمینه و هدف:*** سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان و ایران می‌باشد. از آن‌جا که روش‌های درمانی رایج مانند جراحی و شیمی درمانی به صورت تهاجمی و عوارض جانبی هستند، امروزه تحقیقات به منظور یافتن ترکیبات طبیعی با اثرات جانبی کم‌تر حایز اهمیت‌اند. در این مطالعه از سم زنبور عسل، پپتید ملیتین با ۲۶ اسید آمینه جداسازی و تخلیص شد و تاثیر آن بر میزان زنده بودن و تکثیر سلول‌های سرطانی معده مورد بررسی قرار گرفت.

***روش بررسی:*** ابتدا ملیتین توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (RP-HPLC) و با استفاده از ستون C18 از زهر زنبور عسل استخراج گردید. فعالیت بیولوژیکی ملیتین به‌وسیله تست همولیتیک بر روی گلبول‌های قرمز نسبت به استاندار ملیتین بررسی گردید. جهت بررسی تاثیر ملیتین بر زنده بودن و تکثیر سلول‌های سرطانی معده رده (AGS) Human Gastric Adenocarcinoma Cells، سلول‌های مربوطه در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و با غلظت‌های مختلف ملیتین در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت تیمار و میزان مرگ و میر سلول‌ها به روش رنگ سنجی MTT ( (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید.

***یافته‌ها:*** کروماتوگرام حاصل از RP-HPLC مشخص نمود ملیتین ۵۰٪ زهر مورد مطالعه را تشکیل می‌دهد. آنالیز فراکشن ملیتین توسط SDS-PAGE خالص بودن آن را تایید نمود. آزمون هولیتیک نشان داد ملیتین استخراج شده فعالیت همولیتیک بالایی (HD۵۰=۰/۵μg/ml) از خود نشان می‌دهد. آزمون MTT نشان داد ملیتین در غلظت‌های بالاتر از ۲μg/ml به شدت رشد سلول‌های سرطانی معده را مهار می‌کند. این اثر مهاری وابسته به غلظت ملیتین و مدت زمان اثر می‌باشد.

***نتیجه‌گیری:*** نتایج این پژوهش نشان داد که ملیتین مهار کننده قدرتمند رشد سلول‌های سرطان معده می‌باشد. هم‌چنین مشاهده گردید این اثر مهاری با افزایش غلظت ملیتین و مدت زمان اثر، افزایش می‌یابد.

***کلمات کلیدی:*** ملیتین، سرطان معده، کروماتوگرافی فاز معکوس.

## مقدمه

زهر زنبور عسل در پزشکی سنتی شرقی همواره به عنوان دارویی در درمان بیماری‌های مختلفی هم‌چون آرتریت روماتویید و هم‌چنین جهت کاهش دردهای عضلانی مورد استفاده قرار می‌گرفته است.[۱و۲] این ماده حاوی ۱۸ ترکیب متفاوت هم‌چون آنزیم‌ها، پپتیدها و آمین‌های بیولوژیک می‌باشد. مهم‌ترین پپتیدهای موجود در زهر زنبور ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل می‌باشند و از آنزیم‌های موجود در آن می‌توان به فسفولیپاز A2 اشاره نمود. هم‌چنین از آمین‌های فعال بیولوژیکی زهر زنبور عسل از هیستامین و



www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 13:58 IRDT on Tuesday September 10th 2013

اپی‌نفرین نام برده می‌شود.[۳و۴] ملیتین (Melittin) یک پپتید ۲۶ اسید آمینه‌ای، کاتیونیک و آمفی‌پاتیک می‌باشد و اصلی‌ترین ترکیب موجود در زهر زنبور عسل محسوب می‌گردد.[۵] ملیتین ۴۰ تا ۵۰ درصد وزن خشک زهر زنبور را تشکیل داده و مقدار ترشح آن در زهر بسته به تغذیه و نژاد زنبور متغیر است. از ۲۶ اسید آمینه موجود در ساختمان ملیتین ۲۰ اسید آمینه انتهای آمین پپتید به طور عمده آب‌گریز بوده در حالی که اسیدهای آمینه انتهای کربوکسیل آن (اسیدهای آمینه ۲۱ تا ۲۶) بیش‌تر آب‌دوست می‌باشند. این ساختمان دوگانه دوست به ملیتین امکان واکنش با غشاهای فسفولیپیدی و تخریب آن‌ها را می‌دهد.[۵و۶]

