بررسی اثر زهر زنبور عسل بر سلول‌های سرطان رودهٔ بزرگ انسان و سلول‌های L929

المیرا محمدی [الف]، محسن دوست‌محمدی [ب و پ*]، شاهین گوانجی [پ]، حجت باغ‌شاهی [ج]، زهرا گلستان‌نژاد [د]، عزیزالله باختری [هـ]، محمدرضا گلستان‌نژاد [د]، امیر معتمدی [ز]

[الف] کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

[ب] دکتری علوم داروئی، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، انستیتو نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

[پ] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اصفهان، ایران

[ج] دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ منابع طبیعی و کشاورزی، دانشگاه تهران

[د] استادیار، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، گروه بیماری‌های دهان فک و صورت، دانشکدهٔ دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

[هـ] دکتری ژنتیک، گروه علوم دامی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

[د] استادیار، گروه ارتوپدی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

[ز] دانشجوی دندان‌پزشکی، کمیته پژوهش‌های دانشجویان، دانشکدهٔ دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان به عنوان یک مشکل جهانی است. زهر زنبور عسل برای هزاران سال در درمان بیماری‌های مختلف کاربرد داشته است. اخیراً نیز این ماده به عنوان ترکیب مؤثری برای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. بدیهی است شناسایی ترکیباتی که القاکننده آپوپتوز باشند، می‌توانند در درمان سرطان بسیار تأثیرگذار باشند. زهر زنبور ترکیب بسیار پیچیده‌ای از پپتیدها، آنزیم‌ها و آمین‌های فعال بیولوژیکی است. ملیتین و فسفولیپاز A2 دو جزء اصلی زهر زنبور می‌باشند. .در این مطالعه سعی ما بر این بوده است تا خواص ضد توموری زهر زنبور علیه سرطان رودهٔ بزرگ و سلول L929 مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش تجربی انجام شد. سلول‌های رودهٔ بزرگ انسان (HT-29) و ردهٔ سلول طبیعی فیبروبلاست موش (L929) به‌عنوان شاهد در محیط کشت RPMI-1640 (SIGMA, USA) غنی‌شده رشد داده شدند و سلول‌ها با ۱۲ غلظت مختلف زهر از حداقل ۱ درصد تا ۱۲ µg/ml و در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند پس از طی زمان‌های مورد نظر میزان زنده بدون سلول‌ها به روش MTT تعیین شد. سپس تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS به روش one way ANOVA و نیز ترکی مورد آنالیز آماری قرار و همچنین دو ردهٔ سلولی در غلظت‌های مشابه نیز به آزمون t مستقل مورد آزمون قرار گرفت

یافته‌ها: در غلظت ۶ درصد و در زمان ۲۴ ساعت تعداد سلول‌های زنده کاهش و در غلظت ۶ مولار سلول‌های سرطانی مردند. غلظت ۲ بر سلول‌های L929 مؤثر بوده و در غلظت ۱۲ و ساعت ۲۴ این سلول‌ها از بین رفتند. زهر زنبور عسل دارای اثر مهارکنندهٔ بالاتری بر روی سلول‌های رودهٔ بزرگ انسان (HT-29) نسبت به سلول‌های L929 است.

نتیجه‌گیری: زهر زنبور عسل، دارای اثر کشندگی برسلول‌های روده بزرگ انسان (HT-29) می‌باشد و به‌نظر می‌رسد القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) در سلول‌های سرطانی تیمار شده با زهر زنبور عسل ایجاد شده است که بررسی و اثبات این موضوع نیازمند تحقیق بیشتر است.

کلیدواژه‌ها: کشندگی سلولی، زهر زنبور عسل، HT-29.

تاریخ دریافت: مهر ۹۵

تاریخ پذیرش: آذر ۹۵

مقدمه:

سرطان دومین عامل مرگ و میر در دنیاست (۱).درمان‌های متداول سرطان، دارای عوارض جانبی جدی بوده و تنها چند سال بر طول عمر بیمار می‌افزایند (۲). طب سنتی ایرانی ریشه در تاریخ مردم و مبانی منحصر به خود دارد (۳). اغلب سرطان‌ها درمان قطعی ندارند اما برای جلوگیری از رشد و پیشرفت آنها از روش‌های پرتودرمانی، شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی پیوند مغز استخوان و ...استفاده می‌شود (۴).

* فرد مسئول مکاتبات: mohsend881@yahoo.com

سم زنبور توسط غدد آپیس ملیفرا تولید می‌شود (۵، ۶) در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷، ۸) و اخیراً از زهر زنبور برای درمان سرطان استفاده شده است (۹، ۱۰) و خاصیت ضد سرطانی آن به تأیید رسیده است (۱۱) اما با وجود مطالعات انجام شده در مورد تأثیر زهر زنبور بر سلول‌های سرطانی، به دلیل تنوع بالای سلول‌های سرطانی و همچنین تنوع ترکیبات سمی در زهر زنبور هنوز بررسی بیشتر در مورد تعیین بهترین دوز مؤثر مورد نیاز است. فاکتورهای متعددی تولید زهر زنبور عسل و کیفیت آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مانند: سن زنبور، قدرت کلنی، فصل جمع‌آوری، منبع تغذیه، رفتار دفاعی زنبور، و روش جمع‌آوری زهر زنبور (۷). زهر زنبور عسل در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شده است (۸).

