پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۴ تیر سال ۱۳۹۳ (۷-۱)

تأثیر ژل رویال بر میزان سیتو توکسیتی سلول های تک هسته ای خون محیطی علیه سلول های اریترولوسمی رده K562

سید احسان حسینی[۱]
نوروز دلیرژ[۲]
ناهید افضل آهنگران[۳]

چکیده

سابقه و هدف: ژل رویال که توسط زنبورهای کارگر ترشح می‌شود، دارای فعالیت‌های زیستی مختلفی در سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌باشد. در این مطالعه تأثیر ژل رویال بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و رویارویی این سلول‌ها با سلول سرطانی K562 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول (106 PBMC سلول) انسانی با غلظت‌های متفاوت از ژل رویال (۲۵ mg/ml، ۱۰ mg/ml، ۵ mg/ml) به طور جداگانه و درشرایط استاندارد برای مدت‌زمان ۷۲ ساعت کشت داده شد. سپس در تست Anexin PI (فلوسایتومتری) تأثیر ژل رویال بر میزان سلول‌کشی سلول‌های PBMC، علیه سلول‌های سرطانی K562 مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت. در این آزمایش از آزمون آنالیزی واریانس نیز به منظور ارزیابی اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: در تست Anexin PI (فلوسایتومتری) و مجاورسازی رقت‌های مشخصی از این ژل، با سلول‌های PBMC و رویارویی این سلول‌ها با سلول‌های سرطانی ما شاهد افزایش میزان آپوپتوز و سلول‌کشی سلول‌های سرطانی، نسبت به گروه کنترل بودیم.

استنتاج: با توجه به افزایش میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی مواجه شده با سلول‌های PBMC که با ژل رویال رو به رو شده‌اند می‌توان نتیجه گرفت که ژل رویال می‌تواند در تقویت سیستم ایمنی بر علیه سلول‌های سرطانی و نابودی بیش‌تر آن‌ها مؤثر واقع شود.

واژه های کلیدی: ژل رویال، K562، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن Chronic Myeloid Leukemia (CML) یکی از شناخته شده‌ترین سرطان‌های خون می‌باشد که در سلول‌های بنیادی چند توان به وجود می‌آید(۲،۱). رده سلولی K562 به عنوان یک نمونه سرطانی جهت مطالعه لوسمی میلوئیدی مزمن مطرح می‌باشد(۳).

مولف مسئول: سید احسان حسینی– ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی E-mail:hosseiniseyedehsan@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
۲. دانشیار،گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
۳. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۲/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۳/۳۱

Archive of SID
www.SID.ir

آپوپتوز[1]، یک فرآیند تنظیم شده مرگ سلولی می‌باشد که باعث حذف سلول‌های ناخواسته شده که بدون ایجادآسیب در ارگانیسم‌های چند سلولی می‌گردد و سبب کنترل رشد و ثابت نگاه داشتن شرایط محیط داخل بدن می‌شود(۴). روش‌های بیولوژیک[2]، غیرتهاجمی و موثر می‌باشند(۵). استفاده از ایمنی درمانی در درمان سرطان یکی از روش‌های مورد مطالعه و موثر محسوب می‌شود که در این روش تمرکز بر روی تقویت سیستم ایمنی می‌باشد. تقویت سیستم ایمنی موجب کاهش رشد و جلوگیری از گسترش سلول‌های سرطانی می‌گردد. در این میان ژل رویال یکی از موادی است که به نظر می رسد می‌تواند در تقویت سیستم ایمنی موثر باشد(۷-۶). طی مطالعه‌ای که دز سال ۲۰۰۵ توسط Bincoletto و همکاران صورت گرفت نشان‌دهنده تاثیر ژل رویال بر تعدیل سیستم ایمنی بدن و پاسخ ضد توموری این ژل در بیماری بدخیم ازجمله فیبرو سارکوما همراه با رژیم درمانی می‌باشد(۸). ژل رویال حاوی ویتامین‌های گروه B محلول در آب مانند تیامین، ریبوفلاوین، پیرودوکسین، نیاسین[3]، بیوتین[4]، اسیدفولیک[5]، اینوزیتول[6] و مواد معدنی می‌باشد. هم چنین دارای(۹) اسید آمینه ضروری، قند، استرول[7]، ترکیبات فسفردار، اسیدکولین[8] ودیگر ترکیبات مورد نیاز برای سلامتی می‌باشد(۱۱- ۱۰). از دیگر ترکیبات موثر ژل رویال که در بحث تقویت سیستم ایمنی و تعدیل سیستم ایمنی مطرح می‌باشد ترکیبی به نام ۱۰ هیدروکسی دیستنوئیک اسید(۶) می‌باشد که در این ژل وجود دارد(۷). رفرانس ها باید به ترتیب باشد.