تاکنون خواص مختلفی برای ملیتین گزارش شده است که از این قبیل می‌توان به اثرات ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد سرطانی اشاره نمود.[۷] در سال‌های اخیر مهار سلول‌های سرطانی تخمدان، سینه، کبد و ریه توسط زهر زنبور عسل و ملیتین گزارش شده است.[۸و۹] علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که اثرات سمی ملیتین بر سلول‌های سرطانی بسیار بیش‌تر از سلول‌های طبیعی بدن می‌باشد.[۱۰] در سال ۲۰۰۰ سرطان معده دومین سرطان کشنده و چهارمین سرطان شایع در سراسر جهان بوده است. سالیانه ۶۵۰ هزار مرگ در اثر این بیماری و ۸۸۰۰۰۰ مورد جدید آن گزارش می‌گردد. حدود دو سوم این موارد در کشورهای در حال توسعه می‌باشد.[۱۱] در ایران سرطان معده در رتبه دوم ابتلا به سرطان‌ها قرار دارد و شایع‌ترین سرطان در میان مردان و سومین در میان زنان محسوب می‌گردد.[۱۲] پراکنش این بیماری در سراسر کشور یک‌نواخت نبوده، به گونه‌ای که استان‌های شمالی و شمال غربی بیش‌ترین و استان‌های مرکزی کم‌ترین آمار ابتلا را دارا می‌باشند.[۱۳] جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی از جمله روش‌های مورد استفاده در درمان سرطان معده محسوب می‌گردند که در بیش‌تر موارد به علت تشخیص در مراحل پیشرفته بیماری، با شکست مواجه می‌گردند و هم‌چنین روش‌هایی تهاجمی و دارای عواقب جانبی زیاد هستند.[۱۴]

با توجه با معایب روش‌های درمانی موجود نیاز به استفاده از ترکیبات و روش‌های نوین به ویژه ترکیبات طبیعی موجود در طبیعت در کنترل و درمان سرطان معده بیش از پیش احساس می‌گردد، لذا در این مطالعه اثر ملیتین جدا شده از زهر زنبور عسل بومی ایران بر تکثیر سلول‌های سرطانی معده مورد بررسی قرار گرفت.

## روش بررسی

مواد: در این مطالعه تری‌فلورواستیک اسید (TFA)، استونیتریل (ACN)، (MTT)، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) و ترپیان بلو از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و مواد مورد استفاده در کشت سلول از قبیل محیط کشت RPMI 1640، پنی‌سیلین و استرپتومایسین، FBS و ترپیسین از شرکت گیبکو (Gibco-BRL, Paisley, UK) خریداری گردید. سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسانی رده AGS از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری گردید. مطالعه حاضر به صورت آزمایشگاهی (In vitro) در آزمایشگاه ونوم و توکسین انستیتو پاستور تهران از تابستان ۹۰ تا بهار ۹۱ طی مراحل زیر انجام گردید.

زهر زنبور عسل به کمک دستگاه شوک الکتریکی جمع‌آوری زهر زنبور و مطابق با پروتکل Benton تهیه گردید.[۱۵] به این منظور صفحه شیشه‌ای دستگاه به گونه‌ای در برابر ورودی کندو قرار داده شد که زنبورهایی که قصد ورود به کندو را داشتند مجبور به فرود بر روی این صفحه شیشه‌ای پوشیده شده از سیم می‌شدند. پس از رسیدن زنبورهای موجود بر روی صفحه به تعداد مناسب، جریان الکتریکی ضعیفی در سیم‌ها برقرار گردید. زنبورهای عسل در پاسخ به این شوک الکتریکی ضعیف بلافاصله اقدام به گزش صفحه الکتریکی نمودند. زهر در معرض هوا به سرعت بر روی صفحه شیشه‌ای خشک می‌گردد و پس از خشک شدن از روی صفحه تراشیده و به آزمایشگاه منتقل گردید.

در این روش زهرگیری هیچ آسیبی به زنبور وارد نمی‌گردد. زهر استحصال شده در آب دیونیزه استریل حل گردیده و پس از فیلتراسیون توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتر آماده تزریق به دستگاه HPLC گردید.

جداسازی ملیتین توسط RP-HPLC: جهت جداسازی ملیتین از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (Knauer, Berlin, Germany) با پمپ K-1000، ردیاب UV مدل ۲۵۵۰ (Knauer, Berlin, Germany)، تزریق کننده دستی، لوپ ۲۰ میکرولیتری، ستون $C_{18}$ 100 (C18, 250×4.6 mm, Knauer, Berlin, Germany, Eurosfer) و نرم‌افزار آنالیز Chrom Gate version 3.3.2 استفاده شد. جداسازی با ایجاد گرادیان بین دو محلول A و B انجام شد. آب دیونیزه حاوی ۰/۰۵٪



www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 13:58 IRDT on Tuesday September 10th 2013

TFA به عنوان محلول A و استونیتریل خالص حاوی ۰/۰۵٪ TFA به عنوان محلول B انتخاب و جهت جداسازی ملیتین شیب خطی صفر تا ۶۰ درصد محلول B به مدت ۶۰ دقیقه اعمال گردید. خروجی ستون در طول موج ۲۱۴ نانومتر رصد گردید.

