Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 21, No. 2, May-Jun 2013
Pages: 226-237

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۱، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۲
صفحه: ۲۳۷-۲۲۶

جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل بومی ایران و بررسی اثر آن بر تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه رحم – رده HeLa

حنانه زرین نهاد[۱]، امیر محمودزاده[۲]، کامران پوشنگ باقری[۳]، مهدی مهدوی[۴]، دلاور شهباززاده[۵]، علی مرادی[*۶]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، پردیس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، پردیس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۳،۵- استادیار گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۴- استادیار گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۶- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۱

چکیده

مقدمه: سرطان دهانه رحم دومین سرطان شایع در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. با توجه به اینکه روش‌های متداول درمان به اندازه کافی مؤثر نبوده و با عوارض جانبی همراه است، جستجوی راه‌های درمانی جدید با استفاده از ترکیبات طبیعی اهمیت ویژه‌ای دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر ملیتین مستخرج از زهر زنبور عسل بر تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه رحم- رده HeLa انجام پذیرفت.

روش بررسی: ملیتین با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (RP-HPLC) از زهر زنبور عسل بومی ایران استخراج گردید. جهت اطمینان از فعالیت بیولوژیک ملیتین، تست همولیتیک بر روی گلبول‌های قرمز انجام گردید. در این مطالعه اثر مهاری ملیتین بر تکثیر و میزان حیات (Viability) سلول‌های سرطانی رده HeLa بررسی گردید. به این منظور رده سلولی HeLa در پلیت ۹۶- خانه کشت داده شد. سپس در مجاورت غلظت‌های مختلف ملیتین با زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار گردید. در انتها حیات سلول‌ها با روش MTT در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید.

نتایج: غلظتی از ملیتین که فعالیت همولیتیک ۵۰ درصدی از خود نشان داد، HD۵۰=۰/۵µg/ml شد، در حالی که در مجاورت سرم جنین گاوی (FBS) فعالیت همولیتیک به HD ۵۰=۲µg/ml کاهش یافت. میزان زنده بودن ۵۰ درصدی سلول‌های سرطانی در تیمار با ملیتین با توجه به تست MTT با زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت، ۱µg/ml به دست آمد.

نتیجه‌گیری: ملیتین دارای فعالیت همولیتیک قابل توجهی می‌باشد و از نظر بیولوژیکی بسیار فعال است. نتایج تست MTT نشان داد که ملیتین در شرایط وابسته به غلظت و زمان انکوباسیون، تکثیر سلول‌های HeLa را مهار می‌کند، لذا مطالعات دیگر جهت بررسی مکانیسم اثر ملیتین پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ملیتین، سرطان دهانه رحم، رده سلولی HeLa، MTT

[*](نویسنده مسئول)؛ تلفن : ۰۳۵۱-۸۲۱۳۰۹۱ - داخلی (۲۷۱)، پست الکترونیکی: morady2008@gmail.com

- **این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد می‌باشد.**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

مقدمه

زهر زنبور عسل (BV: Bee Venom) ترکیبی مایع، بی‌رنگ و اسیدی با pH، ۴/۵ تا ۵/۵ می‌باشد که با اتانول غیرفعال می‌شود. پروتئین‌ها و پپتیدها، بخش اصلی زهر و اسیدهای آمینه و ترکیبات معدنی، بخش کوچک آن را تشکیل می‌دهند(۱). بخش فعال زهر از پروتئین‌های متعددی تشکیل شده که موجب التهاب می‌گردند، خاصیت ضدانعقادی دارند و در پزشکی، علم فارماکولوژی و صنعت داروسازی مورد توجه قرارگرفته‌اند(۲). ترکیبات زهر و مکانیسم عمل آنها تا سال‌های ۱۹۵۰-۱۹۴۰ میلادی به دلیل عدم دسترسی به روش‌های مناسب جهت تجزیه و تحلیل، ناشناخته مانده بود. بنابراین تمام اثرات زهر به فعالیت آنزیم فسفولیپازی آن نسبت داده می‌شد. گسترش روش‌های مختلف مانند الکتروفورز، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و پیشرفت در علم بیوشیمی و داروسازی، باعث شد که مکانیسم فعالیت اجزاء زهر زنبور عسل بهتر شناخته شود(۳). ترکیبات مختلف زهر زنبور عسل از اواسط قرن بیستم جدا و شناسایی شد(۴).

