Archive of SID

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز، پاییز ۱۳۹۹، سال ۹، شماره ۴، صفحه‌های ۳۵۷-۳۶۶
مقاله تحقیقی

بررسی اثرات ضد سرطان ناشی از زهر *Apis mellifera* بر رده سلولی سرطان سینه

حسین ذوالفقاریان[1*]، سیما خلیلی‌فرد بروجنی[2]، مهدی بابائی[1و3]

[1] دکترای بیوشیمی، بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)، کرج، البرز، ایران
[2] کارشناس ارشد سم‌شناسی پزشکی، بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)، کرج، البرز، ایران
[3] کارشناس ارشد بیوشیمی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۹/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر آمار افراد مبتلا به سرطان افزایش یافته و به همین دلیل داروهای مختلفی برای درمان سرطان پیشنهاد شده است، اما هیچ کدام از آنها به بهبودی کامل منجر نشده‌اند. بسیاری از سموم زیستی دارای ترکیبات فعال با فعالیت ضد سرطانی هستند. در این میان، زهر زنبور عسل دارای اثرات قوی ضد سرطانی و ضد توموری است. هدف از این پژوهش، بررسی اثرات ضد سرطانی زهر زنبور عسل بر روی رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB-231) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: زهر خام از زنبور عسل *Apis mellifera* بدست آمد و میزان پروتئین آن مشخص گردید. رده سلولی MDA-MB-231 کشت داده شد و سپس سلول‌ها تحت تاثیر غلظت‌های ۱/۵٦ µg/ml، ۳/۱۲۵، ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ از زهر زنبور عسل به مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت قرار گرفتند. ریخت شناسی و مرگ سلولی بررسی شد و درصد بقای سلول‌ها توسط سنجش MTT تعیین گردید.

یافته‌ها: سنجش MTT نشان داد که زهر زنبور عسل در غلظت ٦/۲۵ µg/ml برای MDA-MB-231 منجر به مرگ ۵۰ ٪ از سلول‌ها گردید (P<۰/۰۵). بررسی ریخت شناسی و داده‌های حاصل مشخص کرد که مرگ سلولی ناشی از زنبور عسل منجر به القای آپوپتوز شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که زهر زنبور عسل اثرات ضد سرطانی دارد و می‌توان در صورت تحقیقات بیشتر از آن به عنوان یک گزینه برای تولید داروهای ضد سرطانی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: زهر زنبور عسل، سرطان سینه، آپوپتوز

نویسنده مسئول:
بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)، کرج، ایران

۰۲۶۳۴۵۷۰۰۳۸
E-mail: zolfagharianh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان، گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه آنها رشد سلولی تنظیم نشده و تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی یا مکان اولیه به نقاط دیگر بدن است. بیش از ۱۰۰ نوع سرطان شناخته شده وجود دارد و سرطان پستان از شایع‌ترین سرطان‌ها می‌باشد. تخمین زده می‌شود حدود نیمی از موارد سرطان پستان و ۶۰ ٪ مرگ و میرها در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد.[۱]

درمان سرطان به طور کلی با جراحی، پرتو درمانی، شیمی درمانی (و یا ترکیبی از این سه روش)، هورمون درمانی و ژن درمانی انجام می‌شود. درمان سرطان در بیشتر موارد هزینه‌های بالا و عوارض بسیاری دارد. شیمی درمانی روش معمول در درمان سرطان است، اما تومورها اغلب به شیمی درمانی که منجر به عوارض جانبی بسیاری نیز می‌شود مقاومت نشان می‌دهند.[۲]

مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) مجموعه‌ای از رویدادهای مرگ سلولی است که منجر به ایجاد تغییرات خاص در الگوی ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی می‌شود. عدم وجود آپوپتوز، منجر به تظاهرات مختلفی مانند سرطان می‌گردد.[۳] این موضوع نشان دهنده این است که القای آپوپتوز باعث درمان سرطان می‌شود. امروزه با وجود اینکه ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، با بکارگیری روش‌های درمانی مختلف برای سرطان مورد پذیرش است، اما اهمیت ایجاد آپوپتوز در مقایسه با سایر روش‌ها همچنان نیازمند دانش بیشتری است. توافق کلی بر این موضوع وجود دارد که برای درمان سرطان، رخ دادن آپوپتوز در سلول سرطانی یک روش بهینه محسوب می‌شود.

داروهای به کارگرفته شده در درمان سرطان به صورت بالینی، در فرآیندهایی که مربوط به زنده ماندن و رشد سلول‌ها هستند، اختلال ایجاد می‌کنند و باعث آسیب مستقیم به DNA یا فرآیندهای ترمیم آن می‌شوند.[۴] بعضی از داروهای به کار گرفته شده در درمان سرطان، در صورت سالم بودن مسیرهای القای آپوپتوز در سلول سرطانی، منجر به آپوپتوز می‌شوند. از سویی دیگر ممکن است بعضی از داروها باعث مرگ سلول سرطانی شوند اما مرگ برنامه‌ریزی شده را به راه نیاندازند و اثر خود را به دلیل خاصیت سایتوتوکسیتی خود اعمال کنند.[۵] امروزه بیشتر دانشمندان به دنبال روش‌هایی برای پیشگیری و درمان سرطان هستند که علاوه بر مؤثر بودن، اثرات جانبی کم‌تری داشته باشند. به همین منظور در مطالعات نوین باید از ترکیبات جدید (مانند زهرهای جانوری) برای القای آپوپتوز و درمان سرطان استفاده نمود.[۶]