زمان خروج (Retention time) ملیتین به کمک استاندارد خریداری شده از شرکت سیگما تعیین و فراکشن آن به صورت دستی جمع‌آوری و پس از لیوفیلیزه شدن و تایید خلوص به کمک SDS-PAGE، تعیین غلظت گردیده و جهت انجام آزمایشات بعدی در ۲۰- °C نگه‌داری شد.

به منظور بررسی فعالیت همولیتیک ملیتین استخراج شده، یکی از خواصی که تاکنون در رابطه با ملیتین گزارش گردیده است مربوط به توانایی ملیتین در لیز گلبول‌های قرمز خون (فعالیت همولیتیک) می‌باشد.[۱۶] در این تحقیق، آزمون فعالیت همولیتیک مطابق با پروتکل AL-Badri انجام گردید.[۱۷]

اریتروسیت‌ها از خون تازه هپارینه به‌وسیله سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه 3000 rpm) جدا و با بافر فسفات (PBS) شستشو شدند. سپس رسوب گلبول‌های قرمز (RBC) به گونه‌ای در PBS رقیق گردید تا سوسپانسیون ۲٪ از RBC حاصل شود. سوسپانسیون تهیه شده به هشت خانه از یک پلیت ۹۶ خانه تخت (۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه) منتقل و با هشت غلظت سریالی رقیق شده ملیتین (۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار گردیدند. به عنوان کنترل مثبت و منفی از همان مقدار RBC با تیمار با تراینتون X-100 و PBS به ترتیب استفاده شد.

پلیت ۹۶ خانه حاوی نمونه‌های مورد آزمایش و کنترل‌های مثبت و منفی در انکوباتور ۳۷ °C به مدت دو ساعت قرار داده شد و پس از پایان این مدت سانتریفیوژ شده (۱۰ دقیقه 3000 rpm) و ۶۰ µl از محلول رویی هر یک از خانه‌ها به پلیت دیگری منتقل گردید. میزان جذب نمونه‌ها (Optical Density, OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر (Biotech, EPOCH, USA) اندازه‌گیری گردید. درصد فعالیت همولیتیک نمونه‌ها در مقایسه با کنترل مثبت از رابطه زیر محاسبه شد:

درصد همولیتیک=[(نمونه$OD$-کنترل منفی$OD$)/(کنترل مثبت$OD$-کنترل منفی$OD$)×۱۰۰]

این آزمایش سه بار تکرار گردیده و داده‌ها به صورت Mean±SD بیان گردیده‌اند.

کشت سلول: سلول‌های آدنوکارسینومای معده Human Gastric Adenocarcinoma Cells (AGS) در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در انکوباتور ۳۷ °C با ۵٪ CO2 کشت داده شد. پس از رسیدن سلول‌ها به رشد مناسب، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک کشت سلول به کمک محلول حاوی ۰/۲۵ آنزیم تریپسین و ۰/۱٪ EDTA جدا شده و با رنگ‌آمیزی با تریپان بلو شمارش گردیدند.

بررسی اثر ملیتین بر رشد سلول‌های AGS به کمک MTT: جهت انجام آزمون MTT سلول‌های AGS با جمعیت $۴\times۱۰^{۴}$ سلول در هر خانه به پلیت‌های ۹۶- خانه تخت منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO2 در ۳۷ °C نگه‌داری شدند. پس از پایان مدت زمان انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف (۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) ملیتین به مدت شش و ۱۲ ساعت تیمار گردیدند.

چهار ساعت پیش از پایان مدت زمان انکوباسیون ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT ۲/۵mg/ml به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید. در این روش نمک MTT توسط سلول‌های زنده احیا و به رسوب بنفش رنگی به نام فورمازان (Formazan) تبدیل می‌گردد. شدت رنگ تولیدی با تعداد سلول‌های زنده ارتباط مستقیم دارد.

