مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۲، شماره ۲، تابستان ۹۱، صفحات ۹۳ تا ۱۰۰

Original Article

اثر زهر زنبور عسل بر تمایز عصبی رده سلولی فئوکروماسیتوما (PC12)

کاظم پریور[۱]، مهناز آذرنیا [۲]، محمد نبیونی[۳]، الهام حویزی[۴]،ساره رجبی زلتی[۴]

[۱] استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم وتحقیقات تهران
[۲]دانشیار، گروه ریست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم
[۳]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم
[۴]دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم

چکیده

سابقه و هدف: *رده سلولی فئوکروموسیتوم رت (PC12)، در محیط کشت مناسب و تحت تاثیر عوامل القا کننده تمایز عصبی می‌توانند به سلول‌هایی با فنوتیپ عصبی تبدیل شوند. زهر زنبور عسل حاوی اجزای مختلفی مانند فسفولیپاز ۲ (PLA2) است که به تنهایی اثرات تمایزی بر PC12 دارد، ولی اثر کل زهر بر آن مشخص نیست. لذا در این تحقیق، تاثیر زهر زنبور بر تمایز سلول‌های PC12 بررسی شد.*

روش بررسی: *سلول‌های PC12 در محیط RPMI1640 کشت داده شدند و سپس با زهر زنبور در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و فاکتور رشد عصبی با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و به صورت توام به مدت ۷ روز تیمار شدند و ارزیابی میزان بقا سلولی با روش MTT و تمایز سلولی با مشاهدات مورفولوژیکی و میزان تولید استیل کولین بررسی گردید.*

یافته‌ها: اثر تمایزی زهر زنبور عسل در دوز پایین مشاهده شد و مصرف هم زمان آن با *NGF* تاثیر آن را افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که زهر زنبور در غلظت‌های بالا موجب مرگ سلولی و در غلظت‌های پایین موجب تمایز سلول‌های PC12 به سلول‌های شبه عصبی می‌شود و* مصرف هم زمان آن با *NGF* اثر تمایزی را افزایش می‌دهد

واژگان کلیدی: *سلول‌های PC12، زهر زنبورعسل، فاکتور رشد عصبی، تمایز نورونی.*

مقدمه

بقا، تکثیر و تمایز نورون‌ها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی به وسیله فاکتورهای نوروتروفیک تنظیم می‌شود. این فاکتورها شامل خانواده نوروتروفین‌ها، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و اینترلوکین‌ها هستند. خانواده نوروتروفین‌ها خود شامل فاکتور رشد عصبی، فاکتور نوروتروفین مشتق شده از مغز، نوروتروفین-۳ و نوروتروفین-۴ می‌باشند که پیش برنده تمایز نورون‌ها هستند. گیرنده نوروتروفین‌ها TRK نام دارد که جزء خانواده رسپتورهای تیروزین کینازی محسوب می‌شوند (۱). مهم‌ترین نوروتروفین‌ها NGF است که برای تمایز و بقا نورون‌های سمپاتیکی و حسی در سیستم عصبی محیطی و برای نورون‌های کولینرژیک در مغز مورد نیاز است. NGF همچنین سبب تمایز عصبی در سلول‌های PC12 می‌شود (۱). سلول‌های PC12 مدل مناسبی برای بررسی اثرات تمایزی فاکتورهای مختلف به شمار می‌روند. سلول‌های PC12 تحت تیمار با فاکتورهای مختلف مثل NGF و یا FGF با گسترش نوریت‌ها، به سلول‌هایی با فنوتیپ عصبی تبدیل می‌شوند (۴-۱). تحقیقات قبلی نشان داده که ترکیبات زهر زنبور عسل اثرات متنوعی در تکثیر، بقا و تمایز سلول‌ها دارند. مهم‌ترین ترکیب زهر زنبور که به ویژه اثرات تمایزی بر رده سلولی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم ، دکتر محمد نبیونی
(**email**: nabiuni@tmu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱/۲۷