ترکیب مواد تشکیل‌دهندهٔ زهر زنبور به‌خوبی شناخته شده است (۹، ۱۰). زهر زنبور از ترکیب مخلوطی از پپتیدهای فعال، آنزیم‌ها و آمین‌ها تشکیل شده است (۱۱، ۱۲). کاربردهای درمانی زهر زنبور در زمینهٔ پزشکی برای درمان بیماری‌های مختلف بسیار گسترده است (۱۳، ۱۴). زهر زنبور فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت سلول‌کشی علیه سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی دارد (۱۵). همچنین این ترکیب از تکثیر سلول‌های سرطانی پستانداران ممانعت به‌عمل می‌آورد (۱۶) و همچنین در آرتریت، روماتیسم، درد، تومور و بیماری‌های پوستی و استئوآرتریت اثرات درمانی دارد. علاوه بر این موارد، فعالیت‌های آنتی‌میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت شامل ای‌کلای و سالمونلا، انتروباکتر کلواکه، سیتروباکتر فروندی، و استافیلوکوکوس ارئوس مورد تأیید قرار گرفته شده است (۱۷، ۱۸، ۱۹).

زهر زنبور دارای ترکیبات متعددی مانند فسفولیپید A2، هیالورونیداز، اسید فسفومنواستراز، و لیزوفسفولیپاز است (۲۰، ۲۱). از میان آنها ملیتین، یک پپتید ۲۶ آمینواسیدی آمفی فیل کاتیونی، یک پپتید غیر اختصاصی است که به تمام لیپیدهای غشائی حمله می‌کنند و سبب سمیت قابل ملاحظه می‌شود (۲۲). فسفولیپاز A2، ۱۰-۱۲ درصد پپتیدهای سم را تشکیل می‌دهد و مخرب‌ترین ترکیب apitoxin است. این آنزیمی است که فسفولیپیدهای غشای سلولی را تجزیه می‌کند. خواص آنتی‌باکتریال زهر زنبور به‌عنوان یک ترکیب طبیعی آنتی‌باکتریال به میزان بالایی مطالعه شده است و درمان با زهر زنبور به عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها پیشنهاد داده شده است (۲۲، ۲۳). فعالیت آنتی‌باکتریال بسیار شدید زهر زنبور علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت گزارش شده است (۲۴). علاوه بر این زهر زنبور دارای خواص آنتی‌باکتریال علیه باکتری‌های پوست مانند پروپیونی باکتریو اکنس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، و استرپتوکوکوس پیوجنس است. در مطالعهٔ انجام‌شده توسط یو و همکاران نشان داده شده است که زهر زنبور خواص ضد قارچی علیه تریکوفیتون متاگروفیتس و تریکوفیتون روبروم است. این خاصیت ضد قارچی از فلوکونازول که یک مادهٔ ضد قارچ تجاری است نیز بیشتر است (۲۵). اخیراً مشاهده شده است که نانوذرات حاوی ملیتین می‌توانند خواص ضد HIV داشته باشد و این نشان می‌دهد که می‌توان امید داشت تا از زهر زنبور برای درمان بیماری ایدز استفاده کرد (۲۶).

اخیراً فرمول‌های درمانی متعددی با استفاده از زهر زنبور تهیه شده‌اند و در فروشگاه‌های اروپایی و بین‌المللی در دسترس می‌باشد (۲۷). چون زهر زنبور برای انسان سمی است شناسایی ترکیبات آن، تأثیرات جانبی آن، سمیت آن برای ایجاد فرمول‌های دارویی ایمن جهت تأمین نیازهای انسان ضروری است. به دلیل طبیعت پیچیدهٔ زهر زنبور، این ترکیب به صورت کامل شناسایی نشده است. اخیراً با استفاده از اسپکتروفتومتر جرمی هزاران پروتئین و پپتید با استفاده از مقدار کمی از نمونهٔ پروتئین شناسایی شده‌اند. در حال حاضر دو راه سنتی برای جمع‌آوری زهر زنبور وجود دارد. تحریک الکتریکی و استخراج دستی زهر از غدد زهری (۲۸).

Or-oli ترکیب زهر زنبور تازه و خشک شده بیشتر در ترکیبات فرار متفاوت است و فعالیت بیولوژیکی کلی آن‌ها یکی است. این ترکیب به‌عنوان یک داروی ضد التهابی غیر استروئیدی جهت کاهش درد و درمان بیماری‌های التهاب مزمن مانند آرتریت روماتوئید، مولتیپل اسکلروزیس،(۲۹، ۳۰) و اخیراً در درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود (۹-۱۳). در

سال‌های گذشته مطالعاتی در مورد نقش زهر زنبور انجام شده است که نشان می‌دهند که زهر زنبور خواص مهارکننده امواج رادیوئی (۳۱)، ضد درد (۳۲، ۳۳) و ضد سرطان (۳۴) دارد. علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان‌دهندهٔ تأثیرات متعدد بر التهاب، سلول‌کشی و مهار رشد انواع مختلف سلول‌های سرطانی است (۳۴-۳۶). زهر زنبور تکثیر سلول‌های سرطانی و توموری را مهار می‌کند. این مهار رشد می‌تواند به دلیل پاسخ موضعی سلول‌های ایمنی گره‌های لنفاوی باشد (۱۶، ۳۴). آپوپتوز، نکروز و لیز سلول‌های توموری مکانیسم‌هایی هستند که رشد سلول‌های توموری را مهار می‌کنند. نشان داده شده است که زهر زنبور عسل سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های لوکمی می‌شود (۳۷).