پس از پایان مدت زمان انکوباسیون (شش و ۱۲ ساعت) پلیت‌ها تحت شرایط (۱۰ دقیقه، 3000 rpm) سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. جهت انحلال رسوب رنگی فورمازان ۱۰۰µl DMSO به هر کدام از خانه‌ها اضافه و شدت نور جذب شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. از سلول‌های تیمار نشده با ملیتین به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. از روابط زیر برای محاسبه درصد اثر بازدارندگی ملیتین بر رشد سلول‌های AGS استفاده شد:

A) % Viability= (OD sample/ OD negative control)× 100
B) % Inhibition= 100- Viability

تمام آزمایشات انجام شده در این تحقیق سه بار تکرار گردیده و داده‌ها به صورت Mean±SD بیان شدند. در تمام آنالیزها سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SigmaPlot ویراست ۱۱ رسم شدند.



www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 13:58 IRDT on Tuesday September 10th 2013

## یافته‌ها

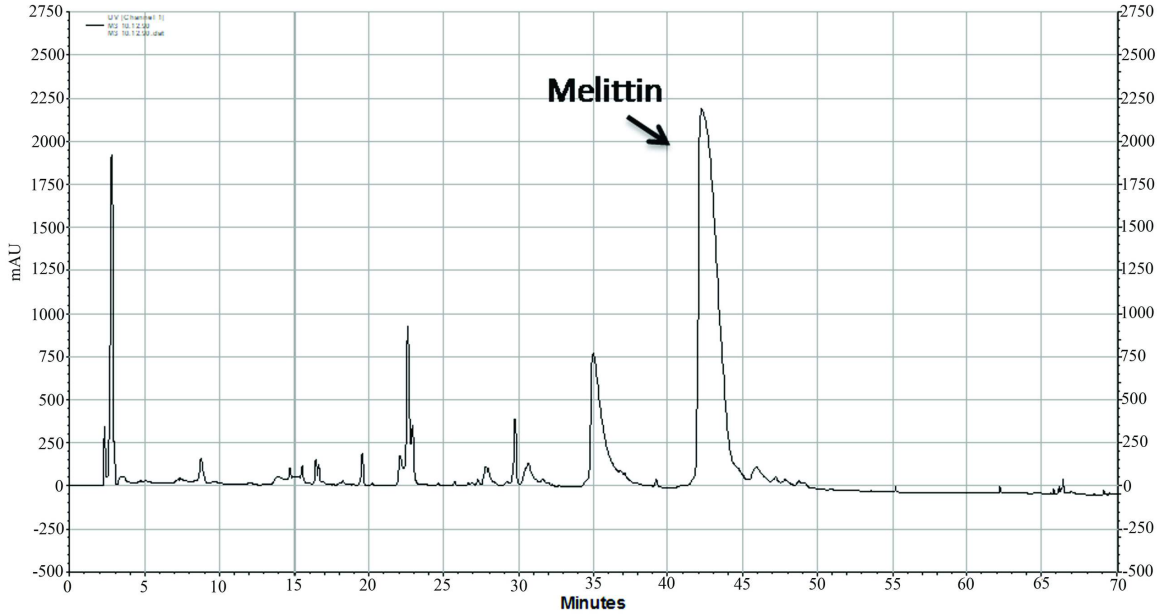
نتایج حاصل از کروماتوگرافی: بر اساس کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه زهر زنبور عسل مورد استفاده در این مطالعه توسط دستگاه RP-HPLC (Knauer, Berlin, Germany) با ستون C18 در طول موج ۲۱۴ نانومتر بیش از صد پیک بزرگ و کوچک مشاهده گردید. از این تعداد حدود ۲۰ پیک اصلی در کروماتوگرام قابل تشخیص بود. زمان خروج ملیتین با استفاده از استاندارد تهیه شده از شرکت سیگما، دقیقه ۴۲ تعیین گردید.

با مشاهده آغاز خروج آن از ستون به طور دستی جمع‌آوری گردید. سطح زیر منحنی فراکشن ملیتین در حدود ۵۰ درصد (۴۹/۸۵٪) کل ترکیبات زهر زنبور عسل بود که این موضوع مطابق با گزارشات پیشین در مورد میزان ملیتین در زهر زنبور عسل می‌باشد.[۱۸و۱۹] (شکل ۱).

همان‌گونه که در تصویر ژل الکتروفورز مشخص است ملیتین بدون ناخالصی استخراج شده است. فراکشن ملیتین پس از جمع‌آوری لیوفیلیزه گردیده و خلوص آن با ژل SDS-PAGE ۱۵٪ تایید گردید (شکل ۲). پس از تعیین غلظت، ملیتین جهت استفاده در آزمایشات بعدی در $^{\circ}C$ ۲۰- نگه‌داری گردید. فعالیت همولیتیک ملیتین: ملیتین از طریق تخریب غشاء گلبول‌های قرمز و آزادسازی هموگلوبین موجب افزایش جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر می‌گردد. از این افزایش شدت جذب نور می‌تواند به عنوان نشانه‌ای از میزان فعالیت لیزکنندگی ملیتین باشد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش همولیتیک انجام شده در این مطالعه، مشاهده گردید ملیتین در غلظت‌های بسیار پایین ۰/۲۵و ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر فاقد فعالیت چشمگیری بوده در حالی که در غلظت‌های بالاتر به طور کامل دارای فعالیت همولیتیک می‌باشد. غلظتی از ملیتین که باعث لیز ۵۰٪ گلبول‌های قرمز در مقایسه با کنترل مثبت (ترایتون X-100) شده است (HD50) برابر ۰/۵µg/ml تعیین گردید (نمودار ۱).

