بررسی تاثیر عصاره الکلی بره موم مراتع استان لرستان بر مهار رشد و تکثیر رده سلولی لنفوسیتی‌های انسانی ۶۰

سید مهرداد کسائی*[۱]، خسرو شهیدی همدانی[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

۲. گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۳/۱٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰٦/۸

چکیده

بره موم ترکیبی است که از چرای زنبور عسل بر گیاهان ساخته می‌شود. عقیده بر این است که بره موم اثر درمانی یا پیشگیری کننده در التهاب، بیماری قلبی و حتی سرطان دارد. بیش از ۳۰۰ ترکیب فعال از نظر زیستی در بره موم نواحی مختلف جهان شناسایی شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره اتانولی بره موم حاصل از چرای زنبورها در مراتع استان لرستان بر فعالیت ضدسرطانی بر رده سلول سرطانی لنفوسیت انسانی ٦۰ بود. نخست عصاره اتانولی بره موم تهیه شد؛ سپس این عصاره با رقت‌های مختلف به محیط کشت سلول‌های لنفوسیت انسانی ٦۰ اضافه شد. پس از ٢٤ ساعت با استفاده از کیت MTT assay رشد و تکثیر سلولی این رده سلولی بررسی شد. عصاره اتانولی این نوع بره موم، موجب مهار وابسته به دوز با IC_{50}=25µgr/ml در رشد و تکثیر رده سلولی لنفوسیت انسانی ٦۰ شد. این نتایج نشان داد که عصاره اتانولی بره موم حاصل از چرای زنبور عسل در مراتع استان لرستان، حاوی ترکیباتی است که می‌تواند فعالیت ضدسرطانی داشته باشند. لذا این نوع بره موم و ترکیبات مرتبط با آن می‌تواند به عنوان روشی در پیشگیری و درمان این نوع سرطان بکار برد.

کلمات کلیدی: بره موم، رده سلولی لنفوسیت‌های انسانی ٦۰، زنبور عسل، مراتع استان لرستان

مقدمه

هدف بسیاری از تحقیقات، شناخت ترکیبات طبیعی و صناعی است که بتوان از آن در پیشگیری یا درمان سرطان استفاده نمود. اخیراً بررسی‌های متعددی در مورد خصوصیات فرآورده‌های طبیعی جهت مهار تکثیر و رشد سلول‌های سرطانی انجام شده که یکی از آنها، بره موم است. بره موم ماده‌ای چسبناک شبیه به موم و از تولیدات زنبور عسل است که ظاهر و ساختار آن به دلیل چرای زنبورها در مناطق با پوشش گیاهی مختلف می‌تواند متفاوت باشد (Fernanders et al., 2007)، اما به طور معمول قورم آن خمیری و رنگ آن از سبز تا قرمز و قهوه‌ای تیره متفاوت است. چسبندگی پروپولیس به دلیل واکنش قوی آن با چربی‌ها و پروتئین‌های پوست می‌باشد (Tosi et al., 2006). زنبورها ابتدا تکه‌های صمغ تراوش شده از جوانه یا شکوفه یا تنه برخی از گیاهان منطقه چرای خود را جمع‌آوری و به داخل کندو حمل می‌کنند (Ebadi and Ahmadi, 1998).

* Email:seyedmehrdadkassaee@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

در حین جمع‌آوری، مقداری بزاق و سایر ترشحات زنبور با آن مخلوط می‌شود (Ebadi and Ahmadi, 1998; Burdock, 1999; Ghisalberti, 1979).

میزان ترکیبات موجود در بره موم‌های مناطق مختلف متفاوت است و به طور معمول از ۳۰ درصد موم، ۵۰درصد صمغ ۱۰درصد چربی‌های ضروری و مواد معطر گیاهی و ۵درصد گرده تشکیل شده است (Ebadi and Ahmadi, 1998; Burdock, 1999). ترکیب شیمیایی این ماده بسیار پیچیده است و بیش از ۳۰۰ ترکیب در نمونه‌های پروپولیس شناسایی شده‌اند که ترکیب آن به منبع گیاهی و فلور محلی بستگی دارد (Tosi et al., 1996).