Archive of SID
www.SID.ir

PC12 دارد، فسفولیپاز A2 است که اثرات نوروتروفینی داشته و هم‌چنین آپوپتوز سلولی را نیز به تعویق می‌اندازد (۸-۴). سلول‌های کرومافینی آدرنال از اولین نوع سلول‌هایی هستند که به عنوان سلول‌های نورواندوکرین مورد توجه قرار گرفتند. سلول‌های کرومافینی به طور وسیعی به عنوان مدلی برای مطالعه مکانیسم‌های سنتز و آزادسازی هورمون‌ها و فاکتورهای نوروتروفیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. سلول‌های PC12 توانایی تولید دوپامین را نیز دارند. بنابراین پیشنهاد شده است که از این سلول‌ها برای درمان بیماران پارکینسونی می‌توان استفاده کرد (۱، ۱۲-۹). در معرض قرار گرفتن سلول‌های PC12 با NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای چند روز سبب توقف تکثیر سلولی و گسترش نوریت‌ها و تبدیل شدن سلول‌ها به سلول‌هایی با مورفولوژی مشابه با سلول‌های عصبی می‌شود. بنابراین سلول‌های PC12 مدل مناسبی برای بررسی اثرات نوریت‌زایی محسوب می‌شوند(۳-۱، ۱۳، ۱۴). برای بررسی تمایز سلول‌های PC12 از نظرمورفولوژیکی اندازه سلول‌ها، تعداد سلول‌های تمایز یافته و اندازه طول نوریت‌ها مورد مطالعه قرار گرفت (۱۵، ۱۶). تحقیقات قبلی نشان داده که ترکیبات زهر زنبور عسل اثرات متنوعی در تکثیر، بقا و تمایز سلول ها دارند و همچنین ثابت شده که بقا و تمایز نورون‌ها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی به وسیله فاکتورهای نوروتروفیک تنظیم می‌شود. در این مطالعه سعی شده با بررسی و مقایسه توان تمایزی زهر زنبور عسل و فاکتور رشد عصبی در سلول‌های PC12 مدلی مناسب جهت مطالعات تمایزی در محیط in vitro فراهم و گامی مفید در درمان بیماری‌های عصبی باشد.

مواد و روشها

سلول‌های PC12 از موسسه پاستور تهران خریداری و در محیط کشت RPMI 1460 محتوی ۱۰٪ سرم گاو و ۱۰۰U/ml استرپتومایسین-پنی سلین، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در رطوبت اتمسفر و ۵٪ CO_2 نگهداری شدند. برای بررسی تمایز سلول‌ها به تعداد 5×10^3 cell/well در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای که با پلی دی لیزین با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پوشش شده بودند، قرار داده شدند. ۲۴ ساعت بعد محیط کشت سلول‌ها با RPMI1640 محتوی ۱٪ سرم و فاکتورهای محرک تعویض شد. غلظت استفاده شده برای NGF ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و برای زهر زنبور عسل µg/ml ۱ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (۲۰-۱۷).

زهر زنبور عسل به صورت پودر با درجه خلوص ۱۰۰ درصد خریداری و درمحلول بافر (PBS) حل شد. برای تعیین دوز مناسب از زهر برای القا نورون در سلول‌ها، ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور با روش MTT assay به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰nm و با استفاده از روش ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا محیط کشت سلول‌ها را خارج کرده، سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت جدید به اضافه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول MTT به هر خانه اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اضافه کردن این محلول، رنگ محیط به علت تولید فورمازان به رنگ آبی در آمدند. بعد از گذشت این مدت زمان پلیت‌ها را از انکوباسیون خارج کرده و به هر خانه ۱ میلی‌لیتر 0.04 N HCl-isopropyl alcohol اضافه شد تا کریستال‌های آبی رنگ تولید شده، حل شوند. سپس به مدت ۴ تا ۱۸ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند. بعد از گذشت این مدت زمان تمام خانه‌های پلیت را پیپتینگ کرده و محلول موجود را در کووت اسپکتروفتومتری ریخته و با طول موج ۵۷۰nm میزان جذب ثبت گردید. غلظت زهری که سبب مرگ ۵۰٪ سلول‌ها شد، به عنوان LD50 در نظر گرفته شد که این آزمایش سه بار با شرایط یکسان انجام گرفت. غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور عسل به عنوان غلظت LD50 تعیین گردید. بنابراین برای بررسی اثرات تمایزی زهر از غلظت‌های پایین‌تر از µg/ml ۵ شامل غلظت‌های ۱ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. بررسی‌های مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس انجام شد. از پنج ناحیه از هر خانه عکس گرفته شد و سپس تعداد سلول‌های تمایز یافته یعنی سلول‌هایی که دارای زواید نورونی با طول حداقل ۱/۵ برابر قطر سلول‌ها بودند، شمارش شد. برای این کار از نرم افزار Imag J استفاده شد و هر آزمایش سه بار تکرار شد (۲۲، ۲۵، ۲۶).

برای بررسی تکثیر سلولی، سلول‌های PC12 در پلیت‌های ۹۶ خانه پلی‌استیرنی در محیط کشت RPMI1640 (Gibco, UK) برای ۲۴ ساعت قرار داده شدند، سپس با NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و زهر زنبور عسل ۱ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار و ۲ تا ۸ روز نگهداری شدند و محیط کشت هر ۳ روز یک بار تعویض گردید و بررسی‌های MTT در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ انجام شد. برای این منظور به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای

Archive of SID
www.SID.ir

۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شد و جذب سلول‌ها با طول موج ۵۷۰ نانومتر و با دستگاه الیزا (Elisa reader) اندازه‌گیری شد (۲۹-۲۷).