مهار رشد سلول‌های AGS توسط ملیتین: میزان اثر مهاری ملیتین بر رشد سلول‌های سرطانی معده (AGS) به روش MTT تعیین گردید. بر اساس نتایج حاصل، ملیتین باعث کنترل رشد سلول‌های سرطانی شده است. این اثر مهاری در هر دو زمان شش و ۱۲ ساعت به طور

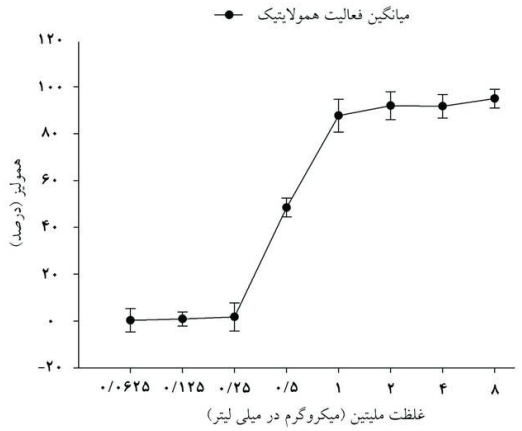



**شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه زهر زنبور عسل بومی ایران مورد استفاده در این مطالعه توسط دستگاه RP-HPLC با ستون C18 در طول موج ۲۱۴ نانومتر.**

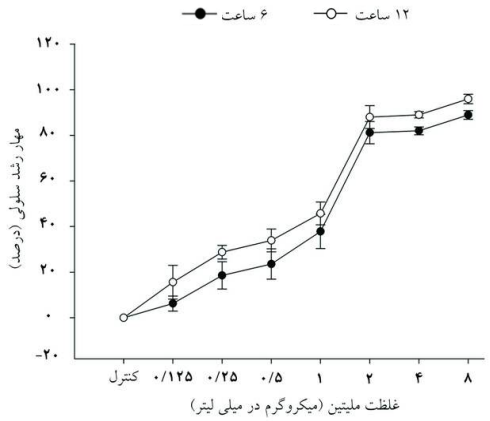


www.SID.ir

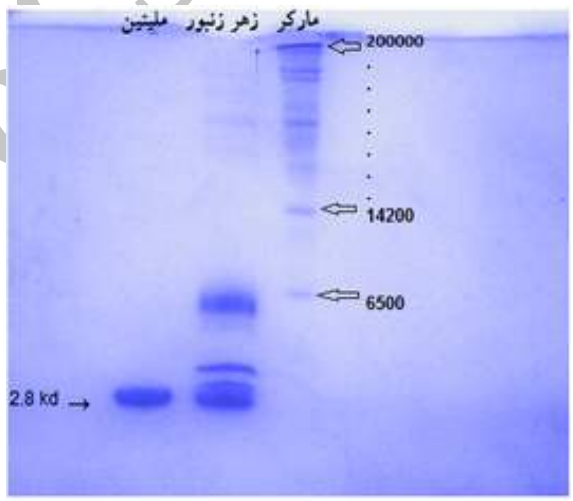
Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 13:58 IRDT on Tuesday September 10th 2013




**نمودار ۱: افزایش میزان فعالیت همولیتیک ملیتین با افزایش غلظت آن.**




**نمودار ۲: اثر غلظت‌های مختلف ملیتین بر رشد سلول‌های سرطانی معده (AGS).**




**شکل ۲: آنالیز الکتروفورزی (SDS-PAGE 15%) فراکشن ملیتین.**

کامل مشهود می‌باشد. غلظتی از ملیتین که موجب مرگ ۵۰ درصدی سلول‌های سرطانی شده است (IC50) برای شش ساعت ۱/۲µg/ml و در ۱۲ ساعت برابر ۱µg/ml می‌باشد (نمودار ۲).

این نتایج نشان می‌دهند ملیتین اثر قدرت‌مندی بر رشد سلول‌های سرطانی معده از خود نشان می‌دهد. این اثر مهاری با افزایش غلظت ملیتین و مدت زمان تیمار سلول‌ها با آن افزایش می‌یابد.