پروپولیس دارای اسیدهای آلیفاتیک و آروماتیک، استرها، فلاونوئیدها، قندها، گلیسرول، اسیدفسفریک، وانیلین، میریستین، ویتامین‌های تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، پانتوتنیک اسید، پیریدوکسین، A، E و C در مقادیر مختلف می‌باشد. همچنین دارای مواد معدنی شامل آهن، منگنز، مس، کلسیم، وانادیوم، آلومینیوم، استرانتیوم، سیلیکون، روی، سدیم، ید و منیزیوم می‌باشد و نیز به مقادیر بسیار کم اسید آمینه که بیشتر از نوع آرژنین و پرولین دارد. مقادیر این ترکیبات در بره موم مناطق مختلف به علت فلور گوناگون گیاهی، متفاوت است (De Vecchi and Drago, 2007; Scifo et al., 2004).

فعالیت زیستی پروپولیس به طور عمده به واسطه چند ماده نظیر فلاونوئیدها، ترپن‌ها، اسیدهای کافئیک، فرولیک، کوماریک و استرهاست. بره موم به طور گسترده جهت فعالیت‌های ضدمیکروبی علیه طیف وسیعی از موجودات زنده (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها) به کار رفته است. همچنین این ترکیب به عنوان ضدالتهاب، بی حس کننده، آنتی اکسیدان، ضدتومور، ضد زخم و محافظت کننده کبد به کار رفته است (De Vecchi and Drago, 2007).

طبق مطالعات، پروپولیس غیرسمی و فاقد عوارض جانبی است (Fernanders et al., 2007). شواهد پیش بالینی و اپیدیمولوژیک نشان می‌دهد که ترکیبات پلی فنولی استخراج شده از بره موم دارای خواص پیشگیری کننده از سرطان است (Birt et al., 2001).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه کیت MTT با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در ۱۰میلی‌لیتر که از شرکت سیگما خریداری شد مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت RPMI1340، همراه FBS ۱۰ درصد به همراه ۱درصد استرپتومایسین ـ پنی سیلین، بره موم حاصل از چرای زنبور عسل در مراتع استان لرستان استفاده شد.

برای تهیه عصاره الکلی بره موم، ابتدا ۱ میلی‌گرم بره موم را در شرایط استریل با ۱ میلی‌لیتر الکل اتیلیک حل کرده و با محیط کشت به ۱۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. سپس این محلول را فیلتر نموده و متعاقباً این ۱۰ میلی‌لیتر محلول با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در حجم ۵۰ میکرولیتر، آلکوئیت گردید. سپس این عصاره با رقت‌های مختلف به محیط کشت سلول‌های لنفوسیت انسانی ۶۰ اضافه شد و ۲۴ ساعت بعد با استفاده از کیت MTT assay تکثیر سلولی این رده را بررسی نمودیم.

ابتدا تعداد مناسب سلول (۵×۱۰^{۶}) را در خانه‌های یک پلیت ۹۶ خانه قرار داده، برای هر غلظت از بره موم سه خانه در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت پس از تیمار به هر خانه از پلیت‌های ۹۶ خانه ۱۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده و سپس ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در این مرحله می‌توان بلورهای فورمازان را توسط میکروسکوپ معکوس در سلول‌های زنده مشاهده کرد. در این مرحله به هر خانه (حتی گروه کنترل) ۱۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانل اسیدی اضافه نموده و پس از گذشت ۶ ساعت محتوای خانه‌ها را چندین بار پیپتاژ نموده تا رسوب داخل سلول‌ها بیرون بریزد. میزان جذب نوری (OD) را در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا اندازه گرفته شد.