زهر زنبور عسل حداقل ۲۸ ترکیب فعال با خواص درمانی متفاوت دارد(۵). این ترکیب از پپتیدهای مختلفی از جمله ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید MCD: Mast Cell Degranulation تشکیل شده است. همچنین آنزیم‌های مانند فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز، آمین‌هایی با فعالیت بیولوژیک متفاوت مانند هیستامین، اپی‌نفرین و اجزاء غیرپپتیدی مانند لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، سینکالین، گلیسرول، نوراپی نفرین و اسیدهای آمینه آزاد از دیگر اجزاء زهر زنبور عسل می‌باشند(۵،۶). ترکیب اصلی زهر لیوفیلیزه، پپتیدی است که توسط محققی به نام Habermann، ملیتین نامیده شده است(۷). این ترکیب، مهم‌ترین جزء فعال زهر زنبور عسل می‌باشد که حدود ۵۰ درصد وزن خشک سم را تشکیل می‌دهد(۸). ملیتین که القاءکننده قوی آپوپتوز و دارای اثرات ضدسرطانی قابل‌توجهی می‌باشد(۹)، در سال ۱۹۵۲ میلادی طی آزمایشات الکتروفورتیک با فسفولیپاز A شناسایی شد(۳). این ترکیب آمفی‌پاتیک، دارای ۲۶ اسیدآمینه با ۶ بار مثبت می‌باشد(۶)، به عبارت دیگر قسمت N-ترمینال مولکول به طور مشخصی هیدروفوب و ناحیه C-ترمینال، هیدروفیل، به شدت بازی و فاقد پل‌دی‌سولفید می‌باشد(۸). خاصیت دوگانه دوستی ملیتین، آن را به یک ترکیب قابل حل در آب تبدیل کرده است(۱۰). این ترکیب دارای فعالیت بالای لیز سلولی به خصوص لیز غشاء گلبول‌های قرمز می‌باشد(۱۱) و در توالی خود بخشی دارد که شبیه به شوینده عمل می‌کند و احتمالاً خاصیت لیزکنندگی ملیتین به همین بخش وابسته است. این پپتید دارای اثرات ضدسرطانی نیز می‌باشد(۱۲). مکانیسم ضدسرطانی ملیتین با آپوپتوز، نکروز و لیز سلول‌های سرطانی توصیف می‌شود(۱۳). ملیتین می‌تواند فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) را القاء کند(۱۴). اخیراً ملیتین به عنوان یک ترکیب ضدسرطان مورد توجه قرار گرفته است و محققین با ایجاد تغییراتی در مولکول آن سعی کرده‌اند انواع واکنش‌های آلرژیک ناشی از بکارگیری ملیتین را کاهش دهند(۸). در سرطان‌هایی مانند سرطان کلیه، ریه، کبد، پروستات، مثانه، لوسمی‌ها و ... سلول‌های بدخیم می‌توانند هدف ملیتین قرار بگیرند(۵). با این همه مکانیسم اثرات ضدسرطانی ملیتین به طور کامل شناخته نشده است(۸). زهر از طریق القاء آپوپتوز، رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم را در سلول‌های سرطانی ریه(۱۵)، سرطان کبد(۱۶)، سرطان پستان(۱۷) و ... مهار می‌کند. سرطان دهانه رحم (Cervical Cancer) یکی از سرطان‌های شایع در زنان می‌باشد. سالیانه حدود ۵۰۰ هزار زن به این بیماری مبتلا می‌شوند و حدود ۳۰۰ هزار نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. بیشتر قربانیان این بیماری در کشورهای در حال توسعه هستند(۱۸). سرطان دهانه رحم در حدود ۱/۶ درصد مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان و ۱۵ درصد مرگ‌های ناشی از سرطان‌های دستگاه تناسلی آنان را به خود اختصاص داده است. امروزه برای درمان سرطان دهانه رحم از روش‌های جراحی، لیزر و فریز کردن جهت از بین بردن بافت و در موارد بسیار شدید از شیمی‌درمانی و پرتودرمانی استفاده می‌شود. درصد درمان با شیمی‌درمانی را حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد اعلام می‌کنند(۱۹). تمام روش‌های ذکر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

شده برای درمان این سرطان روش‌های تهاجمی با عوارض جانبی هستند. با توجه به معایب روش‌های درمانی موجود، نیاز به استفاده از ترکیبات و روش‌های نوین به ویژه ترکیبات طبیعی موجود در طبیعت در کنترل و درمان سرطان دهانه رحم بیش از پیش احساس می‌گردد. لذا در این مطالعه اثر ملیتین جدا شده از زهر زنبور عسل بومی ایران بر تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه رحم مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه از نوع علوم پایه (Basic Science) است. جهت جمع‌آوری زهر زنبور عسل بومی ایران، ابتدا یک کندوی زنبور عسل ایرانی (Apis mellifera meda) واقع در زنبورستانی در منطقه کوهرنگ استان چهارمحال بختیاری انتخاب و از نظر سلامت و نژاد مورد تأیید قرار گرفت.

زهر زنبور عسل به وسیله دستگاه جمع‌آوری زهر زنبور از طریق تحریک الکتریکی و با اندکی تغییر در پروتکل Benton و همکاران در سال ۱۹۶۳ به دست آمد(۲۰). این وسیله جمع‌آوری کننده ونوم با ایجاد شوک الکتریکی، زنبورهای عسل را تحریک می‌کند تا صفحه جمع‌آوری کننده را نیش بزنند. زهر از روی صفحه، جمع‌آوری و برای استفاده بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

جهت آماده سازی زهر زنبور عسل برای تزریق به دستگاه HPLC، ۵ میلی‌گرم از ونوم به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شده و در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شد. سپس به مدت ۲ دقیقه با دستگاه Vortex مخلوط گردید. محلول حاصل در دمای اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روئی به آرامی برداشته شده و رسوب حاصل دور انداخته شد. سوپ روئی به دست آمده در میکروتیوپ‌های فیلتردار با فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر ریخته شد و مجدداً سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف به دست آمده در یک میکروتیوپ تمیز جمع‌آوری و سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد برای آزمایشات بعدی ذخیره شد.

جهت جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - فاز معکوس (Reverse Phase-HPLC) استفاده گردید. در RP-HPLC فاز ثابت شامل یک ماده مانند سیلیکا با یک گروه الکیلی مانند $C_{18}H_{37}$ (ستون C۱۸) یا C_8H_{17} (ستون C۸) می‌باشد و فاز متحرک در این نوع کروماتوگرافی، یک محلول نیمه قطبی است که حاوی استونیتریل، آب بسیار خالص و میزان بسیار کمی تری‌فلوئورو استیک اسید (۰/۰۱ تا ۰/۱ درصد) می‌باشد. جداسازی در RP-HPLC بر اساس اثرات متقابل نیروهای هیدروفوبیک انجام می‌گیرد. در ابتدا شرایط یونی ستون به گونه‌ای تنظیم گردید که مواد به ستون متصل شوند. در این مرحله از محلول‌های به نسبت قطبی مانند آب استفاده شد. در ادامه با تغییر تدریجی قطبیت محلول (استفاده از محلول‌های با قطبیت کمتر مانند استونیتریل) مواد متصل به ستون به ترتیب افزایش در میزان هیدروفوبیسیته خارج شدند. در این مطالعه به منظور شناسایی و همچنین جداسازی ملیتین از دستگاه HPLC (Knauer GmbH, Germany) استفاده شد. سیستم HPLC مورد استفاده از اجزای زیر تشکیل شده بود: پمپ، دتکتور UV، سیستم تزریق با ظرفیت ۲۰ میکرولیتر و یک سیستم کامپیوتر با نرم‌افزار Chrom Gate و ستون C۱۸. این سیستم شامل ۴ محلول اصلی متانول به عنوان محلول A، آب مقطر با درجه خلوص بالا برای HPLC به عنوان محلول B، استونیتریل به همراه ۰/۰۵ درصد تری‌فلورواستیک اسید به عنوان محلول C، آب دیونیزه به همراه ۰/۰۵ درصد تری‌فلورواستیک اسید به عنوان محلول D می‌باشد. پس از تزریق نمونه به دستگاه و پیش از اعمال گرادیانت خطی، ستون به مدت ۵ دقیقه، با ۱۰۰ درصد محلول D شسته شد، سپس از دقیقه ۵ تا دقیقه ۶۰، گرادیانت خطی صفر تا ۶۰ درصد محلول C به مدت ۵۵ دقیقه اعمال گردید. از دقیقه ۶۰ تا ۶۵، یک افزایش ناگهانی گرادیانت خطی در محلول C تا ۹۰ درصد و یک کاهش ناگهانی گرادیانت خطی در محلول D تا ۱۰ درصد اعمال شد. از دقیقه ۶۵ تا ۷۰ محلول C به صفر درصد و محلول D به ۱۰۰ درصد رسید. فراکشن‌های جمع‌آوری شده توسط دستگاه Freeze Dryer (Christ, 2 alpha- Germany) لیوفیلیزه گردیدند. در ادامه به منظور تأیید ملیتین به دست آمده از زهر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