## بحث

این پژوهش به منظور بررسی اثر ملیتین جدا شده از زهر زنبور عسل بر رشد سلول‌های سرطانی معده رده AGS انجام گردید. گرچه پیش از این گزارشاتی مبنی بر مهار انواعی از سلول‌های سرطانی توسط زهر زنبور عسل یا ترکیب اصلی آن (ملیتین) ارایه شده است ولی گزارشی در رابطه با اثر ملیتین بر سلول‌های سرطانی معده (AGS) توسط مجریان این مطالعه مشاهده نگردیده است.

نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده در این مطالعه به خوبی نشان‌دهنده مهار رشد سلول‌های سرطانی معده توسط ملیتین می‌باشد. سرطان معده یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان محسوب می‌گردد.[۲۰و۲۱] عدم توفیق روش‌های درمان این بیماری، نیاز به تحقیق بیش‌تر جهت معرفی مواد موثرتر و روش‌های درمانی کارآمدتر را بیش از گذشته حایز اهمیت نموده است.[۲۲]

تاکنون اثر ترکیبات متعددی بر سلول‌های سرطانی مختلف بررسی شده است و ترکیبات بسیاری وجود دارد که خواص ضد سرطانی آن‌ها گزارش شده است. از جمله ترکیبات مورد بررسی، مواد طبیعی موجود در طبیعت مانند بعضی از انواع گیاهان و خوراکی‌ها می‌باشد. از جمله این ترکیبات طبیعی که خواص ضد سرطانی آن‌ها به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است، زهر زنبور عسل و ترکیب اصلی موجود در آن، ملیتین، می‌باشد. زهر



www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 13:58 IRDT on Tuesday September 10th 2013

زنبور عسل به طور سنتی در پزشکی سنتی شرقی بـه عنـوان دارویـی برای درمان آرتریت روماتویید و تسکین درد مفاصـل مـورد اسـتفاده قرار می‌گرفته است. عـلاوه بـر آن در سـال‌هـای گذشـته گزارشـات متعددی از اثرات درمانی زهر زنبور عـسل در بیمـاری‌هـای مختلـف گزارش شده است. تاکنون خواص متعددی از ملیتـین گـزارش شـده اسـت، از جملـه مـی‌تـوان بـه خـواص ضـد درد، ضـد التهـابی، آنتی‌میکروبیال، همولیتیک و غیره اشاره کرد.

مطالعه بر روی زهر زنبورعسل و ملیتین از سـال‌هـای دور مـورد توجه بوده است. حدود ۶۰ سال پیش Havas اثر زهر زنبـور عـسل را بر نوعی تومور القا شده توسط کلشی‌سین بررسی کـرد. Havas نـشان داد که زهر زنبور عسل دارای اثرات توکسیک بر سـلول‌هـای تومـور می‌باشد. در سـال‌هـای اخیـر خـواص ضـد سـرطانی ملیتـین توجـه دانشمندان را به خود جلب نموده و گزارشات متعددی در این رابطـه ارایه شده است. گزارش شده است ملیتین با القـا مـرگ برنامـه‌ریـزی شده سلولی (آپوپتوز) موجب مهـار سـلول‌هـای سـرطانی هـم‌چـون سرطان ریه و پروستات می‌گردد.[۲۳]

به نظر می‌رسد القا آپوپتوز توسط ملیتین در سلول‌های سرطانی از طریـق مـسیر وابـسته بـه کاسـپاز (Caspase)، پروتئازهـای دخیـل در آپوپتوز، انجام می‌گیرد.[۲۴] اکثر داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی موجب القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مـی‌گردنـد و بـا توجـه بـه گزارشات فوق به نظر می‌رسد، ملیتین از این لحاظ در مطالعات آینـده گزینه مناسبی برای استفاده در درمان سرطان به حساب آید. خاصـیت دوگانه دوستی (Amphiphilic) ملیتـین موجـب گـشته ایـن پپتیـد بـا غشاهای فسفولیپیدی واکنش داده و موجب تخریب آن‌ها شـود. ایـن اثـرات تخریبـی ملیتـین بـا ایجـاد کانـال در سـطح غـشا انجـام می‌گیرد.[۲۶و۲۵و۶]