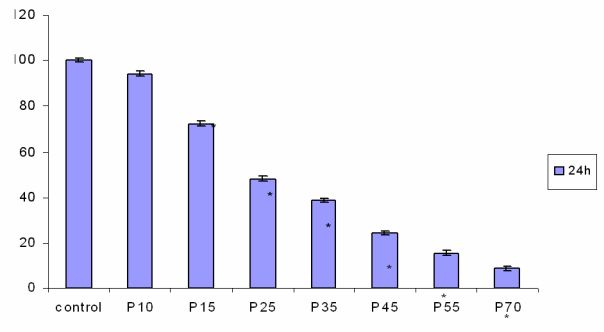
$$\text{درصدOD تست} = \frac{\text{OD تست}\times 100}{\text{OD کنترل}}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Spss 13 در دو بخش توصیفی و استباطی صورت گرفت. در بخش آمار استنباطی جهت بررسی فرضیه‌های پژوهشی از آزمون‌های تحلیل واریانس یکطرفه (One Way Anova) استفاده شد.

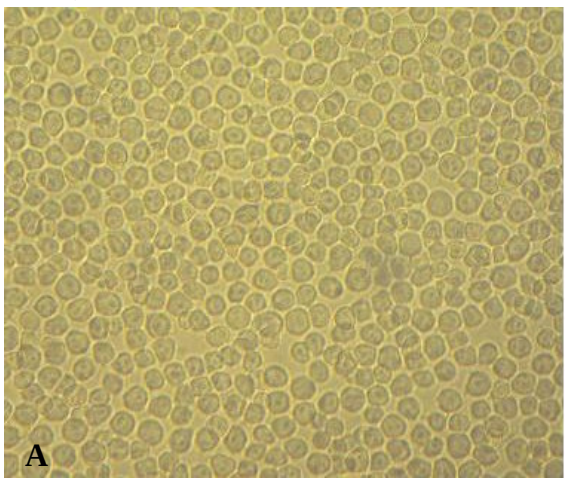
www.SID.ir

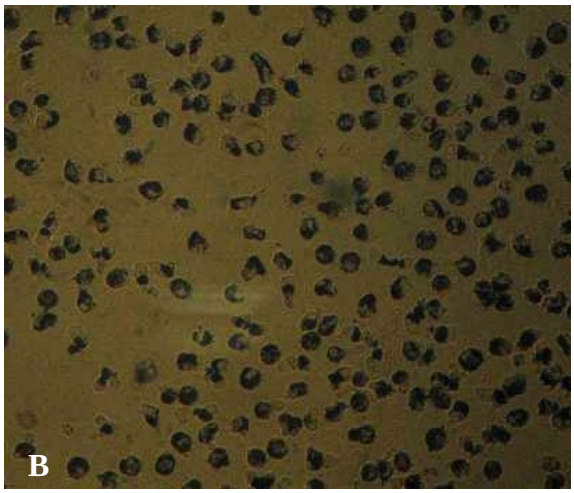
نتایج

پس از تیمار سلول‌های آماده شده به روش فوق، آنها را در هر خانه از پلیت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف بره موم به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد. سپس آزمون MTT به منظور نشان دادن سلول‌های زنده به کار رفت و با استفاده از الایزا و رسم منحنی، میزان تغییرات رشد و تکثیر سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میکروگرم بر لیتر از این نوع بره موم تاثیری بر تکثیر سلول‌ها نداشت و بین این گروه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. به علاوه در غلظت‌های بیشتر از این مقدار کاهش تکثیر و رشد سلولی به صورت وابسته به دوز دیده شد. نشان داده شد که میان این گروه‌ها با هم و با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($p<0.05$) (نمودار ۱).