یکی از روش‌های تشخیص سلول‌های عصبی اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی اختصاصی آنها است. در این روش، استر تیوکولین به عنوان سوبسترای آنزیم کولین استراز به کار می‌رود. این سوبسترا توسط آنزیم هیدرولیز می‌شود و تیوکولین آزاد شده با معرف دی تیونیتروبنزوئیک (DTNB) واکنش داده و به صورت تیوکولین-تیونیتروبنزوئیک بی‌رنگ رسوب می‌کند و تیونیتروبنزوئیک (TNB) زرد رنگ آزاد می‌شود. این تغییر رنگ با دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۴۱۲nm اندازه‌گیری شده و این تغییرات طول موج نشان دهنده میزان فعالیت آنزیمی و آزاد شدن TNB است. در این تحقیق از روش اسپکتوفتومتری Ellman و همکاران استفاده شد.

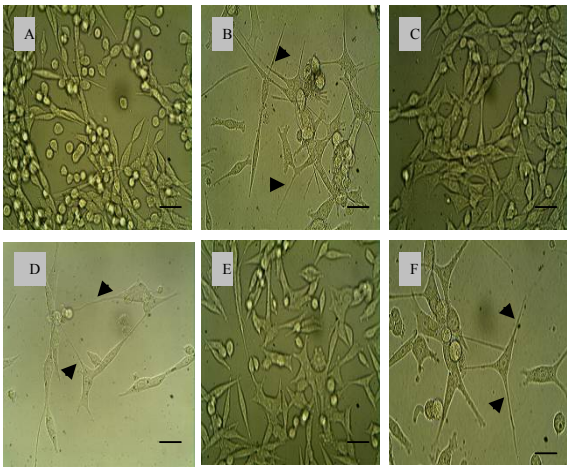
در این مطالعه، از روش آماری ANOVA و برای مقایسه نمونه‌های دوتایی از تست Tukey استفاده شد. $p<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

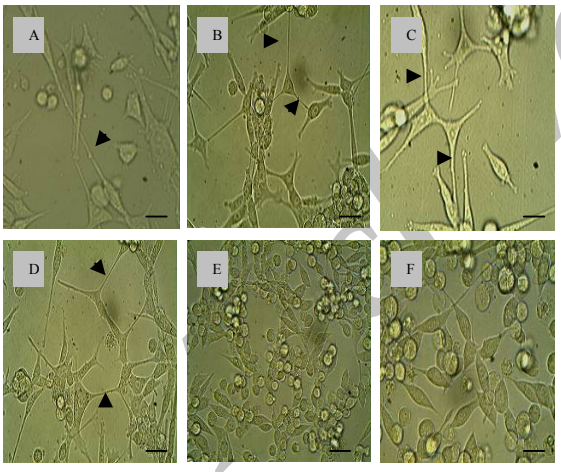
۱. بررسی تمایز رده سلولی PC12 با استفاده از مشاهدات مورفولوژی

الف- بررسی مورفولوژیکی تمایز رده سلولی PC12 به نورون‌های تمایز یافته با استفاده از NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر

در این مطالعه، سلول‌های PC12 به مدت ۱۰ روز تحت تاثیر NGF قرار داده شدند و از نظر مورفولوژیکی در روز های ۱، ۳، ۵ و ۷ (مثلا روز ۱ به معنی یک روز بعد از تیمار سلول‌ها با NGF است) مورد بررسی قرار گرفتند. در روز اول، سلول‌های تیمار شده از نظر مورفولوژیکی کاملا شبیه نمونه کنترل بوده و هیچ گونه تمایزی مشاهده نشد. در روز سوم، نوریت‌ها به صورت جوانه‌هایی در اطراف سلول‌ها شروع به پدیدار شدن کرده و به تدریج گسترش یافتند و در روز پنجم تمایز سلولی از نظر مورفولوژیکی کاملا مشهود بوده و نوریت‌ها به صورت شبکه‌های درهمی گسترش یافته و تقریبا بیش از ۸۰٪ سلول-های PC12 به نورون تمایز یافتند و این تمایز تا روز هفتم به اوج خود رسیده و تقریبا تمام سلول‌ها متمایز شده و طول نوریت‌ها به نهایت خود رسید (شکل ۱ A و B).



شکل ۱- A. سلول‌های PC12 تیمار شده با NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، روز اول؛ B. سلول‌های PC12 تیمار شده با NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، روزپنجم؛ C. سلول‌های PC12 تیمار شده با زهر زنبور عسل با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، روز اول؛ D. سلول‌های PC12 تیمار شده با زهر زنبور عسل با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، روز پنجم؛ E. سلول‌های PC12 تیمار شده با زهر زنبور عسل با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر، روز اول؛ F. سلول‌های PC12 تیمار شده با زهر زنبور عسل با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر، روزپنجم. بزرگنمایی میکروسکوپی X ۴۰۰ (فلش‌ها نشان دهنده زواید نورونی می‌باشند).