ملیتین ترکیبی بسیار پرقدرت می‌باشد و در صورت استفاده از آن در درمان انواع سرطان از طریق روش‌هایی بـا اثـرات جـانبی کـم‌تـر، انقلابی در مبارزه بشر علیـه سـرطان بـه وجـود خواهـد آورد. نتـایج حاصل از آزمایش بررسی فعالیت همولیتیک اثبات نمودند که ملیتـین مورد استفاده در این تحقیق دارای فعالیـت همولیتیـک مـی‌باشـد. بـر اساس این نتایج می‌توان گفت که اصلی‌تـرین مـانع در راه اسـتفاده از ملیتین در درمان سرطان فعالیت همولیتیک آن می‌باشد. لذا در طراحی روش‌های درمان سرطان با استفاده از ملیتین بایـد ایـن نکتـه در نظـر گرفته شود که ورود ملیتین به جریان خون موجب آسیب گلبول‌هـای قرمز می‌گردد. از این رو به نظر می‌رسـد راه‌هـای مناسـب‌تـر درمـان سرطان به کمک ملیتین استفاده از ژن درمـانی (انتقـال ژن ملیتـین بـه سلول‌های سرطانی) یا تحویل اختـصاصی ملیتـین ماننـد لیپـوزوم بـه سلول‌های سرطانی باشد.

تعیین میزان مهار رشد سلول‌های AGS تیمـار شـده بـا ملیتـین از طریق روش MTT نشان داد ملیتین دارای سمّیت زیادی بـر روی ایـن سلول‌ها می‌باشد این اثر مهاری وابسته به زمان و غلظت می‌باشد. این وابستگی به آن معنی است که با افزایش غلظت ملیتین و مـدت زمـان تیمار سلول‌ها مقدار بـیش‌تـری از مهـار رشـد سـلولی مـی‌گـردد. در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بالاتر از ۲µg/ml میـزان بـالایی از مهار رشد سلولی (بیش از ۸۰٪) مشاهده گردید که نشان‌دهنده قدرت بالای ملیتین در نابودی سلول‌های سرطانی معده دارد.

به طور خلاصه، این پـژوهش نـشان داد کـه ملیتـین اثـر مهـاری قدرت‌مندی را بر رشد سلول‌های سرطانی معده از خود نشان می‌دهد و این اثر مهاری وابسته به غلظت ملیتین و مدت زمان تیمار سلول‌هـا می‌باشد. این مطالعه می‌تواند به عنوان شروعی برای مطالعات بیش‌تـر در راستای استفاده از ملیتین جهت ارایه روش‌هـای کارآمـدتر درمـان سرطان معده محسوب می‌گردد.

*سپاسگزاری:* این مقاله حاصل بخشی از پایـان‌نامـه تحـت عنـوان "بررسی اثر ملیتین در القا آپوپتوز در سلول‌هـای سـرطانی معـده" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۱ می‌باشد که با حمایـت انـستیتو پاستور تهران و دانشگاه علوم پزشکی و خـدمات درمـانی یـزد اجـرا شده است.

## References

1. 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.



Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 13:58 IRDT on Tuesday September 10th 2013


2. Lee JD, Park HJ, Chae Y, Lim S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2(1):79-84.
3. Ghabili K, Shoja MM, Parvizi M. Bee venom therapy: a probable etiology of aneurysm formation in aorta. *Med Hypotheses* 2009; 73(3):459-60.
4. Gauldie J, Hanson JM, Rumjanek FD, Shipolini RA, Vernon CA. The peptide components of bee venom. *Eur J Biochem* 1976;61(2):369-76.
5. Bazzo R, Tappin MJ, Pastore A, Harvey TS, Carver JA, Campbell ID. The structure of melittin. A 1H-NMR study in methanol. *Eur J Biochem* 1988;173(1):139-46.
6. Dempsey CE. The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1990;1031(2):143-61.
7. Tichy J, Novak J. Detection of antimicrobials in bee products with activity against viridans streptococci. *J Altern Complement Med* 2000;6(5):383-9.
8. Ip SW, Liao SS, Lin SY, Lin JP, Yang JS, Lin ML, et al. The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo* 2008;22(2):237-45.
9. Wang C, Chen T, Zhang N, Yang M, Li B, Lü X, et al. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting IkappaBalpha kinase-NFkappaB. *J Biol Chem* 2009;284(6):3804-13.
10. 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.
11. Plummer M, Franceschi S, Muñoz N. Epidemiology of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004;(157):311-26.
12. Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Arch Iran Med 2009; 12(6):576-83.
13. Taghavi N, Nasrollahzadeh D, Merat S, Yazdanbod A, Hormazdi M, Sotoudeh M, et al. Epidemiology of upper gastrointestinal cancers in Iran: a sub site analysis of 761 cases. *World J Gastroenterol* 2007;13(40):5367-70.
14. Bornschein J, Rokkas T, Selgrad M, Malfertheiner P. Gastric cancer: clinical aspects, epidemiology and molecular backg-round. *Helicobacter* 2011;16 Suppl 1:45-52.
15. Benton AW, Morse RA, Stewart JD. Venom Collection from Honey Bees. *Science* 1963;142(3589):228-30.
16. Tosteson MT, Holmes SJ, Razin M, Tosteson DC. Melittin lysis of red cells. *J Membr Biol* 1985;87(1):35-44.
17. Al-Badri ZM, Som A, Lyon S, Nelson CF, Nüsslein K, Tew GN. Investigating the effect of increasing charge density on the hemolytic activity of synthetic antimicrobial polymers. *Biomacromolecules* 2008;9(10):2805-10.
18. Rybak-Chmielewska H, Szczêsna T. HPLC study of chemical composition of honeybee (Apis mellifera L.) venom. *J Apicultural Sci* 2004;48(2):103-9.
19. Sciani JM, Marques-Porto R, Lourenço Junior A, Orsi Rde O, Ferreira Junior RS, Barraviera B, et al. Identification of a novel melittin isoform from Africanized Apis mellifera venom. *Peptides* 2010;31(8):1473-9.
20. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12(3):354-62.
21. Shah MA, Khanin R, Tang L, Janjigian YY, Klimstra DS, Gerdes H, et al. Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res* 2011;17(9):2693-701.
22. Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Ann Oncol* 2003;14 Suppl 2: ii31-6.
23. Maher S, McClean S. Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol. *Biochem Pharmacol* 2008;75(5):1104-14.
24. Moon DO, Park SY, Choi YH, Kim ND, Lee C, Kim GY. Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downergulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. *Toxicon* 2008;51(1):112-20.
25. Vogel H, Jähnig F. The structure of melittin in membranes. *Biophys J* 1986;50(4):573-82.
26. Dawson CR, Drake AF, Helliwell J, Hider RC. The interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 1978;510(1):75-86.


