

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره دهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۰، ۱۲۶-۱۱۲

# اثر زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر و تمایز رده سلولی HL-60

کاظم پریور<sup>۱</sup>، محمد نبیونی<sup>۲</sup>، هانیه جلالی<sup>۳</sup>، فاطمه نادعلی<sup>۴</sup>

دریافت مقاله: ۸۸/۲/۱۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۸/۱۲/۳ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۱۱

## چکیده

**زمینه و هدف:** تمایز درمانی از جمله روش‌های درمانی سرطان محسوب می‌شود؛ در این روش از مواد مهارکننده تکثیر و القاء کننده تمایز، نظیر رتینوئیک اسید تمام ترانس استفاده می‌گردد. تجربیات نشان داده‌اند برخی مواد با ویژگی‌های ضد تکثیری، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی در افزایش اثر این ماده و کاهش اثرات مضر جانبی آن مؤثر می‌باشند. با توجه به اثرات ضدتکثیری و ضدالتهابی زهر زنبور عسل، در این مطالعه اثر آن بر عملکرد رتینوئیک اسید تمام ترانس بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی، از رده سلولی HL-60 (Human Lukemia) متعلق به سرطان حاد پرومیلوسیتی استفاده شد. رده سلولی HL-60 از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) و ۱٪ استرپتومایسین-پنی‌سیلین کشت شد. از روش‌های NBT (Nitro-Blue tetrazolium chloride) و ۳-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium- bromide این پژوهش استفاده شد. تمامی تجربیات سه بار تکرار شده و جهت تحلیل داده‌ها از نرمافزار SPSS استفاده شد.

**یافته‌ها:** زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس هر دو قادر به مهار تکثیر سلول‌های HL-60 شدند، همچنین رتینوئیک اسید تمام ترانس موجب القاء تمایز در این سلول‌ها گردید که میزان این تمایز با افزودن زهر زنبور به میزان معنی‌داری در سطح  $p < 0.01$  افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد زهر زنبور بتواند اثرات درمانی رتینوئیک اسید تمام ترانس را شدت بخشد.

**واژه‌های کلیدی:** زهر زنبور عسل، رده سلولی HL-60، تکثیر و تمایز سلولی، رتینوئیک اسید تمام ترانس

۱- استاد گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران

۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران  
تلفن: ۰۴۵۱۰۰۰۵-۰۲۶۱، دورنگار: ۰۴۵۱۰۰۰۵، پست الکترونیکی: Nabiuni@tmu.ac.ir

۳- دانشجو دکتری گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران

۴- استادیار گروه آموزشی هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

## مقدمه

درمان گزارش شد [۸]. غلظت فیزیولوژیک این ماده در بدن  $^{10-8}$ - $^{10-9}$  مولار می‌باشد اما در افراد مبتلا به سرطان از غلظت‌های بالاتر تزدیک به  $^{10-6}$  مولار استفاده می‌شود [۹]. در استفاده از این ماده برخی مشکلات از قبیل کاهش سریع غلظت پلاسمایی دارو، ایجاد مقاومت دارویی، سندرم رتینوئیک اسید وغیره وجود دارد [۱۰-۱۱]. جهت کاهش این‌گونه مشکلات، از مواد کمکی استفاده می‌شود که بتوانند موجب افزایش قدرت درمانی رتینوئیک اسید تمام ترانس گردند، به عنوان مثال مطالعات انجام گرفته نشان داده‌اند روغن زیتون، سیر، پیاز، ویتامین D<sub>3</sub> وغیره، به شدت در افزایش قدرت درمانی رتینوئیک اسید تمام ترانس مؤثر بوده‌اند [۱۲-۱۷].

رده سلولی HL-60 یک رده سلولی مربوط به سرطان حاد پرومیلوسیتی است [۱۸] که در حضور موادی نظیر بوتیرات، هیپوزانتین، فوربول مربیستات استات، ویتامین D<sub>3</sub> و رتینوئیک اسید، از وضعیت تکثیر بی‌رویه خارج شده و به سمت مونوسیت، ماکروفاز و یا گرانولوسیت تمایز می‌یابد، تمایز به سمت دو مسیر میلوئیدی متفاوت و تغییرات مورفولوژیکی و ژنی فاحش مرتبط با تمایز در این رده سلولی، مزیتی جهت استفاده از این رده سلولی محسوب می‌شود [۱۹-۲۰]. اولین بار در سال ۱۹۸۰، Breitman و همکارانش موفق به تمایز این سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس گشتند [۲۱].

زهر زنبور عسل دارای اثرات بیولوژیکی وسیعی از جمله مهار واکنش‌های التهابی، مهار تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی و القاء مرگ سلولی در آنها می‌باشد و نخستین بار Havas در سال ۱۹۵۰ اثر زهر زنبور بر روی یک تومور القاء شده را گزارش کرد [۲۲]، این ماده دارای انواع پیتیدها، آنزیم‌ها، آمین‌های بیولوژیکی و مواد معدنی مختلف می‌باشد، اصلی‌ترین جزء این ترکیب ملیتین است

