

اثر هم افزایی کاربرد توأم زهر زنبور عسل و ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 بر القای 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 هدف: لوسمی حاد پرومیلوسیتی (Acute promyelocytic leukemia) یکی از انواع لوسمی های حاد با جابجایی کروموزوم ۱۵ و ۱۷ [T(15, 17)] است که توانایی تبدیل به سلول های بالغ را نداشته و دائماً تکثیر می شوند. در سال های اخیر غیر از شیمی درمانی ترکیبی، جهت درمان این نوع از سلول های سرطانی نابالغ از روش جدید تمایز درمانی به وسیله عوامل تمایز دهنده استفاده می شود. چون استفاده از غلظت های بالای تمایز دهنده ها بدلیل اثرات جانبی امکان پذیر نیست لذا سعی می شود با به کار بردن ترکیباتی همراه با این مواد، قدرت تمایزی آنها افزایش یابد. در این مطالعه اثر زهر زنبور عسل و ۲۵،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 محیط آزمایشگاهی، غلظت های سمی و غیر سمی زهر زنبور عسل و ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 بر روی سلول های HL-60 با استفاده از روش های شمارش سلولی با تریپان بلو و MTT assay مورد سنجش قرار گرفت. بعلاوه ایجاد تمایز روی این رده ی سلولی توسط رنگ آمیزی رایبت - 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 ویتامین D3 هر دو در الگوی وابسته به دوز و زمان در غلظت های بالا موجب مرگ سلولی و در غلظت های پایین موجب مهار تکثیر این سلول ها می گردند. ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 در غلظت ۵ nM در طول ۷۲ ساعت موجب تمایز این سلول ها به سمت مونوسیت می شود. زهر در غلظت ۲/۵ μ g/ml فقط باعث مهار تکثیر می شود و تأثیری بر تمایز سلول ها ندارد در حالی که در ترکیب با غلظت ۵nM از ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 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 / رده ی سلولی سرطانی پرومیلوسیتی HL-60 / تمایز درمانی / ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3

مقدمه:

مرگ برنامه ریزی شده از بین برونند (۱،۲)، لوسمی حاد از جمله نوع پرومیلوسیتی جزء بیماریهای بدخیم خون می باشد. در این بیماری ابتدا اختلال در سلول های پیش ساز خون به وجود می آید. تکثیر زیاد و غیر قابل کنترل سلول های خون ساز اولیه در مغز استخوان همراه با عدم تمایز این سلول ها به رده ی بالغ، باعث تجمع فراوان

بیشتر سلول های سرطانی مکانیسم های کنترل کننده رشد، تقسیم و تمایز سلولی را از دست داده و به صورت کنترل نشده ای به تکثیر ادامه می دهند. این سلول ها در مراحل اولیه ی رشد باقی می مانند. آنها قادر به تبدیل به سلول های بالغ نیستند و نمی توانند بر اساس

* 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

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 و پرتو 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 در این 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 (۸-۱۰). 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، ضد التهابی و ضد تکثیری دارند توانایی این را دارند که همراه با غلظت های کم کلسیتریول توان تمایزی آن را افزایش دهند (۱۱-۱۹).

زنبوردرمانی در طب قدیم برای درمان بیماریهای مختلف از جمله دردهای مفصلی، بیماریهای عفونی،

بیماریهای پوستی و ... رواج داشته است. امروزه زهر زنبور در درمان بیماریهایی از قبیل آرتريت روماتوئید، دردهای التهابی و احشایی و همچنین سرطان مورد توجه قرار گرفته است. زهر زنبور عسل حاوی پپتید های مختلف از جمله 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 ۱۹۸۵ تا 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: در این مطالعه تجربی به روش *in vitro*، ابتدا رده ی سلولی HL-60 (NCBI Code: C217) از موسسه ی پاستور ایران تهیه شد و در فلاسک 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 ۲۴ خانه ریخته شد (برای مثال $4 \times 10^5 - 5$ 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 ویتامین D3 (Roche, Swiss) در اتانول مطلق و زهر زنبور 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

محلول MTT (Sigma,UK) با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر افزوده شد. سپس ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در این مرحله می توان بلورهای فورمازان را توسط میکروسکوپ معکوس در سلول های زنده مشاهده کرد. بعد از این مرحله به هر خانه ۱ میلی لیتر ایزوپروپانل اسیدی اضافه گردید و پس از گذشت ۳۰ دقیقه محتوای خانه ها چندین بار پیتاژ شد تا رسوب داخل سلول ها بیرون بریزد. سپس محتوای هر خانه در کووت مخصوص اسپکتروفتومتری خالی گردید و میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گرفته شد. از محیط کشت خالی به عنوان صفر کننده دستگاه و از محیط کشت دارای سلول بدون حضور مواد مورد نظر به عنوان کنترل استفاده شد.