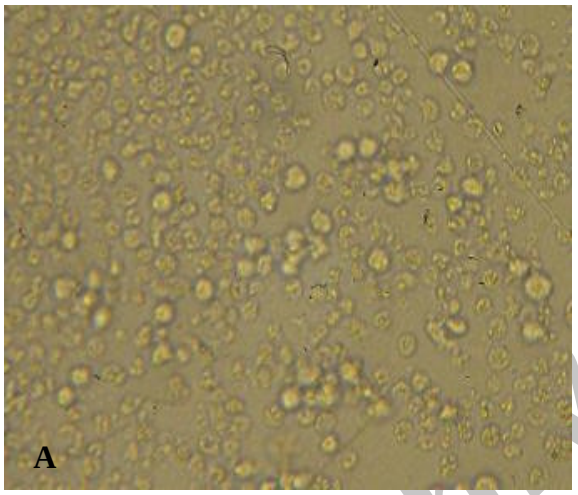


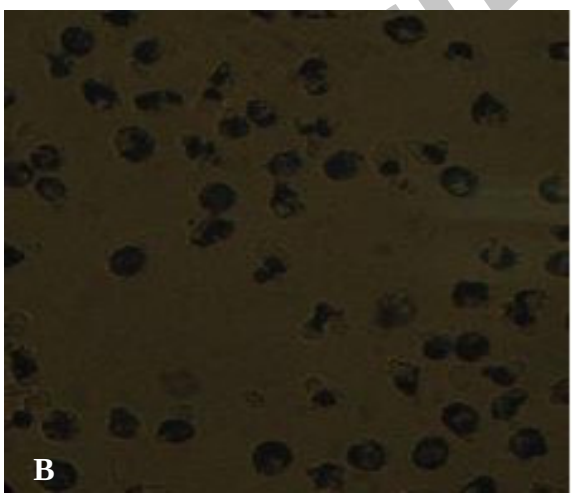
نمودار ۱: درصد بقای سلول‌های HL-60 در تیمار ۲٤ ساعته با غلظت‌های متفاوت بره موم





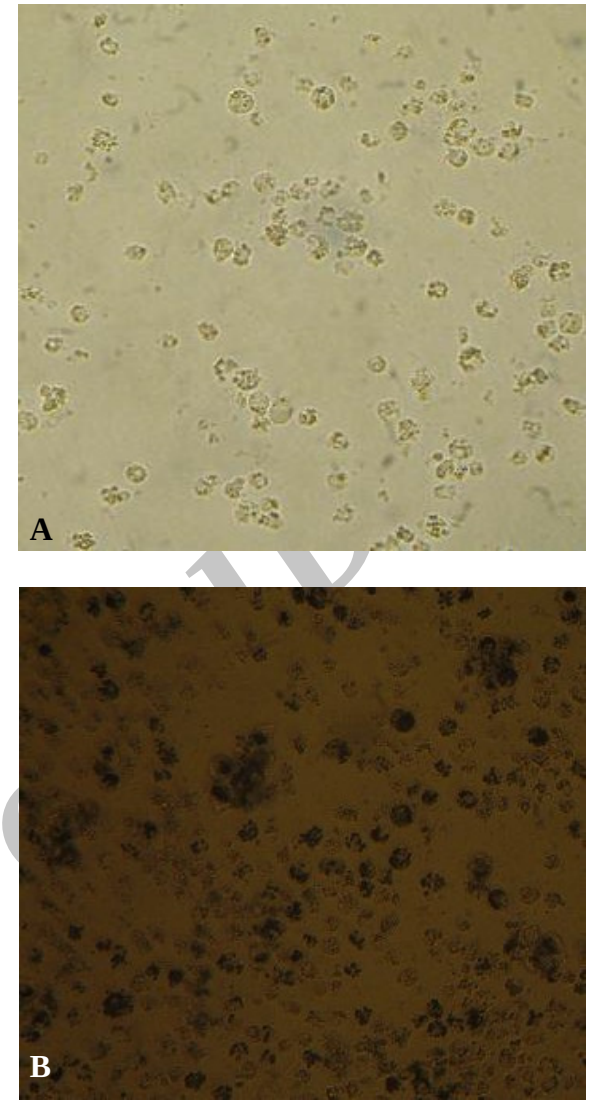
شکل ۱: نمونه کنترل قبل (A) و بعد (B) از افزودن MTT