روش‌های درمانی مختلفی برای ریشه‌کن نمودن سرطان وجود دارد که شیمی درمانی اصلی‌ترین روش محسوب می‌شود، اما به دلیل عوارض جانبی شدید داروهای شیمی درمانی بر روی بافت‌های سالم، امروزه از روش دیگری تحت عنوان تمایز درمانی نیز استفاده می‌شود [۱]. اولین بار در سال ۱۹۷۰ Paran و همکارانش توقف تکثیر و تمایز در سلول‌های سرطان خون را کشف کردند و به دنبال این کشف، در سال ۱۹۷۸ نظریه القاء تمایز در سلول‌های سرطانی و استفاده از این روش جهت درمان سرطان توسط Sachs مطرح شد [۲-۳]. در این روش با استفاده همزمان از مواد کشنده سلول و القاء‌کننده تمایز، تکثیر بی‌رویه سلول‌ها مهار شده و تمایز در آنها القاء می‌شود [۴]. سرطان حاد پرومیلوسیت‌ها که نوعی از سرطان میلوئیدی می‌باشد، با تکثیر بی‌رویه پرومیلوسیت‌ها و عدم تمایز نهایی این سلول‌ها تعریف می‌شود. در افراد مبتلا به این سرطان یک جاچایی کروموزومی به صورت t (q22;q12-21) (15:17) (q22;q12-21) اتصال ژن (Retinoic Acid Receptor α - RARα)، روی کروموزوم ۱۷، به ژن (PML) (Promyelocyte Leukemia)، روی کروموزوم ۱۵ و باعث ایجاد یک پروتئین مرکب تحت عنوان PML-RARα می‌شود [۵]. رتینوئیک اسید تمام ترانس یا All-trans Retinoic Acid (ATRA) از جمله مواد قوی در درمان این نوع سرطان و تمایز درمانی محسوب می‌گردد؛ این ماده موجب مهار تکثیر و القاء تمایز در سلول‌های پرمیلوسیتی به سمت گرانولوسیت‌های بالغ می‌گردد [۶-۷]. این ماده ابتدا در سال ۱۹۸۶، در درمان بیماران مبتلا به سرطان حاد پرمیلوسیتی در سطح کلینیکی مورد استفاده قرار گرفت و در سال ۱۹۸۸ بهبودی کامل ۲۳ بیمار از ۲۴ بیمار تحت

بیشتر سلول‌های HL-60 و حتی افزایش میزان تمایز سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس گردد. رده سلولی HL-60 از استیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت (Gibco, USA) RPMI 1640 حاوی ۰٪ CO<sub>2</sub> و ۱٪ استریوتومایسین-پنی‌سیلین در فشار ۰.۵٪ FBS و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به تعداد  $5 \times 10^4$  سلول بر میلی‌لیتر در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه (NUNC, Netherland) کشت داده شد. شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتومتری صورت گرفت، بدین صورت که سلول‌های ۴ خانه بزرگ شمارش شده و میانگین اعداد به دست آمده در  $10^4$  ضرب شد و تعداد سلول در هر میلی‌لیتر به دست آمد. به دلیل حجم موجود در پلیت‌های ۲۴ خانه و زمان مورد نظر برای تکثیر سلول‌ها و جلوگیری از تجمع بیش از حد سلول‌ها،  $5 \times 10^4$  سلول در هر میلی‌لیتر، مناسب در نظر گرفته شد. محلول غلیظ رتینوئیک اسید تمام ترانس (داروپخش، ایران) با غلظت اولیه ۱ میلی‌مولاً در اتانول مطلق تهیه و بدور از نور در دمای ۷-۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد؛ جهت رقیق نمودن و اضافه نمودن رتینوئیک اسید تمام ترانس به محیط کشت از معادله  $N_1V_1 = N_2V_2$  استفاده شد، به عنوان مثال برای ایجاد غلظت  $10^{-4}$  مولاً، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱ میلی‌مولاً با ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل مخلوط شد. جهت رقیق نمودن تمامی محلول‌های غلیظ از محیط کشت کامل استفاده شد تا اثر اتانول قابل چشم‌پوشی باشد.

پودر زهر زنبور در واحد علوم تحقیقات تهران و با استفاده از روش شوک الکتریکی تهیه شد. محلول غلیظ زهر زنبور با غلظت اولیه  $2/5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سرم فیزیولوژیکی تهیه و در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت رقیق نمودن و ایجاد غلظت مناسب

که ۵۰٪-۶۰٪ زهر را تشکیل می‌دهد [۲۳]. زنبور درمانی در طب قدیم در درمان بیماری‌های مختلفی از جمله دردهای مفصلی، بیماری‌های عفونی، بیماری‌های پوستی و غیره رواج داشته است؛ امروزه زهر زنبور در درمان بیماری‌هایی از قبیل آرتیrit روماتوئید، مالتیپل اسکلروزیس، دردهای التهابی و احشایی و همچنین سرطان و تومورهای سرطانی مورد توجه قرار گرفته است [۲۴-۲۶]. همان‌گونه که اشاره شد، موادی که بتوانند موجب مهار تکثیر و یا القاء آپوپتوz در سلول‌های سرطان حاد پرومیلوسیتی گردد، موجب افزایش تمایز این سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌شوند؛ همچنین مطالعات مختلف نشان داده‌اند موادی با ویژگی‌های ضدالتهابی نیز موجب افزایش مهار تکثیر و تمایز این سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌شوند؛ به عنوان مثال ایندوماتاسین (یک داروی ضدالتهاب) موجب افزایش اثر تمایزدهنگی رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌گردد [۲۷]. با توجه به لزوم استفاده از داروهای با عوارض جانبی کمتر و یا استفاده از روش‌های درمانی جدیدتر و مؤثرتر در درمان انواع سرطان‌ها، و همچنین با توجه به ویژگی‌های شناخته شده زهر زنبور عسل، بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های سرطان حاد پرومیلوسیتی و مقایسه آن با اثرات رتینوئیک اسید تمام ترانس، ضروری به نظر رسیده و هدف این پژوهش قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی که از شهریور ۱۳۸۶ تا شهریور ۱۳۸۷ انجام شد از رده سلولی HL-60 مربوط به سرطان حاد پرومیلوسیتی استفاده گردید و جهت القاء تمایز از رتینوئیک اسید تمام ترانس در طی ۷۲ ساعت استفاده شد [۲۸] و چنین فرض شد که زهر زنبور بتواند موجب مرگ