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

بررسی تمایز سلولی: برای بررسی تاثیر داروها بر بلوغ و تمایز سلول ها می توان از دو روش رنگ آمیزی راییت - گیمسا و آزمایش NBT استفاده کرد:

رنگ آمیزی راییت - گیمسا: پس از سانتیفریژ سوسپانسیون سلولی که در بازه ی زمانی معین در مجاورت مواد مورد نظر بوده و دور ریختن محیط رویی، رسوب سلولی به آرامی با PBS شستشو داده شد. پس از چند بار پیتاژ نمودن رسوب سلولی، مقداری از سلول ها بر روی لام ریخته شد و به آرامی پخش گردید. پس از خشک شدن لام (لام باید در مجاورت هوا و در دمای معمولی آزمایشگاه خشک شود) سلول ها به مدت ۱ دقیقه با متانول تثبیت و سپس به مدت ۱ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند و ۱ میلی لیتر از رنگ تهیه شده بر روی لام ریخته شد، بعد از گذشت ۳ تا ۵ دقیقه ۰/۵ml PBS بر روی رنگ ریخته شد و بعد از گذشت ۴ دقیقه لام به آرامی با آب مقطر شست و شو گردید (PBS یک محلول بافر با pH=7 است و یک محیط خنثی را که مورد نیاز برای عمل رنگ راییت - گیمسا است فراهم می کند). لام آماده پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه قابل مشاهده می باشد. آزمایش احیای NBT: نیترو بلو تترازولیم کلراید، نمک زرد رنگی است که در اثر تولید آنزیم پر اکسیداز، توسط سلول های فاگوسیتوز کننده از قبیل نوتروفیل ها و مونوسیت ها احیا می شود و تبدیل به ماده ی تیره رنگی می گردد که در داخل سلول های تمایز یافته قابل

غلظت هایی در حد $\mu\text{g/ml}$ برای زهر زنبور، nM برای ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 و برای کاستن اثر حلال ها بر روی سلول ها می بایست جهت رقیق نمودن محلول اولیه از محیط کشت کامل استفاده نمود.

بررسی تکثیر و میزان سمی بودن مواد: جهت بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی میزان تکثیر سلول ها و به دست آوردن غلظت های سمی و غیر سمی، ابتدا چندین غلظت از زهر زنبور عسل شامل غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ ، ۷/۵، ۲/۵، ۱۰ و ۵/۰ بر روی سلول ها اثر داده شد. بدین صورت که به ازای هر میلی لیتر محیط کشت $10^4 \times 5$ سلول در هر خانه از پلیت کشت ۲۴ خانه ریخته شد و غلظت های مورد نظر در محیط، تنظیم گردید سپس با روش شمارش سلولی با تریپان بلو و سنجش MTT درصد سلول های زنده و غلظت های سمی و غیر سمی در طول ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به دست آمد.

همچنین جهت بررسی اثر ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 بر روی تکثیر سلول ها و به دست آوردن غلظت های سمی و غیر سمی، ابتدا غلظت های مختلفی از شکل فعال ویتامین D3 شامل غلظت های nM ۲۵، ۵، ۱ و ۵۰ تهیه شد و اثر آنها بر روی تکثیر سلول های HL-60 در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش شمارش سلولی با تریپان بلو و سنجش MTT بررسی شد.

تست MTT برای بررسی درصد سلول های زنده: Dimethyl thiazole diphenile tetrazolium bromide یک نمک تترازولیم محلول در آب است که در محیط فنل، زرد رنگ و در اثر آنزیم های دهیدروژناز که فقط در سلول های زنده فعال می باشند در حلقه ی MTT محلول شکستی ایجاد می نماید و به بلورهای آبی فورمازان غیر محلول تبدیل می شود. لذا با استفاده از طول موج ۵۷۰-۵۴۰ نانومتر، میزان فورمازان که توسط ایزوپروپانل اسیدی یا حلال های دیگر به شکل محلول درمی آید اندازه گیری می شود و به این وسیله، میزان توده ی سلول های زنده تعیین می گردد. جهت روش MTT ابتدا تعداد مناسب سلول (برای مثال $10^4 \times 5$ - سلول به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) و غلظت مواد مورد نظر (برای مثال غلظت $2/5 \mu\text{g/ml}$ زهر زنبور) در خانه های یک پلیت ۲۴ خانه تنظیم شد و برای هر غلظت از ماده ی مورد نظر سه خانه در نظر گرفته شد. بعد از بازه های زمانی معین (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) به هر خانه از پلیت های ۲۴ خانه ۱۰۰ میکرولیتر