تاریخچه به کارگیری زهر زنبور عسل برای درمان به زمان‌های بسیار دور و حدود ۳۵۰۰ سال پیش باز می‌گردد. زهر زنبور اثرات درمانی گسترده‌ای دارد.[۷-۹] طبق تحقیقات اخیر، این ماده ظرفیت کشتن سلول‌های سرطانی را دارد و می‌تواند مرگ آپوپتوزی را القا کند.[۱۰]

زهر زنبور ترکیبی پیچیده از پپتیدهای فعال، آنزیم‌ها و آمین‌ها مانند ملیتین، فسفولیپازA_2، هیستامین، کاتکول آمین‌ها، پلی آمین‌ها را شامل می‌شود[۹]. ملیتین جزء اصلی زهر زنبور عسل است و اخیراً مشخص شده است ملیتین می‌تواند آپوپتوز را القا کند. ملیتین با خاصیت مهاری کالمادولین نقش ضد تکثیری نیز دارد.[۱۰]

با توجه به خاصیت ضد التهابی و ضد تکثیری زهر زنبور عسل که در مطالعات مختلف انجام شده است، ما در این تحقیق اثرات مهار کنندگی سرطان توسط زهر زنبور عسل را در رده سلولی سرطان پستان مورد بررسی قرار دادیم. با توجه به اثرات جانبی که داروهای سایتوتوکسیک شیمی درمانی برای بیمار سرطانی ایجاد می‌کنند، در صورتی که ترکیبات طبیعی مانند زهر زنبور خاصیت ضدسرطانی داشته باشند، به کارگیری آنها می‌تواند چشم اندازی به منظور ایجاد داروهای جدید با بازده بالاتر و عوارض جانبی کم‌تر، ایجاد نماید.

مواد و روش‌ها

تهیه زهر زنبور عسل

زهر زنبور عسل (*Apis mellifera*) به صورت پودر از زنبورداری واقع در اردستان اصفهان خریداری شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری گردید. به منظور انجام آزمایشات محلول استوک آن (۱ mg/ml) تهیه شد به طوری که میزان ۱ میلی گرم آن در شرایط تاریکی به ۱ میلی لیتر محلول PBS استریل افزوده شد. محلول زهر ورتکس گردید و توسط فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین مقدار پروتئین زهر خام

با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از BSA (Bovin Serum Albumin)، مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، به روش پروتئین سنجی لوری تعیین گردید.[۱۱]

کِشت و شمارش سلول

رده سلولی MDA-MB-231 از American Type Culture Collection (Manassas, VA) تهیه شد و در محیط DMEM (Dulbecco´s Modification of Eagle´s Medium) با مکمل ۱۰٪ سرم جنین گوساله (Fetal bovine serum: FBS)، کانامایسین (۱۰۰ IU/ml)، نئومایسین (۱۰۰IU/ml) و L –گلوتامین (۲ میلی مولار) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند.[۱۲] برای پاساژ سلول‌ها و انجام آزمایشاتی از جمله آزمایش MTT ، شمارش تعداد سلول‌ها مورد نیاز است. درصد سلول‌های زنده یا میزان بقای سلولی (viability) با رنگ آمیزی سلول توسط تریپان بلو تعیین گردید.[۱۳] در این شرایط سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذ ناپذیر هستند و سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌کنند. پس از جدا شدن حدود نیمی از سلول‌ها، محیط کشت به میزان دو برابر حجم تریپسین (با FBS ۱۰٪) به فلاسک افزوده شد، تا اثر تریپسین خنثی گردد. سلول‌های جدا شده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل انتقال یافتند و به مدت ۵ دقیقه و با دور rpm ۱۵۰۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی حذف گردید، سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به پلاک سلولی افزوده شد و به خوبی پیپتاژ گردید. در ادامه ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به میکروتیوپ ۰/۵ میلی لیتری افزوده شد و ۱۰ میکرولیتر از تریپان بلو ۰/۴٪ به آن اضافه گردید. پس از پیپتاژ به میزان ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام نئوباری (هموسایتومتر) که قبلاً با الکل ۷۰٪ استریل شده بود و لامل شیشه‌ای روی آن قرار گرفته بود، بارگذاری گردید. شمارش سلولی توسط میکروسکوپ با لنز ۱۰ انجام گرفت.

اندازه‌گیری سیتوتوکسیسیته توسط آزمایش MTT

برای بررسی تأثیر زهر زنبور عسل بر میزان بقای سلولی از روش رنگ سنجی MTT (دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم بروماید)، استفاده شد.[۱۴] این روش بر پایه توانایی تبدیل محلول MTT به بلورهای فورومازان نامحلول توسط سلول‌های زنده استوار است. برای انجام این تست، سلول‌ها با تعداد cell/ml ۵×۱۰^{۴} در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند (در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی و در آخر در همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط اضافه شد). پس از چسبیدن سلول‌ها به سطح پلیت (بعد از ۲۴ ساعت) محیط کشت مصرف شده حذف گردید و سلول‌ها با غلظت‌های µg/ml ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ از زهر زنبور عسل در چاهک‌های پلیت به مدت ۲۴ و۴۸ ساعت تیمار شدند. همچنین در خانه‌های کنترل هیچ گونه تیماری انجام نگرفت. برای هر آزمایش حداقل چهار تکرار صورت گرفت. پس از طی ۲۴ و ۴۸ ساعت به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان، به هر چاهک ۵۰ میکرو لیتر DMSO اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند و سپس دانسیته نوری محلول درون هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر سنجیده شد. درصد بقای سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه گردید.