Archive of SID



www.SID.ir

TUMJ Tehran University Medical Journal, March 2013; Vol. 70, No. 12: 760-767 Original Article

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 13:58 IRDT on Tuesday September 10th 2013

# Isolation of melittin from bee venom and evaluation of its effect on proliferation of gastric cancer cells

Amir Mahmoodzadeh M.Sc.[1,2]
Ali Morady Ph.D.[1*]
Hannaneh Zarrinnahad M.Sc.[1,2]
Kamran Pooshang Bagheri Ph.D.[2]
Pooria Ghasemi-Dehkordi D.V.M.[3]
Mahdi Mahdavi Ph.D.[4]
Delavar Shahbazzadeh Ph.D.[2]
Hamidreza Shahmorady M.Sc.[1]

*1- Department of Biochemistry, International Campus of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.*
*2- Venom and Toxin Laboratory, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.*
*3- Department of Veterinary, Azad University, Shahre kord, Iran.*
*4- Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.*

[*] Corresponding author: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
P.O.Box 8915173149
Tel: +98- 351- 8202633
E-mail: morady2008@gmail.com

## Abstract

Received: August 27, 2012 Accepted: December 15, 2012

***Background*:** Gastric cancer (GC) is one of the most common cancers worldwide and in Iran. Conventional therapies are surgery and chemotherapy. Current studies are evaluating natural compounds in inhibiting growth of cancer cell. In this study isolated peptide melittin with 26 amino acids from bee venom and its impact on the viability and proliferation of gastric cancer cells was investigated.

***Methods*:** At first melittin was purified from honeybee venom using a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP- HPLC) and C18 column. In order to investigate whether melittin, a 26 amino acids peptide which is the main components of honeybee venom, inhibits proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line (AGS cells), MTT ((3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide) assay was performed. Hemolytic assay carried out in order to confirm the biologic activity of the isolated melittin. AGS cells were plated in a 96-well plate and treated with serially diluted concentrations of melittin for 6 and 12 hours. The mortality of the cells was measured via MTT assay at 540 nm.

***Results*:** The obtained chromatogram from RP-HPLC showed that melittin comprises 50% of the studied bee venom. SDS-PAGE analysis of melittin fraction confirmed purity of isolated melittin. Hemolytic activity assay indicates that isolated melittin shows a strong hemolytic activity (HD50=0.5). MTT assay showed that melittin strongly inhibits proliferation of gastric cancer cells at concentrations more than 2µg/ml. This inhibitory effect is dependent to melittin concentration and incubation time.

***Conclusion:*** This study provides evidence that melittin inhibits proliferation of the gastric cancer cells. Results showed that isolated melittin from honey bee venom have cytotoxic effect on AGS cell line with a trend of increasing cytotoxicity with increasing concentration and incubation time.

***Keywords:*** Melittin, reverse-phase chromatography, stomach neoplasm.

Archive of SID



www.SID.ir