نوری (Optimal Density = OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گرفته شد و طبق معادله زیر، درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید [۳۰]:

$$\text{ OD } \times 100 \text{ کنترل/OD تست}$$

جهت بررسی تمایز سلولی از روش‌های مورفولوژیکی و آنزیمی استفاده شد. به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی، سلول‌ها به روش رایت-گیمسا رنگ‌آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با تمایز عبارت بودند از: متراکم و قطعه قطعه شدن هسته سلولی، تغییر رنگ سیتوپلاسم از حالت بازووفیلی به اسیدوفیلی و در نتیجه صورتی رنگ شدن سیتوپلاسم، کوچکتر شدن اندازه سلولی و ناپدید شدن هستک‌ها. جهت تأیید تمایز و اثبات فعال بودن سلول‌های تمایز یافته، از روش احیاء آنزیمی NBT استفاده شد که اساس آن بر فعالیت پراکسیدازی سلول‌های گرانولوسیتی و مونوسیتی استوار می‌باشد، بدین‌صورت که سلول‌های تمایز یافته از لحظه آنزیمی فعال بوده و قادر به احیاء ماده NBT می‌باشند و در نتیجه در این روش، در داخل سیتوپلاسم سلول‌های زنده رنگدانه‌های تیره رنگ تشکیل می‌شود [۱۵]. جهت روش NBT، پس از اضافه نمودن زهر، رتینوئیک اسید تمام ترانس و یا هر دو، و پس از طی دوره‌های زمانی مورد نظر، ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر محلول حیط کشت حاوی سلول با (Sigma, USA) ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر محلول٪ NBT (Phorbol 12-myristate 13- PMA) ۲۰۰ نانوگرم (acetate) (Sigma, USA) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون جهت اعلام میزان تمایز به صورت درصد، سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری شمارش شدند و درصد سلول‌های تمایز یافته طبق معادله زیر تعیین شد:

همانند رتینوئیک اسید عمل شد؛ برای مثال جهت ایجاد غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴ میکرولیتر از محلول ۹۶۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۹۶۶ میکرولیتر محیط کشت کامل مخلوط شد.

جهت تعیین درصد زیست‌پذیری (Viability) سلول‌ها از روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو (Merk, Germany) و MTT استفاده شد (Sigma, USA). برای رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، ۲۰ میکرولیتر سلول با ۲۰ میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو مخلوط گردید و سپس با استفاده از شمارش سلولی، درصد سلول‌های زنده محاسبه شد؛ بدین‌صورت که سلول‌های مرده به دلیل از دست دادن تراوایی غشایی به رنگ آبی تیره در آمده بودند.

پودر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سرم فیزیولوژیکی حل شد و بدور از نور در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. اساس روش TTT بر پایه عملکرد آنزیمی در سلول‌های زنده می‌باشد؛ بدین‌صورت که سلول‌های زنده دارای آنزیم‌های فعال بوده و قادر به احیاء ماده MTT می‌باشند و در اثر این احیاء، رنگدانه‌های تیره رنگ در داخل سلول‌های زنده تشکیل می‌گردد، اما در داخل سلول‌های مرده اثری از این رنگدانه‌ها دیده نمی‌شود [۲۹].

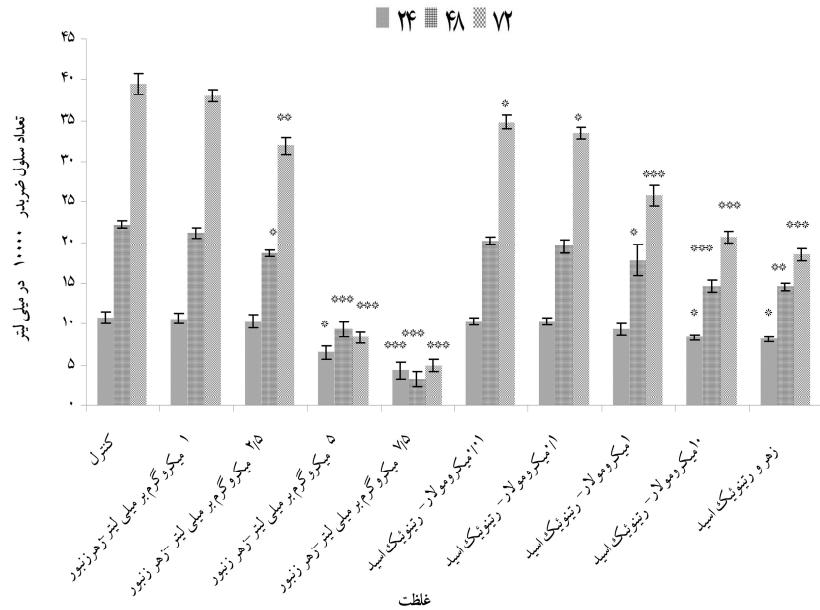
جهت روش TTT، ابتدا  $10 \times 5$  سلول بر میلی‌لیتر در هر خانه از پلیت کشت ۲۴ خانه ریخته شد و غلظت مواد مورد نظر تنظیم گردید؛ پس از اتمام بازه‌های زمانی مورد نظر (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر خانه اضافه شد و ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدور از نور انجام گرفت و پس از اتمام انکوباسیون ۱۰۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی (Merk, Germany) اضافه شد تا رنگدانه‌های داخل سلول‌های زنده بیرون ریخته شوند. میزان حداکثر جذب

وابسته به زمان و غلظت مشاهده شد و بیشترین میزان مرگ در این غلظتها، پس از طی ۷۲ ساعت بود. هر چند غلظت  $2/5$  میکروگرم بر میلی لیتر باعث کاهش معنی دار سلول های زنده نسبت به نمونه کنترل گشت، اما در این غلظت و پس از طی ۷۲ ساعت، بقایای سلول های مرده در محیط تفاوتی با نمونه های کنترل نداشت و به نظر می رسد این کاهش بیشتر مرتبط با مهار تکثیر بوده باشد و نه مرگ سلولی. غلظت های زیر  $2/5$  میکروگرم بر میلی لیتر ( $1/5$  و  $0/5$  میکروگرم بر میلی لیتر) نسبت به نمونه کنترل هیچ تفاوت معنی داری، حداقل در طی ۷۲ ساعت، نشان ندادند (نمودارهای ۱ و ۲).