Viability of cells= test absorbance/control absorbance × 100

در غلظتی از زهر زنبور عسل که تقریباً ۵۰٪ سلول‌ها از بین رفته بودند میزان IC_{50} زهر زنبور بر روی رده سلولی MDA-MB-231 محاسبه شد.

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها

بررسی ریخت شناسی سلول‌های تیمار شده با ترکیب سیتوتوکسیک زهر زنبور عسل توسط میکروسکوپ معکوس انجام شد و با ریخت شناسی سلول‌های کنترل از نظر تغییر شکل سلول‌ها، القای آپوپتوز و بروز نکروز مورد مقایسه قرارگرفت.

ارزیابی آپوپتوز

به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آن که مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌باشد، از میکروسکوپ فلورسنت و

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸ استفاده شد. در این رنگ آمیزی سلول‌های طبیعی به صورت رنگ آبی یا سبز یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی که هسته سلول‌های دستخوش آپوپتوزیس به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیر منظم و به صورت نقاط درخشان قابل مشاهده است. همچنین انقباض سیتوپلاسمی در سلول‌های در معرض زهر قرار گرفته قابل مشاهده می‌باشد.[۱۵]

سلول‌ها با رقت‌های ۱/۵۶ µg/ml، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ از زهر زنبور انکوبه شدند تا رقت IC_{50} زهر بدست آید. در ادامه سلول‌ها با محیط کشت حاوی رقت معادل IC_{50} از زهر زنبور به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از پایان انکوباسیون سلول‌ها برای رنگ آمیزی بیرون آورده شدند. برای تهیه این محلول، ۱ میلی‌گرم رنگ هوخست (Hoechst 33258) در ۱ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل گردید. بعد از رسوب (فیکس کردن سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه) و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (cell/ml 5×10^4) با ۱ میکرو لیتر از رنگ هوخست مخلوط شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در مکان تاریک، رنگ خارج شد و لایه سلولی با PBS شستشو گردید. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام میکروسکوپی قرار گرفت. بعد از تهیه اسمیر سلول‌ها با لام پوشانده شد و با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید.

آزمون قطعه قطعه شدن DNA

با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA وقوع آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفت.[۱۵] در ابتدا سلول‌های کنترل و تیمار شده با زهر زنبور تحت تاثیر بافر لیز کننده (شامل، SDS 0.1%, EDTA 10 mM, W/V, Tris-HCl 10 mM (pH=7.4)) قرار گرفتند پس از سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ g، ۱۰ دقیقه)، DNA با استفاده از ترکیب فنل-کلروفورم-الکل جداسازی شده با اتانول مطلق و NaCl ۵ مولار به مدت یک شب رسوب داده شد. در نهایت رسوب DNA در بافر TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM) حل شد. قطعه قطعه شدن DNA سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در مدت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز قطعه قطعه شدن DNA با الکتروفورز DNA در ژل آگاروز ۱٪ و با ولتاژ ۵۰ ولت صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS ۲۱ استفاده شد و نتایج به صورت میانگین ± SEM بیان گردید. سطح معنی داری $P<0.05^*$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان پروتئین زهر خام زنبور عسل در حدود ۱/۴۸ mg/ml بدست آمد.

اثر سایتوتوکسیک زهر زنبور بر روی سلول‌های MDA-MB-231 با روش MTT نشان داد که میزان بقای سلولی با افزایش دوز زهر زنبور روند کاهشی دارد. در غلظت ۶/۲۵ µg/ml از زهر بعد از ۲۴ ساعت تقریباً ۵۰ درصد سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند. به عبارت دیگر میزان IC_{50} زهر زنبور بعد از ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های MDA-MB-231، ۶/۲۵ µg/ml محاسبه شد. پس از ۴۸ ساعت این روند هم چنان کاهشی بود و IC_{50} به ۳/۱۲۵ تنزل یافت (نمودار ۱).

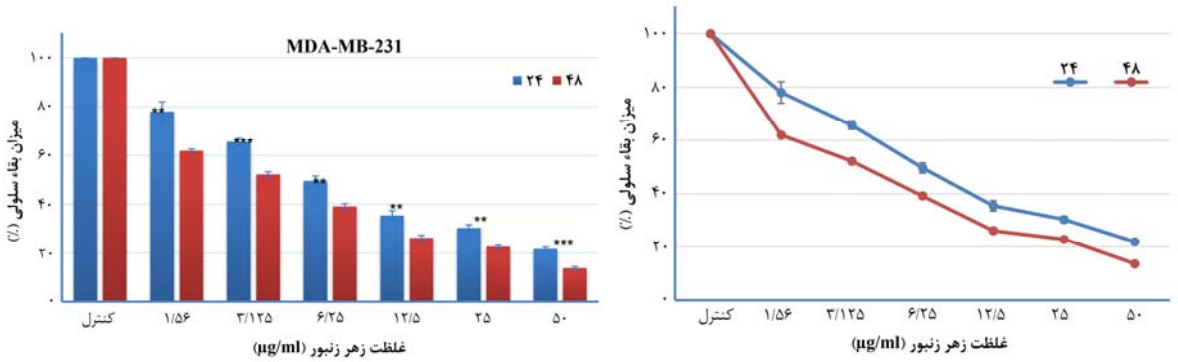
مشخص گردید که با در نظر گرفتن سه فاکتور اثر زهر در سلول‌های تیمار شده و کنترل، اثر غلظت و اثر زمان، می‌توان دریافت که به طور متوسط گروه تیمار نسبت به کنترل ۴۳٪ سلول‌های زنده کم تری داشتند. هم چنین به ازای هر ۱ واحد افزایش غلظت ۰/۹٪ از میزان زنده ماندن سلول‌ها کم شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت نیز به طور متوسط ۹٪ سلول‌ها نسبت به ۲۴ ساعت از دست رفته‌اند.