زنبور عسل بومی ایران، ملیتین استاندارد خریداری شده از شرکت سیگما، با روش مشابه به ستون HPLC تزریق شد و کروماتوگرام حاصل از ملیتین سیگما با کروماتوگرام ملیتین استخراج شده از زهر زنبور عسل بومی ایران مقایسه گردید.

برای اندازه‌گیری غلظت ملیتین، روش تعیین غلظت پروتئین (BCA: Bicin Choninic Acid) با استفاده از کیت Smart BCA Protein Assay Kit (شرکت intron) و مطابق با دستور کیت انجام گردید.

مهم‌ترین فعالیت بیولوژیکی ملیتین فعالیت همولیتیک آن است. فعالیت همولیتیک ملیتین، همان توانایی پپتید در از بین بردن غشای پلاسمایی گلبول‌های قرمز خون می‌باشد که منجر به لیز گلبول‌های قرمز، خروج هموگلوبین و افزایش جذب سلول‌های قرمز خون (RBC) در ۵۴۰ نانومتر می‌شود.

این تست بر اساس پروتکل Al Badri و همکاران با اندکی تغییر انجام شد(۲۱). پس از خونگیری حدود ۱۰ میکرولیتر هپارین به ۵ میلی‌لیتر خون تازه و سالم اضافه شد. فالکون حاوی خون هپارینه به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرارگرفت. سپس به منظور حذف پلاسما و سلول‌های لیز شده، خون کامل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ گردید و با PBS شسته شد. این شستشو تا زمانی ادامه می‌یابد که سوپ روئی RBC کاملاً شفاف شود. پس از شست و شوی نهایی، مایع روئی به آرامی با سمپلر برداشته و دور ریخته شد. به منظور تهیه سوسپانسیون ۲٪RBC، اریتروسیت‌ها با PBS رقیق شدند. به عنوان مثال، برای تهیه ۱۰ میلی‌لیتر ۲٪RBC، از سوسپانسیون حاصل ۲۰۰ میکرولیتر، به یک فالکون منتقل و حجم آن با PBS به ۱۰ سی سی رسانده شد. در مرحله بعد برای ایجاد غلظت‌های ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ملیتین با ۱۰۰ میکرولیتر PBS در یک ردیف از پلیت ۹۶ خانه به طور سریالی رقیق شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ۲٪RBC به هر خانه اضافه گردید (حجم نهایی هر خانه از پلیت، به ۲۰۰ میکرولیتر رسید). هم زمان با مراحل انجام آزمایش، یک ردیف از پلیت به کنترل منفی (۱۰۰ میکرولیتر PBS و ۱۰۰ میکرولیتر RBC دو درصد) و ردیف بعدی به کنترل مثبت (۱۰۰ میکرولیتر ترایتون X۱۰۰ ۱٪ و ۱۰۰ میکرولیتر ۲٪RBC اختصاص داده شد. به عبارت دیگر، پلیت ۹۶ خانه حاوی سه ردیف کنترل منفی، کنترل مثبت و ملیتین رقیق شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. بعد از انکوباسیون، پلیت ۹۶ خانه با دور ۳۰۰۰ تا۳۵۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از سوپ رویی هر خانه به خانه‌های معادل آن در پلیت دیگر منتقل گردید. جذب هموگلوبین آزاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر و با دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر (EPOCH- Biotech, USA) خوانده شد. مراحل انکوباسیون، سانتریفیوژ و اندازه‌گیری جذب نوری برای نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی نیز همانند سایر نمونه‌های مجهول انجام گرفت. داده‌ها با کنترل منفی و کنترل مثبت مقایسه شدند. این آزمایشات سه بار تکرار گردید.

درصد همولیز سلول‌های خونی به صورت زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد همولیز} = \frac{\text{(جذب نوری نمونه ـ جذب نوری کنترل منفی)}}{\text{(جذب نوری کنترل مثبت ـ جذب نوری کنترل منفی)}} \times ۱۰۰$$

علاوه بر این به منظور نشان دادن اثر مهاری سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum) بر قدرت لایز سلول‌ها توسط ملیتین، آزمایشی طراحی گردید. در این آزمایش، در مرحله تهیه سوسپانسیون ۲٪RBC، به PBS مورد استفاده ۱۰ درصد FBS اضافه گردید. سپس تمام مراحل انجام شده در تست همولیتیک در این آزمایش مرحله به مرحله تکرار شد. به این صورت که همان غلظت‌های ملیتین استفاده شده در مرحله قبل به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون ۲٪RBC اضافه گردید. در این آزمایش سلول‌های تیمار شده با PBS به عنوان کنترل منفی و سلول‌های تیمار شده با ترایتون X-100 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. سایر مراحل کاملاً مشابه با آزمایش اول انجام گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Sigma plot نسخه ۱۱ تجزیه و تحلیل و نتایج حاصل از این آزمایش با آزمایش فاقد FBS مقایسه شد.

سلول‌های رده HeLa در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO2 نگهداری گردید. پس از اینکه سلول‌ها تقسیم شده و کف فلاسک کشت سلول را اشغال کردند، به کمک محلول حاوی ۰/۲۵٪ آنزیم تریپسین و ۰/۱٪ EDTA از کف فلاسک جدا و پس از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ معکوس شمارش شدند.