مواد و روش‌ها:

این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. در این روش زهر زنبور عسل در موسسه تحقیقات طب سنتی و گیاهی ایران به‌وسیلهٔ دستگاه جمع‌آوری زهر زنبور از طریق روش شوک الکتریکی با به کارگیری ولتاژ۲۰ ولت که زنبورهای عسل را تحریک می‌کند تا صفحه جمع‌آوری‌کننده را نیش بزنند و نکته قابل توجه این که در این روش هیچگونه آسیبی به زنبور عسل وارد نمی‌شود و زهر استحصال شده بر روی صفحه شیشه‌ای قرار گرفتند و به‌سرعت در معرض هوا خشک می‌شوند و برای استفاده بعدی در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد ذخیره شد.

سلول‌های رودهٔ بزرگ انسان (HT-29)و ردهٔ سلول طبیعی فیبروبلاست موش (L929) به‌عنوان شاهد از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. هر ۲ ردهٔ سلولی از تانک ازت خارج و مرحله یخ‌زدایی سلول‌ها انجام شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (SIGMA, USA) غنی‌شده حاوی ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum (Gibco) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین Unit/ml100 و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین µg/ml100 (Gibco) در انکوباتور CO2 دار (5%) با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و میزان RH=100 رشد داده شدند. پس از انجام یک دوره پاساژ سلولی برای اطمینان از درصد بالای سلول‌های زنده در حال رشد، تست viability با رنگ تریپان‌بلو محاسبه شدکه درصد سلول‌های زنده بیش‌از ۹۰ درصد به دست آمد.

آزمایش MTT

سنجش میزان بقاء سلولی ازروش رنگ‌سنجی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium(MTT) استفاده شد. این روش بر پایه توانایی تبدیل محلول MTT به بلورهای فورومازان نامحلول توسط سلول‌های زنده استوار است (۱، ۲). این تست بر اساس فعالیت سوکسینات دهیدروژناز سلول‌های زنده استوار است، که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کند، که می‌تواند پس از حل کردن در DMSO با دستگاه الایزا ریدر سنجید. به‌منظور انجام این تست، میزان ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی 104×5 سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت در میکروپلیت‌های 96 کشت داده شدند. در ادامه سلول‌ها با غلظت‌های مختلف زهر زنبور (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/ml) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند پس از طی زمان‌های مورد نظر، به ازای هر ۲۰۰ میکرولیتر ازمحیط کشت، ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT به هر خانه از پلیت‌های 9 خانه‌ای اضافه شد. به هر خانه از پلیت 96 بافر گلایسین و DMSO اضافه شد و بعد از آنکه ذرات رنگ به خوبی حل شدند، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط ELISA Microplate Reader قرائت شد.

آنالیز آماری

مقایسهٔ تأثیر غلظت‌های مختلف در هر ساعت برای هر ردهٔ سلولی با نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۰ به روش one way ANOVA مورد آنالیز آماری قرار گرفت و تحلیل معنی‌دار بودن داده‌ها به روش توکی صورت گرفت. مقایسه دو ردهٔ سلولی در غلظت‌های مشابه نیز به آزمون t مستقل مورد آزمون قرار گرفت.

یافته‌ها:

در جدول ۱ اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل بر سلول‌های سرطانی HT-29 و L929 در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مورد بررسی آماری قرار گرفت نتایج نشان داد که با افزایش

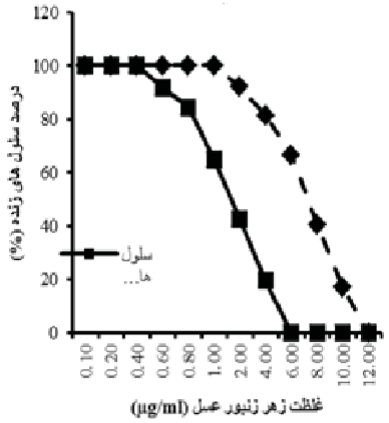
غلظت اثر کشندگی آن بر سلول افزایش می‌یابد ($p<0.0001$). در ۲۴ ساعت اول اثر معنی‌دار زهر زنبور عسل بر کشندگی سلول‌های سرطانی HT-29 از غلظت 0.6 µg/ml شروع می‌شود و در غلظت 6 زنده‌مانی سلول سرطانی به صفر می‌رسد. در ۴۸ ساعت اثر معنی‌دار زهر زنبورعسل بر کشندگی از غلظت ۰/۴ شروع می‌شود و در غلظت ۶ زنده‌مانی سلول سرطانی به صفر می‌رسد. در ۷۲ ساعت اثر معنی‌دار زهر زنبور عسل بر کشندگی از غلظت ۰/۴ شروع می‌شود و در غلظت ۴ زنده‌مانی سلول سرطانی به صفر می‌رسد. برای سلول‌های طبیعی در ۲۴ ساعت اول اثر معنی‌دار زهر زنبور عسل بر کشندگی سلول از غلظت ۲ شروع می‌شود و در غلظت ۱۲ قدرت کشندگی سلول طبیعی به حداکثر می‌رسد. در ۲۴ ساعت دوم اثر معنی‌دار زهر زنبور عسل بر کشندگی از غلظت ۱ شروع می‌شود و در غلظت ۱۲ قدرت کشندگی سلول طبیعی به حداکثر می‌رسد. در ۲۴ ساعت سوم اثر معنی‌دار زهر زنبور عسل بر کشندگی از غلظت ۱ شروع می‌شود و در غلظت ۱۰ قدرت کشندگی سلول طبیعی به حداکثر می‌رسد.

جدول ۱: بررسی اثر کشندگی زهر زنبور عسل بر سلول‌های رودۀ بزرگ انسان (HT-29) و ردۀ سلول طبیعی (L929) برحسب زمان‌های پیگیری به تفکیک غلظت

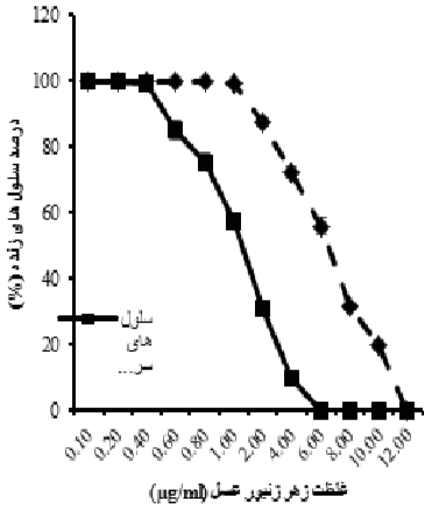
غلظت زهر زنبور عسل (µg/ml)	سلول‌های سرطانی HT-29			سلولهای L929		
	24	48	72	24	48	72
0.1	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
0.2	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
0.4	100±0.00a	99.33±0.67a	98.95±1.05a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
0.6	91.75±1.69b	85.23±2.92b	84.13±2.67b	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
0.8	84.43±1.08c	75.27±2.46c	70.84±2.15c	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
1	64.81±1.28d	57.13±0.45d	51.77±1.00d	100±0.00a	99.00±0.50a	97.50±0.46a
2	42.57±1.52e	30.83±1.80e	19.57±1.16e	92.00±0.96b	87.40±1.41b	85.12±0.82b
4	19.53±1.30f	9.73±1.58f	0.00±0.00f	81.33±1.54c	71.99±1.59c	69.30±0.66c
6	0.00±0.00g	0.00±0.00g	0.00±0.00f	66.63±1.18d	55.80±2.51d	44.49±1.09d
8	0.00±0.00g	0.00±0.00g	0.00±0.00f	40.48±1.63e	31.34±0.94e	17.87±1.37e
10	0.00±0.00g	0.00±0.00g	0.00±0.00f	17.00±0.79f	19.70±0.44f	0.00±0.00f
12	0.00±0.00g	0.00±0.00g	0.00±0.00f	0.00±0.00g	0.00±0.00g	0.00±0.00f

حروف متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی‌داری در سطح ($p<0.0001$) دارد.

روند تغییرات زنده‌مانی سلول در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ برای دو ردۀ سلولی در سه نمودار زیر آورده شده است. آنالیز t-test مستقل بین غلظت‌های مشابه در دو ردۀ سلولی نشان داد که در ۲۴ ساعت اول و دوم تا غلظت ۰/۴ تفاوتی بین دو ردۀ سلولی ناشی از تیمار با زهر زنبور عسل وجود ندارد اما از غلظت ۰/۶ در سطح ۰/۰۰۰۱ بین دو ردۀ سلولی در واکنش به زهر زنبور عسل تفاوت معنی‌دار وجود دارد. در غلظت ۱۲ دوباره دو ردۀ سلولی از نظر زنده‌مانی با تیمار با زهر زنبور عسل یکسان می‌شوند.

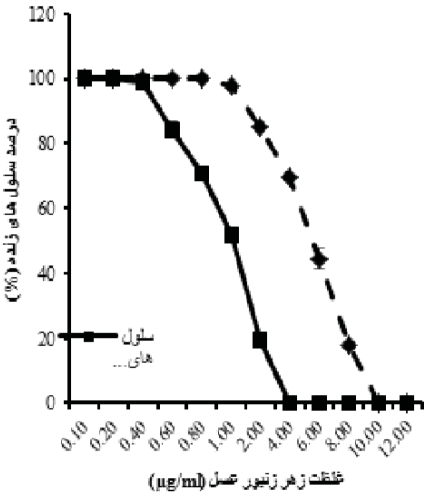


نمودار۱. درصد سلول‌های زنده برحسب غلظت زهر زنبور عسل در ۲۴ ساعت



نمودار۲. درصد سلول‌های زنده برحسب غلظت زهر زنبور عسل و به تفکیک سلول‌ها در ۴۸ ساعت

همچنین در ۲۴ ساعت سوم تا غلظت ۰/۴ تفاوتی بین دو ردهٔ سلولی ناشی از تیمار با زهر زنبور عسل وجود ندارد اما از غلظت ۰/۶ در سطح ۰,۰۰۰۱ بین دو ردهٔ سلولی در واکنش به زهر زنبور عسل تفاوت معنی‌دار وجود دارد. اما در غلظت ۱۰ دوباره دو ردهٔ سلولی از نظر زنده‌مانی با تیمار با زهر زنبور عسل یکسان می‌شود.



نمودار۱. درصد سلول‌های زنده برحسب غلظت زهر زنبور عسل و به تفکیک سلول‌ها در ۷۲ ساعت

میزان IC50 در این مطالعه برای زهر زنبورعسل، بر روی هر دو ردهٔ سلولی HT-29 و L929 در ۲۴ ساعت ابتدایی در جدول ۲ محاسبه شد و نشان می‌دهد باتوجه به این معادلات غلظت مؤثر که در آن ۵۰ درصد سلول‌های سرطانیHT-29 از بین رفتند برابر با IC50=2.55 µg/ml و برای ردهٔ سلولی L929 میزان IC50 برابر با µg/ml6.87 به‌دست آمد. نسبت IC50 سلول L929 به IC50 سلول سرطانی HT-29 برابر است با 6.87/2.55=2.69 که نشان از نیاز بیشتر غلظت زهر زنبور به میزان تقریباً ۲/۶۹ برابر نسبت به سلول سرطانیHT-29 برای مشاهدهٔ اثر کشندگی ۵۰ درصدی روی سلول L929 دارد (جدول ۲).

جدول ۲: میزان IC50 و R2 در این مطالعه برای زهر زنبور عسل بر روی هر دو ردهٔ سلولی HT-29 و L929

معادله سلول‌های نرمال برای محاسبه IC50	معادله سلول‌های سرطانی برای محاسبه IC50
IC = 113.938 - 9.305X X= غلظت زهر زنبور عسل	IC = 93.904–17.179X X= غلظت زهر زنبور عسل
R2 = 98.2%	R2 = 90.5%

R2 معیاری از مناسب‌بودن مدل برای برآورد زنده‌مانی براساس غلظت است. که هرچه به ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد بهتر است.

باتوجه به این معادله غلظت مؤثر که در آن ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی از بین می‌روند برابر باIC50=2.55 µg/ml است. میزان همبستگی بین غلظت زهر و درصد سلول‌های زنده HT-29 برابر است با "۰/۹۵-" که نشان از همبستگی منفی و قوی بین غلظت زهر و درصد سلول‌های زنده HT-29 است. بدین معنی که افزایش غلظت زهر با کاهش مؤثر درصد سلول‌های زنده HT-29 همراه است. هرچه همبستگی به 1± نزدیک‌تر باشد همبستگی قوی‌تر است. R2 معیاری از مناسب بودن مدل برای برآورد زنده‌مانی بر اساس غلظت می‌باشد که هرچه به ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد بهتر است. باتوجه به این معادله

غلظت مؤثر که در آن ۵۰ درصد سلول‌های L929 از بین می‌روند برابر با 6.87µg/ml به دست آمد و میزان همبستگی بین غلظت زهر و درصد سلول‌های زنده L929 برابر است با "۰/۹۹-" که نشان از همبستگی منفی و قوی بین غلظت زهر و درصد سلول‌های زنده L929 می‌باشد. بدین معنی که افزایش غلظت زهر با کاهش مؤثر درصد سلول‌های زنده L929 همراه است.

بحث:

تحقیق نشان داد که زهر زنبور عسل در غلظت ۰/۶ در ۲۴ ساعت و ۰/۴ در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت اثر کشندگی بر سلول‌های سرطان روده دارد.

در این مطالعه تأثیرات سلول‌کشی زهر زنبور علیه سلول‌های روده‌ای و فیبروبلاستی مورد بررسی قرار گرفتند و تلاش شد تا مناسب‌ترین مقدار مؤثرهٔ این ترکیب حیاتی به‌دست آید سم زنبور توسط غدد آپیس ملیفرا تولید می‌شود (۹، ۱۰). فاکتورهای متعددی تولید زهر زنبور عسل و کیفیت آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مانند: سن زنبور ، قدرت کلنی، فصل جمع‌آوری، منبع تغذیه، رفتار دفاعی زنبور و روش جمع‌آوری زهر زنبور. زهر زنبور عسل در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شده است (۱۱، ۱۲)

اخیراً مون و همکارانش نشان دادند که تنظیم‌کننده‌های کلیدی در زهر زنبور سبب القاء آپوپتوزیس Bcl-2 و-caspase 3 هستند و سبب تنظیم منفی مسیرهای فعال شده با موتان زا می‌شود. همچنین گزارش شده است که زهر زنبور سبب القاء آپوپتوز از طریق کاسپاز ۳ در فیبروبلاست‌های ریوی (۳۵، ۳۸) و همچنین بیان سیکلواکسیژناز در سلول‌های سرطان ریه می‌شود (۳۶-۳۹). اخیراً گزارشات متعددی نشان داده‌اند که برخی مواد طبیعی رشد سلول‌های توموری و متاستاز را مهار می‌کنند و سبب القا آپوپتوز می‌شوند (۲۸). در طی دو دههٔ اخیر پپتیدهای ملیتین موجود در زهر زنبور به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب زهر زنبور توجه بسیار زیادی به‌عنوان عامل بالقوه در درمان سرطان به خود جلب کرده است (۴۰، ۴۱). ملیتین یک پپتید آمفی‌فیلیک است که گفته می‌شود تأثیرات همولیتیک و فعالیت آنتی‌میکروبی دارد (۳۸). ملیتین همچنین تغییرات ساختاری غشاءها را در پی دارد که سبب ایجاد سوراخ، یکی شدن و وزیکولاسیون می‌شود (۴۲-۴۴). این تغییرات مورفولوژیکی غشاء می‌توانند سبب ترشح هورمون (۴۵، ۴۶)، جداشدن پروتئین‌های غشاء (۴۷) و تغییرات پتانسیل غشاء (۴۸) شوند. علاوه بر این ملیتین سبب القاء آنزیم‌های فراوانی مانند جی- پروتئین، پروتئین کیناز سی، آدنیلات سیکلاز فسفولیپاز سی، و فسفولیپاز دی می‌شود. ملیتین در القا پیام نقش دارد و به‌صورت مستقیم تغییرات نوکلئوتیدی توسط پروتئین‌های هفت‌بار گذرنده را القا می‌کنند. علاوه بر این، ملیتین مهارکننده فعالیت پروتین جی توسط کاهش تمایل GTP و GDP به پروتئین جی می‌شود (۴۹). بنابراین فرض شده است که تحریک Gi و مهار Gs در مهار القا شده با ملیتین نقش دارد. ملیتین اولین پروتئینی است که فعالیت ذاتی پروتئین جی را مهار می‌کند (۴۸، ۴۹). گذشته از تأثیرات متعدد ملیتین، این ترکیب به‌عنوان یک فعال‌کنندهٔ فسفولیپاز A2 در سلول‌های مختلف شناخته می‌شود. فسفولیپاز A2 ترشحی زهر زنبور که یکی از اعضاء خانواده فسفولیپازهاست و هیدرولیز پیوند sn-2ی اسید چرب گلیسروفسفولیپیدهای غشائی را انجام می‌دهد و تولید اسید چرب آزاد و لیزوفسفولیپید می‌کند (۵۰-۵۲). به‌طور کلی، آنزیم‌های فسفولیپاز A2 می‌توانند ایمنی سلول‌ها و توانایی تکثیر سلول‌های توموری را با مکانیسم‌های متعدد تحت تأثیر قرار دهند. فسفولیپاز A2 به‌صورت کاتالیتیکی اجزا غشاء سلولی را هیدرولیز و تجزیه می‌کنند (۴۷) و به تبع آن ساختار غشا دو لایه را به هم می‌ریزد. تعامل مستقیم فسفولیپاز A2 با گیرنده‌های سطح سلول انواع مختلفی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند رشد سلول را تنظیم می‌کنند (۴۸-۵۶). تحریک ایمنی و یا فعالیت سلول‌کشی ترکیباتی مانند فسفاتیدیل کولین، و واسطه‌های لیپیدی در مطالعات متعددی مشاهده شده‌اند. آنالوگ‌های سنتزی لیزولیپیدها، که از لحاظ ساختاری شبیه محصولات فسفولیپاز A2 هستند، از طریق بلوکه کردن ERK و PKB/AKt فعالیت ضد رشدی و سلول‌کشی از خود نشان می‌دهند و بنابراین می‌توانند برای درمان سرطان استفاده شوند (۵۷، ۵۸). ملیتین موجود در زهر

زنبور حدود ۵۰–۷۰ درصد ترکیبات آن را شامل می‌شود و یک پپتید ضد میکروبی است که فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی دارد. گزارشات نشان می‌دهند که ملیتین یکی از مهارکننده‌های فعالیت کالمودولین است و به این طریق رشد سلول را مهار می‌کند. مهارکننده‌های کالمودولین برای سلول‌های سرطانی سمی هستند (۵۴). داروهایی که فعالیت کالمودولین را مهار می‌کنند سبب مهار سنتز DNA در سلول‌ها شده و حرکت کروموزوم‌ها در طی متافاز را بلوکه می‌کند و به این طریق رشد سلول‌های رحم همستر چینی را مهار می‌کند و سلول‌کشی وینکریستین، دوکسوروبیسین و بلئومایسین را افزایش می‌دهد (۵۹–۶۰). متاستاز سلول توموری فرایندی پیچیده است و شامل واکنش‌های بین سلول توموری و بافت میزبان می‌باشد. متاستاز تومور مهم‌ترین دلیل مرگ در بیماران سرطانی است.

چو و همکارانش نشان دادند که زهر زنبور به صورت مستقیم مهاجرت سلول‌های سرطانی از طریق سرکوب بیان MMP-9 را مهار می‌کنند. اورسلیک نشان داد که متاستاز ریوی در سلول‌های موشی می‌تواند به‌صورت مؤثری توسط زهر زنبور و در دوز ۷۵ و ۱۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم مهار شود (۵۷–۶۱). با وجود مطالعات انجام‌شده در مورد تأثیر زهر زنبور بر سلول‌های سرطانی، به دلیل تنوع بالای سلول‌های سرطانی و همچنین تنوع ترکیبات سمی زنبورهای مختلف هنوز بررسی‌های بیشتر جهت یافتن بهترین دوز مؤثر و همچنین بررسی احتمال تأثیر زهر زنبور بر سلول‌های مورد نظر لازم است

References:

1. Motavalizadeh Ardekani A, Hashemi M, Safakish M, Alem-Bagheri A, Baradaran Shokoohi S, Mosaddegh M. Medical Treatment of Cancer in Traditional Iranian Medicine. jiitm. 2012; 3 (1) :3-18

2. Robbins AL. Robbins Basic Pathology. A L. Robbins. Translator shahab shahmadadi, yonese jahangiri. 7th.ed. danesh poub. 1384.

3. Soltani A. History of Cancer Treatment in Traditional Medicine. Proceedings on Traditional Medicine in Iran, 1362

4. Tarver T. Cancer facts & figures 2012. American cancer society (ACS) Atlanta, GA: American Cancer Society, 2012. 66 p., pdf. Available from.

5. Palma, M.S. and M.R. Brochetto-Braga, Biochemical variability between venoms from .different honey-bee (Apis mellifera) racesComparative Biochemistry and Physiology Part C:Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 1993 Oct 1;106(2):423-7

6. Shaposhnikova, V.V., L.N. Kublik, A.A. Narimanov,M.K.H. Levitman, O.E. Orlova, A.A. Kudriavtsev,V.V. Leshchenko and Iu. N. Korystov.Growth inhibition and induction of tumor cell deathby phospholipase A2 and lipoxygenase inhibitorsIzvestiia Akademii Nauk. Seriia Biologicheskaia. 2001; (2): 249-252.

7. Auturum H, H. Kneitz . DieGgiftsekretion in der Giftdruse derHonigbiene in Abhngigkeit vomLebensalter. Biol. Zentr.1959;78:602-598.

8. Hegazi A. G. Role of cytokines inbee venom therapy - Part I.Apitherapy Review.2009; Issue 3

9. Banks, B.E.L. and R.A. Shipolini. Chemistry andpharmacology of honey-bee venom. In: T. Ipek, (Ed.),Venoms of the Hymenoptera. Academic Press. 1986; 330-403.

10. Hegazi, A.G. Role of cytokines in bee venomtherapy-Part I. Apitherapy Review. 2009;3:23.

11. Liu, X., Chen, D., Xie, L., & Zhang, R.Effect of honeybee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cellsin-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. Journalof Pharmacy and Pharmacology. 2002 Aug;54(8):1083-9.

12. Potts, B.C.M., D.J. Faulkner, M.S. de Carvalho and R.S. Jacobs. The chemical mechanism ofinactivation of bee venom phospholipase A2 by themarine natural products manoalide, luffarielloide andscalaradial. J. Am. Chem. Soc. 1992 Jun;114(13):5093-100.

13. Habermann E. Bee and wasp venoms. Science. 1972 Jul 28;177(4046):314-22.

14. Dotimas EM, Hider RC. Honeybee venom. Bee world. 1987 Jan 1;68(2):51-70.

15. Hegazi, A.G. Medical importance of bee products. ARI B L M / BEE SCIENCE. 2012; 12(4): 136-146.

16. Shaposhnikova, V.V., L.N. Kublik, A.A. Narimanov,M.K.H. Levitman, O.E. Orlova, A.A. Kudriavtsev,V.V. Leshchenko and Iu. N. Korystov. Growth inhibition and induction of tumor cell death.by phospholipase A2 and lipoxygenase inhibitorsIzvestiia Akademii Nauk. Seriia Biologicheskaia. 2001; 249-252.

17. Oršolić N, Šver L, Verstovšek S, Terzić S, Bašić I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. Toxicon. 2003 Jun 1;41(7):861-70.

18. Harwig, S.S., L. Tan, X.D.Qu, Y. Cho, P.B. Eisenhauer and R.I. Lehrer. Bactericidal properties ofmurine intestinal phospholipase A2. The Journal ofClinical Investigation. 1995 Feb 1;95(2):603-10.

19. Koduri, R., J. Gronroos, V. Laine, C. Le Calvez,G. Lambeau, T. Nevalainen and M. Gelb.Bactericidal properties of human and murine groupsI, II, V, X and XII secreted phospholipases A2. Journal of Biological Chemistry. 2002 Dec 13;277(50):48535-49.

20. Boutrin, M.C., H.A. Foster and V.W. Pentreath.The effects of bee (Apis mellifera) venomphospholipase A2 on Trypanosoma brucei bruceiand enterobacteria. Experimental Parasitology. 2008 Jun 1;119(2):246-51.

21. Somerfield SD, Stach JL, Mraz C, Gervais F, and Skamene E. Bee venom inhibits superoxide production by human neutrophils.Inflammation.1984; 8: 385–391

22. Banks BEC and Shipolini RA. Chemistry and pharmacology of honeybee venom. In Venoms of the Hymenoptera. Piek T (ed.) Academic Press, London, UK.1986; 329–416.

23. Pan H, Soman NR, Schlesinger PH, Lanza GM, and Wickline SA. Cytolytic peptide nanoparticles ('NanoBees') for cancertherapy. Wiley Interdisciplinary Reviews-nanomedicine and Nanobiotechnology. 2011 May;3(3):318-27.

24. Saini SS, Peterson JW, and Chopra AK. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity.Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997 Sep 18;238(2):436-42.

25. .Perumal SR, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Chow TK, Bow H, Yap EH, and Thong TWJ. Antibacterial activity of snake,scorpion and bee venoms: A comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. Journal of Applied Bacteriology. 2007 Mar;102(3):650-9.

26. Yu AR, Kim JJ, Park GS, Oh SM, Han CS, Lee MY. Biochemistry: The Antifungal Activity of Bee Venom against Dermatophytes. Journal of Applied Biological Chemistry. 2012;55(1):7-11.

27. Hood JL, Jallouk AP, Campbell N, Ratner L, Wickline SA: Cytolyticnanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. Antivir Ther. 2012, 18:95–103.

28. Kokot ZJ, Matysiak J, Kłos J, Kedzia B, Hołderna-Kedzia E: Application ofPrincipal Component Analysis for evaluation of chemical andantimicrobial properties of honey bee (Apis mellifera) venom. Journal of apicultural research. 2009 Jan 1;48(3):168-75.

29. Ali MA. Studies on bee venom and its medical uses. Int J Adv Res Technol. 2012 Jul;1(2):69-83.

30. Kwon YB, Lee JD, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK, Beitz AJ, Lee JH. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. Pain. 2001 Feb 15;90(3):271-80.

31. Park, H. J., Lee, S. H., Son, D. J., Oh, K. W., Kim, K. H., Song,H. S., Kim, G. J., Oh, G. T., Yoon, D. Y., & Hong, J. T.Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammationmediator generation by suppression of NF-kappaB throughinteraction with the p50 subunit. Arthritis and Rheumatism . 2004 Nov;50(11):3504-15.

32. Varanda, E. A., & Tavares, D. C. Radioprotection:mechanism and radioprotective agents including honey beevenom. Venom Anim Toxins. 1998; 4(1), 5–21.

33. Kim, H. W., Kwon, Y. B., Ham, T. W., Roh, D. H., Yoon, S. Y.,Lee, H. J., Han, H. J., Yang, I. S., Beitz, A. J., & Lee, J. H. Acupoint stimulation using bee venom attenuatesformalin-induced pain behavior and spinal cord fos expressionin rats. Journal of Veterinary and Medicine Science. 2003; 65(3), 349–355.

34. Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K., &Hong, J. T.Therapeutic application of anti-arthritis, painreleasing,and anti-cancer effects of bee venom and itsconstituent compounds. Pharmacology & Therapeutics.. 2007 Aug 1;115(2):246-70.

35. Yin, C. S., Lee, H. J., Hong, S. J., Chung, J. H., & Koh, H. G.Microarray analysis of gene expression in chondrosarcomacells treated with bee venom. Toxicon. 2005 Jan 1;45(1):81-91.

36. Hu H, Chen D, Li Y, Zhang X. Effect ofpolypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosisinduction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitroand Balb/c nude mice in-vivo. Journal of Pharmacy andPharmacology. 2006; 58(1), 83–89

37. Moon DO, Park SY, Heo MS, Kim KC, Park C, Ko WS, Choi YH, Kim GY. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. International immunopharmacology. 2006 Dec 5;6(12):1796-807.

38. Hong, S. J., Rim, G. S., Yang, H. I., Yin, C. S., Koh, H. G., Jang,M. H., Kim, C. J., Choe, B. K., & Chung, J. H. Beevenom induces apoptosis through caspase-3 activation insynovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis.Toxicon. 2005; 46, 39–45.

39. Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I, Lee JS, Kim KA, Kim EH, Kim CJ. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. Journal of pharmacological sciences. 2003;91(2):95-104.

40. Leuschner C, Hansel W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. Current pharmaceutical design. 2004 Jul 1;10(19):2299-310.

41. Ling CQ, Li B, Zhang C, Gu W, Li SX, Huang XQ, Zhang YN. Anti-hepatocarcinoma effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene. Zhonghua gan zang bing za zhi= Zhonghua ganzangbing zazhi= Chinese journal of hepatology. 2004 Dec;12(12):741-4.

42. Wade D, Boman A, Wåhlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, Merrifield RB. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1990 Jun 1;87(12):4761-5.

43. .Katsu T, Kuroko M, Morikawa T, Sanchika K, Fujita Y, Yamamura H, Uda M. Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1989 Aug 7;983(2):135-41.

44. Dempsey CE. The actions of melittin on membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes. 1990 May 7;1031(2):143-61.

45. Ladokhin AS, Selsted ME, White SH. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulatedmarkers: pore formation by melittin. Biophysical Journal. 1997; 1762–1766.

46. Kiesel, L., Rabe, T., Hauser, G., Przylipiak, A., Jadali, F., &Runnebaum, B. Stimulation of luteinizing hormonerelease by melittin and phospholipase A2 in rat pituitary cells.Molecular and Cellular Endocrinology. 1987; 51, 1–6.

47. Hui S. W, Stewart C. M, Cherry R. J. Biochimica etBiophysica Acta. 1990; 335–340.

48. Carrasquer G, Li M, Yang S, Schwartz M. Effect of melittin on PD, resistance and short-circuit current in the frog gastric mucosa. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1998 Mar 2;1369(2):346-54.

49. Fukushima N, Kohno M, Kato T, Kawamoto S, Okuda K, Misu Y, Ueda H. Melittin, a metabostatic peptide inhibiting Gs activity. Peptides. 1998 May 1;19(5):811-9.

50. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. Journal of Biological Chemistry. 1994 May 6;269(18):13057-60.

51. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2000 Oct 31;1488(1-2):1-9.

52. Valentin E, Lambeau G. What can venom phospholipases A2 tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A2?. Biochimie. 2000 Sep 10;82(9-10):815-31.

53. .Lambeau GA, Schmid-Alliana A, Lazdunski M, Barhanin J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. Journal of Biological Chemistry. 1990 Jun 5;265(16):9526-32.

54. Journal of Biology and Chemistry. 1990; 9526–9532.

55. Lambeau G, Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. Trends in pharmacological sciences. 1999 Apr 1;20(4):162-70.

56. Fonteh AN, Atsumi GI, LaPorte T, Chilton FH. Secretory phospholipase A2 receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A2 in murine bone marrow-derived mast cells. The Journal of Immunology. 2000 Sep 1;165(5):2773-82.

57. Ruiter GA, Verheij M, Zerp SF, van Blitterswijk WJ. Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. 2001 Feb 1;49(2):415-9.

58. Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt/PKB survival pathway. Anti-cancer drugs. 2003 Feb 1;14(2):167-73.

59. Oršolić N. Potentiation of Bleomycin lethality in HeLa and V79 cells by bee venom. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 2009 Sep 1;60(3):317-26.

60. Chafouleas JG, Bolton WE, Means AR. Potentiation of bleomycin lethality by anticalmodulin drugs: a role for calmodulin in DNA repair. Science. 1984 Jun 22;224(4655):1346-8.

61. Oršolić, N., & Bašić, I. Apoptosis and necrosis aspossible mechanisms for antitumor activity of bee venom.Mellifera. 2003 May 1;3(5).