در این مطالعه با توجه به اثرات ضد توموری در راستای تعدیل سیستم ایمنی ژل رویال، میزان سلول کشی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نرمال رویارویی شده با ژل رویال بر علیه سلول‌های سرطانی K562 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده که در سال ۱۳۹۱ و در شرایط استاندارد کشت سلول، در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه صورت گرفت. برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، ابتدا خون هپارینه با محیط کشت RPMI-1640 رقیق شده را به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده است اضافه کرده سپس با سرعت ۸۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. سلول‌های PBMC که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده را به آرامی جمع‌آوری کرده و PBMC به دست آمده را با پیپت پاستور استریل برداشته شده و بعد از سه بار شست وشو در RPMI 1640، برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. تعداد و میزان سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به دست آمده با استفاده از رنگ تری پان بلو[9] (TB) تعیین گردید(۹)؛ سپس رده سلولی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه، و در شرایط In Vitro در محیط کشت RPMI1640 و FBS[10] ۱۰ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد کشت داده شد.

ژل رویال از زنبورداران آذربایجان غربی شهرستان ارومیه به صورت تازه خریداری، و در شرایط استاندارد نگهداری شد؛ سپس برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه غلظت های متفاوت، ژل رویال را با بافر[11] PBS به نسبت ۲۰ mg/ml رقیق کرده و بعد از سانتریفیوژ با دور g ۱۰۰۰۰، قسمت مومی شکل آن را جدا کرده و با فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرون استریل گردید. سپس رقت‌های مورد نیاز از آن به وسیله محلول بافر PBS تهیه و به میزان مورد نیاز (۲۵mg/ml، ۱۰mg/ml، ۵ mg/ml) جهت انجام هر آزمایش در لوله‌های استریل در ۲۰-۰ درجه نگهداری شد(۱۲).

سلول‌ها به تعداد ۱۰۶ از PBMCs در شرایط رشد

1. Apoptosis
2. Biologic
3. Niacin
4. Biotin
5. Folic acid
6. Inositol
7. Estrol
8. Colin acid

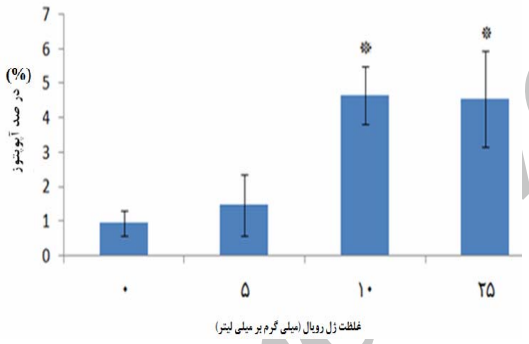
9. Trypan blue
10. Fetal Bovine Serum
11. Phosphate-Boffered Saline