شکل ۲- A. سلول‌های PC12 تیمار شده باNGF و زهر زنبور عسل با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، روز اول؛ B. سلول‌های PC12 تیمار شده باNGF و زهر زنبور عسل با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، روز پنجم؛ C. سلول‌های PC12 تیمار شده باNGF و زهر زنبور عسل با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر، روز اول؛ D. سلول‌های PC12 تیمار شده باNGF و زهر زنبور عسل با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر، روز پنجم ؛ E. سلول‌های PC12 نمونه کنترل، روز اول؛ F. سلول‌های PC12 نمونه کنترل، روزپنجم. بزرگنمایی میکروسکوپی X ۴۰۰ (فلش‌ها نشان دهنده زواید نورونی می باشند).

Archive of SID

www.SID.ir

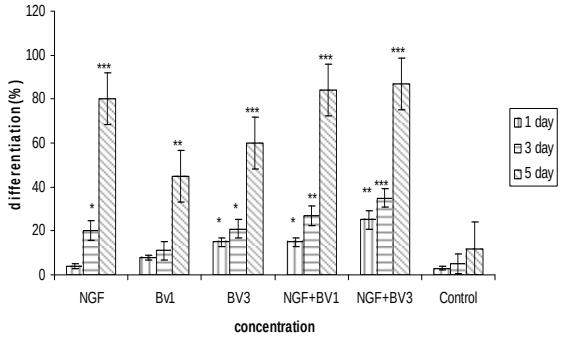
غلظت زهری که سبب مرگ ۵۰٪ از سلول‌ها گردد به عنوان LD50 در نظر گرفته می‌شود که در این تحقیق نیز غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور عسل به عنوان غلظت LD50 تعیین گردید. به همین دلیل به منظور بررسی تمایز سلول‌ها از غلظت‌های پایین‌تر از غلظت به دست آمده به عنوان LD50 یعنی غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد که جزییات این روش در بخش مواد و روش‌ها ذکر شد.

ب- بررسی مورفولوژیکی تمایز رده سلولی PC12 به نورون‌های تمایز یافته با استفاده از زهر زنبور عسل

در این تحقیق از غلظت‌های مختلف زهرزنبور عسل برای بررسی تمایز سلولی استفاده شد و غلظت‌های اپتیمم، غلظت‌های ۱ و ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. بررسی‌های مورفولوژیکی زهر با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد که در روز اول تعداد سلول‌های تمایز یافته کم می‌باشد (حدود ۸٪) و این تعداد در روز سوم به مقدار جزیی افزایش یافته، اما از این روز به بعد تعداد سلول‌های تمایز یافته به سرعت افزایش می‌یابد، به طوری که در روز پنجم این تعداد به اوج خود یعنی حدود ۲۵٪ رسید و بعد از آن سلول‌ها شروع به از بین رفتن کردند. (شکل ۱ C و D). برای زهر با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به زهر با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تعداد سلول‌های تمایز یافته بیشتر بود، به طوری که در روز اول حدود ۱۵٪ سلول‌ها و در روز سوم حدود ۲۵٪ سلول‌ها تمایز یافته و در روز پنجم تعداد سلول‌های تمایز یافته به اوج خود رسیدند و حدود ۳۸٪ سلول‌ها تمایز یافتند و در روزهای بعد از آن تعداد سلول‌های تمایز یافته ثابت و مرگ و میر سلولی افزایش یافت، به طوری که در روز هفتم تقریبا تمامی سلول‌ها از بین رفتند (شکل ۱ E و F).

ج- بررسی مورفولوژیکی تمایز رده سلولی PC12 به نورون‌های تمایز یافته با استفاده از زهر زنبور عسل و NGF به صورت هم‌زمان