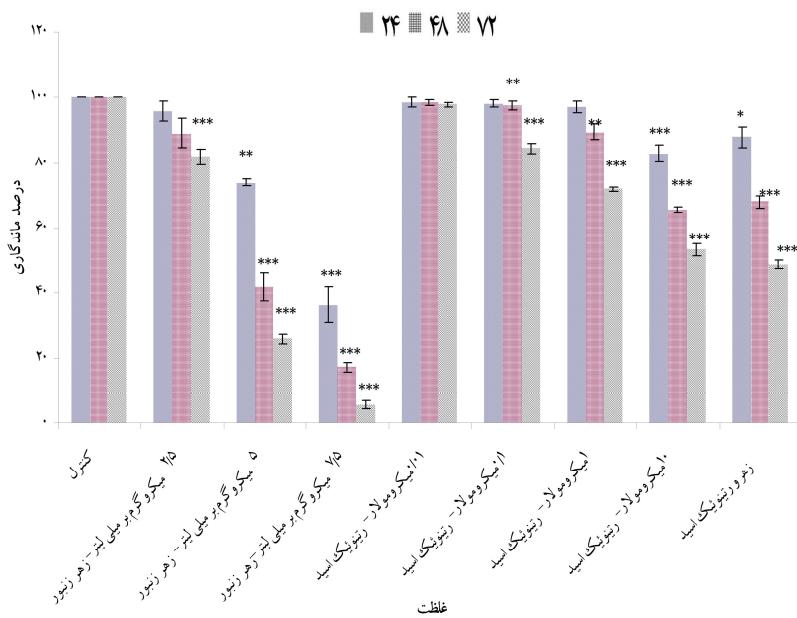
$\times 100$  کل سلول های شمارش شده / سلول های دارای رنگدانه تمامی تجربیات انجام شده، حداقل سه بار تکرار شدند. جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS. ۱۳ و از آزمون آماری ANOVA استفاده شد. کمتر از  $0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

اثر زهر زنبور بر تکثیر سلول های HL-60: نتایج حاصل از شمارش تریپان بلو و MTT نشان داد زهر زنبور در غلظت های بالای  $10$  میکروگرم بر میلی لیتر دارای اثر کشنده گی بسیار شدیدی بود؛ در غلظت های  $7/5$  و  $5$  میکروگرم بر میلی لیتر نیز القاء مرگ سلولی به صورت



نمودار ۱- مقایسه اثر غلظت های مختلف زهر زنبور، رتینوئیک اسید تمام ترانس و هر دو بر تکثیر سلول های HL-60 طی  $24$ ،  $48$  و  $72$  ساعت نسبت به کنترل بر اساس شمارش با تریپان بلو. آزمون آماری ANOVA:  
 $p < 0/05$ : \*  
 $p < 0/01$ : \*\*  
 $p < 0/001$ : \*\*\*



نمودار ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف زنگ زنیبور، رتینوئیک اسید تمام ترانس و هر دو بر درصد سلول‌های زنده HL-60 طی ۷۲، ۴۸ و ۲۴ ساعت نسبت به کنترل بر اساس روش MTT آزمون آماری ANOVA  
\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$

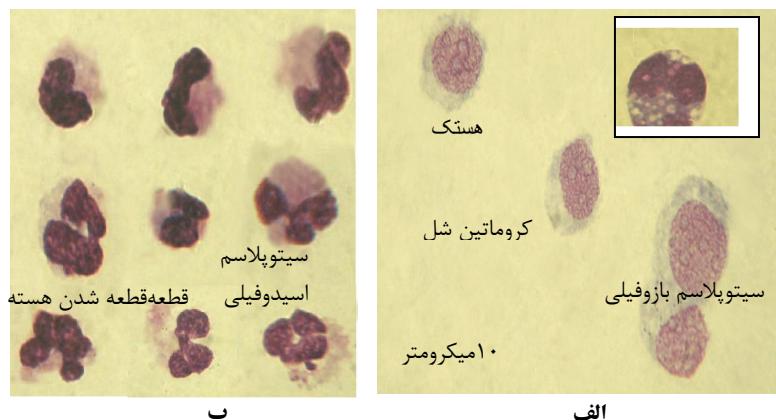
کاهش تعداد سلول‌های زنده ناشی از مهار تکثیر سلولی بوده باشد (نمودارهای ۱ و ۲).

اثر هم‌افزایی زنگ زنیبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر و بقاء سلول‌های HL-60: جهت بررسی اثر هم‌افزایی زنگ زنیبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر میزان تکثیر و بقاء سلول‌های HL-60، غلظت‌های ۲/۵ میکرومولار و ۱ میکرومولار از رتینوئیک اسید تمام ترانس انتخاب شدند، زیرا این غلظت‌ها موجب مهار تکثیر سلول‌ها شده و در عین حال اثرات سمی کمتری نسبت به غلظت‌های بالاتر داشتند. بررسی اثر هم‌زمان این دو ماده نشان داد، میزان مهار تکثیر سلولی در زمان هم‌افزایی به میزان معنی‌داری نسبت به زمان استفاده از هر یک به تنها یکی، افزایش یافت؛ به طوری که پس از طی ۷۲ ساعت، میزان مهار تکثیر سلولی در حضور غلظت ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید

اثر رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر سلول‌های HL-60: جهت بررسی اثر رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر سلول‌ها و بدست آوردن غلظت‌های سمی و غیرسمی، غلظت‌های ۱۰، ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس بر سلول‌ها اثر داده شد، نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و MTT نشان داد رتینوئیک اسید تمام ترانس در الگویی وابسته به زمان و غلظت، موجب القاء مرگ سلولی و یا مهار تکثیر سلول‌های HL-60 می‌گردد؛ بدین صورت که بیشترین اثر کشنندگی مربوط به غلظت ۱۰ میکرومولار و پس از طی ۷۲ ساعت بود. در غلظت‌های پایین‌تر نیز کاهش تعداد سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار بود. اما علی‌رغم کاهش تعداد سلول‌های زنده، علائم مرگ سلولی نسبت به غلظت ۱۰ میکرومولار بسیار کمتر بود و چنین به نظر می‌رسد که

غلظت‌های استفاده شده باعث تمایز نشد. رتینوئیک اسید تمام ترانس در غلظت ۱ میکرومولار در طی ۷۲ ساعت، میزان معنی‌داری از تمایز در این سلول‌ها را القاء کرد. بر اساس این یافته‌ها، غلظت ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس، به عنوان غلظت مناسب جهت ایجاد تمایز طی ۷۲ ساعت انتخاب شد، زیرا هم دارای اثر مهار تکثیر بود و هم نسبت به غلظت‌های پایین‌تر در طی ۷۲ ساعت میزان بیشتری از تمایز را القاء کرد (شکل ۱).