Archive of SID
www.SID.ir

بهینه و به طور جداگانه در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۵ درصد FBS کشت داده شدند. یک گروه به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و گروه‌های سلولی PBMCs در مجاورت غلظت‌های مختلف از ژل رویال (۵mg/ml، ۱۰mg/ml، ۲۵mg/ml) به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. سپس سلول های PBMCs مواجه شده با ژل رویال، به مدت ۵ ساعت با سلول سرطانی K562 و به تعداد ۱۰۴ سلول به طور هم زمان کشت داده شدند (نسبت تقریبی PBMC۱:۱۰۰ : K562 =). سوسپانسیون سلول را جدا کرده و با بافر PBS و به وسیله سانتریفیوژ با سرعت ۶۵۰ × g به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو صورت گرفت. سپس سلول‌های شست و شو داده شده در ۱ میلی‌لیتر بایندینگ بافر حل گردید. ۱۰۰ میکرو لیتر از آن را برداشته و ۸ میکرولیتر Anexin PI به محلول اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریک خانه قرار داده شد. در مرحله آخر، ۴۰۰ میکرولیتر از محلول باندینگ بافر به آن اضافه و با دستگاه فلوسایتومتری سنجش گردید. میزان مرگ سلولی و تعداد سلول‌های سالم، توسط دستگاه فلوسایتومتری DACO USA و نرم‌افزار Flow Max مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش به منظور ارزیابی اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون آنالیزی واریانس استفاده شد.

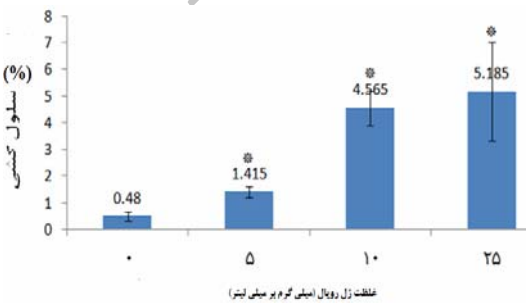
یافته ها

در سنجش میزان آپوپتوز و نکروز سلول‌های k562 مواجه شده با سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که قبلا با غلظت‌های مختلف ژل رویال انکوبه شده بودند، نتایج به دست آمده نشان داد که ژل رویال در غلظت‌های mg/ml5 و mg/ml10، سبب افزایش میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی در مواجه با سلول‌های PBMC می‌شوند (نمودار شماره ۱). هم‌چنین ما شاهد افزایش میزان قدرت سلول کشی (شامل نکروز و آپوپتوز) سلول‌های PBMC مواجه شده با این ژل بوده‌ایم (نمودارشماره۲). سلول‌های PBMC که با غلظت 25 mg/ml از ژل رویال مواجه شده‌اند اثرات سلول کشی بیش‌تری نسبت به دیگر غلظت‌ها بر علیه سلول‌های سرطانی از خود نشان داد. همان‌طور که (تصویر شماره ۱) نشان داده شده سلول‌های سرطانی و PBMC در جداسازی توسط دستگاه فلوسیتومتری در دو منطقه گیت شده جداگانه از هم تفکیک شدند که بر اساس قرارگیری سلول‌ها در دو منطقه گیت شده متفاوت ما به راحتی می‌توانیم سلول‌های PBMC مواجه شده با سلول‌های سرطانی را از همدیگر تفکیک کنیم(تصویر شماره ۲). در نمونه شاهد مثبت نیز (تصویر شماره ۳)که هیچ‌گونه مواجه‌ای صورت نگرفته ما شاهد زنده بودن بیش از ۹۹درصد سلول‌های سرطانی می‌باشیم، که Q1:شامل سلول‌های آپوپتوز اولیه،Q2 :آپوپتوز ثانویه، Q3: سلول‌های زنده و Q4: شامل سلول‌های نکروز شده می‌باشد.



نمودار شماره ۱: اثر ژل رویال بر میزان آپوپتوز سلول‌های K562 مواجه شده با PBMC در سنجش با تست Anexin PI .