مشاهدات میکروسکوپی و رنگ آمیزی هوخست سلول‌های MDA-MB-231 نشان داد که از نظر ریخت شناسی اختلاف چشمگیری بین سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با زهر زنبور و سلول‌های کنترل مشاهده شد. در شکل ۱ به وضوح مشهود است که در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۶/۲۵ µg/ml از زهر زنبور کاهش تعداد سلول‌ها، کوچک شدن چشمگیر سلول‌ها و از دست دادن شکل طبیعی سلول و لبه‌های غیر مشخص و همچنین در قسمت‌هایی تجمع سلولی و نیز تبدیل سلول‌ها از حالت کشیده به

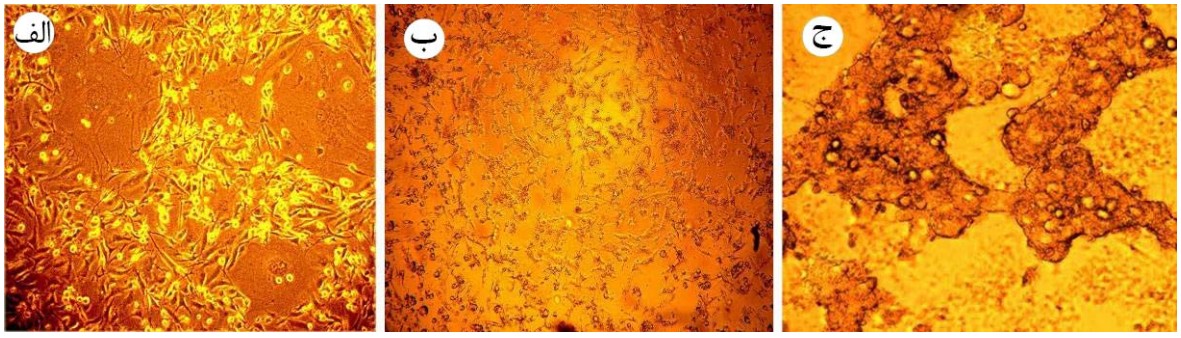
www.SID.ir

Archive of SID

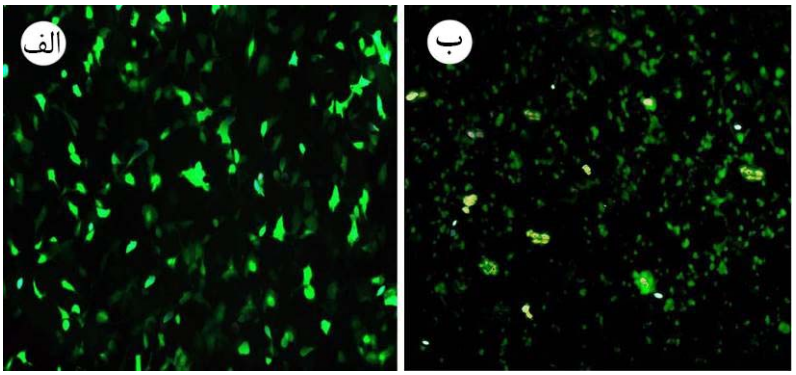
حالت گرد مشاهده شد (شکل ۱ ب) که این اثرات می‌تواند از نشانه‌های آپوپتوز باشند، در حالی که سلول‌های کنترل سلول‌هایی سالم و یکپارچه با هسته کاملاً طبیعی و لبه‌های مشخص بود (شکل ۱ الف).



نمودار ۱: نمودار ستونی و خطی میزان بقای سلول‌های MDA-MB-231 تحت تاثیر غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در مدت ۲٤ و ٤٨ ساعت با روش MTT (Mean± SEM، $p<0.001^{***}$)



شکل ۱: ریخت شناسی سلول MDA-MB-231 تیمار شده با زهر زنبور. الف: کنترل، ب: ٦/۲۵ µg/ml و ج: ۱۲/۵ µg/ml



شکل ۲: ریخت شناسی سلول MDA-MB-231 تیمار شده با زهر زنبور. الف: کنترل و ب: ٦/۲۵ µg/ml