شکل ۲: نمونه سلول تیمار شده با غلظت ۲۵ میکروگرم قبل (A) و بعد (B) از MTT

www.SID.ir



شکل ۳: نمونه سلول تیمار شده با غلظت ۷۰ میکروگرم قبل (A) و بعد (B) از MTT

بحث

بره موم در کشورهای اروپایی، شمال و جنوب آمریکا، چین و ژاپن در طب سنتی کاربرد دارد (Khalil, 2006). گزارش‌ها حاکی از آن است که بره موم طیف وسیعی از فعالیت‌ها نظیر اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی و حفاظت از کبد و به علاوه اثر ضدسرطانی را دارا می‌باشد (Khalil, 2006; Burdock, 1999). کاربرد پزشکی این ماده به علت نوع ترکیبات شیمیایی و گیاهی بودن منشاء آن به ویژه از زمانی که ترکیبات پلی فنلی و مشتقات آن در بره موم شناسایی شده در حال افزایش است (Khalil, 2006; Burdock, 1999). این بررسی اثرات مهار کنندگی رشد توسط بره موم را در شرایط invitro نشان می‌دهد. در این مطالعه دریافتیم که عصاره الکلی بره موم حاصل از چرای زنبورها در مراتع استان لرستان، سبب مهار رشد رده سرطانی سلول‌های لنفوسیت انسانی ۶۰ می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره الکلی بره موم حاوی ترکیباتی است که فعالیت ضدتکثیری دارند. فعالیت ضدتکثیری بره موم با آنچه گزارش‌های قبلی در مورد سایر رده‌های سلول سرطانی ارائه داده‌اند مطابقت دارد. به عنوان مثال بره موم برزیل و هلند فعالیت ضدتکثیری در رده‌های کارسینوما کلون 26-L5 جوندگان، ملانوما B16-BL6 جوندگان، فیبروکارسینوما HT1080 انسانی و آدنوکارسینوما ریه A549 انسانی نشان می‌دهد (Banskota et al., 2002; Li et al., 2008). به علاوه بره موم منطقه شیلی اثر مهارکنندگی بر رشد و تکثیر رده‌های کارسینوما اپیدرموئید دهانی KB انسانی و کارسینوما پروستات آندروژنیک DU145 نشان داده است (Russo et al., 2004).

در میان بیش از ۳۰۰ ترکیب مختلف موجود در بره موم مشخص شده است که استر caffeic acid phenethyl مهار کننده رشد و القاء کننده استراحت در فاز G_1 سیکل سلولی و آپوپتوزیس در رده‌های سلول سرطانی SW480 و HCT116 می‌باشد (Xiang et al., 2006; He et al., 2006). مطالعات دیگری نشان می‌دهد که فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک به مانند عصاره اتانولی بره موم مهارکننده تکثیر سلول‌های سرطانی و نیز القاء کننده خاموشی سیکل سلول و آپوپتوزیس‌اند (Orsolic et al., 2006; Bufalo et al., 2007). به علاوه عصاره اتانولی بره موم محرک ایمنی هومورال است و ایمنی سلولی بدن را نیز افزایش می‌دهد (Orsolic et al., 2006; Missima and Sforcinm, 2008). مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی بره موم حاصل از چرای زنبور عسل بر فلور بومی گیاهی مراتع استان لرستان، سبب مهار وابسته به دوز IC_{50}=25µgr/ml رشد سلول‌های سرطانی رده HL-60 می‌شود. بنابراین نتایج این تحقیق تایید کننده گزارش‌های قبلی و اثبات کننده طیف وسیعی از ویژگی‌های ضدتکثیری عصاره‌های بره موم‌های مناطق مختلف در رده‌های مختلف

www.SID.ir

سلول سرطانی است. پیشنهاد می‌شود که در مناطق مختلف کشورمان که قطب زنبورداری محسوب می‌شوند، مطالعات دقیق به منظور تعیین آثار بره موم و اجزاء سازنده آن، به تفکیک صورت پذیرد و نتایج حاصله بتواند در ساخت داروهای مربوطه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با آنالیز و مقایسه ترکیبات فلور گیاهی منطقه با اجزاء بره موم، می‌توان به تاثیر ترکیب گیاهی بر پیشگیری و درمان هم چشم داشت.