تمام ترانس در حدود ۰/۲۸٪ و در حضور غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور در حدود ۰/۱۸٪ بود، ولی در حضور همزمان هر دو ماده، افزایشی فاحش در مهار تکثیر سلول‌ها رخ داد و میزان مهار به حدود ۰/۵۱٪ افزایش یافت؛ کاهش تعداد سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل نیز معنی‌دار بود (نمودارهای ۱ و ۲). اثر زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تمایز سلول‌های HL-60: بررسی اثر زهر زنبور بر تمایز سلول‌های HL-60 نشان داد که زهر زنبور در هیچ‌یک از



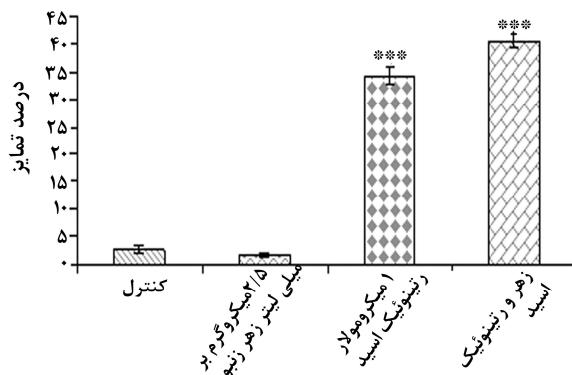
شکل ۱- مقایسه سلول‌های پرومیلوسیتی HL-60 در حالت‌های (الف) تمایز نیافته (داخل کادر: سلول در حال مرگ) و (ب) تمایز یافته. رنگ آمیزی رایت-گیمسا مشاهده با میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر

نشان داد در حضور همزمان رتینوئیک اسید تمام ترانس و زهر زنبور میزان تمایز سلول‌ها نسبت به حضور منفرد رتینوئیک اسید تمام ترانس افزایش یافت. بر اساس روش NBT، میزان سلول‌های  $NBT^+$  در حضور همزمان رتینوئیک اسید تمام ترانس و زهر زنبور در مقایسه با نمونه‌های کنترل و نمونه‌هایی که تنها تحت تأثیر زهر زنبور قرار گرفته بودند به میزان مشهودی بالا بود؛ از طرفی، افودن زهر زنبور موجب افزایش معنی‌دار تمایز در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس نیز گشت، به طوری که

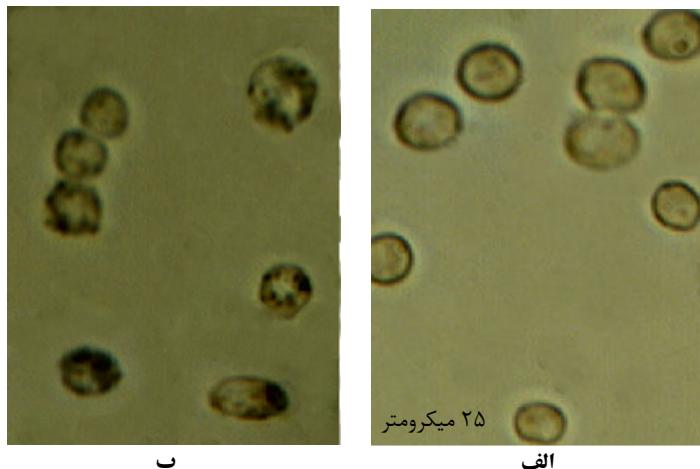
اثر هم‌افزایی زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تمایز سلول‌های HL-60: جهت بررسی اثر حضور همزمان زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تمایز سلول‌های HL-60، بر اساس تجربیات قبلی در همین پژوهش، غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور، به عنوان مهارکننده تکثیر سلولی، و ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس، به عنوان القاء‌کننده تمایز انتخاب شدند و میزان تمایز سلول‌ها در ۷۲ ساعت بررسی شد. بررسی تغییرات مورفولوژیکی بر اساس رنگ آمیزی رایت-گیمسا

موجب ۳/۶٪ افزایش در میزان تمایز شد که این افزایش در حد ۰/۰۵ p< معنی دار بود (نمودار ۳ و شکل ۲).

بر اساس روش آنزیمی، در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس تمایز در حدود ۳۳/۳۴٪ بود و افزودن زهر به آن



نمودار ۳) مقایسه درصد تمایز سلول‌های HL-60 در حضور ۰.۵ میکروگرم بر میلی لیتر زهر زنیبور، ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس و هر دو نسبت به نمونه کنترل، ۷۲ ساعت پس از آغاز اثر مواد بر اساس سنجش NBT. آزمون آماری ANOVA p<0.001 \*\*\*.



شکل ۲ - روش NBT: (الف) سلول‌های کنترل بدون تشکیل دانه‌های تیره رتگ در داخل سلول‌ها. (ب) سلول‌های تمایز یافته به نوتوفیل دارای دانه‌های تیره رتگ. مشاهده با میکروسکوپ نوری در زیر لام‌نتوبار. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.

رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌شود. زهر زنیبور به تنها یک موجب تمایز سلول‌های HL-60 نشد اما موجب افزایش تمایز سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس تمایز سلول‌ها از این نتایج می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که حضور همزمان این مواد موجب مهار بیشتر تکثیر سلولی شد و این مهار منجر به افزایش میزان تمایز گشت. در مورد سازوکارهایی که زهر زنیبور توانسته است موجب

## بحث

نتایج به دست آمده در این پژوهش تأیید‌کننده اثرات مهاری زهر زنیبور عسل و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر رده سلولی HL-60 بود. همچنین مقایسه اثر همزمان این دو ماده با اثر منفرد هر کدام از آنها نشان داد که حضور زهر زنیبور، موجب تشدید اثر مهارکنندگی

موجب مهار فعالیت NF-κB می‌گردد. Park و همکارانش طی مطالعات گسترهای نشان داده‌اند که در مدل‌های حیوانی و افراد مبتلا به آرتیت روماتوئید، زهر زنبور و ترکیب اصلی موجود در آن یعنی ملیتین موجب مهار فعالیت NF-κB و در نتیجه مهار واکنش‌های التهابی می‌گردد [۳۳-۳۴] Son و همکارانش نشان دادند زهر زنبور و ملیتین موجب مهار تکثیر سلول‌های عضله صاف از طریق غیرفعال‌سازی NF-κB می‌شوند [۳۵]. تنظیم چرخه سلولی از جمله فرآیندهای مهم دیگر در تنظیم تکثیر و تمایز سلول‌های لوکمیایی می‌باشد و مطالعات مختلف نشان داده است القاء تمایز در سلول‌های APL سلول‌ها در فاز G0/G1 چرخه سلولی همراه می‌باشد و در واقع تمایز این سلول‌ها به شدت با مهار تکثیر آنها در ارتباط است.