در این مطالعه، از غلظت‌های ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر NGF همراه با دو غلظت زهر یعنی ۱ و ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد به طور کلی میزان القاء تمایز سلول های PC12 به صورت تیمار هم‌زمان بیشتر از NGF و زهر به طور جداگانه بود که از نظر عددی تفاوت اندکی میان حالت تیمار هم‌زمان و NGF به تنهایی وجود داشت، اما تفاوت حالت هم‌زمان (یعنی NGF و زهر) نسبت به اثر زهر به تنهایی به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) قابل توجه بود و هم‌چنین میزان تمایز NGF با زهر با غلظت ۳ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به NGF همزمان با زهر با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشتر بود ($p<۰/۰۵$)، اما میزان بقاء سلول‌ها در حالت تیمار هم‌زمان تقریبا مانند NGF بود و میزان بقاء در این حالت از میزان بقاء نمونه‌های تیمار شده با زهر به طور معنی داری ($p<۰/۰۰۱$) بیشتر بود (شکل ۲) (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه اثر زهر زنبور عسل و NGF به تنهایی و به صورت هم‌زمان بر تمایز سلول‌های رده سلولی PC12 نسبت به کنترل در روز ۱، ۳ و ۵ بعد از تیمار ($^{*}p<۰/۰۵$، $^{**}p<۰/۰۱$، $^{***}p<۰/۰۰۱$ با استفاده از آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey). NGF= NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، BV1&BV3= زهر زنبور عسل با غلظت‌های ۱ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر

۲.بررسی Viability رده سلولی PC12 با استفاده از روش MTT

ابتدا محیط کشت سلول‌ها را خارج کرده سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت جدید به اضافه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول MTT به هر خانه اضافه کردیم. سپس پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اضافه کردن این محلول رنگ محیط به علت تولید فورمازان به رنگ آبی در درآمد. بعد از گذشت این مدت زمان پلیت‌ها را از انکوباسیون خارج کرده و به هر خانه ۱ میلی‌لیتر 0.04 N HCl-isopropyl alcohol اضافه شد تا کریستال‌های آبی رنگ تولید شده حل شوند. سپس به مدت ۴ تا ۱۸ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داری شدند. بعد از گذشت این مدت زمان تمام خانه‌های پلیت را پیپتینگ کرده و محلول موجود را در کووت اسپکتروفتومتری ریخته و با طول موج ۵۷۰nm میزان جذب ثبت گردید.

الف- بررسی Viability سلول‌های PC12 تیمار شده با NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر

NGF از جمله فاکتورهایی است که سبب حفظ بقای سلول‌ها می‌شود. در بررسی‌های این تحقیق نیز این قضیه حاکم بود، به طوری که در آزمایش‌های انجام شده بر روی سلول‌های PC12 در روزهای اول و سوم، Viability سلولی صددرصد و در روز پنجم Viability سلولی ۹۳٪ تعیین گردید.

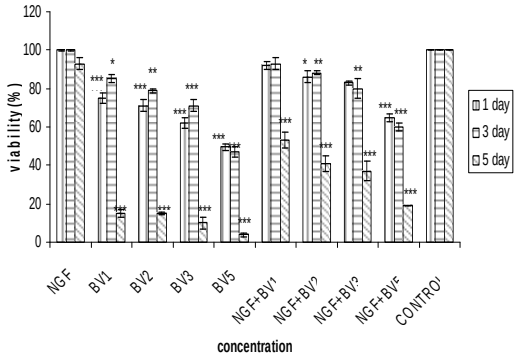
Archive of SID
www.SID.ir

ب- بررسی Viability سلول‌های PC12 تیمار شده با زهر زنبور عسل

در این مطالعه از غلظت‌های۱، ۲، ۳، ۵ و ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور استفاده شد. از میان این غلظت‌ها، غلظت زهر ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان LD50 تعیین گردید. زیرا در بررسی روز اول میزان Viability سلولی در این روز ۵۰٪ بود و در غلظت‌های بالاتر تقریبا بیشتر سلول‌ها از بین رفتند. میزان Viability سلولی برای غلظت زهر ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به بقیه غلظت‌های زهر بالاتر بود و هرچه غلظت زهر افزایش یابد میزان Viability سلولی کاهش نشان می‌دهد. نکته‌ای که در این آزمایش قابل توجه است این است که میزان Viability سلولی برای غلظت‌های زهر ۱، ۲ و ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر از روز اول تا سوم به طور جزئی افزایش یافت و بعد از آن یعنی تا روز پنجم به طور چشم‌گیری کاهش یافت. به طور کلی، میزان Viability سلول‌های تیمار شده با زهر نسبت به NGF به ویژه در روز پنجم به طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($p<۰/۰۰۱$).

ج- بررسی Viability سلول‌های PC12 تیمار شده با NGF و زهر زنبور عسل

در این مطالعه، از غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر NGF به همراه غلظت‌های زهر ۱ و ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. میزان Viability سلولی در مصرف NGF و زهر به تنهایی کمتر و در مصرف هم‌زمان آنها به طور معنی داری بیشتر بود. نتایج حاصل از Viability با روش MTT در نمودار ۲ آمده است.



نمودار ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل و NGF بر درصد بقاء (viability) رده سلولی PC12 در روزهای ۱، ۳ و ۵ بعد از تیمار با روش MTT ($^{*}p<۰/۰۵$، $^{**}p<۰/۰۱$، $^{***}p<۰/۰۰۱$) با استفاده از آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey). NGF =NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر؛ BV1,BV3,BV5= زهر زنبور عسل با غلظت‌های۱، ۲، ۳ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

۳. نتایج حاصل از بررسی واکنش آنزیمی (AChE)

این بررسی ۶ روز پس از تیمار بر روی سلول‌ها انجام شد. البته این بررسی در روزهای دیگر نیز انجام گرفت، ولی بهترین روز تمایز سلول‌ها ۶ روز پس از تیمار بود. طبق پروتوکل این بررسی‌ها انجام گرفت و جذب‌های به دست آمده ثبت شد و سپس شیب نمودار از فرمول زیر بدست آمد:

شیب= تغییر در جذب/ دقیقه

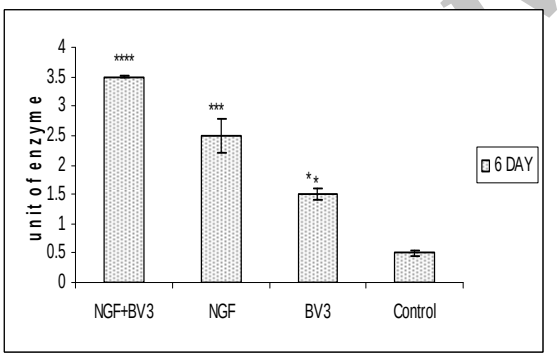
و سپس تغییرات شیب تقسیم بر عدد ۱۳۶۰۰ (ضریب انهدام) مساوی است با تولید یک مول محصول بر لیتر بر دقیقه و سپس در واحد رقت ضرب شد و میزان آنزیم در محیط بر حسب واحد به دست آمد. نتایج بدست آمده در تعیین مقدار آنزیم در حالت‌های مختلف نشان داد که میزان آنزیم در نمونه تیمار شده با NGF+BV3 به میزان ۰/۳۵ بیشتر از بقیه بود، بنابراین میزان تمایز در این حالت بیشتر از حالت‌های دیگر (زهر به تنهایی و NGF به تنهایی) بود. بنابراین مشخص شد هر چه میزان آنزیم در نمونه بالاتر باشد در نتیجه میزان تمایز بیشتر است (نمودار ۳).

مکانیسم عمل واکنش آنزیمی

تیوکولین استر ⟶ (کولین استراز) تیوکولین

-تیونیتروبنزوئیک ⟶ دی تیونیتروبنزوئیک+تیوکولین

(رسوب زرد) تیونیتروبنزوئیک + تیوکولین



نمودار ۳- مقایسه فعالیت آنزیمی در سلول‌های تیمار شده در روز ۶ بعد از تیمار ($^{*}p<۰/۰۵$، $^{**}p<۰/۰۱$، $^{***}p<۰/۰۰۱$) با استفاده از آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey). NGF =NGF با غلظت ۰/۵ میکرو مولار؛ BV=زهر زنبور عسل با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

بحث

با توجه به توانایی تبدیل سلول‌های PC12 در شرایط آزمایشگاهی به سلول‌های عصبی، در تحقیق حاضر از این

www.SID.ir

سلول‌ها استفاده شد و این سلول‌ها در حضورزهر زنبور و فاکتوررشد عصبی کشت داده شدند تا سلول‌های عصبی حاصل شود. اعتقاد بر این است که با دستیابی به دانش فنی تولید سلول‌های عصبی و با فراهم آوردن امکان تمایز آنها می‌توان این سلول‌ها را در جهت بررسی روش‌های سلول درمانی و پیوند سلولی به کار گرفت. در سال ۲۰۰۶، Ohuma و همکارانش بیان کردند سلول‌های PC12 در محیط کشت مناسب تکثیر می‌یابند و به دنبال تیمار با NGF، تکثیر را متوقف کرده و به سلول‌های عصبی تمایز می‌یابند که یافته‌های ما نیز این نتایج را تایید کرد (۲۴). در سال ۲۰۰۴، Das و همکارانش بیان کردند که سلول‌های PC12 در غیاب NGF دارای اشکال گرد و کوچک هستند و زواید خیلی کمی دارند، اما در معرض قرار دادن این سلول‌ها با NGF به مدت هفت روز سبب افزایش قطر سلول‌های PC12 و همچنین گسترش نوریت‌ها می‌شود. Das و همکاران برای بررسی تمایز نورون‌ها، تعداد سلول‌های نوریت‌دار و طول نوریت‌ها را اندازه‌گیری و اعلام کردند که سلول‌هایی که با NGF تیمار شده بودند در روز ششم بیشترین طول نوریت‌ها را نشان داده و در روز هفتم تقریبا ۹۰٪ سلول‌ها تمایز یافته بودند (۷). ما نیز در آزمایشات خود با شمارش تعداد سلول‌های تمایز یافته، حداکثر تمایز با NGF را در روز ششم به دست آوردیم که حدود ۹۵٪ سلول‌ها تمایز یافته بودند.

زنبوردرمانی از زمان بسیار قدیم در درمان انواع بیماری‌های عفونی، التهابی و مفصلی کاربرد فراوانی داشته و امروزه نیز ثابت شده که زهر زنبور عسل و یا ترکیبات آن در تکثیر، بقا، تمایز و رشد سلول‌ها اثرات متفاوتی دارد. در سال ۲۰۰۳، Nakashima و همکارانش بیان کردند که فسفولیپاز A2 باعث ایجاد نوریت‌ها در سلول‌های PC12 می‌شود. این عمل فسفولیپاز A2 همراه با آزاد شدن اسیدهای چرب صورت می‌گیرد، حتی مقدار فعالیت فسفولیپاز A2 را می‌توان با توجه به مقدار آزاد شدن اسید های چربی مثل آراشیدویک اسید ارزیابی کرد. تحقیقات نشان می‌دهد که القاء Neurite-Outgrowth (نوریت زایی) بوسیله فسفولیپاز A2 یا هومولوگ‌های آن مثل P15 به طور نزدیکی وابسته به توانایی فسفولیپاز A2 در آزاد کردن اسیدهای چرب در سلول‌های زنده PC12 است (۲۳). در سال ۲۰۰۵، Masuda و همکارانش ضمن تایید نتایج Nakashima در آزمایشات خود اثرات تمایزی فسفولیپاز A2 و NGF را به صورت توام و جداگانه مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که فسفولیپاز A2 در ایجاد Neurite-Outgrowth در سلول‌های PC12 موثر است (۲۱). یکی از دلایل اثبات تمایز سلول‌های PC12، توانایی آنها در تولید آنزیم استیل کولین استراز است (۷، ۲۴، ۳۰). ما نیز در آزمایشات خود با اندازه‌گیری میزان این آنزیم نتیجه گرفتیم که سلول‌های PC12 با تیمار با NGF و زهر زنبور عسل به سلول عصبی تمایز یافته و استیل کولین استراز تولید می‌کنند. در تحقیقی که ما انجام دادیم از زهر زنبور عسل به صورت کامل استفاده شد. زهر زنبور عسل از ترکیبات زیادی ساخته شده است که در برخی مقالات به اثرات تمایزی برخی از اجزای آن مثل PLA2 اشاره شده است. باید توجه داشت که تفکیک زهر به اجزای سازنده آن روندی پیچیده، زمان‌بر و پرهزینه است. تعداد سلول‌های دارای نوریت در رده سلولی PC12 تیمار شده با زهر زنبور عسل با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روز پنجم بعد از کشت ۲۵٪ به دست آمد و تعداد سلول‌های دارای نوریت با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روز پنجم بعد از کشت ۳۸٪ به دست آمد. در حالی که گروه Nakashima که اثرات تمایزی PLA2 (که یکی از اجزای مهم زهر زنبور عسل است) را با غلظت ۱۰ نانو مولار بر روی سلول‌های PC12 مورد بررسی قرار داده بودند، تعداد سلول‌های دارای نوریت در روز پنجم را ۳۷٪ اعلام کردند.

می‌توان نتیجه گیری کرد که زهر زنبور عسل می‌تواند به عنوان عامل موثری در القاء تمایز عصبی مورد توجه قرار گیرد و با توجه به اینکه دوزهای بالای آن اثرات آپوپتوتیک نشان داده است، ازدوزهای پایین آن به صورت هم‌زمان با عوامل القاء کننده دیگر از جمله فاکتورهای رشد استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و تشکر خود را از مدیریت مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی و آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم به واسطه حمایت‌هایشان برای انجام این پروژه اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1. Arioka M, heon SH, Ikeno Y, Nakashima S, Kitamot KA. Novel neurotrophic role of secretory phospholipases A2 for cerebllar granula nrurons. Febs letters 2005; 579: 2693-701.

2. Bai J, Nakamura H, Kwon YA. Critical roles of thioredoxin in nerve growth factor-mediated signal transduction and neurite outgrowth in PC12 cells. Neuroscience 2003; 23: 503-509.

Archive of SID
www.SID.ir

3. Beaujean D, Rosenbaum C. Combinatorial code of growth factors and neuropeptides define neuroendocrine differentiation in PC12 cells. Experiment Neurol 2003;184: 348-58.

4. Cappelletti G, Maggioni MG, Tedeschi G, Maci R. Protein tyrosine is triggered by nerve growth factor during neuronal differentiation of PC12 cells. Experiment Cell Res 2003; 288: 9-20.