نتیجه‌گیری نهایی

عصاره اتانولی بره موم حاصل از چرای زنبور عسل بر فلور بومی گیاهی مراتع استان لرستان، سبب مهار رشد و تکثیر واضح وابسته به دوز سلول‌های HL60 می‌شود. در این بررسی غلظت‌های بالای ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر (IC_{50}=25µgr/ml) غلظت کشنده و غلظت‌های پایین تر از آن دارای خاصیت ضدتکثیری می‌باشد.

منابع

Banskota, A.H., Nagaoka, T., and Sumioka, L.Y. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. J Ethnopharmaco, l80: 67-73.

Birt, D.F., Hendrich, S., and Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther, 90: 157–77.

Bufalo, M.C., Candeias, J.M., and Sforcin, J.M. (2007). In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEP-2) cells, eCAM 22:1–5.

Burdock, G.A. (1999). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol, 36(4): 347-63.

Ebadi, R., and Ahmadi, A.A. (1998) Bee breeding. Isfahan: Rah-e-Nejat-e-Isfahan publications.

DeVecchi, E., and Drago, L. (2007). propolis' antimicrobial activity: whats'new? Infez Med. 15(1): 7-15.

Fernanders, F.F., Dias, A.L., Ramos, C.L., Ikegaki, M., Siqueira, A.M., and Franco, M.C. (2007). The in vitro antifungal activity evaluation of propolis G_{12} ethanol extract on Cryptococcus neoformans. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 49(2): 93-5.

Ghisalberti, E.L. (1979). Propolis: A review. Bee World, 60: 59-84.

He, Y.J., Liu, B.H., Xiang, D.B., Qiao, Z.Y., Fu, T., and He, Y.H. (2006). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway down-regulation. World J Gastroenterol, 12: 4981-4985.

Khalil, M.L. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pac J Cancer Prev, 7: 22-31.

Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., and Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship Bioorg Med Chem, 16: 5434-5440.

Missima, F., and Sforcinm, J.M. (2008). Green brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. eCAM, 5: 71–5.

Orsolic, N., Saranovic, A., and Basic, I. (2006). Direct and indirect mechanisms of antitumour activity of propolis and its phenolic compounds. Planta Med, 72: 20–7.

Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., and Garbarino, J.A. (2004) Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. Life Sci, 76: 545-558.

Scifo, C., Cardile, V., Russo, A., Consoli, R., Vancheri, C., and Capasso, F. (2004). Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells. Oncol Res, 14(9): 415-26.

Sporn, M.B., and Suh, N. (2006). Chemoprevention of cancer. Carcinogenesis, 21: 525-53.

Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., and Bruni, A. (1996) Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. Phytother Res, 10(4): 335-6.

Xiang, D., Wang, D., and He, Y. (2006). Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. Anticancer Drugs, 17: 753-762.

Archive of SID

www.SID.ir

A Study of ethanol extract of propolis derived from bees' grazing in Lrestan province ranges on inhibition of growth and proliferation of HL60 cell line

Kassaee, S.M[*1], Shahidi Hamedani, Kh[2]
1. Department of Biology, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran.
2. Department of Agriculture, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran.

Abstract

Propolis is a compound drived from bees' grazing on plants. It is believed that the propolis has preventive and therapeutic effect in inflammation, cardiac disease and even cancers. More than 300 bio-active compounds have been identified from bee propolis in various regions of the world. This research aimes to study the impact of anticancer activity of ethanol extract of propolis derived from bees' grazing in Lorestan province ranges on HL60 carcinoma cell line. First the ethanol extract of propolis was provided and then this extract was added to culture medium in different dilutions. After 24 hours, proliferation rate of cells was measured using an MTT assay kit. The ethanol extract of propolis caused a marked dose-dependent proliferation and growth inhibition on HL60 carcinoma cell line, IC_{50}=25µg/ml. These findings indicate that the ethanol extract of propolis- drived from bees' grazing on Lorestan province ranges, contains components that may have anticancer activity on HL60 carcinoma cell line. Thus, propolis and related products may provide a novel approach to the chemopreventation and treatment of human HL60 carcinoma.

Keyword: Bees, HL60 cell line, Lorestan province ranges, Propolis

Archive of SID

* *Email:seyedmehrdadkassaee@yahoo.com*

www.SID.ir