Archive of SID

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره دهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۰، ۱۲۶-۱۱۲

اثر زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر و تمایز رده سلولی HL-60

کاظم پریور[۱]، محمد نبیونی[۲]، هانیه جلالی[۳]، فاطمه نادعلی[۴]

دریافت مقاله: ۸۸/۲/۱۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۸/۱۲/۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۹/۱۰/۱۱ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: تمایز درمانی از جمله روش‌های درمانی سرطان محسوب می‌شود؛ در این روش از مواد مهارکننده تکثیر و القاءکننده تمایز، نظیر رتینوئیک اسید تمام ترانس استفاده می‌گردد. تجربیات نشان داده‌اند برخی مواد با ویژگی‌های ضد تکثیری، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی در افزایش اثر این ماده و کاهش اثرات مضر جانبی آن مؤثر می‌باشند. با توجه به اثرات ضدتکثیری و ضدالتهابی زهر زنبور عسل، در این مطالعه اثر آن بر عملکرد رتینوئیک اسید تمام ترانس بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، از رده سلولی HL-60 (Human Lukemia) متعلق به سرطان حاد پرومیلوسیتی استفاده شد. ردهٔ سلولی HL-60 از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) و ۱٪ استرپتومایسین- پنی‌سیلین کشت شد. از روش‌های MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium- bromide) و NBT (Nitro-Blue tetrazolium chloride) در این پژوهش استفاد شد. تمامی تجربیات سه بار تکرار شده و جهت تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها: زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس هر دو قادر به مهار تکثیر سلول‌های HL-60 شدند، همچنین رتینوئیک اسید تمام ترانس موجب القاء تمایز در این سلول‌ها گردید که میزان این تمایز با افزودن زهر زنبور به میزان معنی‌داری در سطح $p<0/01$ افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد زهر زنبور بتواند اثرات درمانی رتینوئیک اسید تمام ترانس را شدت بخشد.

واژه‌های کلیدی: زهر زنبور عسل، رده سلولی HL-60، تکثیر و تمایز سلولی، رتینوئیک اسید تمام ترانس

۱- استاد گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران
تلفن: ۰۲۶۱-۴۵۱۰۰۰۵، دورنگار: ۰۲۶۱-۴۵۱۰۰۰۵، پست الکترونیکی: Nabiuni@tmu.ac.ir
۳- دانشجو دکتری گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران
۴- استادیار گروه آموزشی هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

روش‌های درمانی مختلفی برای ریشه‌کن نمودن سرطان وجود دارد که شیمی درمانی اصلی‌ترین روش محسوب می‌شود، اما به دلیل عوارض جانبی شدید داروهای شیمی درمانی بر روی بافت‌های سالم، امروزه از روش دیگری تحت عنوان تمایز درمانی نیز استفاده می شود[۱]. اولین بار در سال ۱۹۷۰، Paran و همکارانش توقف تکثیر و تمایز در سلول‌های سرطان خون را کشف کردند و به دنبال این کشف، در سال ۱۹۷۸ نظریه القاء تمایز در سلول‌های سرطانی و استفاده از این روش جهت درمان سرطان توسط Sachs مطرح شد [۳-۲]. در این روش با استفاده همزمان از مواد کشندهٔ سلول و القاءکنندهٔ تمایز، تکثیر بی‌رویه سلول‌ها مهار شده و تمایز در آنها القاء می‌شود [۴]. سرطان حاد پرومیلوسیت‌ها که نوعی از سرطان میلوئیدی می‌باشد، با تکثیر بی‌رویه پرومیلوسیت‌ها و عدم تمایز نهایی این سلول‌ها تعریف می‌شود. در افراد مبتلا به این سرطان یک جابجایی کروموزومی به صورت t (15:17) (q22;q12-21) صورت می‌گیرد که منجر به اتصال ژن (Retinoic Acid Receptor α - RARα)، روی کروموزوم ۱۷، به ژن (Promyelocyte Leukemia) PML، روی کروموزوم ۱۵ و باعث ایجاد یک پروتئین مرکب تحت عنوان PML-RARα می‌شود [۵]. رتینوئیک اسید تمام ترانس یا (All-trans Retinoic Acid (ATRA، از جمله مواد قوی در درمان این نوع سرطان و تمایز درمانی محسوب می‌گردد؛ این ماده موجب مهار تکثیر و القاء تمایز در سلول‌های پرومیلوسیتی به سمت گرانولوسیت‌های بالغ می‌گردد [۷-۶]. این ماده ابتدا در سال ۱۹۸۶، در درمان بیماران مبتلا به سرطان حاد پرومیلوسیتی در سطح کلینیکی مورد استفاده قرار گرفت و در سال ۱۹۸۸بهبودی کامل ۲۳ بیمار از ۲۴ بیمار تحت درمان گزارش شد [۸]. غلظت فیزیولوژیک این ماده در بدن 10^{-9}-10^{-8} مولار می‌باشد اما در افراد مبتلا به سرطان از غلظت‌های بالاتر نزدیک به 10^{-6} مولار استفاده می‌شود [۹]. در استفاده از این ماده برخی مشکلات از قبیل کاهش سریع غلظت پلاسمایی دارو، ایجاد مقاومت دارویی، سندرم رتینوئیک اسید و غیره وجود دارد [۱۱-۱۰]. جهت کاهش این‌گونه مشکلات، از مواد کمکی استفاده می‌شود که بتوانند موجب افزایش قدرت درمانی رتینوئیک اسید تمام ترانس گردند، به عنوان مثال مطالعات انجام گرفته نشان داده‌اند روغن زیتون، سیر، پیاز، ویتامین D_3 و غیره، به شدت در افزایش قدرت درمانی رتینوئیک اسید تمام ترانس مؤثر بوده‌اند [۱۷-۱۲].