5. Chaldakov GN. More powerful than NGF 1951. Biomed Rev 2002; 13: 67-69.

6. Chiou SH, Kao CL, Chiu JH, Tsai TH. Evaluation of anti-Fas ligand-induced apoptosis and neural differentiation of PC12 cells treated with nerve growth factor using small interfering RNA method and sampling by micro dialysis. Anal Biochem 2007; 363: 49-57.

7. Das KP, Freudenric TM. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth:a comparison of morphological and neurochemical measures. Neurotoxicol Teratol 2004; 26: 397-406.

8. Foley JD, Grunwald EW, Nealey PF. Cooperative modulation of neuritogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor. Biomaterials 2005; 26: 3639-44.

9. Fujita T, Maturana AD, Ikuta J, Hamada J. Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to protein to transport mitochondria in neuritis of NGF-stimulated pc12 cells. Biochem Biophys Res Commun 2007; 361: 605-10.

10. Gutacker C, Klock G, Diel P. nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate clusterin gene expression in PC12 cells. Biochem 1999; 339: 759-66.

11. Hashimotoy A, Onodera T, Ikeda H, Kitani H. Isolation and charactrisation of fetal bovin brain cells in primary culture. Res Vet Sci 2000; 69: 36-46.

12. IkenoY, Konno N, Cheon SH, Bolchi A, Ottonello S, Kitamoto K, et al. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells through lysophosphalidylcholine generation and activation of G2A receptor. Biol Chem 2005; 280: 28044-52.

13. Jin K, Mao XO, Greenberg DA .Stem cell factor stimulates Neurogenesis in vitro and in vivo. Clin Invest 2002; 110: 311-19.

14. Jones L, Oudegat M, Bunget MB, Tuszynski MH. Topical review neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. Physiology 2001; 533: 83-89.

15. Kamata H, Oka SH, Kakuta J, Hirata H. Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. Biochem Biophys 2005; 434: 16-25.

16. Kamata Y, Shiraga H, Tal A, Kawamoto Y. Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the medium-chain fatty acid octanoic acid. Neurocience 2007; 146: 1073-81.

17. Kang B, Liang Y, Wu M, Wang H. Sirpα negatively regulates differentiation of PC12 cell. Mol Brain Res 2005; 138: 205-14.

18. Kwon YB, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Bee venom acupoint stimulation increases fos expression in catecholaminergic neuron s in the rat brain. Mol Cell 2004; 17: 329-33.

19. Lipps BV. Detection of nerve growth factor (NGF) in venoms from diverse source: isolation and characterization of NGF from the venom of honey bee (Apis melifera). J Nat ToXins 2000; 9: 9-13.

20. Lortie K, Huang D, Chakravarthy B, Comas T, Chao SL, Morley P. The gas7 protein potentiates NGF-mediated differentiation of PC12 cells. Brain Res 2005; 1036: 27-36.

21. Matsuda H, Koyama H, Sato H, Konno K, Ushio H, Matsuda K. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. J Experiment Med 2005; 187: 297-306.

22. Mitchell PJ, Hnson JC, Bergeron M, Smith RC. Aquantitative method for analysis of in vitro neurite. Neurosci Methods 2007; 164: 350-62.

23. Nakashim S, Ikeno Y, Yokoyama T, Kuwana M, Bolchi A, Ottonello S, et al. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells. Biochem 2003; 376: 655-66.

24. Ohnuma K, Hayashi Y, Furue M, Kaneko K, Asashima M. Serum-free culture conditions for serial subculture of undifferentiation PC12 cells. Neurosci Methods 2006; 151: 250-61.

25. Rossi F, Gianola S, Corvetti L. Regulation of intrinsic neuronal properties for axon growth and regeneration. Progr Neurobiol 2007; 81: 1-28.

26. Palmada M, Kanwal S, Rutkoski NJ, Johnson RS, Carter BD. C-jun is essential for sympathetic neuronal death induced by NGF withdrawal but not by p75 activation. Cell Biol 2002; 158: 453-61.

Archive of SID

www.SID.ir

27. Peiren N, Vanrobaeys F, Devreese B, Jacobs FJ. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. Biochimica Biophysica Acta 2005; 1752: 1-5.

28. Schweitzer ES. Regulated and constitutive secretion of distinct molecular forms of acetylcholinesterase from PC12 cells. Cell Sci 1993; 106: 731-40.

29. Shibata A, Laurent CE, Smithgall TE. The c-fes proteine-tyrosine kinase accelerates NGF-induced differentiation of pc12 cells through a p13k-dependent mechanism. Cell Signal 2003; 15: 279-88.

30. Takeda K, Hatai T, Hamazaki TS, Saitoh M. Apoptosis signal-regulating kinase 1 induces neuronal differentiation and survival of pc12 cells. Biochem Mol Biol 2000; 275: 9805-13.

Archive of SID

www.SID.ir