سلول‌های HeLa از کف فلاسک $25\ cm^2$ جدا شدند. شمارش سلولی انجام گردید و تعداد ۱۰۴ × ۴ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف با حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت (۱۰٪ FBS+RPMI۱۶۴۰)، کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ و ۵٪CO2 قرار داده شدند. سپس محیط کشت حاوی سرم از چاهک‌ها خارج و سلول‌ها با غلظت‌های ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ µg/ml ملیتین در محیط کشت فاقد FBS به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار گردیدند. ۴ ساعت پیش از پایان مدت زمان انکوباسیون به هر یک از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۲/۵ گرم در میلی‌لیتر) اضافه گردید. سپس پلیت‌ها مجدداً به مدت چهار ساعت در انکوباتور با همان شرایط قبلی قرار گرفتند. در پایان زمان انکوباسیون، کریستال‌های تشکیل شده در پلیت را با میکروسکوپ معکوس مشاهده کرده و محیط کشت با سمپلر چند کاناله به آرامی، به طوری که نوک سمپلر به کریستال‌های نامحلول فرمازان در کف پلیت برخورد نکند، خارج شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه گردید. چندین بار محلول به آرامی با سمپلر پیپت شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Epoch, Biotech,USA) اندازه‌گیری گردید. آزمایش به صورت ۳ بار تکرار و نتایج به صورت انحراف معیار±میانگین نمایش داده شدند.

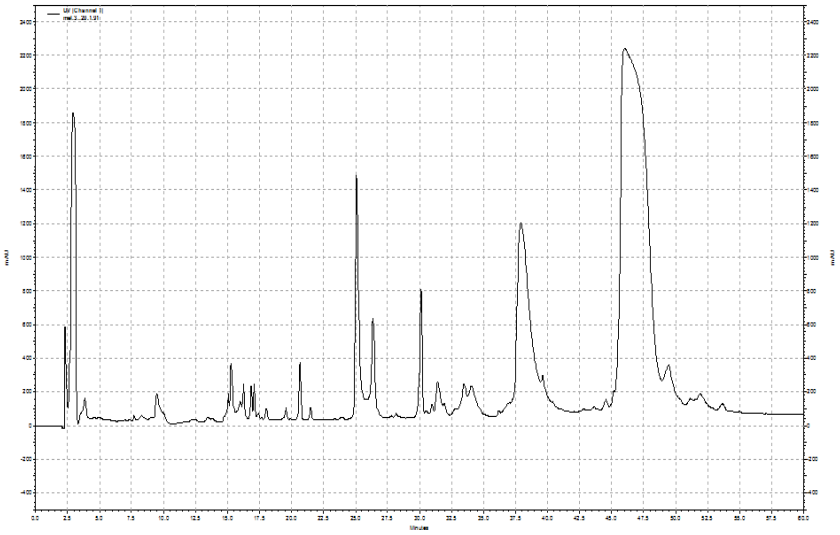
درصد سمیت و نیز درصد سلول‌های زنده با کمک فرمول‌های زیر محاسبه می‌شوند:

$$\text{درصد سمیت} = \left(1 - \frac{\text{(میانگین جذب نوری نمونه)}}{\text{(کنترل منفی)}}\right) \times 100 \quad \text{(Toxicity)}$$

(درصد سمیت − ۱۰۰) × حیات = درصد سلول‌های زنده

نتایج

در این مطالعه کروماتوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل زهر زنبور عسل بومی ایران نشان‌دهنده وجود بیش از ۱۰۰ ترکیب مختلف در زهر بود. حدود ۲۰ پیک بزرگ در این کروماتوگرام قابل تشخیص می‌باشد. پیک مربوط به ملیتین به صورت دستی جمع‌آوری گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ملیتین حدود ۴۹ تا ۵۰ درصد زهر زنبور عسل بومی ایران را تشکیل می‌دهد. این پپتید، در دقیقه ۴۵/۶ در گرادیانت خطی ۴۰ درصد محلول C (استونیتریل) و ۶۰ درصد محلول D (آب +TFA٪۰/۰۵) از ستون خارج گردید (شکل ۱).

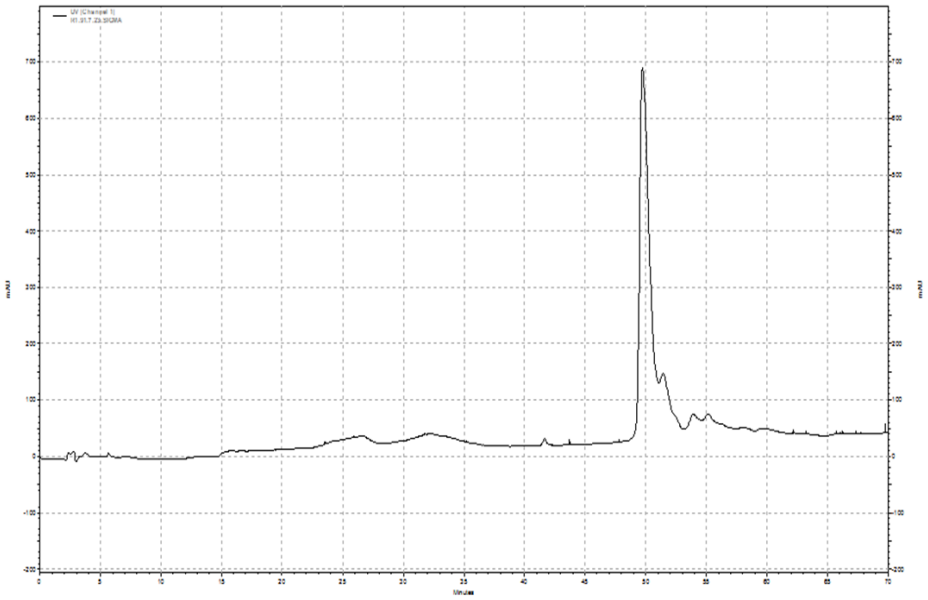


شکل ۱: پروفایل پروتئینی تجزیه و تحلیل زهرزنبور عسل بومی ایران توسط HPLC در طول موج ۲۱۴nm

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

ملیتین ۴۵/۶ دقیقه پس از تزریق زهر به دستگاه در گرادیانت خطی ۴۰ درصد محلول C و ۶۰ درصد محلول D خارج گردید.