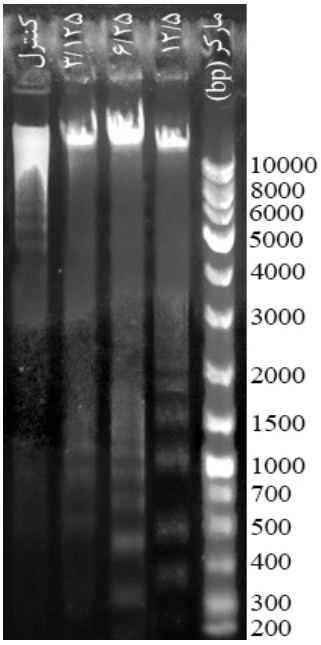
www.SID.ir

Archive of SID

در غلظت ۱۲/۵ µg/ml تجمعات شدید سلولی و غیرقابل تشخیص بودن سلول‌ها و تخریب آن‌ها و خارج شدن محتوای سلولی و سیتوپلاسم حباب‌دار و ورم سلول‌ها مشاهده شد (شکل ۱ ج) که می‌تواند از نشانه‌های نکروز در این غلظت باشد. پس از رنگ آمیزی هوخست، به وضوح نقاط درخشان که به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته می‌باشد در تیمار (IC_{50}) مشاهده شد. همچنین کوچک شدن سلول‌ها و چروکیدگی و از دست رفتن شکل مشخص آن‌ها و کاهش تعداد سلول‌ها نیز مشهود است (شکل ۲ ب). در حالی که این نقاط در گروه کنترل وجود ندارند و سلول‌ها به صورت یکنواخت دیده شدند (شکل ۲ الف).

الکتروفورز DNA از سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل برای مدت ۲٤ ساعت قطعه قطعه شدن DNA را نشان داد (شکل ۳). این نتایج نشان داد که تیمار با زهر زنبور، شکستگی DNA را فقط در سلول‌های سرطانی تیمار شده با زهر ایجاد می‌کند. حالت نردبانی در وزن مولکولی پایین در گروه‌های تیمار مشاهده شد. بنابراین، به نظر می‌رسد رده سلولی سرطانی که در غلظت IC_{50} به زهر زنبور حساس هستند. فرم آپوپتوز القا شده توسط زهر با تاثیرات سرکوب کننده رشد آن همبستگی دارد و می‌توان استنباط کرد تاثیر ممانعت از رشد زهر زنبور عسل در سلول‌های سرطانی انتخاب شده با مکانیسم قطعه قطعه شدن DNA ارتباط نزدیک دارد. این نتایج به علت آپوپتوز ایجاد می‌گردد.

در رده سلولی MDA-MB-231 در چاهک کنترل هیچ‌گونه شکستنی از DNA مشاهده نگردید. در غلظت ۳/۱۲۵ µg/ml (IC_{50}) قطعاتی در محدود ۲۰۰–۱۸۰ جفت باز را ایجاد کرد که نشان دهنده قطعه قطعه شدن DNA در این غلظت و وقوع آپوپتوز است. در غلظت ٦/۲۵ µg/ml نیز قطعه قطعه شدن ایجاد گردید. در غلظت ۱۲/۵ µg/ml هیچ گونه شکستگی مشاهده نشد که می‌تواند به علت وقوع نکروز در این غلظت باشد. همچنین می‌توان گفت شکستگی DNA در یک روند وابسته به دوز افزایش یافته است.



شکل ۳: الکتروفورز ژل آگارز DNA سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل

بحث

زهر زنبور عسل با فعالیت‌های زیستی باعث بروز اثرات سیتوتوکسیک در سلول‌ها از جمله سلول‌های سرطانی می‌شود. گزارش شده که سموم برخی از حیوانات مانند زنبور، مار، عقرب و عروس دریایی از طریق القای آپوپتوز دارای اثر سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشند. امروزه مشخص شده است ارتباط نزدیکی بین آپوپتوز و ایجاد سرطان وجود دارد، در نتیجه جلوگیری از ایجاد سرطان با روش‌های نوین سودمند خواهد بود.[۱٦] به کارگیری محصولاتی که منشأ طبیعی دارند و دارای خواص ضد سرطانی و القای آپوپتوز هستند می‌توانند چشم اندازی برای جلوگیری از سرطان‌های مختلف ایجاد کند. به همین منظور در این پژوهش بررسی اثر ضد سرطانی زهر زنبور عسل به عنوان یک ماده با منشأ طبیعی صورت پذیرفت.

اثر ضد سرطانی زهر زنبور عسل بستگی به ترکیبات موجود در این زهر دارد. اصلی‌ترین ماده موجود در زهر زنبور، ملیتین است[۹] که به نظر می‌رسد مهمترین نقش را تاثیر ضد سرطانی زهر زنبور دارد. ملیتین با وجود خاصیت دوگانه دوستی (Amphiphilic) خود

www.SID.ir

Archive of SID

بـا غشاهای فسفولیپیدی واکنش می‌دهد و تخریـب آنهـا را در پـی دارد.[۱۷] به نظر می‌رسد القای آپوپتوز توسـط ملیتـین در سـلول‌هـای سرطانی از طریـق مسیر وابسته بـه کاسپاز (Caspase)، پروتئازهـای دخیل در آپوپتوز، انجام می‌گیرد.[۱۸]

Hong و همکارانش، برای اولین بار گزارش دادند که زهر زنبور قادر به القای آپوپتوز در فیبروبلاست‌هـای سـینوویال بیمـاران دچـار آرتریت روماتوئید است.[۱۹] در تحقیقی با بررسی اثر زهـر زنبـور بـر روی سـلول‌هـای کارسـینومای اپیدرموئیـد سـرویکس انسـانی رده سلولی Ca Ski، نشان داده شد که زهـر زنبـور آپوپتـوز را از طریـق افزایش بیان کاسـپاز ۸، تغییـرات در نسـبت Bcl-2/Bax و تغییـر در عملکرد میتوکندری القا می‌کند.[۲۰]

یافته‌های ما در این پژوهش نیز نشان دادند که زهر زنبـور دارای اثـر سایتوتوکسـیتی در یـک رونـد وابسـته بـه دوز و زمـان روی سلول‌هـای MDA-MB-231 اسـت. مطالعـه غلظـت‌هـای مختلـف سلول‌های تیمار شده با زهر زنبور و سلول‌های کنترل نشـان داد کـه مهار رشد سلول‌ها توسط این ترکیبات وابسته به غلظت زهر و زمان است و هر دو تاثیر معناداری در تیمار با زهر زنبور دارنـد. بررسـی داده‌های بدست آمده نشان داد که درصد بقـای سـلولی سـلول‌هـای تیمار شده با دوزهای مختلف زهر زنبور نسبت به سلول‌های کنتـرل در یک روند وابسته به دوز زمان تفاوت معنـی داری دارد ($p<0.05$). میزان IC_{50}، برای سـلول‌هـای MDA-MB-231 مقـدار ٦/٢٥ µg/ml پس از ٢٤ ساعت و ٣/١٢٥ پس از ٤٨ سـاعت زهـر زنبـور بدسـت آمد. براساس سایر پـژوهش‌هـا ایـن میـزان بـرای رده‌هـای سـلولی مختلف، متنوع بدست آمده است به این صورت کـه ۲ µg/ml بـرای ملانومـای انسـانی A2058، ۱۰ µg/ml بـرای سـرطان ریـه رده سـلولی NCI- H1299 و سـرطان تخمـدان انسـانی رده سـلولی A2780cp، ۸ µg/ml مشخص شده است.[۲۱]

نتایج حاصل از آزمون MTT در این آزمـایش نشـان داد کـه بـا افزایش دوز در زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت میـزان بقـای سـلولی کـاهش یافت. این بدان معنی است که افزایش دوز اثـر قـوی‌تـری در مهـار تکثیر سلول‌های MDA-MB-231 دارد. اما در ۷۲ ساعت با افـزایش دوز، اثر مهار کنندگی تکثیر زهر زنبور، به دلیل پایین بودن نیمه عمر زهر و غیر فعال شدن اجـزای سـازنده آن در محـیط کشـت رو بـه افـزایش دارد. ایـن رونـد افزایشـی تـا ٤٨ سـاعت توسـط Liu و همکارانش گزارش شده است.[۲۲] پس از این زمان سلول‌هـا بازیـابی شده و تا ۷۲ ساعت درصد بقا افزایش می‌یابد.[۲۳]

در سلول‌های MDA-MB-231 در هر دو زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از تیمار با زهر زنبور روند کاهشـی در زنـده مانـدن سـلول‌هـا مشاهده شد که این روند در غلظت‌های بالاتر هم چنان ادامه دارد و به موازات هم پیش می‌رود و در غلظت ٦/٢٥ µg/ml در ٢٤ سـاعت پس از تیمار ۵۰ ٪ سلول‌ها زنده ماندند.

از نظر ماکروسکوپی یکسان نبـودن رنـگ ناشـی از حـل شـدن کریستال‌های فورمازان در DMSO طی زمان‌هـای ٢٤ و ٤٨ سـاعت در هر دو آزمایش طراحی شده دلیل دیگری بر ایـن اسـت کـه اثـر سیتوتوکسیک زهر زنبور عسل وابسته به غلظت زهر و زمان اسـت. زیرا تعداد کریستال‌های فورمازان تشکل شده در سلول‌های زنده در ارتباط مستقیم با غلظت رنگ تولید شده می‌باشد، بنابراین اگر زمـان در تاثیر زهر موثر باشد، باید غلظت رنگ چاهک‌هـا در زمـان هـای ٢٤ و ٤٨ ساعت با یگدیگر تفاوت چشمگیری داشت که نتایج ایـن گونه بود.

اثر مهار تکثیر زهر زنبور عسل توسط محققینی که زهر زنبور را بر روی تعدادی رده‌های سرطانی بررسی کردند نیـز مشـاهده شـده است. Liu و همکـارانش[۲۲] گـزارش دادنـد کـه زهـر زنبـور تکثیـر سلول‌های ملانومای موشی را در شرایط درون تنی و برون تنی مهار می‌کند. Chu و همکارانش[۲۴] گزارش کردند کـه زهـر زنبـور عسـل موجب مهار رشـد سـلول‌هـای کارسـینومای کبـدی و سـلول‌هـای اوستئوسارکومای MG63 می‌گردد. Chen و همکارانش[۲۵] نیـز اثبـات کردند که زهر زنبور در سلول‌هـای اوستئوسـارکوما موجـب مـرگ آپوپتوزی سلول‌های U2OS از طریق بیان Fas می‌شود.

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها نشـان داد در سـلول‌هـای تیمـار شده بـا IC_{50}، کوچـک شـدن سـلول، تجمـع سـلولی، سیتوپلاسـم حباب‌دار، تغییر شکل سـلولی، چروکیـدگی سـلول، کـاهش تعـداد سلول‌ها و از دست رفتن حالت طبیعی سیتوپلاسم و هسته مشـاهده می‌شود که می‌توانند به دلیل آپوپتوز باشند که با بررسی‌هـای زریـن نهاد و همکارانش و همچنین ابراهیم و همکارانش تطابق دارد.[۲۶و۲۷]

با توجه به داده‌های بدست آمده اثبات شد که مرگ سلولی القـا شده با زهر زنبور از نوع آپوپتوز می‌باشد. در تائید داده‌های بدسـت آمده از این آزمایش، نـوع مـرگ القـا شـده توسـط زهـر زنبـور در

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های سرطانی در شرایط برون‌تنی (in vitro) و درون‌تنی (in vivo) در پژوهش‌هایی توسط سایر محققین گزارش شده است. Jang و همکارانش[۲۸] دریافتند که زهر زنبور موجب القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطان ریه NCI-H1299 شده و این عمل از طریق مهار بیان COX2 صورت می‌گیرد. Moon و همکارانش[۲۳] نشان دادند که تیمار سلول‌های لوکمیایی u937 با زهر زنبور، باعث القای آپوپتوزیس از طریق کاهش بیان چرخه سیگنالینگ AKt، ERK می‌گردد. Orsalic و همکارانش[۲۹] زهر زنبور را بر روی سلول‌های کارسینومای پستانی در شرایط برون تنی بررسی کردند و با استفاده از آزمون MTT دریافتند که زهر زنبور در زمان ۲٤، ٤۸، ۷۲ ساعت در دوزهای ۲/۱۵ و ۱/٤۳ میکروگرم بر میلی‌گرم موجب ۵۰ درصد مرگ و میر سلول‌ها می‌شود. همچنین آنالیز فلوسیتومتری annexin نشاندار با فلورسئین و پروپودیوم یداید تکثیر این سلول‌ها را ۳ ساعت بعد از تیمار این سلول‌ها با دوز ۲/۸۵ میکروگرم بر میلی لیتر حدود ۵۰ درصد آپوپتوزیس نشان داد. در تحقیقاتی زهر زنبور بر سلول‌های فیبروبلاست سینوویال اثر داده شد و مشخص گردید زهر زنبور در دوز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به دوز و زمان موجب القای اثرات سمی و فعال کردن چرخه مرگ آپوپتوزیس با کاهش بیان Bcl2، افزایش بیان bax و کاسپاز ۳ در این سلول‌ها می‌شود.[۱۹و۳۰]

داده‌های حاصل از قطعه‌قطعه شدن DNA در این مطالعه نشان داد که نوع مرگ سلولی القا شده توسط زهر زنبور آپوپتوزیس بوده و ۵۰ درصد این سلول‌ها دچار مرگ سلولی آپوپتوزیس شدند. در برخی سلول‌ها در دوزهای بالاتر شکستگی DNA مشاهده نگردید که می‌تواند مرگ سلولی در این غلظت‌ها به دلیل لیز شدن سلول‌ها و نکروز باشد و لذا به همین علت هیچ گونه قطعه قطعه شدنی مشاهده نشد.

در نهایت باید گفت که داروی ضد سرطان ایده‌آل دارویی است که قادر باشد به طور اختصاصی سلول سرطانی را از بین ببرد، ولی متأسفانه برخلاف داروهای ضد میکروبی که اثرات سمی کمتری بر روی سلول‌های سالم دارند، اغلب داروهای ضد سرطان سلول‌های سالم در حال رشد را نیز می‌کشند و باعث بروز نکروز می‌گردند که ممکن است جان بیمار به مخاطره بیافتد. بنابراین کمتر بودن اثر نکروتیک زهر زنبور در مقایسه با ترکیبات دیگر از نظر درمانی و صنعت دارو سازی مزیت بزرگی به حساب می‌آید که با شناسایی مسیر راه اندازی آپوپتوز تحت تاثیر زهر زنبور می‌توان این زهر را به تنهایی یا در کنار سایر داروها در درمان سرطان به کار برد.

References

1. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. World J Clin Oncol. 2016; 7(1): 54-86.
2. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L. Current challenges in cancer treatment. Clin Ther. 2016; 38(7): 1551-1566.
3. Shahramyar Z, Zare Mirakabadi A, Morovati H. Cytotoxicity effect of ICD-85 (Venom-derived peptides) on promyelocytic cancer cell lines (HL-60). Med Sci. 2012; 21(4): 238-243. [In Persian].
4. Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Hinshaw HD, Jalal SI, et al. DNA repair targeted therapy: the past or future of cancer treatment? Pharmacol Ther. 2016; 160: 65-83.
5. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. Int J Mol Sci. 2018; 19(2): 1-9.
6. Li L, Huang J, Lin Y. Snake venoms in cancer therapy: Past, present and future. Toxins (Basel). 2018; 10(9): 1-8.
7. Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Bee venom (*Apis Mellifera*) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains: Bee venom an effective potential for bacteria. J Pharmacopuncture. 2016; 19(3): 225-230.
8. Babaie M, Ghaempanah A. *Evaluation of hemolytic activity and biochemical properties of Apis mellifera* bee venom on NIH laboratory mice. J Neyshabur Univ Med Sci. 2020; 8(3): 25-34.
9. Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Honey bee venom (*Apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time. J Pharmacopuncture. 2015; 18(4): 7-11.
10. Wehbe R, Frangieh J, Rima M, El Obeid D. Bee Venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. Molecules. 2019; 24(16): 1-13.
11. Babaie M, Zolfagharian H, Zolfaghari M, Jamili S. Biochemical, hematological effects and complications of *Pseudosynanceia Melanostigma* envenoming. J Pharmacopuncture. 2019; 22(3): 140-146.
12. Selenius LA, Lundgren MW, Jawad R, Danielsson O, et al. The cell culture medium affects growth, phenotype

www.SID.ir

Archive of SID

expression and the response to selenium cytotoxicity in A549 and HepG2 cells. Antioxidants (Basel). 2019; 8(5): 1-14.

13. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol. 2015; 111: 1-3.
14. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. Cold Spring Harb Protoc. 2018(6): 1-4.
15. Naseri M, Hesami Tackallou S, Mahdavi M, et al. Induction of apoptosis in K562 leukemia cells upon exposure to a derivative from 4-aryl-4H chromenes family. AUMJ. 2012; 1(2): 109-116. [In Persian].
16. Chaisakul J, Hodgson WC, Kuruppu S, Prasongsook N. Effects of animal venoms and toxins on Hallmarks of cancer. J Cancer. 2016; 7(11): 1571-1578.
17. Mahmoodzadeh A, Morady A, Zarrinnahad H, et al. Isolation of melittin from bee venom and evaluation of its effect on proliferation of gastric cancer cells. Tehran Univ Med J. 2013; 70(12): 760-767. [In Persian].
18. Moon DO, Park SY, Choi YH, et al. Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downer-gulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. Toxicon. 2008; 51(1): 112-120.
19. Hong SRG, Yang H, Yin C, Koh H, et al. Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. Toxicon. 2005; 46: 39-45.
20. IP SW, Wei HC, Lin JP, Kuo H, et al. Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. Anti-cancer Res. 2008; 28(2): 833-842.
21. Alizadehnohi M, Nabiuni M, Nazari Z. The lethal effect of honey bee venom on human ovarian cancer cisplatin resistance cell line A2780cp. Int Con Envir Biomed Biotechnol. 2012; 41: 46-49.
22. Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melano-macells In-vitro and growth of murine B16 melanomas Invivo. Pharm Pharmacol. 2002; 54(8): 1083-1089.
23. Moon DPS, Heo M, Kim K, Park C, et al. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downre gulation of ERK and Akt. Int Immunopharmacol. 2006; 6: 1796-1807.
24. Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, Chang HC, et al. Phospholipase A_2-independent Ca entry andsubsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. Life Sci. 2007; 80: 364-369.
25. Chen YQ, Zhu ZA, Hao YQ, Dai KR, et al. Effect of melittin on apoptosis and necrosis of U2 OScells. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2004; 2(3): 208-209. [Article in Chinese].
26. Ebrahim K, Vatanpour H, Zare A, Shirazi FH, et al. Anticancer activity a of Caspian cobra (*Naja naja oxiana*) snake venom in human cancer cell lines via induction of apoptosis. Iran J Pharm Res. 2016; 15: 101-112.
27. Zarrinnahad H, Mahmoodzadeh A, Hamidi MP, Mahdavi M, et al. Apoptotic effect of melittin purified from Iranian honey bee venom on human cervical cancer HeLa cell line. Int J Pept Res Ther. 2018; 24(4): 563-570.
28. Jang MH, Shin MC, Sabina LS, Han SM, et al. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. Pharmacol Sci. 2007; 91: 95-104.
29. Orsalic N. Potentiation of bleomycin lethality in Hela and V79 cells by bee venom. Cytotoxicity of bee venom. 2009; 60(3): 317-326.
30. Yeo SW, Seo JC, Choi YH, Jang KJ. Induction of growth inhibition and apoptosis by bee venom in human breast carcinoma MCF-7 cells. Kor Acup Mox Soc. 2003; 20(3): 45-62.

www.SID.ir

Archive of SID

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences

Alborz University of Medical Sciences Journal, October 2020, Vol. 9, No. 4: 357-366 *Original Article*

Evaluation of Anticancer Effects Induced by *Apis mellifera* Venom on Breast Cancer Cell Line

Hossein Zolfagharian*[1], Sima Khalilifard Borojeni[2], Mahdi Babaie[1,3]

[1] *PhD, Department of Venomous Animals and Antinenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran*

[2] *MsC, Department of Venomous Animals and Antinenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran*

[3] *MsC,Young Researchers and Elites club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

***Corresponding Author:**
PhD, Department of Venomous Animals and Antinenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran

Tel: 02634570038
E-mail: zolfagharianh@yahoo.com

Received:18 Dec. 2019; Accepted: 18 Apr. 2020

Abstract

Background: In recent years, the number of people with cancer has increased. For this reason, different drugs have been suggested for the treatment of cancer, but none of them has resulted in complete remission. Many bio-toxins are biologically active compounds with anticancer activity. In the meantime, bee venom (BV) has a potent anti cancer and tumor effects. The aim of present study is evaluation of BV anticancer effects on breast cancer cell line (MDA-MB-231).

Methods: Crude bee venom was obtained from *Apis mellifera* and the amount of its protein was determined. MDA-MB-231 cancer cell line was cultured and then the cells were exposed to 1.56, 3.125, 3.25, 6.25, 12.5, 25 and 50 µg/ml of bee venom for 24 and 48 h, respectively. The morphology and apoptosis were evaluated and cell viability was determinedby MTT assay.

Results: MTT assay showed that BV at concentration 6.25 µg/ml for MDA-MB-231 killed 50% of cells ($p<0.05$). Morphological analysis and the obtained data indicated that cell death caused by BV was induced apoptosis.

Conclusion: Findings indicated that BV have anticancer effects and with further investigation, it can be used in production of anticancer drugs.

Keyword: Bee Venom, Breast cancer, Apoptosis

www.SID.ir