ردهٔ سلولی HL-60 یک ردهٔ سلولی مربوط به سرطان حاد پرومیلوسیتی است [۱۸] که در حضور موادی نظیر بوتیرات، هیپوزانتین، فوربول مریستات استات، ویتامین D_3 و رتینوئیک‌اسید، از وضعیت تکثیر بی‌رویه خارج شده و به سمت مونوسیت، ماکروفاژ و یا گرانولوسیت تمایز می‌یابد، تمایز به سمت دو مسیر میلوئیدی متفاوت و تغییرات مورفولوژیکی و ژنی فاحش مرتبط با تمایز در این ردهٔ سلولی، مزیتی جهت استفاده از این ردهٔ سلولی محسوب می‌شود [۲۰-۱۹]. اولین بار در سال ۱۹۸۰، Breitman و همکارانش موفق به تمایز این سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس گشتند [۲۱].

زهر زنبور عسل دارای اثرات بیولوژیکی وسیعی از جمله مهار واکنش‌های التهابی، مهار تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی و القاء مرگ سلولی در آنها می‌باشد و نخستین بار Havas در سال ۱۹۵۰ اثر زهر زنبور بر روی یک تومور القاء شده را گزارش کرد [۲۲]، این ماده دارای انواع پپتیدها، آنزیم‌ها، آمین‌های بیولوژیکی و مواد معدنی مختلف می‌باشد، اصلی‌ترین جزء این ترکیب ملیتین است

www.SID.ir

Archive of SID

که ۶۰٪-۵۰٪ زهر را تشکیل می‌دهد [۲۳]. زنبور درمانی در طب قدیم در درمان بیماری‌های مختلفی از جمله دردهای مفصلی، بیماری‌های عفونی، بیماری‌های پوستی و غیره رواج داشته است؛ امروزه زهر زنبور در درمان بیماری‌هایی از قبیل آرتریت روماتوئید، مالتیپل اسکلروزیس، دردهای التهابی و احشایی و همچنین سرطان و تومورهای سرطانی مورد توجه قرار گرفته است [۲۶-۲۴]. همان گونه که اشاره شد، مواد که توانند موجب مهار تکثیر و یا القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطان حاد پرومیلوسیتی گردند، موجب افزایش تمایز این سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌شوند؛ همچنین مطالعات مختلف نشان داده‌اند موادی با ویژگی‌های ضدالتهابی نیز موجب افزایش مهار تکثیر و تمایز این سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌شوند؛ به عنوان مثال ایندومتاسین (یک داروی ضدالتهاب) موجب افزایش اثر تمایزدهندگی رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌گردد [۲۷]. با توجه به لزوم استفاده از داروهای با عوارض جانبی کمتر و یا استفاده از روش‌های درمانی جدیدتر و مؤثرتر در درمان انواع سرطان‌ها، و همچنین با توجه به ویژگی‌های شناخته شده زهر زنبور عسل، بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های سرطان حاد پرومیلوسیتی و مقایسهٔ آن با اثرات رتینوئیک اسید تمام ترانس، ضروری به نظر رسیده و هدف این پژوهش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی که از شهریور ۱۳۸۶ تا شهریور ۱۳۸۷ انجام شد از رده سلولی HL-60 مربوط به سرطان حاد پرومیلوسیتی استفاده گردید و جهت القاء تمایز از رتینوئیک اسید تمام ترانس در طی ۷۲ ساعت استفاده شد [۲۸] و چنین فرض شد که زهر زنبور بتواند موجب مرگ بیشتر سلول‌های HL-60 و حتی افزایش میزان تمایز سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس گردد.

رده سلولی HL-60 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco,USA) حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ استرپتومایسین-پنی‌سیلین در فشار ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به تعداد ۵×۱۰^{۴} سلول بر میلی‌لیتر در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه (NUNC, Netherland) کشت داده شد. شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتومتری صورت گرفت، بدین‌صورت که سلول‌های ۴ خانه بزرگ شمارش شده و میانگین اعداد به دست آمده در $۱۰^{۴}$ ضرب شد و تعداد سلول در هر میلی‌لیتر به دست آمد. به دلیل حجم موجود در پلیت‌های ۲۴ خانه و زمان مورد نظر برای تکثیر سلول‌ها و جلوگیری از تجمع بیش از حد سلول‌ها، ۵×۱۰^{۴} سلول در هر میلی‌لیتر، مناسب در نظر گرفته شد. محلول غلیظ رتینوئیک اسید تمام ترانس (داروپخش، ایران) با غلظت اولیه ۱ میلی‌مولار در اتانول مطلق تهیه و بدور از نور در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد؛ جهت رقیق نمودن و اضافه نمودن رتینوئیک اسید تمام ترانس به محیط کشت از معادله $N_1V_1=N_2V_2$ استفاده شد، به عنوان مثال برای ایجاد غلظت $۱۰^{-۴}$ مولار، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱ میلی مولار با ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل مخلوط شد. جهت رقیق نمودن تمامی محلول‌های غلیظ از محیط کشت کامل استفاده شد تا اثر اتانول قابل چشم‌پوشی باشد.

پودر زهر زنبور در واحد علوم تحقیقات تهران و با استفاده از روش شوک الکتریکی تهیه شد. محلول غلیظ زهر زنبور با غلظت اولیه ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سرم فیزیولوژیکی تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت رقیق نمودن و ایجاد غلظت مناسب

www.SID.ir

Archive of SID

همانند رتینوئیک‌اسید عمل شد؛ برای مثال جهت ایجاد غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴ میکرولیتر از محلول ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۹۶۶ میکرولیتر محیط کشت کامل مخلوط شد.

جهت تعیین درصد زیست‌پذیری (Viability) سلول‌ها از روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو (Merk, Germany) و MTT استفاده شد (Sigma, USA). برای رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، ۲۰ میکرولیتر سلول با ۲۰ میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو مخلوط گردید و سپس با استفاده از شمارش سلولی، درصد سلول‌های زنده محاسبه شد؛ بدین‌صورت که سلول‌های مرده به دلیل از دست دادن تراوایی غشایی به رنگ آبی تیره در آمده بودند.

پودر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سرم فیزیولوژیکی حل شد و بدور از نور در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. اساس روش MTT بر پایه عملکرد آنزیمی در سلول‌های زنده می‌باشد؛ بدین‌صورت که سلول‌های زنده دارای آنزیم‌های فعال بوده و قادر به احیاء ماده MTT می‌باشند و در اثر این احیاء، رنگدانه‌های تیره رنگ در داخل سلول‌های زنده تشکیل می‌گردد، اما در داخل سلول‌های مرده اثری از این رنگدانه‌ها دیده نمی‌شود [۲۹].