ملیتین خریداری شده از شرکت سیگما نیز با روش مشابه به ستون HPLC تزریق گردید و در دقیقه ۴۸/۱ از ستون جدا شد (شکل ۲).



شکل۲: پروفایل پروتئینی تجزیه و تحلیل ملیتین سیگما توسط HPLC در طول موج ۲۱۴ nm

ملیتین سیگما ۴۸/۱ دقیقه پس از تزریق زهر به دستگاه در گرادیانت خطی ۴۵ درصد محلول C و ۵۵ درصد محلول D خارج گردید.

تست همولیتیک به منظور بررسی اثر همولیتیک ملیتین بر سلول‌های قرمز خون انسان انجام شد.

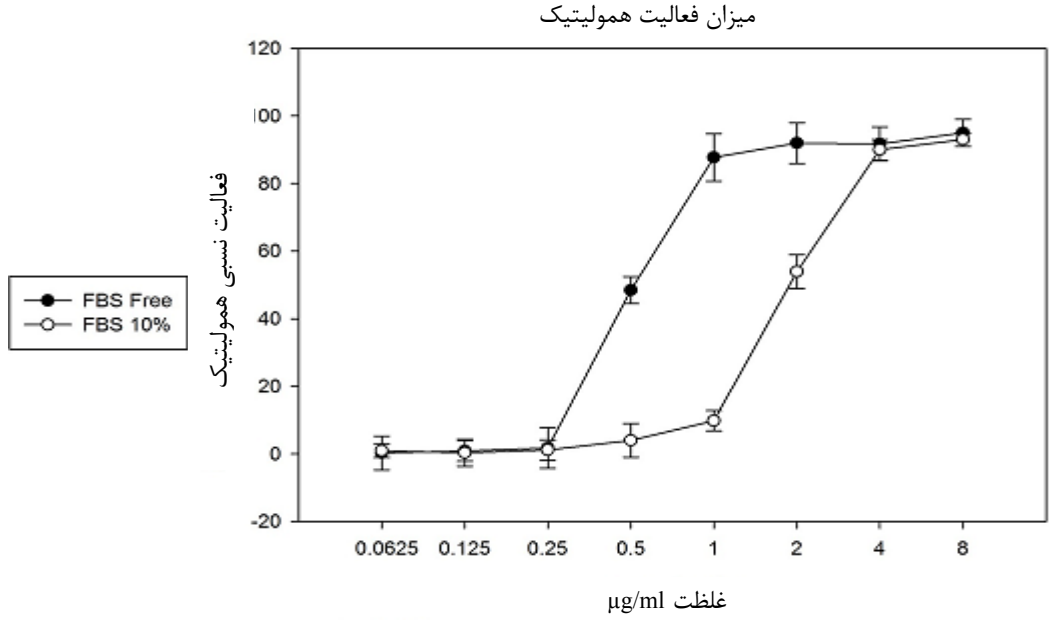
در این مطالعه آزمایش همولیتیک نشان داد که ملیتین در غلظت‌های کمتر از ۰/۲۵µg/ml فاقد فعالیت همولیتیک چشمگیر می‌باشد، در حالی که در مقایسه با کنترل مثبت، در غلظت‌های بالاتر از ۱µg/ml فعالیت همولیتیک ملیتین، تقریباً ۹۰ درصد بوده است. غلظتی از ملیتین که به نسبت ترایتون X۱۰۰ (کنترل مثبت) باعث لیز ۵۰ درصد از گلبول‌های قرمز می‌شود (HD۵۰) برابر ۰/۵µg/ml تعیین گردید.

علاوه بر این در آزمایش طراحی شده و به منظور بررسی اثر مهاری سرم جنین گاوی (FBS) بر فعالیت همولیتیک ملیتن، مشاهده گردید، این ماده به شدت فعالیت همولیتیک ملیتین را مهار می‌کند. نتایج این آزمایش نشان دادند که ملیتین تا غلظت ۱ µg/ml در حضور FBS فاقد فعالیت همولیتیک بوده و تنها در غلظت‌های ۴ µg/ml و ۸ ملیتین فعالیت شدید همولیتیک از خود نشان دادند. در این مطالعه ۵۰ HD ملیتین در حضور FBS برابر ۲ µg/ml تعیین گردید که نشان‌دهنده افزایش۵۰ HD در حضور FBS نسبت به عدم حضور آن می‌باشد.

نمودار فعالیت همولیتیک ملیتین دارای ۳ ناحیه مشخص می‌باشد؛ ناحیه ۱: غلظت‌هایی از ملیتین که میزان فعالیت در آنها بسیار پایین و در حد صفر می‌باشد و قادر به قرار گرفتن در داخل غشاء نیست. ناحیه ۲: غلظت‌هایی که در آنها فعالیت ملیتین با شیب تندی افزایش می‌یابد؛ و در پایان ناحیه ۳: غلظت‌هایی از ملیتین که فعالیت در آنها حداکثر بوده و سریعاً باعث تخریب غشاء می‌شود و افزایش در میزان ملیتین دیگر نمی‌تواند منجر به افزایش فعالیت گردد (نمودار ۱).

به این ترتیب شکل خاص سیگموئیدی نمودار فعالیت همولیتیک ملیتین ایجاد می‌گردد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

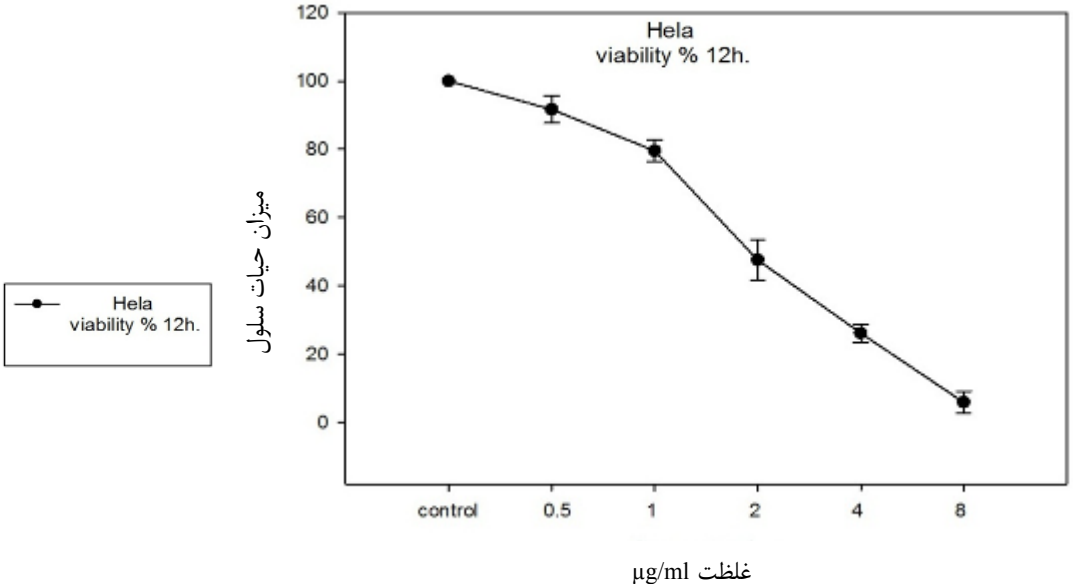


نمودار ۱: مقایسه فعالیت همولیتیک در حضور و بدون حضور FBS

تست با سه بار تکرار انجام و نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین نمایش داده شد.

تست MTT به منظور بررسی اثر ملیتین بر مهار رشد سلول‌های رده HeLa انجام شد.

نتایج مربوط به اثر ملیتین بر کاهش حیات سلول‌ها در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت به ترتیب در نمودارهای ۲ و ۳ آمده است. این نتایج نشان می‌دهند که اثر مهاری ملیتین بر رشد سلول‌های سرطانی رحم رده HeLa به غلظت ملیتین و مدت زمان انکوباسیون وابسته می‌باشد. غلظتی از ملیتین که موجب مرگ ۵۰ درصدی سلول‌های سرطانی شده است (IC۵۰) در مدت ۱۲ ساعت برابر ۱/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای ۲۴ ساعت برابر ۱/۷میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. میزان حیات سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های فوق برای مدت زمان ۱۲ ساعت به ترتیب برابر ۳/۱۹±۵/۸۹، ۲/۶۱±۲۶/۱۷، ۵/۹۸±۴۷/۵۸، ۳/۲±۷۹/۵۶ و ۴±۹۱/۶۷ محاسبه گردید (نمودار۲).



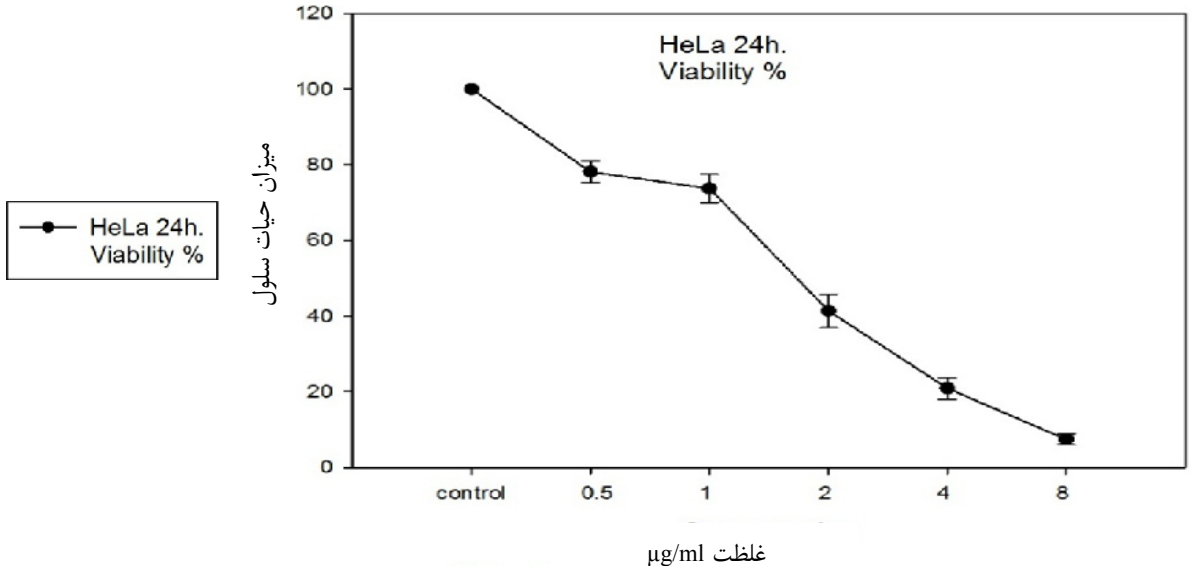
نمودار ۲: درصد حیات سلول‌های HeLa تیمار شده با ملیتین به مدت ۱۲ ساعت

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

حیات سلول‌ها تست MTT و سه بار تکرار، اندازه‌گیری نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده است.

همچنین میزان حیات سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های فوق برای مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب برابر ۱/۴۲±۷/۴۳، ۲/۸۱±۲۰/۸۸، ۴/۴۶±۴۱/۳۷، ۳/۶۸±۷۳/۷۳ و ۲/۸۲±۷۸/۱ محاسبه گردید (نمودار۳).

حیات سلول‌ها با تست MTT و سه بار تکرار، اندازه‌گیری و نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده است.



نمودار ۳: درصد حیات سلول‌های HeLa تیمار شده با ملیتین به مدت ۲۴ ساعت

بحث

هدف اصلی این مطالعه جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل بومی ایران و بررسی اثر مهاری آن بر رشد سلول‌های سرطانی رده HeLa بوده است. به علاوه در این مطالعه اثرات بیولوژیک ملیتین و نقش FBS در کاهش میزان تخریب ملیتین بر گلبول‌های قرمز، با تست همولیتیک بررسی گردید. نکته قابل توجه در این پژوهش که در مطالعات قبلی وجود ندارد، نوع و منبع زهر به کار برده شده (زهر زنبور عسل ایرانی) می‌باشد.

در اغلب مطالعات مشابه، ملیتین به صورت تجاری خریداری و برای انجام آزمایشات مختلف استفاده شد. در حالی که در تعداد معدودی از مطالعات از جمله پژوهش حاضر، پپتید به روش دستی و با روش RP-HPLC از زهر زنبور عسل تخلیص گردید.