رتینوئیک اسید تمام ترانس از جمله مواد قوی در تنظیم چرخه سلولی انواع رده‌های سلولی سرطانی و از جمله لوکمیایی محسوب می‌گردد که با تنظیم بیان انواع تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی موجب مهار تکثیر و توقف سلول‌ها در فاز G0 و تمایز سلولی می‌گردد [۳۶]. ترکیباتی از قبیل انواع ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ضدالتهاب‌ها و عصاره‌های گیاهی با قدرت مهار تکثیر سلولی در افزایش میزان تمایز سلول‌ها در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس بسیار مؤثر بوده‌اند. به عنوان مثال Dirsch و همکارانش نشان دادند که ترکیبات موجود در سیر، موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های HL-60 می‌گردد [۱۳]. بعدها Seki و همکارانش نیز نشان دادند روغن‌هایی به دست آمده از سیر و پیاز موجب مهار تکثیر سلول‌های HL-60، القاء تمایز و افزایش میزان تمایز در

چنین اثراتی گردد اطلاعات زیادی در دسترس نیست، به ویژه که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر توأم زهر زنبور و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر و تمایز رده سلولی HL-60 صورت نگرفته است، اما با مروری بر عملکردهای رتینوئیک اسید تمام ترانس و زهر زنبور تا حدودی می‌توان مسیرهای مولکولی را که زهر زنبور می‌توانسته اثرات خود را اعمال نماید، تفسیر نمود. در این بین، فعالیت NF-κB (Nuclear Factor-κB) اهمیت خاصی دارد؛ این فاکتور از جمله عواملی است که در مهار تکثیر و القاء تمایز در سلول‌های لوکمیایی و از جمله HL-60 دخیل می‌باشد و رونویسی بسیاری از ژن‌های دخیل در سرطان، التهاب، آپوپتوز و تکثیر سلولی را تنظیم می‌نماید. افزایش بیان این فاکتور در بسیاری از سلول‌های لوکمیایی دیده می‌شود که منجر به مقاوم شدن این سلول‌ها در برابر عوامل متوقف‌کننده تکثیر و یا القاء‌کننده آپوپتوز می‌گردد [۳۱]. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند موادی که موجب مهار فعالیت این فاکتور رونویسی گردند، موجب ایجاد آپوپتوز و یا مهار تکثیر و القاء تمایز در سلول‌های HL-60 و یا افزایش میزان تمایز در حضور موادی از قبیل VD<sub>3</sub> (Vitamin D<sub>3</sub>)، Bunce و همکارانش نشان دادند که داروهای می‌شوند. Bunce ضدالتهاب غیراستروئیدی با قدرت مهار فعالیت NF-κB، از قبیل ایندوموتاسین و آسپیرین، میزان تمایز سلول‌های HL-60 را در حضور غلظت‌های پایین رتینوئیک اسید افزایش می‌دهند؛ سایر مطالعات نیز نشان دادند اضافه نمودن استامینوفن به محیط کشت سلول‌های HL-60 موجب افزایش تمایز آنها در حضور رتینوئیک اسید می‌گردد [۳۲، ۲۷]. گزارشات متعددی تأثید‌کننده این موضوع بوده است که زهر زنبور در غلظت‌های پایین

موجب آپوپتوz گردد [۴۰]. اثرات مهاری ملیتین نیز اول بار در سال ۱۹۸۵ توسط Hait و همکارانش بررسی شد. آنها نشان دادند که ملیتین به عنوان یک مهارکننده کالمودولین باعث مهار رشد و تکثیر در سلول‌های لوکمیابی انسان و موش می‌گردد و این ویژگی ملیتین را به دلیل مهارکننده کالمودولین بودن آن دانستند [۲۲]. از طرفی Si و همکاران اثر مهارکننده‌های کلسیم-کالمودولین کیناز بر روی میزان تمایز سلول‌های HL-60 در پاسخ به رتینوئیک اسید را بررسی کردند و نشان دادند که میزان تمایز این سلول‌ها در حضور چنین مهارکننده‌هایی افزایش می‌یابد [۴۱]. ملیتین همچنین موجب فعال شدن فسفولیپاز A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) می‌گردد و فعال شدن فسفولیپاز A<sub>2</sub> نیز منجر به تغییرات بعدی در سلول‌های سرطانی می‌شود. Liu و Levy نقش PLA<sub>2</sub> و اسید آرشیدونیک به عنوان یک متابولیت PLA<sub>2</sub> را بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های HL-60 بررسی کردند، آنها نشان دادند مهارکننده‌های PLA<sub>2</sub> موجب مهار تکثیر سلول‌های HL-60، L929، 3T3 می‌شوند. چنین مهارکننده‌هایی زمان دو برابر شدن این سلول‌ها را به طور فاحشی افزایش دادند اما تأثیری بر تمایز و یا میزان تمایز در حضور رتینوئیک اسید و ویتامین D<sub>3</sub> نداشتند [۴۲].