جهت روش MTT، ابتدا ۵×۱۰^{۴} سلول بر میلی‌لیتر در هر خانه از پلیت کشت ۲۴ خانه ریخته شد و غلظت مواد مورد نظر تنظیم گردید؛ پس از اتمام بازه‌های زمانی مورد نظر (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر خانه اضافه شد و ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدور از نور انجام گرفت و پس از اتمام انکوباسیون ۱۰۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی (Merk, Germany) اضافه شد تا رنگدانه‌های داخل سلول‌های زنده بیرون ریخته شوند. میزان حداکثر جذب نوری (Optimal Density = OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گرفته شد و طبق معادله زیر، درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید [۳۰]:

$$\text{OD تست} / \text{OD کنترل} \times ۱۰۰$$

جهت بررسی تمایز سلولی از روش‌های مورفولوژیکی و آنزیمی استفاده شد. به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی، سلول‌ها به روش رایت-گیمسا رنگ‌آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با تمایز عبارت بودند از: متراکم و قطعه قطعه شدن هسته سلولی، تغییر رنگ سیتوپلاسم از حالت بازوفیلی به اسیدوفیلی و در نتیجه صورتی رنگ شدن سیتوپلاسم، کوچکتر شدن اندازه سلولی و ناپدید شدن هستک‌ها. جهت تأئید تمایز و اثبات فعال بودن سلول‌های تمایز یافته، از روش احیاء آنزیمی NBT استفاده شد که اساس آن بر فعالیت پراکسیدازی سلول‌های گرانولوسیتی و مونوسیتی استوار می‌باشد، بدین‌صورت که سلول‌های تمایز یافته از لحاظ آنزیمی فعال بوده و قادر به احیاء ماده NBT می‌باشند و در نتیجه در این روش، در داخل سیتوپلاسم سلول‌های زنده رنگدانه‌های تیره رنگ تشکیل می‌شود [۱۵]. جهت روش NBT، پس از اضافه نمودن زهر، رتینوئیک اسید تمام ترانس و یا هر دو، و پس از طی دوره‌های زمانی مورد نظر، ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول با ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱٪ NBT (Sigma,USA) حاوی ۲۰۰ نانوگرم PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma,USA) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون جهت اعلام میزان تمایز به صورت درصد، سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری شمارش شدند و درصد سلول‌های تمایز یافته طبق معادله زیر تعیین شد:

www.SID.ir

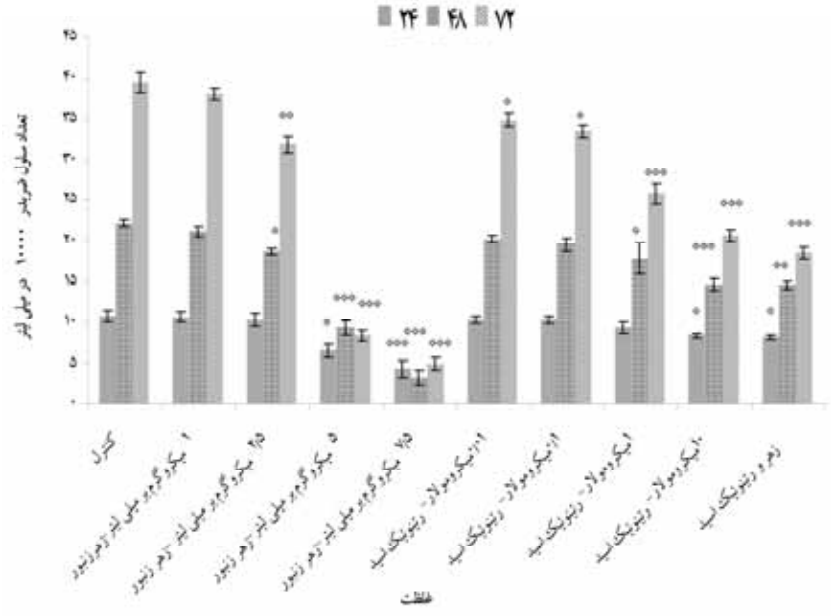
Archive of SID

۱۰۰×کل سلول‌های شمارش‌شده/ سلول‌های دارای رنگدانه

تمامی تجربیات انجام شده، حداقل سه بار تکرار شدند. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS.۱۳ و از آزمون آماری ANOVA استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر زهر زنبور بر تکثیر سلول‌های HL-60: نتایج حاصل از شمارش تریپان بلو و MTT نشان داد زهر زنبور در غلظت‌های بالای ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اثر کشندگی بسیار شدیدی بود؛ در غلظت‌های ۷/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز القاء مرگ سلولی به صورت وابسته به زمان و غلظت مشاهده شد و بیشترین میزان مرگ در این غلظت‌ها، پس از طی ۷۲ ساعت بود. هر چند غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش معنی‌دار سلول‌های زنده نسبت به نمونه کنترل گشت، اما در این غلظت و پس از طی ۷۲ ساعت، بقایای سلول‌های مرده در محیط تفاوتی با نمونه‌های کنترل نداشت و به نظر می‌رسد این کاهش بیشتر مرتبط با مهار تکثیر بوده باشد و نه مرگ سلولی. غلظت‌های زیر ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به نمونه کنترل هیچ تفاوت معنی‌داری، حداقل در طی ۷۲ ساعت، نشان ندادند (نمودارهای ۱ و ۲).