در این مطالعه کروماتوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل کروماتوگرافیک زهر زنبور عسل بومی ایران نشان داد که ملیتین حدود ۵۰ درصد ترکیبات زهر را تشکیل می‌دهد که این نتیجه با گزارشات Rybak-chmielewska و همکارش مطابقت دارد(۴).

تعداد پیک‌های مشاهده شده در این کروماتوگرام مشابه گزارشات پیش از این در رابطه با زهر زنبور عسل بومی سایر مناطق جهان می‌باشد(۲۲)، بنابراین به نظر می‌رسد تفاوت چشمگیری در میزان و نوع ترکیبات زهر زنبور عسل بومی ایران در مقایسه با مناطق دیگر مانند زهر زنبور عسل بومی اروپا و برزیل وجود نداشته باشد(۶). مقایسه کروماتوگرام حاصل از HPLC ملیتین سیگما و ملیتین استخراج شده از زنبور عسل ایرانی، شباهت ملیتین حاصل از زنبور ایرانی و غیرایرانی را به وضوح نشان می‌دهد. با انجام آزمایشاتی چون تعیین غلظت و HPLC، دیده شده است ملیتین استخراج شده از زهر زنبور عسل بومی ایران از نظر درجه خلوص نسبت به نوع دیگر به مراتب برتری دارد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

به منظور نشان دادن اثر مهاری ترکیباتی چون اسیدهای چرب و کلسترول بر فعالیت ملیتین، از FBS که حاوی مقادیر زیادی پروتئین، کلسترول و انواع اسیدهای چرب می‌باشد، استفاده گردید. آزمایش همولیتیکی که به این منظور طراحی شده بود، نشان داد که فعالیت همولیتیک ملیتین در حضور FBS به شدت کاهش می‌یابد. این اتفاق با افزایش HD۵۰ از ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در حضور ۱۰ درصد FBS در محیط قابل مشاهده است. بنابراین در تست MTT، هنگام تیمار سلول‌ها، برای نشان دادن اثر واقعی ملیتین بر مهار رشد سلول‌های سرطانی، از محیط کشت فاقد FBS استفاده شد، در حالی که در پژوهش‌هایی که پیش از این صورت گرفته بود FBS در این مرحله از پژوهش، از محیط کشت حذف نمی‌شد و بنابراین IC۵۰ ملیتین به طور قابل توجهی افزایش می‌یافت.

پیش از این در مطالعات متعددی، اثر ملیتین بر حیات سلول تأیید شده بود(۲۳).

از آنجایی که ملیتین دارای بخش‌های هیدروفوب در ساختار خود می‌باشد، دیده شده که به راحتی می‌تواند در ساختار ایجاد منفذ کند و همچنین در غلظت‌های خیلی پایین می‌تواند طی مکانیسم‌های خاص که هنوز مشخص نیست باعث شروع آپوپتوز یا مرگ سلولی شود. سلول‌های سرطانی از آنجایی که دارای تقسیمات بیشتر سلولی هستند، بیشتر تحت تأثیر آپوپتوزی ملیتین قرار می‌گیرند. این موضوع با توجه به نتایج به دست آمده از فلوسایتومتری با پروپودیوم یدید و انکسین ۵ روشن شده است.

در این مطالعه نیز نتایج حاصل از تست MTT، اثر مهاری ملیتین بر حیات سلول‌ها را تأیید کرد. این اثر مهاری با غلظت ملیتین و مدت زمان انکوباسیون ارتباط مستقیم دارد. به عبارت دیگر، میزان سمیت ملیتین بر روی سلول‌های سرطانی، با افزایش غلظت ملیتین و مدت زمان اثر آن افزایش می‌یابد و به ویژه در غلظت‌های بالاتر از ۱ µg/ml، رشد سلول‌های سرطانی HeLa به شدت مهار می‌شود. این نتایج مطابق با گزارش Moon و همکاران می‌باشد(۲۴). در مطالعات دیگری که پیش از این صورت گرفته بود نیز ملیتین جدا شده از زهر زنبور عسل، در شرایط وابسته به غلظت و مدت زمان انکوباسیون، رشد سلول‌های سرطانی را مهار می‌کرد(۲۶،۲۵). بنابراین ملیتین (اصلی‌ترین جزء زهر زنبور عسل) می‌تواند به عنوان یک ترکیب طبیعی مناسب برای تحقیقات ضدسرطانی در آینده مورد مطالعات بیشتری قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ملیتین با درجه خلوص بالا از زهر زنبور عسل بومی ایران جدا شد. با تست همولیتیک مشخص شد که ملیتین جدا شده از زهر زنبور عسل به لحاظ بیولوژیکی بسیار فعال است و FBS که دارای انواع اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب می‌باشد، سمیت ملیتین را تا حد قابل توجهی مهار می‌کند. تست MTT نیز نشان داد که ملیتین در شرایط وابسته به غلظت و زمان انکوباسیون، رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی HeLa را مهار می‌کند و دارای اثرات توکسیک در این سلول‌ها می‌باشد.

نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یافته‌های اولیه در درمان سرطان دهانه رحم با ملیتین به طور گسترده‌تر مورد بررسی قرار گیرد.

عدم انجام بعضی از روش‌های مرتبط به دلیل کمبود بودجه و عدم دسترسی آسان به برخی از کیت ها و مواد مورد نیاز از محدودیت‌های پژوهش حاضر بودند.

سپاسگزاری

در پایان لازم می‌دانم از آزمایشگاه ونوم و توکسین انستیتو پاستور ایران به پاس همکاری‌های بی‌شائبه و حمایت‌های بی‌دریغشان در تمام مراحل انجام این مطالعه تشکر نمایم.

References:

1- Moon DO, Park SY, Lee KJ, Heo MS, Kim KC, Kim MO, et al. ***Bee venom and melittin reduce***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. Int Immunopharmacol 2007; 7(8): 1092-101.

2- Bogdanov S. ***Bee venom: composition, health, medicine: a review.*** Peptides. 1: p. 0.6.

3- Klocek G, Seeling J. ***Melittin interaction with sulfated cell sugars.*** Biochemistry 2008; 47(9): 2841-9.

4- Rybak-Chmielewska H, Szczêsna T. ***Hplc study of chemical composition of honeybee (Apis mellifera L.) venom***. J Apicul Sci 2004; 48(2): 103-9.

5- Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, 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(2): 246-70.

6- Zhao J, Zhang S, Shen J, Qi Y, Xue X, Li Y, et al. ***Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from Apis mellifera by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry.*** Anal Biochem 2010; 404(2): 171-8.

7- Gauldie J, Hanson JM, Rumjanek FD, Shipolini RA, Vernon CA. ***The peptide components of bee venom.*** Eur J Biochem 1976; 61(2): 369-76.

8- Bramwell VW, Somavarapu S, Outschoorn I, Alpar HO. ***Adjuvant action of melittin following intranasal immunisation with tetanus and diphtheria toxoids.*** J Drug Target 2003; 11(8-10): 525-30.

9- Hong SJ, Rim GS, Yang HI, Yin CS, Koh HG, Jang AH, et al. ***Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis.*** Toxicon 2005; 46(1): 39-45.

10- Raghuraman H, Chattopadhyay A. ***Interaction of melittin with membrane cholesterol: a fluorescence approach.*** Biophys J 2004; 87(4): 2419-32.

11- Uawonggul N, Thammasirira KS, Chaveerach A, Chuachan C, Daduang S. ***Plant extract activities against the fibroblast cell lysis by honey bee venom*** J Med Plants Res 2011; 5(10),1978-86.

12- Winder D, Günzburgb WH, Erfle V, Salmons B. ***Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells.*** Biochem Biophy Res Commun 1998; 242(3): 608-12.

13- Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, Bartsch G, Thurnher M. ***Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3, 4)-bisphosphate.*** Cancer Immunol Immunother 2006 55(11): 1374-83.

14- Vento R, D'Alessandro N, Giuliano M, Lauricella M, Carabillò M, Tesoriere G. ***Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress.*** Exp Eye Res 2000; 70(4): 503-17.

15- Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I, et al. ***Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299.*** J Pharmacol Sci 2003; 91(2): 95-104.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

16- Wang C, Chen T, Zhang N, Yang M, Li B, Lü X, et al. ***Melittin, a major component of bee venom , sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κB α kinase-NF κB.*** J Biolog Chem 2009; 284(6): 3804-13.

17- Ip SW, Liao SS, Lin SY, Lin JP, Yang JS, Lin ML, et al. ***The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells.*** In Vivo 2008; 22(2): 237-45.

18- Znaor A. ***Cervical cancer epidemiology.*** Hrvatski kongres ginekološke onkologije s međunarodnim sudjelovanjem; 2008.

19- Bergmark K, Avall-Lundqvist E, Dickman PW, Henningsohn L, Steineck G. ***Patient-rating of distressful symptoms after treatment for early cervical cancer.*** Acta Obstet Gynecol Scand 2002; 81(5): 443-50.

20- Benton AW, Morse MR, Stewart JD. ***Venom collection from honeybees.*** Science 1963; 142(3589): 228-30.

21- Al-Badri ZM, Som A, Lyon S, Nelson CF, Nüsslein K, Tew GN. ***Investigating the effect of increasing charge density on the hemolytic activity of synthetic antimicrobial polymers.*** Biomacromol 2008; 9(10): 2805-10.

22- Sciania JM, Margues-Porto R, Loutenco Junior A, Orsi Rde O, Ferreira Junior RS, Barraviera B, et al**.** ***Identification of a novel melittin isoform from Africanized Apis mellifera venom.*** Peptides 2010; 31(8): 1473-9.

23- Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, 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(2): 246-70.

24- Moon DO, Park SY, Choi YH, Kim ND, Lee C, Kim GY. ***Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells.*** Toxicon 2008; 51(1): 112-20.

25- Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, et al. ***Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the rac1-dependent pathway.*** Hepatology 2008; 47(6): 1964-73.

26- Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, Han SB, et al. ***Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway.*** Toxicol Appl Pharmacol 2012; 258(1): 72-81.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

Isolation of Melittin from Iranian Honey Bee Venom and Investigation of Its Effect on Proliferation of Cervical Cancer- HeLa Cell Line

Zarinnahad H(Msc)[1], Mahmoodzadeh A(Msc)[2], Pooshang Bagheri K(PhD)[3], Mahdavi M(PhD)4, Shahbazzadeh D (PhD)[5], Moradi A (PhD)[*6]

[1,2,6]Department of Biochemistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[3,5]Department of Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[4]Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: *22 Nov 2012* ***Accepted:*** *9 Feb 2013*

Abstract

Introduction: Cervical cancer is the second prevalent cancer in developing countries and the sixth prevalent cancer in USA. Since conventional treatment methods are associated with detrimental side effects, searching for new drugs using natural ingredients is very important. Previous studies have shown that melittin (main component of honey bee venom) has anticancer properties along with the effect on cell membrane and activation of apoptosis. In this study, inhibitory effects of melittin on the viability and proliferation of cervical cancer cell line (HeLa) was investigated.

Methods: Melittin was purified from honeybee venom using reversed-phase HPLC method. Then, biological activity of melittin was examined by hemolytic activity analysis on the red blood cells. In order to investigate whether melittin inhibits proliferation of HeLa cell, MTT assay was performed. HeLa cells were plated in a 96-well plate and treated with serially diluted concentrations of melittin for 12 and 24 hours. The viability of the cells was measured via MTT assay at 540nm.

Results: Melittin showed a strong hemolytic activity (HD50=0.5 μg/ml) which can be reduced by FBS(HD50=2 μg/ml). Results of MTT assay indicated that melittin shows cytotoxic effect on cervical cancer cells with IC50 = 1.2 ug/ml at 12h incubation period.

Conclusion: In this study, biological activity of melittin and inhibitory effect of FBS on hemolysis were determined via hemolytic activity analysis. MTT assay indicated that melittin induced cytotoxic effects in a dose dependent manner on cervical cancer cells and it also revealed dependence on incubation time as well.

Keywords: Cervical cancer; HeLa cell line; Melittin; MTT

This paper should be cited as:
Zarinnahad H, Mahmoodzadeh A, Pooshang Bagheri K, Mahdavi M, Shahbazzadeh D, Moradi A. ***Isolation of melittin from iranian honey bee venom and investigation of its effect on proliferation of cervical cancer- hela cell line***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(2): 226-37.

****Corresponding author: Tel: +98 351 8213091, Email: morady2008@gmail.com***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]