صورت وابسته به زمان و غلظت، موجب القای مرگ این سلول ها شدند. غلظت $2/5 \mu\text{g/ml}$ 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 $P < 0.001$ معنی دار بود. غلظت های $1/5$ و $0/5$ نسبت به نمونه کنترل، هیچ تفاوت معنی داری در طی ۷۲ ساعت نشان ندادند (جدول ۱).

جدول ۱: درصد سلول های زنده HL-60 در حضور غلظت های مختلف زهر زنبور عسل در مقایسه با کنترل در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT assay.

	control	2.5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	7.5 $\mu\text{g/ml}$
24h	100 \pm 0	98.13 \pm 0.6	70.16 \pm 0.61**	38.26 \pm 0.37***
48h	100 \pm 0	91.33 \pm 0.27**	43.44 \pm 1***	15.34 \pm 0.65***
72h	100 \pm 0	83.3 \pm 0.43***	17 \pm 0.54***	8 \pm 0.55***
Mean \pm (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 ویتامین D3 بر روی تکثیر سلول های HL-60 نشان داد که ۱، ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 در الگوی وابسته به زمان و غلظت، موجب القای مرگ سلولی و یا 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. غلظت ۲۵ nM نیز اثر سایتوتوکسیک داشته و در طول ۷۲ ساعت موجب مرگ سلولی گردید. اما غلظت های ۵ nM و ۱ بدون این که باعث مرگ سلولها شوند در الگوی وابسته به غلظت و زمان، موجب مهار تکثیر سلول ها شدند (جدول ۲).

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

	control	1nM	Vd3	5nM	Vd3	25nM	V d3	50nM	V d3
24h	100 \pm 0	98.29 \pm 0.68		96.31 \pm 0.26		85.23 \pm 0.53		75.17 \pm 0.81*	
48h	100 \pm 0	92.89 \pm 0.60		86.52 \pm 0.94*		69.53 \pm 1***		57.1 \pm 1.1***	
72h	100 \pm 0	87.87 \pm 0.37**		76.45 \pm 0.75***		50.9 \pm 0.53***		40.2 \pm 0.89***	
Mean \pm (SEM)		* $P < 0.05$		** $P < 0.01$		*** $P < 0.001$			

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

مشاهده می باشد. برای انجام این تست ابتدا سوسپانسیون سلولی را که بازه زمانی مشخصی در معرض دارو بوده است شمارش نموده و سوسپانسیونی حاوی 4×10^4 سلول از آن تهیه شد. سپس این سوسپانسیون داخل لوله آزمایش ریخته شد و به میزان هم حجم آن از محلول ۱٪ NBT حل شده در PBS شامل ۲۰۰ ng/ml از PMA به آن اضافه گردید و به 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 و از تقسیم تعداد این سلولها بر تعداد کل سلول ها ضرب در ۱۰۰؛ در صد سلول های تمایز یافته به دست آمد.

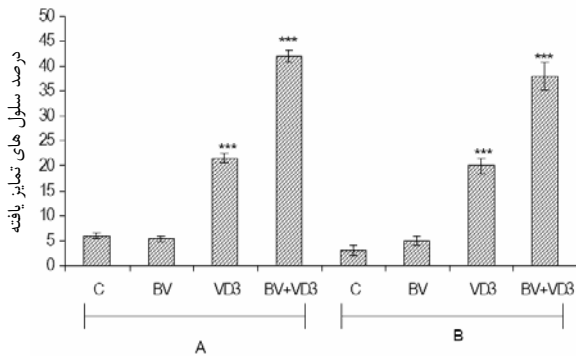
آنالیز آماری: تمام آزمایش ها، حداقل سه بار تکرار گردید. جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS, Version 13 و از روش one-way ANOVA استفاده شد و P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excell ترسیم شدند.