### نتیجه‌گیری

با توجه به مسیرهای مولکولی دخیل در عملکرد رتینوئیک اسید تمام ترانس بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های لوکمیابی و از جمله HL-60 و سازوکارهای شناخته شده دخیل در عملکرد زهر زنبور، به نظر می‌رسد زهر زنبور از طریق سازوکارهای متعددی بتواند با عملکردهای رتینوئیک اسید تمام ترانس برهمکنش داشته باشد. به عنوان مثال، همان‌طور که اشاره شد زهر زنبور

حضور ATRA از طریق تنظیم چرخه سلولی می‌گردد [۱۴]. ایندیرابین و مشتقات آن به عنوان مهارکننده‌های قوی کینازهای وابسته به سایکلین و متوقف‌کننده سلول‌ها در فاز G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>، میزان تمایز سلول‌های HL-60 در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس را به طور چشمگیری افزایش داده‌اند [۱۵]. ویتامین E [۱۶]، عصاره برگ درخت زیتون [۱۷]، تیموپنتین [۱۸]، تری‌فنیلتین [۳۷] و بسیاری دیگر از مواد آنتی‌تومور و تنظیم‌کننده تکثیر سلولی در مهار تکثیر و تنظیم مرگ و یا تمایز سلولی در رده سلولی HL-60 مؤثر بوده‌اند. زهر زنبور نیز ممکن است از طریق متوقف نمودن سلول‌ها در فازهای G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> و از طریق سازوکارهای مشابه توانسته باشد میزان تمایز سلولی در حضور رتینوئیک اسید تمام ترانس را افزایش دهد. وقوع آپوپتوz در حضور زهر نیز از جمله موضوعاتی است که مورد مطالعه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است. بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی یک رده سلولی مربوط به سرطان گردن به نام CaSki، نشان داد که زهر زنبور در الگویی وابسته به مقدار و زمان، موجب کاهش تعداد سلول‌های زنده و القاء تغییرات مورفو‌لوزیکی مربوط با آپوپتوz در آنها می‌گردد [۳۸]. Jang و همکارانش اثر زهر زنبور در مهار COX-2 و ایجاد آپوپتوz در رده سلولی NCI-H1299 مربوط به سرطان ریه را گزارش کردند [۲۴]. Moon و همکارانش نیز با بررسی اثر زهر زنبور بر روی رده‌سلولی میلوئیدی U937، وقوع آپوپتوz و کاهش فاکت پروتئین‌های ضد آپوپتوz از قبیل Bcl-xL، Bcl-2، cIAP-2 و فعال شدن فاکت کاسپازهای ۳ و ۹ را در این رده میلوئیدی نشان دادند [۳۹]. Chu و همکاران نشان دادند ملیتین موجب افزایش یون کلسیم داخل سلولی شده و افزایش میزان Ca<sup>2+</sup> داخل سلول می‌تواند

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران صورت گرفته است؛ از استادی محترم و تمامی کسانی که در این دانشکده به اجرای این پژوهش کمک نمودند، سپاسگزاری می‌شود. همچنین از جانب آقای دکتر ایمانی، جانب آقای مهندس عزیز محمودزاده و جانب آقای دکتر مهدوی که در مراحلی از کار خالصانه ما را کمک نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

موجب مهار فعالیت NF- $\kappa$ B، مهار تولید سایتوکین‌های التهابی، کاهش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوز و مهار کلسیم کالmodولین کینازها و تأثیر بر فعالیت فسفولیپاز A<sub>2</sub> می‌گردد و احتمال دارد زهر زنبور از طریق این مسیرها بتواند بر روی عملکرد رتینوئیک اسید تمام ترانس تأثیرگذار باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، بنظر می‌رسد زهر زنبور بتواند اثرات درمانی رتینوئیک اسید تمام ترانس را شدت بخشد و جهت تأثیر اثرات مثبت زهر زنبور نیاز به مطالعات تكمیلی فراوانی می‌باشد.

### References

- [1] Mchenzie Sl. Text book of hematology, Bultimore. 2000; pp: 711-26.
- [2] Paran M, Sachs L, Barak Y, Resnitzky P. In vitro induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 67(3): 1542-9.
- [3] Sachs L. The differentiation of myeloid leukemia cells: new possibilities for therapy. *Br J Haematol* 1978; 40: 509-17.
- [4] Miller WHJr, Waxman S. Differentiation induction as a treatment for hematologic malignancies. *Oncogene* 2002; 21(21): 3496-506.
- [5] Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001; 20(49): 7186-203.
- [6] Altucci L, Wilhelm E, Gronemeyer H. Leukemia: beneficial actions of retinoids and rexinoids. *Int Biochem Cell Biol* 2004; 36(2): 178-82.
- [7] Wang ZY. Treatment of acute leukemia by inducing differentiation and apoptosis. *Ham-Wasserman Lecture* 2003.
- [8] Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988; 72(2): 567-72.

- [9] Collins SJ. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia* 2002; 16(10): 1896-905.
- [10] Adamson PC. All-trans-retinoic acid pharmacology and its impact on the treatment of acute promyelocytic leukemia. *The Oncologist* 1996; 1: 305-14.
- [11] Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Miclea JM, Chastang C, et al. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995; 85(10): 2643-53.
- [12] Abaza L, Talorete T, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui Olive Leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(5): 1306-12.
- [13] Dirsch VM, Gerebs AL, Vollmar AM. Ajoene a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemia cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor KappaB. *Mol Pharmacol* 1998; 53(3): 402-7.
- [14] Seki T, Tsuji K, Hayato Y, Moritomo T, Ariga T. Garlic and onion oils inhibit proliferation and induce differentiation of HL-60 cells. *Cancer Letters* 2000; 160(1): 29-35.
- [15] Kim S, Kim Si, Choi S, Kim Y, Kim T. Enhancing effect of indirubin derivate on 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and all-trans retinoic acid-induced differentiation of HL-60 leukemia cells. *Bioorganic Med Chem* 2006; 14: 6752-8.
- [16] Fong W, Tse A, Poon K, Wang C. Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(2): 427-41.
- [17] Fan Y, Chang H, Liu J, Zhao L, Yang D, Wang R. Thymopentin, an immunomodulatory peptide, suppresses proliferation and induces differentiation. *Molecular Cell Research* 2006; 1763(10): 1059-66.
- [18] Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979; 54(3): 713-33.
- [19] Sokoloski JA, Hodnick WF, Mayne ST, Cinquina C, Kim CS, Sartorelli AC. Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by Vitamin E and other antioxidants in combination with low levels of Vitamin D3: Possible relationship to NF-Kappa B. *Leukemia* 1997; 11: 1546-53.
- [20] Yang L, Zhao H, Li SW, Ahrens K, Collins C, Eckenrode S, et al. Gene expression profiling during All-trans Retinoic Acid-induced cell differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Molecular Diagnostics* 2003; 5(4): 212-21.

- [21] Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(5): 2936-40.
- [22] 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 Thera* 2007; 115 (2): 246-70.
- [23] Terra RM, Guimaraes JA, Verli H. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *J Molecular Graph Model* 2007; 25(6): 767-72.
- [24] Jang MH, Shin MC, Limi 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.
- [25] Trushin MV. Bee venom therapy and low dose naltrexon for treatment of multiple sclerosis. *Nepal Journal of Neuroscience* 2006; 3:71-7.
- [26] Orsoli CN, Sver L, Verstovsek S, Terzić S, Basić I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon* 2003; 41(7): 861-70.
- [27] Bunce CM, French PJ, Durham J, Stockley RA, Michell RH, Brown G. Indomethacin potentiates the induction of HL 60 differentiation to neutrophils, by retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor and to monocytes, by vitamin D3. *Leukemia* 1994; 8(4): 595-604.
- [28] Marekova M, Vavrova J, Vokurkova D, Psutka J. Modulation of ionizing radiation-induced apoptosis and cell cycle arrest by all-trans retinoic acid in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Physiol Res* 2003; 52(5): 599-606.
- [29] Yedjou CG, Moore P, Tchounwou PB. Dose- and time-dependent response of human leukemia (HL-60) cells to arsenic trioxide treatment. *Int J Environ Res Public Health* 2006; 3(2): 136-40.
- [30] Oka Y, Naomoto Y, Yasouka Y, Hatano H, Haisa M, Tanaka N, et al. Apoptosis in cultured human colon cancer cells induced by combined treatments with 5-fluorouracil, tumor necrosis factor- alpha and interferon-alpha. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27(4): 231-5.
- [31] Cilloni D, Martinelli G, Messa F, Baccarani M, Saglio G. Nuclear factor kB as a target for new drug development in myeloid malignancies. *Haematologica* 2007; 92 (9): 1224-9.
- [32] Bunce CM, Mountford JC, French PJ, Mole DJ, Durham J, Michell RH, et al. Potentiation of myeloid differentiation by anti-inflammatory agents, by steroids and by retinoic acid involves a single intracellular target, probably an enzyme of the aldoketoreductase family. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1311: 189-98.

- [33] Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, Kim KH, Song HS, et al. 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(11): 3504-15.
- [34] Park HJ, Lee HJ, Choi MS, Son DJ, Song HS, Lee JM, et al. JNK pathway is involved in the inhibition of inflammatory target gene expression and NF-kappaB activation by melittin. *Inflammation* 2008; 31(7): page number not for citation purpose.
- [35] Son DJ, Ha SJ, Song HS, Lim Y, Yun YP, Lee JW, et al. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappaB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *J Pharmacol Experimental Therapeutics* 2006; 317(2): 627-34.
- [36] Horie N, Mori T, Asada H, Ishikawa A, Johnstone PG, Takeishi K. Implication of CDK inhibitors p21 and p27 in the differentiation of HL-60 cells. *Biol Pharmacology* 2004; 27(7): 992-7.
- [37] Watanabe H, Adachi R, Hirayama A. Triphenyltin enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 306: 26-31.
- [38] Ip SW, Wei HC, Lin JP, Kuo HM, Liu KC, Hsu SC, et al. Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. *Anticancer Research* 2008; 28: 833-42.
- [39] Moon DO, Park SY, Heo MS, Kim KC, Park C, Ko WS. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Immunopharmacology* 2006; 6(12): 1796-807.
- [40] Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, Chang HC, Chi CC, Su HH. Phospholipase A<sub>2</sub>-independent Ca<sup>2+</sup> entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. *Life Science* 2007; 80(4): 364-9.
- [41] Si J, Mueller L, Collins S. CaMKII regulates retinoic acid transcriptional activity and the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Clinical Investigation* 2007; 117(5): 1412-21.
- [42] Liu Y, Levy R. Phospholipase A<sub>2</sub> has a role in proliferation but not in differentiation of HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1355(3): 270-80.

## The Effect of Honey Bee Venom and All-trans Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of HL-60 Cell Line

K. Parivar<sup>1</sup>, M. Nabiuni<sup>2</sup>, H. Jalali<sup>3</sup>, F. Nadali<sup>4</sup>

Received: 06/05/09

Sent for Revision: 22/02/10

Received Revised Manuscript: 01/01/11

Accepted: 10/01/11

**Background and Objectives:** Differentiation therapy is one of the methods for treatment of cancer. In this method, some drugs such as All-trans Retinoic Acid, are used which can inhibit proliferation of cancerous cells and induce cell differentiation. Previous experiments showed some anti-proliferation materials, anti-inflammation materials or anti-oxidant materials could influence the effects of such drugs and decrease resulting side effects. In this research the effects of the Honey Bee Venom, on All-trans Retinoic Acid functions was measured.

**Materials and Methods:** In this experimental project we used HL-60 cell line belonging to acute promyelocytic leukemia. The HL-60 cell line was obtained from Pasteur Institute of Iran, and were grown in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 1% streptomycin-penicillin. We used MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide) and NBT (Nitro-Blue tetrazolium chloride) tests for these purposes. All experiments were done three times and data were analyzed using SPSS.

**Results:** Both Honey Bee Venom and All-trans Retinoic Acid could inhibit proliferation of HL-60 cells, also All-trans Retinoic Acid could induce differentiation in these cells. The amount of differentiation was increased significantly ( $p<0.01$ ) in the presence of Honey Bee Venom.

**Conclusion:** On the base of our findings, it seemed that Honey Bee Venom could increase anti cancer effects of All-trans Retinoic Acid.

**Key words:** Honey Bee Venom, HL-60 cell line, Cell Proliferation and Differentiation, All-trans Retinoic Acid

**Funding:** This project was funded by Tarbiat Moallem University of Tehran.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Tarbiat Moallem University approved the study.

**How to cite this article:** Parivar K, Nabiuni M, Jalali H, Nadali F. The Effect of Honey Bee Venom and All-trans Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of HL-60 Cell Line. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2011; 10(2): 112-26. [Farsi]

1- Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Tel: (0261) 4510005, Fax: (0261) 4510005, e-mail: Nabiuni@tmu.ac.ir

3- PhD Student, Dept. of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

4- Assistant Prof., Dept. of Hematology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran