Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:47 +0330 on Friday September 22nd 2017

مقاله پژوهشی

اثر هم افزایی کاربرد توأم زهر زنبور عسل و۲۵،۱– دی هیدروکسی ویتامینD3 برالقای تمایز رده ی سلولی سرطانی پرومیلوسیتی HL-60

دکتر هما محسنی کوچصفهانی*، دکتر کاظم پریور**، دکتر محمد نبیونی*، مریم رحیمی***

دریافت : ۸۸/۷/۲۳ ، پذیرش : ۸۸/۱۲/۱۵

چکیده:

مقدمه و هـدف : لوسـمی حـاد پرومیلوسـیتی (Acute promyelocytic leukemia) یکـی از انـواع لوسـمی هـای حـاد بـا جابجـایی کروموزوم۱۵ و۱۷ [T(15, 17)] است که توانایی تبدیل به سلول های بالغ را نداشته ودائماً تکثیر می شوند. در سـال هـای اخیـر غیر از شیمی درمانی ترکیبی، جهت درمان این نوع از سلول های سرطانی نابالغ از روش جدید تمایز درمـانی بـه وسـیله عوامـل تمایز دهنده استفاده می شود .چون استفاده از غلظت های بالای تمایز دهنده ها بدلیل اثرات جانبی امکان پذیر نیست لـذا سـعی می شود با به کار بردن ترکیباتی همراه با این مواد، قدرت تمایزی آنها افزایش یابد. دراین مطالعه اثر زهر زنبور عسل و۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 به تنهایی و همراه با هم بر روی تمایز سلول های سرطانی HL-60 بررسی شده است.

روش کار : در این مطالعه ی تجربی در محـیط آزمایـشگاهی، غلظـت هـای سـمی و غیـر سـمی زهـر زنبـور عـسل و۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 بر روی سلول های HL-60 با استفاده از روش های شمارش سلولی با تریپـان بلـو و MTT assay مـورد سنجش قرار گرفت .بعلاوه ایجاد تمایز روی این رده ی سلولی توسط رنگ آمیزی رایت ـ گیمسا و تست NBT بررسی شد. جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS و آزمون آماری one-way ANOVA استفاده گردید.

نتایج : نتایج به دست آمده نشان داد که زهر زنبور و ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتـامین D3 هـر دو در الگـویی وابـسته بـه دوز و زمان درغلظت های بالا موجب مرگ سلولی و در غلظت های پایین موجب مهار تکثیـر ایـن سـلول هـا مـی گردنـد. ۱ ،۲۵- دی هیدروکسی ویتامینD3 در غلظت ۵ nM در طول ۷۲ ساعت موجب تمایز این سلول ها به سمت مونوسیت مـی شـود. زهـر در غلظت ۲/۵ μ g/ml فقط باعث مهار تکثیر می شود و تأثیری بر تمایز سلول ها ندارد در حالی کـه در ترکیـب بـا غلظـت ۵nM از ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامینD3 قدرت تمایزی و ضد تکثیری آن افزایش می یابد.

نتیجه نهایی : زهر زنبور عسل در غلظت های غیر سمی و مهار کننده ی تکثیر می تواند همراه با ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 توان ضد تکثیری و تمایزی آن را به سمت مونوسیت افزایش دهد.

کلید واژه ها: زهر زنبور عسل/ رده‌ی‌سلولی سرطانی پرومیلوسیتی HL-60 / تمایز درمانی/ ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامینD3

مقدمه :

بیـشترسلول هـای سـرطانی مکانیـسم هـای کنتـرل کننده رشد، تقسیم و تمـایز سـلولی را ازدسـت داده و بـه صورت کنترل نشده ای به تکثیـر ادامـه مـی دهنـد . ایـن سلول ها در مراحل اولیه ی رشد باقی می مانند. آنها قادر به تبدیل به سلول های بالغ نیستند و نمی توانند بر اساس مرگ برنامه ریزی شده از بین بروند (۱،۲). لوسمی حاد از جمله نـوع پرومیلوسـیتی جـزء بیماریهـای بـدخیم خـون می باشد .در این بیماری ابتدا اختلال در سلول های پیش ساز خون به وجود می آید .تکثیر زیاد و غیر قابـل کنتـرل سلول های خون ساز اولیه در مغز استخوان همراه با عـدم تمایز این سلول ها بـه رده ی بـالغ، باعـث تجمـع فـراوان

* استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران (Kouchesfehani@yahoo.com)

** استاد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

*** کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی جانوری دانشگاه تربیت معلم تهران

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:47 +0330 on Friday September 22nd 2017

سلول های بلاست بدخیم در مغز استخوان و در نهایت خون می شود. از برنامه های درمانی که تا به امروز برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته است شیمی درمانی وپرتو درمانی می باشد (۳). در شیمی درمانی از داروهای سیتوتوکسیک به منظور از بین بردن سلول های بلاست بدخیم استفاده می شود. اما در این روش درصد زیادی از سلول های سالم خون ساز به همراه سلول های بدخیم از بین می روند . بعلاوه شیمی درمانی به تنهایی اغلب همراه با توسعه مقاومت دارویی و سمیت سیستمیک است که اثرات مفید شیمی درمانی را محدود می نماید.

در سال های اخیر تحقیقات گسترده ای جهت یافتن داروهایی که بتوانند به جای از بین بردن سلول های بدخیم، باعث مهار تکثیر و پیشبرد تمایز آنها به سمت رده ی بالغ شوند انجام شده است. روش تمایز درمانی در دهه ی اخیر مورد توجه و استفاده فراوانی قرار گرفته است (۴،۵). از جمله مواد مورد استفاده دراین روش می توان به مشتقات ویتامین A و ویتامین D و همچنین انواع سایتوکین ها اشاره کرد (۶،۷).

HL-60 یک رده ی سلولی سرطان خون است که از بیماران مبتلا به لوسمی حاد پرومیلوسیتی گرفته شده است. این سلول ها در مرحله ی پرومیلوسیتی متوقف شده و به سرعت تکثیر می شوند و توانایی تبدیل به سلول های بالغ را ندارند. مطالعات قبلی نشان داده که ۲۵،۱ - دی هیدروکسی ویتامین D3 با نام متداول کلسیتریول علاوه بر نقش مهم خود در هومئوستازی کلسیم در بدن دارای توانایی ضد تکثیری است و همچنین دیده شده که باعث مهار تکثیر سلول های HL-60 و تمایز آنها به سمت رده ی مونوسیت می شود(۱۰-۸). از آن جایی که به کار بردن غلظت های بالای کلسیتریول سمی بوده و همچنین باعث به وجود آمدن اثرات جانبی، افزایش کلسیم می شوند برای مقابله با این محدودیت راه کار های دیگری ارائه شده است از جمله اینکه موادی همراه با غلظت های کم کلسیتریول به کار می برند تا اثرات تمایزی آن را افزایش دهند. مطالعات قبلی نشان داده برخی مواد که اثرات آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد تکثیری دارند توانایی این را دارند که همراه با غلظت های کم کلسیتریول توان تمایزی آن را افزایش دهند (۱۹-۱۱).

زنبوردرمانی درطب قدیم برای درمان بیماریهای مختلف ازجمله دردهای مفصلی، بیماریهای عفونی، بیماریهای پوستی و ... رواج داشته است. امروزه زهر زنبور در درمان بیماریهایی از قبیل آرتریت روماتوئید، دردهای التهابی و احشایی و همچنین سرطان مورد توجه قرار گرفته است. زهر زنبور عسل حاوی پپتید های مختلف ازجمله ملیتین ،آپامین، آدولاپین؛ آنزیم هایی از جمله فسفولیپاز A2 ، آمین های فعال بیولوژیک نظیر هیستامین ،اپی نفرین و اجزای غیر پپتیدی با خواص دارویی فراوان می باشد. با مطالعات انجام شده از سال ۱۹۸۵تا به حال مشخص شده است که زهر زنبور عسل، دارای خاصیت ضد التهابی و ضد سرطانی است (۲۴-۲۰).

با توجه به اثرات ضد التهابی و ضد سرطانی زهر زنبور عسل این مطالعه با هدف بررسی این مسئله که آیا به کارگیری توأم غلظت های مهار کننده ی تکثیر زهر زنبور عسل به همراه کلسیتریول می تواند توان ضد تکثیری و تمایزی کلسیتریول را افزایش دهد یا خیر؟ انجام گرفت.

روش کار:

کشت سلول و اثر زهر زنبور عسل و ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 : دراین مطالعه تجربی به روش in vitro ، ابتدا رده ی سلولی HL-60 (NCBI Code: C217) از موسسه ی پاستور ایران تهیه شد و درفلاسک کشت سلول در محیط کشت(RPMI 1640(Gibco,USA حاوی 10% FBS (Gibco,USA) و ۱٪ استرپتومایسین-پنی سیلین در فشار ۵٪ CO2 کشت داده شد. قبل از بررسی تأثیر دارو بر تکثیر رده سلولی HL-60 ابتدا تکثیر این سلول ها به تنهایی و بدون تأثیر دارو در محیط کشت بررسی شد . به این صورت که ابتدا با روش شمارش سلولی با تریپان بلو درصد زنده بودن سلول ها محاسبه شد تا بیش از ۹۰٪ باشد. سپس تعداد مشخصی سلول در هر خانه از پلیت ۲۴خانه ریخته شد (برای مثال ۵×۱۰^{۴}- ۴ سلول به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از خانه ها، نمونه برداری شد و تعداد سلول ها با روش شمارش سلولی با لام هماسیتومتر محاسبه گردید. برای بررسی اثرات دارویی بر سلول ها غلظت های لازم تهیه شد. ماده ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامینD3 (Roche,Swiss) دراتانول مطلق و زهرزنبور عسل در سرم فیزیولوژی حل شد و به این صورت محلول های اولیه ای به غلظت (۲mg/ml) زهر زنبو عسل و (۴μM) ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 به دست آمد. در مراحل بعدی برای بدست آوردن

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:47 +0330 on Friday September 22nd 2017

غلظت هایی در حدμ g/ml برای زهـر زنبـور، nM بـرای ١، ٢٥- دی هیدروکـسی ویتـامین D3 و بـرای کاسـتن اثرحلال ها بر روی سـلول هـا مـی بایـست جهـت رقیـق نمودن محلول اولیه از محیط کشت کامل استفاده نمود .

بررسی تکثیر و میزان سمی بودن مواد : جهت بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی میـزان تکثیـر سـلول هـا و بـه دسـت آوردن غلظت های سمی و غیر سمی، ابتدا چندین غلظـت از زهر زنبور عسل شـامل غلظـت μg/ml١٠، ٧/٥، ٢/٥،٥، ١، و ٥ /٠ بر روی سلول ها اثر داده شد. بدین صـورت کـه به ازای هر میلی لیتر محیط کشت $10^4 \times 5$ سـلول در هـر خانه از پلیت کشت ٢۴ خانه ریختـه شـد و غلظـت هـای مورد نظر در محیط، تنظیم گردید سپس با روش شمارش سلولی با تریپان بلو و سـنجشMTT درصـد سـلول هـای زنده و غلظت های سـمی و غیـر سـمی در طـول ٢۴، ۴٨ و٧٢ ساعت به دست آمد.

همچنین جهت بررسی اثـر ١، ٢٥- دی هیدروکـسی ویتامین D3 بر روی تکثیـر سـلول هـا و بـه دسـت آوردن غلظت های سمی و غیر سمی، ابتدا غلظت هـای مختلفـی از شکل فعال ویتامین D3 شامل غلظت هـایnM ٢٥،٥،١ و٥٠ تهیه شد و اثر آنها بر روی تکثیر سلول هـای HL-60 در مدت ٢۴، ۴٨ و٧٢ ساعت با روش شـمارش سـلولی بـا تریپان بلو وسنجش MTT بررسی شد.

تـستMTT بـرای بررسـی درصـد سـلول هـای زنـده : Dimethyl thiazole diphenile tetrazolium bromide یک نمک تترازولیم محلول در آب است که در محیط فنل، زرد رنگ ودر اثر آنزیم های دهیدروژناز که فقط در سلول های زنده فعال می باشند در حلقه ی MTT محلـول شکـستی ایجاد می نماید و به بلورهای آبـی فورمـازان غیـر محلـول تبدیل می شود. لذا با اسـتفاده از طـول مـوج ٥٧٠- ٥۴٠ نانومتر، میزان فورمازان که توسط ایزوپروپانـل اسـیدی یـا حلال های دیگر به شکل محلول درمی آیـد انـدازه گیـری می شود و به این وسیله، میزان توده ی سلول هـای زنـده تعیین می گردد. جهت روشMTT ابتدا تعداد مناسب سلول (برای مثال5×10^4- ۴ سلول به ازای هر میلی لیتر محـیط کشت) و غلظت مواد مورد نظر(برای مثال غلظتμg/ml ٢/٥ زهر زنبور) در خانه های یک پلیت ٢۴ خانه تنظیم شـد و برای هر غلظت از مـاده ی مـورد نظـر سـه خانـه در نظـر گرفته شد. بعـد از بـازه هـای زمـانی معـین(٢۴، ۴٨ و٧٢ ساعت) به هر خانه از پلیت های ٢۴ خانه ١٠٠ میکرولیتر محلولMTT (Sigma,UK) با غلظت ٥ میلی گرم درمیلی لیتـر افـزوده شـد. سـپس ۴ سـاعت در دمـای ٣٧درجـه سانتیگراد انکوبه گردید. دراین مرحله مـی تـوان بلورهـای فورمازان را توسط میکروسکوپ معکـوس در سـلول هـای زنده مشاهده کرد. بعد از این مرحله به هـر خانـه١ میلـی لیتر ایزوپروپانل اسیدی اضافه گردید و پس از گذشت ٣٠ دقیقه محتوای خانه ها چندین بار پیپتـاژ شـد تـا رسـوب داخل سلول ها بیرون بریزد. سپس محتـوای هـر خانـه در کووت مخصوص اسپکتروفتومتری خـالی گردیـد و میـزان جذب نوری(OD) در طول موج ٥٧٠ نانومتر اندازه گرفتـه شد. از محیط کشت خالی به عنوان صفر کننده دسـتگاه و از محیط کشت دارای سلول بدون حضور مواد مـورد نظـر به عنوان کنترل استفاده شد.

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

بررسی تمایز سلولی : بـرای بررسـی تـاثیر داروهـا بـر بلـوغ وتمایز سلول ها می توان از دو روش رنگ آمیـزی رایـت - گیمسا و آزمایش NBT استفاده کرد:

رنگ آمیزی رایت ـ گیمسا : پس از سانتریفوژ سوسپانسیون سلولی که در بازه ی زمانی معین در مجاورت مـواد مـورد نظر بوده و دور ریختن محیط رویـی، رسـوب سـلولی بـه آرامی با PBS شستشو داده شد. پـس از چنـد بـار پیپتـاژ نمودن رسوب سلولی، مقـداری از سـلول هـا بـر روی لام ریخته شد و به آرامی پخش گردید. پس از خـشک شـدن لام (لام باید در مجاورت هوا و در دمای معمولی آزمایشگاه خشک شود) سلول ها به مدت ١ دقیقه با متانول تثبیت و سپس به مدت ١ دقیقه با آب مقطر شستـشو داده شـدند و١ میلی لیتر از رنگ تهیه شده بـر روی لام ریختـه شـد، بعد از گذشت٣ تـا ٥ دقیقـه PBS ٠/٥ml بـر روی رنـگ ریخته شد وبعد از گذشت ۴ دقیقه لام بـه آرامـی بـا آب مقطر شست و شـو گردیـد (PBS یـک محلـول بـافر بـا pH=7 است و یک محیط خنثی را که مورد نیاز برای عمل رنگ رایت - گیمسا است فراهم می کند). لام آماده پـس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه قابل مشاهده می باشد.

آزمایش احیای NBT : نیترو بلو تتـرازولیم کلرایـد، نمـک زرد رنگی است که در اثر تولید آنزیم پر اکـسیداز، توسـط سـلول هـای فاگوسـیتوز کننـده از قبیـل نوتروفیـل هـا و مونوسیت ها احیـا مـی شـود و تبـدیل بـه مـاده ی تیـره رنگی می گردد که در داخل سلول های تمایز یافته قابـل

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:47 +0330 on Friday September 22nd 2017

مشاهده می باشد. برای انجام این تست ابتدا سوسپانسیون سلولی را که بازه زمانی مشخصی در معرض دارو بوده است شمارش نموده وسوسپانسیونی حاوی ۴×۱۰^{۴} سلول از آن تهیه شد. سپس این سوسپانسیون داخل لوله آزمایش ریخته شد وبه میزان هم حجم آن از محلول ۱٪ NBT حل شده در PBS شامل ۲۰۰ ng/ml از PMA به آن اضافه گردید وبه مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در این مدت سلول های تمایز یافته در پی بلع ذرات لاتکس یا ذرات دیگر پس از شروع راه متابولیکی هگزوز منوفسفات می توانند NBT زرد رنگ و شفاف را تبدیل به ماده فورمازان آبی نمایند. پس از مدت ۳۰ دقیقه میزان ۱۰ مایکرولیتر از این سوسپانسیون برداشت شد و بر روی لام نئوبار قرار داده شد و تعداد سلول های رنگ گرفته (که در آنها دانه های آبی رنگ بسیار تیره ای ، متمایل به قهوه ای تشکیل شده بود) شمارش گردید وا ز تقسیم تعداد این سلولها برتعداد کل سلول ها ضرب در ۱۰۰؛ در صد سلول های تمایز یافته به دست آمد.

آنالیز آماری : تمام آزمایش ها، حداقل سه بار تکرار گردید.جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS ,Version 13 و از روش one-way ANOVA استفاده شد و P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد ونمودارها با استفاده از نرم افزار Excell ترسیم شدند.

نتایج:

نتایج تکثیر رده سلولی HL-60 بدون تأثیر دارو : بررسی میزان تکثیر سلول های HL-60 در محیط کشت (بدون تأثیر دارو) با روش شمارش سلولی با تریپان بلو نشان داد که رشد این سلول ها سریع بوده بطوری که بعد از ۲۴ساعت کشت ازیک تعداد اولیه ۵×۱۰^{۴} سلول در هر میلی لیتر محیط کشت به $۱۰^{۴}\times$ (۰/۵± ۱۰/۵) افزایش یافت و در مجموع زمان دو برابر شدن این سلول ها تقریباً ۲۴-۳۶ ساعت بود.

اثر زهر زنبور عسل و ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 بر روی تکثیر سلول های HL-60 : بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی میزان تکثیر سلولهایHL-60 نشان داد که غلظتهای مختلف زهر زنبور عسل در بازه های زمانی مختلف بر روی سلول های HL-60 اثرات متفاوتی دارند. به این صورت که زهر زنبور در غلظت های بالای ۱۰μg/ml اثر کشندگی بسیار شدیدی دارد.غلظت هایμg/ml ۷/۵ و۵ هم به صورت وابسته به زمان و غلظت، موجب القای مرگ این سلول ها شدند. غلظت μg/ml ۲/۵ باعث مهار تکثیر سلولها شد به طوری که پس از طی ۷۲ ساعت بقایای سلول های مرده در محیط، تفاوتی با نمونه های کنترل نداشت و مهار تکثیر نسبت به نمونه کنترل در P<0.001معنی دار بود. غلظت های μg/ml ۱و۰/۵ نسبت به نمونه کنترل، هیچ تفاوت معنی داری در طی ۷۲ ساعت نشان ندادند (جدول۱).

جدول ۱ : درصد سلول های زنده HL-60 در حضور غلظت های مختلف زهر زنبور عسل در مقایسه با کنترل در مدت۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT assay.

	control	2.5μg/ml	5μg/ml	7.5μg/ml
24h	100±0	98.13±0.6	70.16±0.61**	38.26±0.37***
48h	100±0	91.33±0.27**	43.44±1***	15.34±0.65***
72h	100±0	83.3±0.43***	17±0.54***	8±0.55***

Mean ± (SEM) * P<0.05 , ** P<0.01 , *** P< 0.001

تعداد سلولهای اولیه 5×10^{4} سلول در هر میلی لیتر محیط کشت بود.

بررسی اثر ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامینD3 بر روی تکثیر سلول های HL-60 نشان داد که ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامینD3 در الگویی وابسته به زمان وغلظت، موجب القای مرگ سلولی ویا مهار تکثیر سلول های HL-60 می شود. بدین صورت که بیشترین اثر سایتوتوکسیک در غلظت ۵۰ nM و در طول ۷۲ ساعت مجاورت در معرض ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 به دست آمد . غلظتnM ۲۵ نیز اثر سایتوتوکسیک داشته و در طول ۷۲ ساعت موجب مرگ سلولی گردید. اما غلظت های ۵ nM و ۱بدون این که باعث مرگ سلولها شوند در الگویی وابسته به غلظت و زمان، موجب مهار تکثیر سلول ها شدند(جدول۲).

جدول ۲ درصد سلول های زنده HL-60 در حضور غلظت های مختلف ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 درمقایسه با کنترل در مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت باروش MTT assay.

	control	1nM Vd3	5nM Vd3	25nM V d3	50nM V d3
24h	100±0	98.29±0.68	96.31±0.26	85.23±0.53	75.17±0.81*
48h	100±0	92.89±0.60	86.52±0.94*	69.53±1***	57.1±1.1***
72h	100±0	87.87±0.37**	76.45±0.75***	50.9±0.53***	40.2±0.89***

Mean ± (SEM) * P<0.05 , ** P<0.01 , *** P< 0.001

تعداد سلولهای اولیه 5×10^{4} سلول در هر میلی لیتر محیط کشت بود.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:47 +0330 on Friday September 22nd 2017

بررسی کاربرد همزمان غلظت های مهاری ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 (۵ nM) و زهر زنبور عسل (۲/۵μg/ml) بر تکثیر سلول های HL-60 نشان داد که میزان مهار تکثیر سلولی به میزان معنی داری نسبت به حضور منفرد آنها افزایش می یابد و در طول ۴۸و ۷۲ ساعت میزان مهار تکثیر را افزایش می دهد. بنابراین زهر زنبور همراه با ویتامین D3 اثر هم افزایی در مهار تکثیر سلولهای HL-60 دارد(جدول۳).

جدول ۳ : درصد سلول های زنده HL-60 در نمونه کنترل، غلظت ۲/۵ μg/ml زهر زنبور عسل، غلظت ۵ nM ویتامین D3 و غلظت ۲/۵μg/ml زهر زنبور عسل همراه با ۵ nM ویتامین D3 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ساعت کشت در مقایسه با کنترل با روش MTT assay.

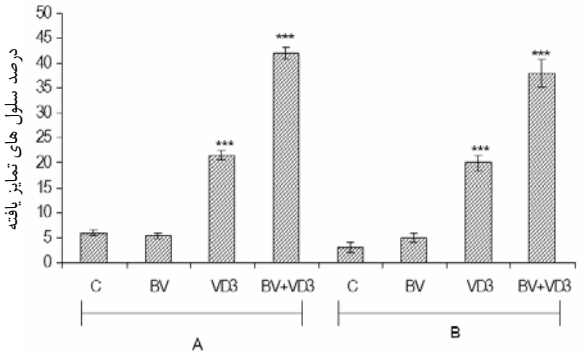
	control	bee venom	vitamin D3	Vitamin D3+bee venom
24h	100±0	98.36±0.3	97.24±0.6	95.39±0.47
48h	100±0	91.27±0.33**	86.87±0.74***	79.49±0.34***
72h	100±0	82.22±0.46***	76.65±0.55***	61.19±0.6***

Mean ± (SEM) * P<0.05 , ** P<0.01 , *** P< 0.001

اثرزهر زنبور و ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 بر تمایز سلول های HL-60 : بررسی های اولیه که بر اساس تغییرات مورفولوژیکی صورت گرفت نشان داد که ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 در غلظت ۵ نانومولار، تغییرات زیادی را در طول ۷۲ساعت در ارتباط با تمایز موجب می شود. غلظت های پایین تر نیزمی توانند در مدت زمان بیشتری این تمایز را ایجاد کنند .بر اساس این مشاهدات، غلظت ۵ نانومولار به عنوان غلظت مناسب، جهت ایجاد تمایز، طی ۷۲ ساعت انتخاب شد زیرا هم، دارای اثرات مهاری تکثیر و غیر سمی بود و هم نسبت به غلظت های پایین تر در مدت زمان کمتری (۷۲ ساعت) میزان مناسبی از تمایز را القا می کرد. سنجش NBT که بر اساس فعالیت آنزیمی مونوسیت ها استوار است تأیید کننده ی تمایز سلول ها در حضور ویتامین D_3 در مقایسه با نمونه ی کنترل بود.

بر اساس تغییرات مورفولوژیکی و همین طور تست NBT زهر زنبور درغلظت مهاری تکثیر یعنی غلظت ۲/۵ μg/ml هیچ گونه تغییری را مبنی بر پیشبرد تمایزاین سلول ها نشان نداد.

بررسی تغییرات مورفولوژیکی به وسیله ی رنگ آمیزی رایت –گیمسا وتست NBT نشان داد که کاربرد همزمان غلظت های ۵نانومولار ۱، ۲۵ -دی هیدروکسی ویتامین D3به عنوان القا کننده تمایز و ۲/۵μg/ml زهرزنبور به عنوان مهار کننده تکثیر در طی ۷۲ساعت میزان تمایز سلول ها را نسبت به۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 به تنهایی به طور معنی داری در سطح P<0.001 افزایش می دهد (نمودار۱).



نمودار ۱: درصد سلولهای تمایز یافته HL-60 درغلظت ۲/۵μg/ml زهر زنبور عسل ،غلظت ۵ nM ویتامین D3 و در غلظت توام درطول ۷۲ ساعت کشت در مقایسه با کنترل (A) بارنگ آمیزی رایت –گیمسا و (B) با روش NBT
(Mean±SEM) *** P<0.001

بحث:

نتایج به دست آمده نشان داد که زهر زنبور و۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامینD3 در الگویی وابسته به غلظت و زمان در غلظت های بالا موجب مرگ سلولی و در غلظتهای پایین موجب مهار تکثیر سلول ها می شوند. به طوری که زهر زنبور با غلظت۵μg/mlدر طول ۴۸ ساعت تقریباً باعث کشته شدن ۵۰٪ سلول ها و در غلظت۷/۵μg/ml، باعث کشته شدن ۸۵٪ سلول ها شد. ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 با غلظت ۲۵ nM در طول ۷۲ ساعت موجب کشته شدن۵۰ ٪ سلول ها گردید در حالی که با افزایش غلظت، درصد بیشتری از سلول ها دچار مرگ شدند. بعلاوه مشاهده شد که زهر زنبور با غلظت ۲/۵μg/ml و ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامینD3 با غلظت ۵nM بدون داشتن اثر سایتوتوکسیک باعث مهار تکثیر سلول ها شدند. مقایسه اثر زهر زنبور و ویتامین D3 نشان داد که در غلظت های غیر سمی ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 اثر مهاری قوی تری نسبت به زهر زنبور دارد. به طوری که ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامینD3 با غلظت

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:47 +0330 on Friday September 22nd 2017

۵ nM و زهرزنبور با غلظت۲/۵ μg/mlدر طول ۷۲ ساعت به ترتیب موجب ۲۳/۵۵٪ و ۱۶/۷٪ مهار تکثیر شدند. مطالعات قبلی نیز غلظت غیر سمی و مهاری ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 را ۵ nM گزارش کردند (۱۲،۱۴،۱۵،۱۷،۱۸) که نتایج مطالعه ی حاضر هم راستا با مطالعات مذکور بود و آنها را تأیید می کند. اثر هم زمان هر دو ماده در غلظت های غیر سمی موجب افزایش در مهار تکثیر سلول ها شد. به طوری که می توان گفت زهر زنبور موجب افزایش قدرت مهاری ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 می شود. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که ویتامین D3 با غلظت ۵nM در طول ۷۲ ساعت باعث ۱۷٪ تمایز سلول ها به مونوسیت می شود. درصد تمایز سلول های HL-60 در طول ۷۲ ساعت مواجه با ۵ nM از ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 توسط محققین دیگر۲۲٪ (۱۲) ۲۰٪ (۱۴) و ۱۹٪ (۱۵) گزارش شده است. که نتایج مطالعه‌ی حاضر هم راستا با مطالعات مذکور بود و آنها را تأیید می کند . اثر زهر زنبور بر تمایز این سلول ها در تحقیقات گذشته، گزارش نشده است اما در این پژوهش مشاهده شد که زهر، خود به تنهایی موجب تمایز سلول هایHL-60 نمی شود اما در ترکیب با ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 موجب افزایش چشمگیری در تمایز سلول ها به سمت مونوسیت می شود و توان تمایزی ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 را افزایش می دهد که در مقایسه با سلول هایی که فقط تحت تأثیر ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 قرار گرفته بودند در سطح P<0.001 معنی دار بود.

مطالعات گذشته، نشان دادند که۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامینD3 می تواند پاسخ های بیولوژیکی مثل تمایز سلولی را از طریق مسیرهای سیگنالینگ ژنومی به وسیله ی رسپتور ویتامین D3(VDR) و رونویسی ژنهای خاص ایجاد کند. برخی از مکانیسم ها ی شناخته شده در این رابطه به قرار زیر هستند:

۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 می تواند به طور مستقیم با مهار Cyclin-dependent kinase (CDK1) و سنتز cyclin ها و به طور غیر مستقیم با افزایش رونویسی ژنهای مهار کننده ی CDK1 مثل P21 وP27 عمل نماید (۲۸-۲۵). ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 علاوه بر مهار تکثیر سلول های سرطانی موجب کاهش فعالیت برخی انکوژن ها، کاهش برخی فاکتور ها که در سلولهای سرطانی افزایش یافته مثل NF-κB ، افزایش فعالیت مهار کننده های تومور وافزایش فعالیت کیناز ها می شود و در نتیجه در سلول هایی که تکثیرشان مهار شده است موجب پیشبرد تمایز آنها به سمت بلوغ می گردد (۳۲-۲۹).

از آنجایی که غلظتهای بالای ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامینD3 سمی بوده و منجر به ایجاد اثرات جانبی می گردد ، از غلظت های درحد نانومولار جهت ایجاد تمایز استفاده می شود. بنابراین راه کار دیگر استفاده از موادی است که اثرات ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامینD3 را تقویت می کنند.در مطالعات گذشته نشان داده شد که برخی ترکیبات نظیر capsaicin (۱۱)، artemisinin (۱۴) indirubin (۱۵) Honokiol and magnolol (۱۹) Parathenolide (۱۲) و عوامل ضد التهابی غیر استروئیدی (۱۷) توانایی این را دارند که قدرت تمایزی شکل فعال ویتامین D3 را افزایش دهند.

با توجه به بررسی هایی که در این مطالعه انجام گرفت دیده شد که زهر زنبور عسل نیز، توان تمایزی ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 را افزایش می دهد. اما مکانیزم عمل آن هنوز مشخص نشده است. با توجه به مطالعات قبلی موادی که می توانند توان تمایزی ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 را افزایش دهند معمولاً یک یا چند عملکرد آن را تقویت می کنند. برای مثال استیل سالسیلیک اسید و استامینوفن به عنوان نماینده های غیر استروئیدی ضد التهابی و نیز پاراتنولید از طریق مهار بیان NF-κB موجب افزایش توان تمایزی ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 به سمت مونوسیت می شوند. (۱۲،۱۸). artemisinin از طریق افزایش فعالیت PKC توان تمایزی۲۵،۱ - دی هیدروکسی ویتامینD3 را به سمت مونوسیت افزایش می دهد(۱۴). ترکیبات غیر استروئیدی ضد التهابی به علاوه با مهار فعالیت سیکلو اکسیژناز (COX)باعث افزایش مقدار cAMP در سلول می شوند و همراه با ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامینD3 توان تمایزی آن را به مونوسیت افزایش می دهند (۱۷). مطالعات گذشته در رابطه با ترکیبات و مکانیسم های اثر زهر زنبور روی سلول های مختلف، نشان دادند که زهر زنبور عسل با ترکیبات فعالی از قبیل ملیتین و فسفولیپاز A2 دارای توانایی مهار بیان سیکواکسیژناز و فاکتور هسته ای κB(NF-κB) است(۲۲،۲۳).

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:47 +0330 on Friday September 22nd 2017

نتیجه نهایی:

می توان گفت زهر زنبورعسل از طریق مهار فعالیت NF-κB و Cox می تواند توان تمایزی ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 را افزایش دهد. البته زهر زنبور عسل برای اینکه بتواند عمل تمایزی خود را انجام دهد حتماً به مقدار کمی از ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 نیاز دارد، چون خود زهر زنبور عسل به تنهایی قادر به تمایز این سلول ها به مونوسیت نمی باشد که این نتیجه هم مشابه با مطالعات گذشته ای است که نشان دادند هیچ یک از موادی که توان تمایزی۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 را افزایش می دهند به تنهایی قادر به پیشبرد تمایز این سلول ها به سمت بلوغ نیستند.

سپاسگزاری :

از همکاری صمیمانه آقای دکتر غلامی مدیر عامل محترم شرکت داروسازی زهرآوی و همچنین از استاد محمود شعبانی ونیز از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت معلم که امکانات اجرایی این طرح پژوهشی را فراهم نمودند تشکر وقدردانی می گردد .

منابع :

1. Leszczyniecka M ,Roberts T ,Dent P ,Grant S ,Fisher P. Differentiation therapy of human cancer : basic science and clinical application. Pharmacol Ther 2001;90:105-156
2. Kitada S , Pedersen I , Schimmer A , Reed J. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. Oncogene 2002;21:3459-3474
3. Johnstone WR , Ruefli AA, Lowe WS. Apoptosis : A link between cancer genetics and chemotherapy. Cell 2002;108:153-164
4. Spira AI, Carducci MA. Differentiation therapy. Curr Opin Pharmacol 2003; 3: 338-343
5. Miller W, Waxman S. Differentiation induction as a treatment for hematologic malignancie . Oncogene 2002; 21 : 3496-3506
6. Kawamoto H, Minato N. Myeloid cells. Biochem Cell Biol 2004; 36:1374-1379
7. Lotem1 J, Sachs L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. Oncogene 2002; 21: 3284 – 3294
8. Matsuhisa1 T, Mori Y. Mode of differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60, by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. Blood Cells Mol Dis 1995; 21: 42-48
9. Lal H, Pandey R, Aggarwal SK. Vitamin D: nonskeletal actions and effects on growth. Nutr Res 2000; 19: 1683-1718
10. Lips P. Vitamin D physiology. Biophys Mol Biol 2006; 92 : 4-8
11. Kang NS , Chung WS , Kim ST . Capsaicin potentiates vitamin D3 and retinoic acid – induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells . Eur J Pharmacol 2001; 420 : 83- 90
12. Kang NS, Kim HS, Chung WS , Lee HM , Kim JH, Kim ST. Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin D3- induced differentiation of human leukaemic HL- 60 cells into monocytes by parthenoide via inhibition of NF-k B activity. Br J Pharmacol 135:1235-1244
13. Kim HS, Kang NS, Kim IH, Kim ST. Potentiaton 1,25-dihydroxyvitamin D3 - induced differentiation of human leukemia cells into monocytes by costunolide, a germacranolide sesquiterpene lactone. Biochem Pharmacol 2002; 64 :1233-1242
14. Kim HS, Kim JH, Kim ST. Differential involvement of protein kinase C in human promyelocytic leukemia cell differentiation enhanced by artemisinin. Eur J Pharmacol 2003; 482: 67-76
15. Kim HS, Kim WS, Choi JS , Kim CY, Kim ST. Enhancing effect of indirubin derivative on 1,25 dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid- induced differentiation of HL-60 leukemia cells . Leuk Res 2006;22: 153-161
16. Kim SD, Kim HS, Song HJ, Chang TY, Hwang YS, et al. Enhancing effects of ceramide derivatives on 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of human HL-60 leukemia cells. Life Sci 2007;81 :1638–1644
17. Liuch LG, Ayala MJ, Alcain JF, Buron IM, Quesada MJ, Navas P. Inhibition of cox activity by NSAIDs or ascorbate increases cAMP levels and enhances differentiation in 1,25-dihydroxyvitamin D3- induced HL-60 cells. Arch Biochem Biophys 2005; 436: 32-39
18. Sokoloski AJ, Sartorelli CA. Induction of differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D3. Leuk Res 1997; 22: 153-161
19. Fong FW, Wing T, Se KA, Poon HK, Wang C. Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Biochem Cell Biol 2005; 37: 427-441
20. Lee YJ, Kang SJ , Kim BM, Kim YJ, Woo HD, Chun HV. Cytotoxicity of honeybee (Apis mellifera) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. Chem Biol Interact 2007; 169 : 189–197
21. Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in vitro and growth of murine B16 melanomas in vivo. Pharm Pharmacol 2002; 54 (8) :1083–1089
22. Park HJ, Lee SH, Son DJ, Kim KH, Song HS. 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: 3504−3515.
23. Park HJ, Son DJ, Lee CW, Choi MS, Lee US, Song HS. Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with IkappaB kinase. Biochem Pharmacol 2007; 73: 237-247
24. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song SH, Lee CK , Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis,pain-releasing,and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds . Pharmacol Ther 2007; 115: 361-763
25. Juan G, Li X , Darzynkiewicz1 Z. Phosphorylation of retinoblastoma protein assayed in individual HL-60 cells during their proliferation and differentiation. Exp Cell Res 1998; 244: 83–92
26. Lie P, Li C, Zhao X, Zhang X , Nicosia SV , Bai W. p27(Kip1) stabilization and G1 arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin-dependentkinase 2 and Skp1-Cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. J Biol 2004 ; 279: 25260–25267
27. Liue M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. Genes Dev 1998;10: 142–153
28. Luong QT, Koeffler PH. Vitamin D compounds in leukemia. Hematol Oncol 2005; 97: 195-202.
29. Tse WA, Wan KC, Shen LX, Zhu YG, Chung YH, Yang M, Fong FW. 1,25–dihydroxy vitamin D3 induced biphasic NF-KB responses during HL-60 leukemia cells differentiation through protein induction and PI3K/AKt- dependent Phosphorylation/ degradation of IKB. Cell Res 2007; 313:1722-1734
30. Tsiftsoglou A, Pappas SI, Vizirianakis SI. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. Pharmacol Ther 2003; 100: 257-290
31. Tsiftsoglou AS, Wong W. Molecular and cellular mechanisms of leukemic hemopoietic cell differentiation: an analysis of the fiend system. Anticancer Res 1985; 5: 81–99
32. Wang X, Studzinski GP. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) defines the first phase of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of HL60 cells. J Cell Biochem 2001; 80 :471–482

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:47 +0330 on Friday September 22nd 2017