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 ۲۴ ساعت کشت از یک تعداد اولیه 5×10^4 سلول در هر میلی لیتر محیط کشت به $10^4 \times (10/5 \pm 0/5)$ افزایش یافت و در مجموع زمان دو برابر شدن این سلول ها تقریباً ۳۶-۲۴ 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 سلولهای HL-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 $10 \mu\text{g/ml}$ اثر کشندگی بسیار شدیدی دارد. غلظت های $7/5 \mu\text{g/ml}$ و ۵ هم به

رایت - گیمسا و تست NBT نشان داد که کاربرد همزمان غلظت های ۵ نانومولار ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 به عنوان القا کننده تمایز و ۲/۵ μg/ml زهر زنبور به عنوان مهار کننده تکثیر در طی ۷۲ ساعت میزان تمایز سلول ها را نسبت به ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 به تنهایی به طور معنی داری در سطح $P < 0.001$ افزایش می دهد (نمودار ۱).



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

بحث:

نتایج به دست آمده نشان داد که زهر زنبور و ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 در الگویی وابسته به غلظت و زمان در غلظت های بالا موجب مرگ سلولی و در غلظت های پایین موجب مهار تکثیر سلول ها می شوند. به طوری که زهر زنبور با غلظت ۲/۵ μg/ml در طول ۴۸ ساعت تقریباً باعث کشته شدن ۵۰٪ سلول ها و در غلظت ۲/۵ μg/ml، باعث کشته شدن ۸۵٪ سلول ها شد. ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 با غلظت ۲۵ nM در طول ۷۲ ساعت موجب کشته شدن ۵۰٪ 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 ۲/۵ μg/ml و ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 با غلظت ۵ nM 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 ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 اثر مهاری قوی تری نسبت به زهر زنبور دارد. به طوری که ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 با غلظت

بررسی کاربرد همزمان غلظت های مهاری ۱، ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین D3 (۵ nM) و زهر زنبور عسل (۲/۵ μg/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 ۴۸ و 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 (جدول ۳).

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 ۲/۵ μg/ml زهر زنبور عسل همراه با ۵ nM ویتامین D3 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت 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) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$			

اثر زهر 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 ۷۲ ساعت در ارتباط با تمایز موجب می شود. غلظت های پایین تر نیز می 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 D3 در مقایسه با نمونه ی کنترل بود.

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

بررسی تغییرات مورفولوژیکی به وسیله ی رنگ آمیزی

سرطانی افزایش یافته مثل NF-κB، افزایش فعالیت مهار کننده های تومور و افزایش 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 (۲۹-۳۲).

از آنجایی که غلظتهای بالای ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 سمی بوده و منجر به ایجاد اثرات جانبی می گردد، از غلظت های در حد نانومولار جهت ایجاد تمایز استفاده می شود. بنابراین راه کار دیگر استفاده از موادی است که اثرات ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 را تقویت می کنند. در مطالعات گذشته نشان داده شد که برخی ترکیبات نظیر (۱۱) capsaicin، (۱۴) artemisinin، (۱۵) indirubin، (۱۶) Parathenolide 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 ۲۵،۱- 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 ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 را افزایش دهند معمولاً یک یا چند عملکرد آن را تقویت می کنند. برای مثال استیل سالیسیلیک اسید و استامینوفن به عنوان نماینده های غیر استروئیدی ضد التهابی و نیز پاراتنولید از طریق مهار بیان NF-κB موجب افزایش توان تمایزی ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 به سمت مونوسیت می شوند. (۱۲،۱۸) artemisinin از طریق افزایش فعالیت PKC توان تمایزی ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 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 ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 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 (NF-κB) است (۲۲،۲۳).

۵ nM و زهر زنبور با غلظت ۲/۵ μg/ml در 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 دیگر ۲۲٪ (۱۲) ۲۰٪ (۱۴) و ۱۹٪ (۱۵) گزارش شده است. که نتایج مطالعه ی 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 های HL-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 که ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 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 های 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 و P27 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

- 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. Potentiation 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, Alcaín 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

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 تمایزی ۲۵،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 و نیز از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت معلم که امکانات اجرایی این طرح پژوهشی را فراهم نمودند تشکر و قدردانی 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. Loteml J, Sachs L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene* 2002; 21: 3284 – 3294
8. Matsuhisa 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: non-skeletal 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

- 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, Darzynkiewicz 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-dependent kinase 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. Tsiftoglou A, Pappas SI, Vizirianakis SI. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther* 2003; 100: 257-290
 31. Tsiftoglou 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