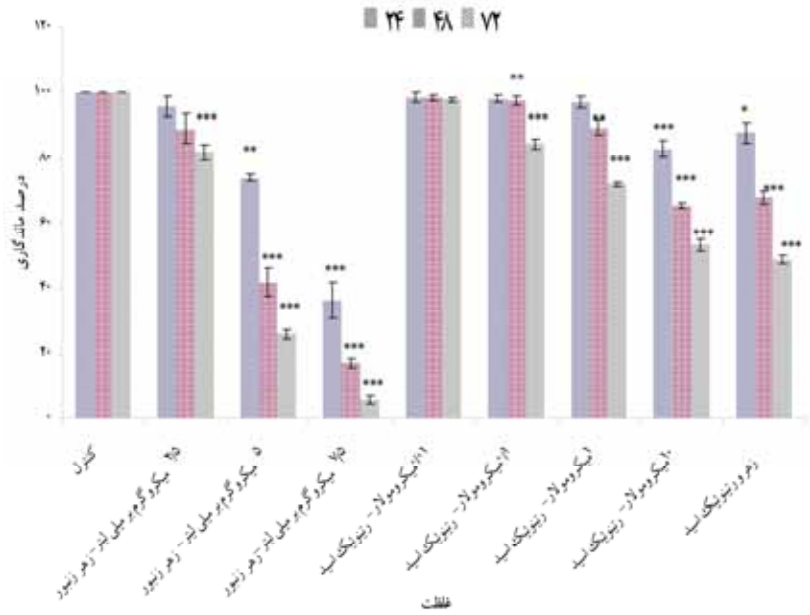


نمودار ۱- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور، رتینوئیک اسید تمام ترانس و هر دو بر تکثیر سلول‌های HL-60 طی ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت نسبت به کنترل بر اساس شمارش با تریپان بلو. آزمون آماری ANOVA.

: $p< ۰/۰۵$ **: $p<۰/۰۱$، ***: $p< ۰/۰۰۱$

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور، رتینوئیک اسید تمام ترانس و هر دو بر درصد سلول‌های زنده HL-60 طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به کنترل بر اساس روش MTT. آزمون آماری ANOVA.
****: $p<0/05$ **: $p<0/01$، ***: $p<0/001$***

اثر رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر سلول‌های HL-60: جهت بررسی اثر رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر سلول‌ها و بدست آوردن غلظت‌های سمی و غیرسمی، غلظت‌های ۱۰، ۱، ۰/۱و ۰/۰۱ میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس بر سلول‌ها اثر داده شد، نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و MTT نشان داد رتینوئیک اسید تمام ترانس در الگویی وابسته به زمان و غلظت، موجب القاء مرگ سلولی و یا مهار تکثیر سلول‌های HL-60 می‌گردد؛ بدین صورت که بیشترین اثر کشندگی مربوط به غلظت ۱۰ میکرومولار و پس از طی ۷۲ ساعت بود. در غلظت‌های پایین‌تر نیز کاهش تعداد سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار بود. اما علی‌رغم کاهش تعداد سلول‌های زنده، علائم مرگ سلولی نسبت به غلظت ۱۰ میکرومولار بسیار کمتر بود و چنین به نظر می‌رسد که کاهش تعداد سلول‌های زنده ناشی از مهار تکثیر سلولی بوده باشد (نمودارهای ۱ و ۲).

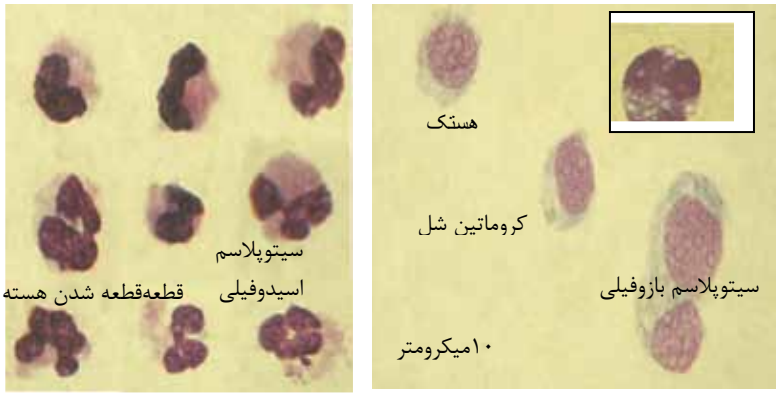
اثر هم‌افزایی زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر و بقاء سلول‌های HL-60: جهت بررسی اثر هم‌افزایی زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر میزان تکثیر و بقاء سلول‌های HL-60، غلظت‌های ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از زهر زنبور و ۱ میکرومولار از رتینوئیک اسید تمام ترانس انتخاب شدند، زیرا این غلظت‌ها موجب مهار تکثیر سلول‌ها شده و درعین حال اثرات سمی کمتری نسبت به غلظت‌های بالاتر داشتند. بررسی اثر همزمان این دو ماده نشان داد، میزان مهار تکثیر سلولی در زمان هم‌افزایی به میزان معنی‌داری نسبت به زمان استفاده از هر یک به تنهایی، افزایش یافت؛ به طوری که پس از طی ۷۲ ساعت، میزان مهار تکثیر سلولی در حضور غلظت ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید

www.SID.ir

Archive of SID

تمـام تـرانس در حـدود ۲۸٪ و در حـضور غلظـت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور در حـدود ۱۸/۰۴٪ بـود، ولی در حضور همزمان هـر دو مـاده، افزایـشی فـاحش در مهـار تکثیـر سـلول‌هـا رخ داد و میـزان مهـار بـه حـدود ۵۱/۲۱٪ افزایش یافت؛ کاهش تعداد سـلول‌هـا نـسبت بـه نمونه کنترل نیز معنی‌دار بود (نمودارهای ۱ و ۲).

اثر زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تمـایز سـلول‌هـای HL-60: بررسـی اثـر زهـر زنبـور بـر تمـایز سلول‌های HL-60 نشان داد که زهر زنبور در هـیچ‌یـک از غلظت‌های استفاده شده باعث تمایز نشد. رتینوئیک اسـید تمام ترانس در غلظت ۱ میکرومـولار در طـی ۷۲ سـاعت، میزان معنی‌داری از تمایز در این سلول‌ها را القاء کـرد. بـر اساس این یافته‌ها، غلظت ۱ میکرومولار رتینوئیـک اسـید تمام ترانس، به عنوان غلظت مناسـب جهـت ایجـاد تمـایز طی ۷۲ ساعت انتخاب شد، زیرا هم دارای اثر مهار تکثیـر بود و هم نسبت به غلظت‌های پایین‌تر در طـی۷۲ سـاعت میـزان بیـشتری از تمـایز را القـاء کـرد (شـکل ۱).



الف ب

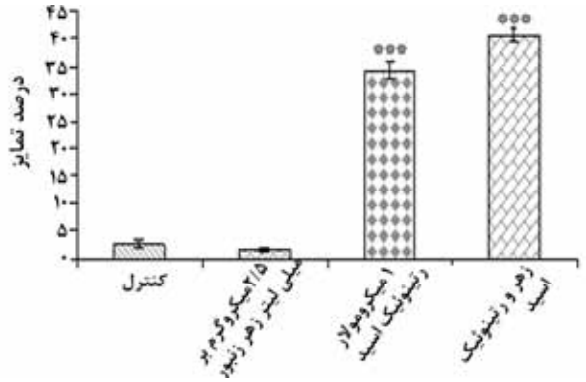
شکل ۱- مقایسه سلول‌های پرومیلوسیتی HL-60 در حالت‌های الف) تمایز نیافته (داخل کادر: سلول در حال مـرگ) و ب) تمایز یافته. رنگ‌آمیزی رایت -گیمسا مشاهده با میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر

اثر هم‌افزایی زهر زنبور و رتینوئیک‌اسید تمام ترانس بر تمایز سـلول‌هـای HL-60: جهـت بررسـی اثـر حـضور همزمان زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تمـایز سلول‌های HL-60، بـر اسـاس تجربیـات قبلـی در همـین پژوهش، غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور، بـه عنوان مهارکنندهٔ تکثیر سلولی، و ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس، به عنوان القاءکنندهٔ تمایز انتخاب شدند و میزان تمایز سلول‌ها در ۷۲ ساعت بررسی شـد. بررسـی تغییرات مورفولوژیکی بر اساس رنگ‌آمیزی رایـت-گیمـسا نشان داد در حضور همزمان رتینوئیک اسید تمام ترانس و زهر زنبور میزان تمایز سلول‌هـا نـسبت بـه حـضور منفـرد رتینوئیک اسید تمام ترانس افزایش یافت. بر اسـاس روش NBT، میـزان سـلول‌هـای NBT^+ در حـضور همزمـان رتینوئیک اسید تمام تـرانس و زهـر زنبـور در مقایـسه بـا نمونه‌های کنترل و نمونه‌هایی که تنهـا تحـت تـأثیر زهـر زنبور قرار گرفته بودنـد بـه میـزان مـشهودی بـالا بـود؛ از طرفی، افزودن زهر زنبور موجب افزایش معنی‌دار تمایز در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس نیز گشت، به طوری که

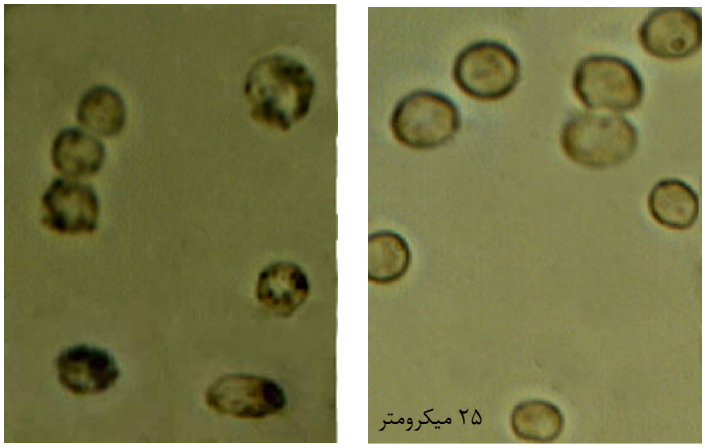
www.SID.ir

Archive of SID

بر اساس روش آنزیمی، در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس تمایز در حدود ۳۴/۳۳٪ بود و افزودن زهر به آن موجب ۶/۳۳٪ افزایش در میزان تمایز شد که این افزایش در حد $p<0/05$ معنی‌دار بود (نمودار۳ و شکل ۲).



نمودار ۳) مقایسهٔ درصد تمایز سلول‌های HL-60 در حضور ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور، ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس و هر دو نسبت به نمونهٔ کنترل، ۷۲ ساعت پس از آغاز اثر مواد بر اساس سنجش NBT.
آزمون آماری ANOVA. ***: $p<0/001$.



ب **الف**

شکل ۲- روش NBT: الف) سلول‌های کنترل بدون تشکیل دانه‌های تیره رنگ در داخل سلول‌ها. ب) سلول‌های تمایز یافته به نوتروفیل دارای دانه‌های تیره رنگ. مشاهده با میکروسکوپ نوری در زیر لام نئوبار. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.

بحث

نتایج به دست آمده در این پژوهش تأئیدکننده اثرات مهاری زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر رده سلولی HL-60 بود. همچنین مقایسه اثر همزمان این دو ماده با اثر منفرد هر کدام از آنها نشان داد که حضور زهر زنبور، موجب تشدید اثر مهارکنندگی رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌شود. زهر زنبور به تنهایی موجب تمایز سلول‌های HL-60 نشد اما موجب افزایش تمایز سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس گشت. با استفاده از این نتایج می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که حضور همزمان این مواد موجب مهار بیشتر تکثیر سلولی شد و این مهار منجر به افزایش میزان تمایز گشت. در مورد سازوکارهایی که زهر زنبور توانسته است موجب

www.SID.ir

Archive of SID

چنین اثراتی گردد اطلاعات زیادی در دسترس نیست، به ویژه که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر توأم زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر و تمایز رده سلولی HL-60 صورت نگرفته است، اما با مروری بر عملکردهای رتینوئیک اسید تمام ترانس و زهر زنبور تا حدودی می‌توان مسیرهای مولکولی را که زهر زنبور می‌توانسته اثرات خود را اعمال نماید، تفسیر نمود. در این بین، فعالیت NF-κB (Nuclear Factor-κB) اهمیت خاصی دارد؛ این فاکتور از جمله عواملی است که در مهار تکثیر و القاء تمایز در سلول‌های لوکمیایی و از جمله HL-60 دخیل می‌باشد و رونویسی بسیاری از ژن‌های دخیل در سرطان، التهاب، آپوپتوز و تکثیر سلولی را تنظیم می‌نماید. افزایش بیان این فاکتور در بسیاری از سلول‌های لوکمیایی دیده می‌شود که منجر به مقاوم شدن این سلول‌ها در برابر عوامل متوقف‌کنندهٔ تکثیر و یا القاءکنندهٔ آپوپتوز می‌گردد [۳۱]. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند موادی که موجب مهار فعالیت این فاکتور رونویسی گردند، موجب ایجاد آپوپتوز و یا مهار تکثیر و القاء تمایز در سلول‌های HL-60 و یا افزایش میزان تمایز در حضور موادی از قبیل رتینوئیک اسید تمام ترانس و VD_3 (Vitamin D_3) می‌شوند. Bunce و همکارانش نشان دادند که داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی با قدرت مهار فعالیت NF-κB ، از قبیل ایندومتاسین و آسپیرین، میزان تمایز سلول‌های HL-60 را در حضور غلظت‌های پایین رتینوئیک اسید افزایش می‌دهند؛ سایر مطالعات نیز نشان دادند اضافه نمودن استامینوفن به محیط کشت سلول‌های HL-60 موجب افزایش تمایز آنها در حضور رتینوئیک اسید می‌گردد [۳۲، ۲۷]. گزارشات متعددی تأئیدکنندهٔ این موضوع بوده است که زهر زنبور در غلظت‌های پایین موجب مهار فعالیت NF-κB می‌گردد. Park و همکارانش طی مطالعات گسترده‌ای نشان داده‌اند که در مدل‌های حیوانی و افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید، زهر زنبور و ترکیب اصلی موجود در آن یعنی ملیتین موجب مهار فعالیت NF-κB و در نتیجه مهار واکنش‌های التهابی می‌گردد [۳۳-۳۴] Son و همکارانش نشان دادند زهر زنبور و ملیتین موجب مهار تکثیر سلول‌های عضلهٔ صاف از طریق غیرفعال‌سازی NF-κB می‌شوند [۳۵]. تنظیم چرخهٔ سلولی از جمله فرآیندهای مهم دیگر در تنظیم تکثیر و تمایز سلول‌های لوکمیایی می‌باشد و مطالعات مختلف نشان داده است القاء تمایز در سلول‌های APL (Acute Myeloid Leukemia) و از جمله HL-60 با توقف سلول‌ها در فاز G0/G1 چرخهٔ سلولی همراه می‌باشد و در واقع تمایز این سلول‌ها به شدت با مهار تکثیر آنها در ارتباط است.

رتینوئیک اسید تمام ترانس از جمله مواد قوی در تنظیم چرخهٔ سلولی انواع رده‌های سلولی سرطانی و از جمله لوکمیایی محسوب می‌گردد که با تنظیم بیان انواع تنظیم‌کننده‌های چرخهٔ سلولی موجب مهار تکثیر و توقف سلول‌ها در فاز G0 و تمایز سلولی می‌گردد [۳۶]. ترکیباتی از قبیل انواع ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ضدالتهاب‌ها و عصاره‌های گیاهی با قدرت مهار تکثیر سلولی در افزایش میزان تمایز سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس بسیار مؤثر بوده‌اند. به عنوان مثال Dirsch و همکارانش نشان دادند که ترکیبات موجود در سیر، موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های HL-60 می‌گردد [۱۳]. بعدها Seki و همکارانش نیز نشان دادند روغن‌های به دست آمده از سیر و پیاز موجب مهار تکثیر سلول‌های HL-60، القاء تمایز و افزایش میزان تمایز در

www.SID.ir

Archive of SID

حضور ATRA از طریق تنظیم چرخهٔ سلولی می‌گردند [۱۴]. ایندیرابین و مشتقات آن به عنوان مهارکننده‌های قوی کینازهای وابسته به سایکلین و متوقف‌کنندهٔ سلول‌ها در فاز G0/G، میزان تمایز سلول‌های HL-60 در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس را به طور چشمگیری افزایش داده‌اند [۱۵]. ویتامین E [۱۹]، عصارهٔ برگ درخت زیتون [۱۲]، تیموپنتین [۱۷]، تری‌فنیلتین [۳۷] و بسیاری دیگر از مواد آنتی‌تومور و تنظیم‌کنندهٔ تکثیر سلولی در مهار تکثیر و تنظیم مرگ و یا تمایز سلولی در ردهٔ سلولی HL-60 مؤثر بوده‌اند. زهر زنبور نیز ممکن است از طریق متوقف نمودن سلول‌ها در فازهای G0/G1 و از طریق سازوکارهای مشابه توانسته باشد میزان تمایز سلولی در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس را افزایش دهد. وقوع آپوپتوز در حضور زهر نیز از جمله موضوعاتی است که مورد مطالعه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است. بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی یک ردهٔ سلولی مربوط به سرطان گردن به نام CaSki، نشان داد که زهر زنبور در الگویی وابسته به مقدار و زمان، موجب کاهش تعداد سلول‌های زنده و القاء تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با آپوپتوز در آنها می‌گردد [۳۸]. Jang و همکارانش اثر زهر زنبور در مهار COX-2 و ایجاد آپوپتوز در ردهٔ سلولی NCI-H1299 مربوط به سرطان ریه را گزارش کردند [۲۴]. Moon و همکارانش نیز با بررسی اثر زهر زنبور بر روی ردهٔسلولی میلوئیدی U937، وقوع آپوپتوز و کاهش فاحش پروتئین‌های ضد آپوپتوز از قبیل Bcl-2، Bcl-xl و cIAP-2 و فعال شدن فاحش کاسپازهای ۳ و ۹ را در این رده میلوئیدی نشان دادند [۳۹]. Chu و همکاران نشان دادند ملیتین موجب افزایش یون کلسیم داخل سلولی شده و افزایش میزان Ca^{2+} داخل سلول می‌تواند موجب آپوپتوز گردد [۴۰]. اثرات مهاری ملیتین نیز اول بار در سال ۱۹۸۵ توسط Hait و همکارانش بررسی شد. آنها نشان دادند که ملیتین به عنوان یک مهارکنندهٔ کالمودولین باعث مهار رشد و تکثیر در سلول‌های لوکمیایی انسان و موش می‌گردد و این ویژگی ملیتین را به دلیل مهارکنندهٔ کالمودولین بودن آن دانستند [۲۲]. از طرفی Si و همکاران اثر مهارکننده‌های کلسیم-کالمودولین کیناز بر روی میزان تمایز سلول‌های HL-60 در پاسخ به رتینوئیک اسید را بررسی کردند و نشان دادند که میزان تمایز این سلول‌ها در حضور چنین مهارکننده‌هایی افزایش می‌یابد [۴۱]. ملیتین همچنین موجب فعال شدن فسفولیپاز A_2 (PLA_2) می‌گردد و فعال شدن فسفولیپاز A_2 نیز منجر به تغییرات بعدی در سلول‌های سرطانی می شود.Liu و Levy نقش PLA_2 و اسید آراشیدونیک به عنوان یک متابولیت PLA_2 را بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های HL-60 بررسی کردند، آنها نشان دادند مهارکننده‌های PLA_2 موجب مهار تکثیر سلول‌های HL-60، L929، 3T3 می‌شوند. چنین مهارکننده‌هایی زمان دو برابر شدن این سلول‌ها را به طور فاحشی افزایش دادند اما تأثیری بر تمایز و یا میزان تمایز در حضور رتینوئیک اسید و ویتامین D_3 نداشتند [۴۲].

نتیجه‌گیری

با توجه به مسیرهای سلولی دخیل در عملکرد رتینوئیک اسید تمام ترانس بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های لوکمیایی و از جمله HL-60 و سازوکارهای شناخته شدهٔ دخیل در عملکرد زهر زنبور، به نظر می‌رسد زهر زنبور از طریق سازوکارهای متعددی بتواند با عملکردهای رتینوئیک اسید تمام ترانس برهمکنش داشته باشد. به عنوان مثال، همان‌طور که اشاره شد زهر زنبور

www.SID.ir

Archive of SID

موجب مهار فعالیت NF-κB، مهار تولید سایتوکین‌های التهابی، کاهش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوز و مهار کلسیم کالمودولین کینازها و تأثیر بر فعالیت فسفولیپاز A_2 می‌گردد و احتمال دارد زهر زنبور از طریق این مسیرها بتواند بر روی عملکرد رتینوئیک اسید تمام ترانس تأثیرگذار باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، بنظر می‌رسد زهر زنبور بتواند اثرات درمانی رتینوئیک اسید تمام ترانس را شدت بخشد و جهت تأئید اثرات مثبت زهر زنبور نیاز به مطالعات تکمیلی فراوانی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران صورت گرفته است؛ از اساتید محترم و تمامی کسانی که در این دانشکده به اجرای این پروژه کمک نمودند، سپاسگزاری می‌شود. همچنین از جناب آقای دکتر ایمانی، جناب آقای مهندس عزیز محمودزاده و جناب آقای دکتر مهدوی که در مراحلی از کار خالصانه ما را کمک نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

References

[1] Mchenzie Sl. Text book of hematology, Bultimore. 2000; pp: 711-26.

[2] Paran M, Sachs L, Barak Y, Resnitzky P. In vitro induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patiens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 67(3): 1542-9.

[3] Sachs L. The differentiation of myeloid leukemia cells: new possibilities for therapy. *Br J Haematol* 1978; 40: 509-17.

[4] Miller WHJr, Waxman S. Differentiation induction as a treatment for hematologic malignancies. *Oncogene* 2002; 21(21): 3496-506.

[5] Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001; 20(49): 7186-203.

[6] Altucci L, Wilhelm E, Gronemeyer H. Leukemia: benefical actions of retinoids and rexinoids. *Int Biochem Cell Biol* 2004; 36(2): 178-82.

[7] Wang ZY. Treatment of acute leukemia by inducing differentiation and apoptosis. *Ham-Wasserman Lecture* 2003.

[8] Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988; 72(2): 567-72.

www.SID.ir

Archive of SID

[9] Collins SJ. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia* 2002; 16(10): 1896-905.

[10] Adamson PC. All-trans-retinoic acid pharmacology and its impact on the treatment of acute promyelocytic leukemia. *The Oncologist* 1996; 1: 305-14.

[11] Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Miclea JM, Chastang C, et al. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995; 85(10): 2643-53.

[12] Abaza L, Talorete T, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui Olive Leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(5): 1306-12.

[13] Dirsch VM, Gerebs AL, Vollmar AM. Ajoene a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemia cells, accompanied by generation of reactive oxygen soecies and activation of nuclear factor KappaB. *Mol Pharmacol* 1998; 53(3): 402-7.

[14] Seki T, Tsuji K, Hayato Y, Moritomo T, Ariga T. Garlic and onion oils inhibit proliferation and induce differentiation of HL-60 cells. *Cancer Letters* 2000; 160(1): 29-35.

[15] Kim S, Kim Si, Choi S, Kim Y, Kim T. Enhancing effect of indirubin derivates on 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and all-trans retinoic acid-induced differentiation of HL-60 leukemia cells. *Bioorganic Med Chem* 2006; 14: 6752-8.

[16] Fong W, Tse A, Poon K, Wang C. Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(2): 427-41.

[17] Fan Y, Chang H, Liu J, Zhao L, Yang D, Wang R. Thymopentin, an immunomodulatory peptide, suppresses proliferation and induces differentiation. *Molecular Cell Research* 2006; 1763(10): 1059-66.

[18] Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979; 54(3): 713-33.

[19] Sokoloski JA, Hodnick WF, Mayne ST, Cinquina C, Kim CS, Sartorelli AC. Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by Vitamin E and other antioxidants in combination with low levels of Vitamin D3: Possible relationship to NF-Kappa B. *Leukemia* 1997; 11: 1546-53.

[20] Yang L, Zhao H, Li SW, Ahrens K, Collins C, Eckenrode S, et al. Gene expression profiling during All-trans Retinoic Acid-induced cell differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Molecular Diagnostics* 2003; 5(4): 212-21.

www.SID.ir

Archive of SID

[21] Breitman TR, Selonickt SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(5): 2936-40.

[22] 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 Thera* 2007; 115 (2): 246-70.

[23] Terra RM, Guimaraes JA, Verli H. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *J Molecular Graph Model* 2007; 25(6): 767-72.

[24] Jang MH, Shin MC, Limi 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.

[25] Trushin MV. Bee vemom therapy and low dose naltrexon for treatment of multiple sclerosis. *Nepal Journal of Neuroscience* 2006; 3:71-7.

[26] Orsoli CN, 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.

[27] Bunce CM, French PJ, Durham J, Stockley RA, Michell RH, Brown G. Indomethacin potentiates the induction of HL 60 differentiation to neutrophils, by retinoic acid and granulocyte colony-stimulating, factor and to monocytes, by vitamin D3. *Leukemia* 1994; 8(4): 595-604.

[28] Marekova M, Vavrova J, Vokurkova D, Psutka J. Modulation of ionizing radiation-induced apoptosis and cell cycle arrest by all-trans retinoic acid in promyelocyticleukemia cells (HL-60). *Physiol Res* 2003; 52(5): 599-606.

[29] Yedjou CG, Moore P, Tchounwou PB. Dose- and time-dependent response of human leukemia (HL-60) cells to arsenic trioxide treatment. *Int J Environ Res Public Health* 2006; 3(2): 136-40.

[30] Oka Y, Naomoto Y, Yasouka Y, Hatano H, Haisa M, Tanaka N, et al. Apoptosis in cultured human colon cancer cells induced by combined treatments wtih 5-fluorouracil, tumor necrosis factor- alpha and interferon-alpha. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27(4): 231-5.

[31] Cilloni D, Martinelli G, Messa F, Baccarani M, Saglio G. Nuclear factor kB as a target for new drug development in myeloid malignancies. *Haematologica* 2007; 92 (9): 1224-9.

[32] Bunce CM, Mountford JC, French PJ, Mole DJ, Durham J, Michell RH, et al. Potentiation of myeloid differentiation by anti-inflammatory agents, by steroids and by retinoic acid involves a single intracellular target, probably an enzyme of the aldoketoreductase family. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1311: 189-98.

www.SID.ir

Archive of SID

[33] Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, Kim KH, Song HS, et al. Anti arthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the P50 subunit. *Arthritis Rheum* 2004; 50(11): 3504–15.

[34] Park HJ, Lee HJ, Choi MS, Son DJ, Song HS, Lee JM, et al. JNK pathway is involved in the inhibition of inflammatory target gene expression and NF-kappaB activation by melittin. *Inflammattion* 2008; 5(7): page number not for citiation purpose.

[35] Son DJ, Ha SJ, Song HS, Lim Y, Yun YP, Lee JW, et al. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappaB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *J Pharmacol Experimental Therapeutics* 2006; 317(2): 627-34.

[36] Horie N, Mori T, Asada H, Ishikawa A, Johnstone PG, Takeishi K. Implication of CDK inhibitors p21 and p27 in the differentiation of HL-60 cells. *Biol Pharmacology* 2004; 27(7): 992-7.

[37] Watanabe H, Adachi R, Hirayama A. Triphenyltin enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 306: 26-31.

[38] Ip SW, Wei HC, Lin JP, Kuo HM, Liu KC, Hsu SC, et al. Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. *Anticancer Research* 2008; 28: 833-42.

[39] Moon DO, Park SY, Heo MS, Kim KC, Park C, Ko WS. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Immunopharmacology* 2006; 6(12): 1796-807.

[40] Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, Chang HC, Chi CC, Su HH. Phospholipase A_2-independent Ca^{2+} entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. *Life Science* 2007; 80(4): 364-9.

[41] Si J, Mueller L, Collins S. CaMKII regulates retinoic acid transcriptional activity and the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Clinical Investigation* 2007; 117(5): 1412-21.

[42] Liu Y, Levy R. Phospholipase A_2 has a role in proliferation but not in differentiation of HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1355(3): 270-80.

www.SID.ir

Archive of SID

The Effect of Honey Bee Venom and All-trans Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of HL-60 Cell Line

K. Parivar[1], M. Nabiuni[2], H. Jalali[3], F. Nadali[4]

Received: 06/05/09 **Sent for Revision: 22/02/10** **Received Revised Manuscript: 01/01/11** **Accepted: 10/01/11**

Background and Objectives: Differentiation therapy is one of the methods for treatment of cancer. In this method, some drugs such as All-trans Retinoic Acid, are used which can inhibit proliferation of cancerous cells and induce cell differentiation. Previus experiments showed some anti-proliferation materials, anti-inflammation materials or anti-oxidant materials could influence the effects of such drugs and decrease resulting side effects. In this research the effects of the Honey Bee Venom, on All-trans Retinoic Acid functions was measured.

Materials and Methods: In this experimental project we used HL-60 cell line belonging to acute promyelocyte leukemia. The HL-60 cell line was obtained from Pasteur Institute of Iran, and were grown in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 1% streptomycin-penicilin. We used MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide) and NBT (Nitro-Blue tetrazolium chloride) tests for these purposes. All experiments were done three times and data were analyzed using SPSS.

Results: Both Honey Bee Venom and All-trans Retinoic Acid could inhibit proliferation of HL-60 cells, also All-trans Retinoic Acid could induce differentiation in this cells. The amount of differentiation was increased significantly ($p<0.01$) in the presence of Honey Bee Venom.

Conclusion: On the base of our findings, it seemed that Honey Bee Venom could increase anti cancer effects of All-trans Retinoic Acid.

Key words: Honey Bee Venom, HL-60 cell line, Cell Proliferation and Differentiation, All-trans Retinoic Acid

Funding: This project was funded by Tarbiat Moallem University of Tehran.

Conflict of interest: None declared**.**

Ethical approval: The Ethics Committee of Tarbiat Moallem University approved the study.

How to cite this article: Parivar K, Nabiuni M, Jalali H, Nadali F. The Effect of Honey Bee Venom and All-trans Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of HL-60 Cell Line. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2011; 10(2): 112-26. [Farsi]

1- Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran
2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran
Corresponding Autor: Tel: (0261) 4510005, Fax: (0261) 4510005, e-mail: Nabiuni@tmu.ac.ir
3- PhD Student, Dept. of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran
4- Assistant Prof., Dept. of Hematology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

www.SID.ir