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ نسبت به گروه شاهد می‌باشد

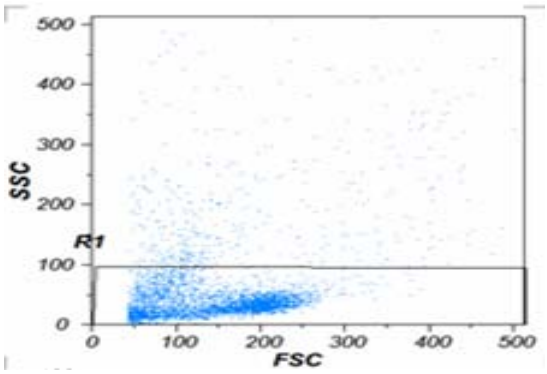


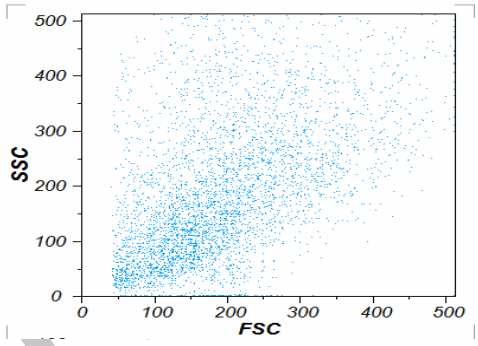
نمودار شماره ۲: اثر ژل رویال بر میزان سلول کشی PBMC بر علیه سلول‌های K562 در سنجش با تست Anexin PI.

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ نسبت به گروه شاهد می‌باشد

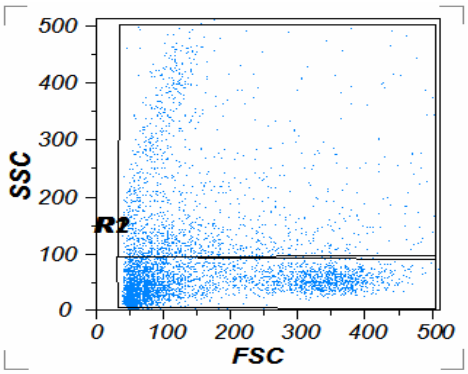
Archive of SID

www.SID.ir

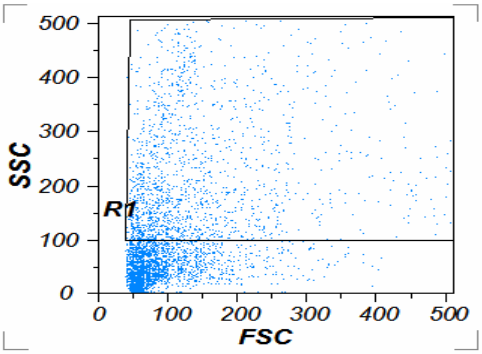


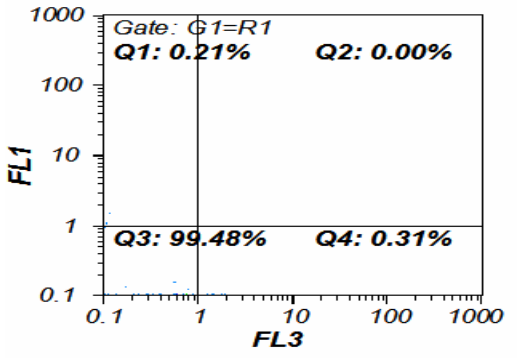


تصویر شماره ۱: نمایی از محل قرارگیری سلول های PBMC (نمودار بالایی) و محل قرارگیری سلول های K562 (نمودار پایینی) در سنجش فلوسایتومتری



تصویر شماره ۲: نمونه ای از نمودار فلوسایتومتری سلول های سرطان K562 که به طور هم زمان با سلول های PBMC مواجه شده است





تصویر شماره ۳: نمونه شاهد آپوپتوز سلول های K562 تیمار نشده همراه با درصد سلول های زنده (رنگ آمیزی شده با Anexin PI)

بحث

ژل رویال دارای خواص آنتی‌اکسیدانی(۱۳)، حفاظتی علیه آسیب‌های DNA (11) و فعالیت‌های ضد توموری می‌باشد(۱۴). هم چنین در مطالعات گذشته نشان داده شده است که ژل رویال از طریق افزایش تعداد لوکوسیت‌ها سبب تقویت سیستم ایمنی می‌شود(۱۵). مطالعات آزمایشگاهی و مطالعه روی حیوانات آزمایشگاهی نیز نشان از اثرات ضد توموری و ضد التهابی این ماده دارد(۱۷).

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نقش مهمی در دفاع علیه عوامل بیگانه و تومورها به همراه دارد که می‌تواند در تقویت سیستم ایمنی بسیار حائز اهمیت باشد. تقویت سیستم ایمنی موجب کاهش رشد و جلوگیری از گسترش سلول‌های سرطانی می‌گردد(۷). در این مواجه سلولی، به علت عدم تحریک لنفوسیت‌های B و T در مواجه تکراری با سلول سرطانی، سلول خاطره‌ای B و T ایجاد نشده و ما تنها شاهد تأثیر سلول‌های NK که سلول‌های کشنده طبیعی ایمنی ذاتی هستند می‌باشیم(۱۸). سلول‌های NK که تا ۲۰ درصد از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون را شامل می‌شوند، سلول‌های سرطانی را شناسایی کرده و با کشتن مستقیم این سلول‌ها و یا با ترشح سایتوکاین‌های التهابی، در جهت تحریک دیگر سلول‌های سیستم ایمنی برعلیه سلول‌های سرطانی پاسخ می‌دهند(۱۹).

Archive of SID
www.SID.ir

در این مطالعه که با هدف بررسی اثرات غلظت‌های مختلف ژل رویال بر سلول‌های PBMC انجام شد، غلظت‌های مختلف ژل رویال را با سلول‌های PBMC مواجه کردیم؛ سپس قدرت سلول کشی سلول‌های PBMC تیمار شده را بر سلول سرطانی K562 مورد سنجش قرار دادیم. نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش دوز، میزان سلول کشی این سلول‌ها بر علیه سلول‌های سرطانی اعم از آپوپتوز و نکروز، نسبت به نمونه شاهد افزایش می‌یابد (نمودارهای شماره ۱ و۲). مطالعات زیادی در مورد تاثیر ژل رویال بر فعالیت سلول‌های PBMC انجام نگرفته است، با این وجود Erem و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ژل رویال باعث افزایش ترشح اینترفرون گاما از لنفوسیت‌ها می‌گردد(۱۲). اکثر سلول‌های PBMC را لنفوسیت‌های T و NK تشکیل می‌دهند که مولد اینترفرون گاما نیز هستند. افزایش ترشح اینترفون گاما از جمله عواملی است که موجب بهبود دهنده عملکرد سیستم ایمنی وتقویت عملکرد سلول‌های NK در برابر سرطان‌ها می‌شود. در مطالعات دیگری که توسط Gasic و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Oka و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، اثرات تقویت کننده ژل رویال در شرایط In vitro همراه با افزایش فعالیت لنفوسیت‌ها در بهبود عملکرد سیستم ایمنی، مورد تأیید قرار گرفت(۱۴، ۲۰).

نتایج این مطالعه و تاحدودی مطالعات دیگر نشان دهنده آن است که تیمار PBMC با ژل رویال می‌تواند سبب افزایش میزان سلول کشی آن‌ها بر علیه سلول‌های K562 شود که سلول هدف، سلول NK می‌باشد که می‌تواند در نابودی سلول‌های سرطانی بیش‌ترین نقش را ایفا کند. از آن‌جا که تقویت سیستم ایمنی موجب کاهش رشد و جلوگیری از گسترش سلول‌های سرطانی می‌شود، ژل رویال می‌تواند به عنوان یک ترکیب مکمل در درمان لوسمی، و هم چنین جهت جبران عوارض جانبی ناشی از شیمی درمانی همراه با بحث تقویت سیستم ایمنی بدن مطرح گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه بوده و با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شد. بدین وسیله نیز از مساعدت و همکاری آقایان دکتر سید میثم ابطحی، کارشناس آزمایشگاه آقای اصغر علیاری و کارشناس ارشد ایمنی شناسی سرکار خانم هامون نورد تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96(10): 3343-3356.
2. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksma OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. Blood 1996; 88(9): 3522-3527.
3. Lozzio BB, Lozzio CB. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. Int J Cancer 1977; 19(1): 136.
4. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. J Biochem Mol Biol 2005; 38(4): 391-398.
5. Mattil-Fritz S, Scharner D, Piuko K, Thönes N, Gissmann L, Müller H, et al. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric

Archive of SID
www.SID.ir

papillomavirus-like particles. J Gen Virol 2008; 89(Pt 1): 138-147.

6. Sver L, Orsolić N, Tadić Z, Njari B, Valpotić I, Basić I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1996; 19(1): 31-38.
7. Vucevic D, Melliou E, Vasilijic S, Gasic S, Ivanovski P, Chinou I, et al. Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. Int Immunopharmacol 2007; 7(9): 1211-1220.
8. Kobayashi N, Unten S, Kakuta H, Komatsu N, Fujimaki M, Satoh K, et al. Diverse biological activities of healthy foods. In Vivo 2001; 15(1): 17-23.
9. Abtahi Froushani SM, Delirezh N, Hobbenaghi R, Mosayebi Gh. Therapeutic effects of all-trans retinoic acid on experimental autoimmune encephalomyelitis and its role in T-helper lymphocyte responses. Tehran Univ Med J 2012; 69(11): 710-717.
10. Kobayashi N, Unten S, Kakuta H, Komatsu N, Fujimaki M, Satoh K, et al. Diverse biological activities of healthy foods. In Vivo 2001; 15(1): 17-23.
11. Ishii R, Horie M, Murayama M, Maitani T. Analysis of tetracyclines in honey and royal jelly by LC/MS/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 2006; 47(6): 277-283.
12. Erem C, Deger O, Ovali E, Barlak Y. The effects of royal jelly on autoimmunity in Graves' disease. Endocrine 2006; 30(2): 175-183.
13. Inoue S, Koya-Miyata S, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. Exp Gerontol 2003; 38(9): 965-969.
14. Oka H, Emori Y, Kobayashi N, Hayashi Y, Nomoto K. Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. Int Immunopharmacol 2001; 1(3): 521-532.
15. Kaftanoglu, O; Tanyeli, A. The use of royal jelly during threatment of childhood malignancies, Bee Products. Properties, Aplication, and Apitherapy 1997; PP179-183.
16. Al-Mufarrej SI, El-Sarag MSA. Effects of royal jelly on the humoral antibody response and blood chemistry of chickens. J Appl Anim Res 1997; 12(1): 41-47.
17. Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, et al. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. Biosci Biotechnol Biochem 2004; 68(1): 138-145.
18. Janeway CA Jr. Approaching the asymptote Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1989; 54(Pt 1): 1-13.
19. Paul WE. Fundamental Immunology. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 483-539.
20. Gasic S, Vucevic D, Vasilijic S, Antunovic M, Chinou I, Colic M. Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro. Immunopharmacol Immunotoxicol 2007; 29(3-4): 521-536.

Archive of SID
www.SID.ir

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Royal Jelly on Peripheral Blood Mononuclear Cells Cytotoxicity against the K562 Erythroleukemia Cell Line

Seyed Ehsan Hosseini[1]
, Norouz Delerezh[2]
, Nahid Afzal Ahangaran[3]

[1] MSc in Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received March 1, 2014 ; Accepted June 21, 2014)

Abstract

Background and purpose: Royal jelly (RJ) is a substance synthesized by worker bee- is shown to have various biological activities on different cells and tissues of the human body. In this study the effect of RJ on peripheral blood mononuclear cells cytotoxicity against the K562 Erythroleukemia cell line was investigated.

Material and methods: In this experimental study human PBMCs (106 cells/ml) were separately cultured in standard conditions. The cells were then incubated with different concentrations of RJ (5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml) for 72 hours. Subsequently, cytotoxic effect of PBMCs pulsed with RJ on K562 was evaluated by Anexin PI test (Flow cytometry).

Results: In the Anexin PI test, apoptotic property and cytotoxic effect of PBMCs pulsed with RJ on K562 increased significantly compared to those of the control group.

Conclusion: PBMCs pulsed with RJ increased survival rate of PBMCs after treatment with RJ. This compound could be beneficial in preventing and controlling carcinoma cells.

Keywords: Royal jelly, K562, peripheral blood mononuclear cell

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(114): 1-7 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir