تاریخ چاپ: تابستان ۱۳۹۱

اثر زهر زنبور عسل و L- آسکوربیک‌اسید (ویتامین C) بر تکثیر ردهٔ سلولی سرطانی پرومیلوسیتی HL-60

*هما محسنی کوچصفهانی، محمد نبیونی، سارا میرسپاسی، زهرا صفایی‌نژاد:
دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی

چکیده

لوسمی حاد پرومیلوسیتی یکی از انواع لوسمی حاد است. L- آسکوربیک‌اسید (ویتامین C)، اثر مهار تکثیری بر روی سلول‌های لوسمی حاد پرومیلوسیتی دارد. این ویتامین در دوزهای بالا اثر سیتوتوکسیک بر روی رده‌های سلولی مختلف است که این اثر به خاصیت اکسیداسیون- احیای آن وابسته است. تجربیات نشان داده است که استفاده از ترکیباتی با خاصیت ضد تکثیری و ضد التهابی در افزایش اثر این ماده و کاهش اثرات جانبی آن مؤثر است. با توجه به اثرات ضدتکثیری و ضد سرطانی زهر زنبورعسل، در این پژوهش، اثر آن برعمل‌کرد L-آسکوربیک‌اسید بررسی شد. پس از تعیین غلظت‌های سمی و غیرسمی L- آسکوربیک‌اسید و زهر زنبورعسل بر روی سلول‌های HL-60، اثر هر یک به تنهایی و همراه با هم بر روی رشد سلول‌های HL-60 با شمارش سلولی با تریپان بلو و روش MTT بررسی شد. تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار (Instate 3) و آزمون آماری (one-way ANOVA) استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که L -آسکوربیک‌اسید و زهرزنبورعسل در الگویی وابسته به دوز و زمان در غلظت زیاد موجب القا مرگ سلولی و در غلظت‌های کم موجب مهار تکثیر می‌گردند. L- آسکوربیک‌اسید در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در طول ۷۲ ساعت باعث مهار تکثیر سلول‌های HL-60 شد و اثر مهاری L- آسکوربیک‌اسید در صورت استفاده توأم زهر زنبورعسل به‌صورت چشم‌گیری افزایش یافت. بر پایهٔ این نتایج پیشنهاد می‌شود که زهر زنبورعسل در غلظت‌های غیرسمی بتواند توان ضدتکثیری L- آسکوربیک‌اسید را بر روی سلول‌های سرطانی HL-60 افزایش دهد.

مقدمه

سلول‌های سالم و طبیعی در بدن به دقت و با نظم خاص و بسته به نیاز بدن تقسیم می‌شوند. در سرطان سلول‌ها مکانیسم‌های کنترل کنندهٔ رشد، تقسیم و تمایز سلولی را از دست می‌دهند و به‌صورت کنترل‌نشده‌ای تکثیر می‌شوند [۱]، [۲]. سرطان مجموعه‌ای از تغییرات سلولی است که باعث خود مختار شدن سلول‌ها می‌شود [۳]. لوسمی حاد پرومیلوسیتی، نوعی از سرطان میلوئیدی است. دراین لوسمی جابه‌جایی کروموزومی T (15:17)

واژه‌های کلیدی: L- آسکوربیک‌اسید، زهرزنبورعسل، ردهٔ سلول سرطانی پرومیلوسیتی HL-60، ضدتکثیری.

دریافت ۹۰/۸/۳۰ پذیرش۹۰/۱۲/۱۳

*نویسندهٔ مسئول kouchesfehani@yahoo.com

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

صورت می‌گیرد که منجر به اتصال ژن رسپتور رتینوئیک اسید RARα روی کروموزوم ۱۷ به ژن PML روی کروموزوم ۱۵، ایجاد پروتئینی مرکب باعنوان PML-RARα می‌شود. این پروتئین مرکب به‌وجود آمده دارای عمل‌کردهایی است که منجر به ایجاد سرطان میلوئیدی می‌گردد و با حضور فراوان سلول‌های نابالغ پرومیلوسیتی در مغز استخوان و در نهایت خون همراه است [۴]. ردهٔ سلولی HL-60 که در این پژوهش استفاده شد، یک ردهٔ سلولی مربوط به سرطان حاد پرومیلوسیتی است که سلول‌ها در مرحلهٔ پرومیلوسیت متوقف شده‌اند. این سلول‌ها به سرعت تکثیر می‌شوند و توانایی تبدیل به سلول بالغ را ندارند. در مرحلهٔ پرومیلوسیتی سیتوپلاسم سلول‌ها شدیداً بازوفیلی و دارای دانه‌های برجستهٔ آزروفیلیک[۱] هستند. نسبت هسته به سیتوپلاسم در این سلول‌ها بالاست و دارای کروماتین بدون تراکم و ۴-۲ هستک هستند. رشد سلول‌های HL-60 کاملاً به‌حضور FBS وابسته است و بهترین تحریکات رشد در FBS ۲۰-۱۰ درصد دیده می‌شود [۵]. زهر زنبورعسل در طب قدیم در درمان بیماری‌های مختلفی ازجمله دردهای مفصلی، بیماری‌های عفونی، بیماری‌های پوستی وغیره رواج داشته است؛ امروزه استفاده از زهر زنبور در درمان بیماری‌هایی از قبیل آرتریت روماتوئید، MS یا مالتیپل اسکلروزیس، دردهای التهابی و احشایی و همچنین سرطان مورد توجه قرار گرفته است [۶]، [۷]. زهر زنبورعسل دارای بیش از۱۸ ترکیب فعال از جمله ملیتین، آدولاپین، آنزیم فسفولیپاز A_2، چندین بیوآمین نظیر هیستامین، اپی‌نفرین و غیره با خواص دارویی فراوان است. نخستین بار هاواس[۲] در سال ۱۹۵۰ اثر زهر زنبور را بر روی یک تومور القا شده گزارش کرد. پس از آن نیز پژوهش‌های فراوانی بر روی خاصیت کشندگی این ترکیب در سلول‌ها و تومورهای سرطانی صورت گرفت. ملیتین که ۶۰-۵۰ درصد زهر را تشکیل می‌دهد، پروتئین کوچکی است که از ۲۶ اسید آمینه تشکیل شده است و جز اصلی ترکیبات سمی زهر است. ملیتین باعث فعال شدن آنزیم فسفولیپاز A_2 موجود در زهر می‌شود و دارای اثرات ضدآرتریتی، ضدالتهابی و سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی است [۸]. L- آسکوربیک اسید[۳]، (L-AA) ، ویتامین مهم محلول در آب است که در سلول‌ها و پلاسما دیده می‌شود و برای سنتز کلاژن، کارنی‌تین و نوروترانسمیترها نیاز است [۹]، [۱۰]. L- آسکوربیک‌اسید یک دهندهٔ الکترون است و تمام خاصیت‌های L- آسکوربیک‌اسید به این عمل آن مرتبط است. L- دی‌هیدروآسکوربیک اسید[۴]، (L-DHA)، فرم اکسید شدهٔ L- آسکوربیک‌اسید است که با آنزیم L- آسکوربات اکسیداز[۵] و گلوتاتیون به L- آسکوربات احیا می‌شود.L- آسکوبیک اسید ویتامینی آنتی اکسیدانت است که مستقیماً با از بین بردن رادیکال‌های آزاد (ROS) که در طول متابولیسم طبیعی سلول ایجاد می‌شوند، بدن را در مقابل استرس‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند [۹]، [۱۱].

---

۱. Azurophilic ۲. Havas ۳. L-Ascorbic Acid ۴. L-Dehydroascorbic acid
۵. L-ascorbate oxidase

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

L- آسکوربیک اسید فقط یک آنتی‌اکسیدانت نیست، بلکه تحت شرایط خاصی به‌عنوان پرو- اکسیدانت عمل می‌کند. این ویتامین دارای خاصیت اکسیداسیون-احیا است و در حضور اکسیژن مولکولی اکسید شده و دی‌هیدروآسکوربیک اسید و هیدروژن‌پراکسید (H_2O_2) تولید می‌کند [۱۲]. داده‌های (*in vitro*) پیشنهاد می‌کنند که غلظت کم L- آسکوربیک‌اسید خاصیت پرواکسیدانتی دارد اما در غلظت زیاد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی است [۱۳]. رادیکال‌های آزاد می‌توانند باعث تخریب DNA شوند و رشد تومور را شروع کنند. L- آسکوربیک اسید با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد می‌تواند با سرطان مبارزه کند. هم‌چنین به‌عنوان یک پرواکسیدانت می‌تواند با تولید رادیکال‌های آزاد، تومورها را در مراحل اولیه نابود کند و نیز با بهبود بخشیدن سنتز کلاژن از حملهٔ تومور به سایر بافت‌ها جلوگیری می‌کند [۱۳]، [۱۴]. شواهد بسیاری نشان می‌دهد که L- آسکوربیک‌اسید به صورت انتخابی بر روی برخی از انواع تومورها سمی است و عمل پرواکسیدانتی آن بیش‌تر از خاصیت آنتی‌اکسیدانتی است [۱۰]، [۱۵]. بررسی‌ها نشان می‌دهد L- آسکوربیک‌اسید دارای اثر مهار رشد و تکثیر بر روی سلول‌های سرطان لوسمی حاد پرومیلوسیتی است [۱۰]، [۱۲]، [۱۶]. با توجه به اثرات ضدتکثیری و ضدسرطانی زهر زنبورعسل این پژوهش با هدف بررسی اثر زهر زنبورعسل بر روی سلول‌های سرطان حاد پرومیلوسیتی و بررسی عمل‌کرد آن بر اثر مهار تکثیری L- آسکوربیک اسید انجام شد.

روش کار

در این پژوهش ردهٔ سلولی HL-60 (NCBI Code: C217) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت (جیبکو[۱]، آمریکا) RPMI-1640 حاوی ۱۰ % FBS (جیبکو، انگلستان) و ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در فشار۵% CO2 و دمای ۳۷°C در فلاسک ۲۵ cm^3 کشت داده شد. زهر زنبورعسل از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات با غلظت اولیهٔ ۱ میلی‌گرم تهیه شد و در ۱ میلی‌لیتر PBS حل گردید و در دمای ۴۰°C- نگه‌داری شد. L- آسکوربیک اسید (سیگما[۲]، آمریکا) با غلظت‌های اولیه ۱۰۰mM و۱۰ در هر بار تیمار در شرایط بدون نور تهیه شد. به‌منظور بررسی اثر زهر زنبورعسل بر روی میزان تکثیر سلول‌های HL-60، ۵×۱۰^۴ سلول به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت شمارش و در پلیت ۲۴ خانه با غلظت‌های مورد نظر (۱، ۲/۵، ۵، ۱۰،۷/۵، ۱۵ و ۲۰µg/ml) تیمار شد و بعد از طی بازه‌های زمانی مشخص (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) درصد سلول‌های زنده و غلظت‌های سمی و غیرسمی با روش شمارش سلولی با تریپان‌بلو وMTT محاسبه شد. هم‌چنین برای بررسی اثر L- آسکوربیک اسید بر روی تکثیر سلول‌ها و به‌دست آوردن غلظت‌های سمی و غیرسمی، اثر غلظت‌های مختلف L- آسکوربیک اسید (۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۱، ۱/۵ mM) بر روی سلول‌های HL-60 در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش شمارش سلولی با تریپان‌بلو بررسی شد. برای رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، ۲۰ میکرولیتر سلول با ۲۰ میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو مخلوط

۱. Gibco ۲. Sigma

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

گردید. سپس با استفاده از شمارش سلولی با لام هموسیتومتر درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. سلول‌های زنده به رنگ اجازهٔ عبور از غشا را نمی‌دهند و روشن دیده شدند، در صورتی که سلول‌های مرده به‌علت از دست دادن تراوایی غشا به رنگ آبی‌تیره در آمده بودند. MTT یک نمک تترازولیم زرد رنگ محلول در آب است که توسط آنزیم‌های دهیدروژناز سلول‌های زنده، در حلقه MTT محلول شکستی ایجاد شده و به بلورهای بنفش رنگ فورمازان نامحلول احیاء می‌شود. تشکیل این بلورها و تغییر رنگ محیط میزانی برای سنجش تعداد سلول‌های زنده محسوب می‌گردد. برای انجام روش MTT، بعد از گذشت بازهٔ زمانی معین به هر خانه از پلیت‌های ۲۴ خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (سیگما- انگلستان) با غلظت ۵ mg/ml در شرایط تاریکی افزوده شد و پلیت ۴ ساعت دور از نور در دمای ۳۷°C انکوبه گردید. سپس به هر خانه یک میلی‌لیتر ایزوپروپانول اسیدی (مرک[۲]، آلمان) افزوده شد. اسید موجود در ایزوپروپانول باعث می‌شود غشا سلول لیز شده و ایزوپروپانول وارد سلول شود و بلورهای نامحلول فورمازان را به حالت محلول در آورد. سپس محتوی خانه‌ها پیپتاژ شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گرفته شد. مطابق معادلهٔ زیر درصد بقای سلول‌ها[۳] محاسبه گردید. از محیط کشت خالی برای صفر کردن دستگاه و محیط کشت دارای سلول بدون حضور مواد مورد نظر به‌عنوان کنترل استفاده شد.

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{OD تست} \times ۱۰۰}{\text{OD کنترل}}$$

تمامی تجربیات حداقل سه بار تکرار شدند. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار (Instate 3)، از روش (one-way ANOVA) استفاده شد و P value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ترسیم شدند.

نتایج

اثر زهر زنبور عسل روی تکثیر سلول‌های HL-60:

اثر زهر زنبور بر روی بقای سلول‌های HL-60 با استفاده از شمارش تریپان‌بلو و MTT انجام شد و نتایج نشان داد که زهر در غلظت‌های بالای ۱۰ µg/ml دارای اثر کشندگی شدیدی است به‌طوری که در غلظت ۲۰ µg/ml زهر به‌محض اضافه کردن به محیط موجب لیز شدن سلول‌ها گردید و در غلظت ۱۲ µg/ml بعد از گذشت ۴۸ ساعت هیچ سلول زنده‌ای در محیط دیده نشد. غلظت ۵ µg/ml زهر زنبور پس از طی ۲۴ ساعت تیمار، بقای سلولی ۵۸ درصد محاسبه شد و بقای سلولی پس از طی ۷۲ ساعت تیمار با غلظت ۱۰ µg/ml زهر زنبور به ۷ درصد کاهش یافت. غلظت ۲/۵ µg/ml زهر زنبور پس از گذشت ۷۲ ساعت تفاوتی در تعداد سلول‌های مرده نسبت به نمونهٔ کنترل ایجاد نکرد و مهار تکثیر نسبت به نمونهٔ کنترل در سطح P<۰/۰۱ معنی‌دار بود. غلظت ۱ µg/ml زهر زنبور حداقل در طی ۷۲ ساعت، هیچ تفاوت معنی‌داری را در بقای سلولی نسبت به نمونه کنترل نشان نداد (نمودار ۱ و جدول ۱ و نمودار ۲، جدول ۲ و شکل ۱).

۱. dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium bromide ۲. Merck ۳. cell Viability

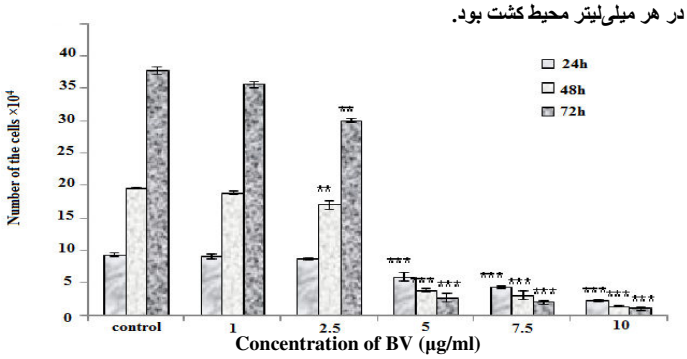
[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

جدول۱. اثر غلظت‌های مختلف زهر زنبور بر تکثیر سلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از شمارش تریپان‌بلو

	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
کنترل	۹/۴۲±۰/۲۵×۱۰^{۴}	۱۹/۶۱±۰/۱۱×۱۰^{۴}	۳۷/۸۹±۰/۵۸×۱۰^{۴}
۱ µg/ml	۹/۲۱±۰/۳۸×۱۰^{۴}	۱۸/۹۲±۰/۳۳×۱۰^{۴}	۳۵/۶۷±۰/۴۶×۱۰^{۴}
۲/۵ µg/ml	۸/۷۸±۰/۲۵×۱۰^{۴}	۱۷/۰۳±۰/۷۵×۱۰^{۴}**	۳۰/۱±۰/۳۳×۱۰^{۴}**
۵ µg/ml	۶±۰/۷×۱۰^{۴}***	۳/۸۸±۰/۲۵×۱۰^{۴}***	۲/۶۸±۰/۶۷×۱۰^{۴}***
۷/۵ µg/ml	۴/۴±۰/۱۱×۱۰^{۴}***	۳/۱۲±۰/۶۶×۱۰^{۴}***	۲/۰۳±۰/۳۱×۱۰^{۴}***
۱۰ µg/ml	۲/۲۶±۰/۱۷×۱۰^{۴}***	۱/۴±۰/۱۲×۱۰^{۴}***	۱/۰۶±×۰/۲×۱۰^{۴}***

(Mean ± SEM، **P <۰/۰۱ ، ***P <۰/۰۰۱)

تعداد اولیهٔ سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود.



نمودار ۱. اثرغلظت‌های مختلف زهر زنبورعسل بر تکثیرسلول‌های HL-60 (تعداد سلول‌ها ×۱۰^{۴}) پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از شمارش سلولی با تریپان‌بلو (*P<۰/۰۰۱ ، **P<۰/۰۱، Mean ± SEM)، تعداد اولیه سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود**

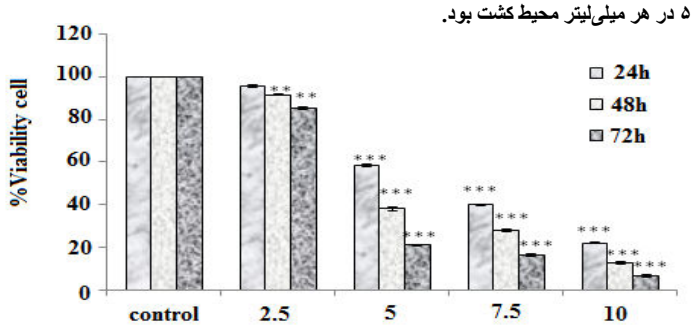
Concentration of BV (µg/ml)

جدول ۲. درصد سلول‌های زنده HL-60 درحضور غلظت‌های مختلف زهر زنبورعسل در مقایسه با کنترل در مدت ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت با روش MTT

	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
کنترل	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰
۲/۵ µg/ml	۹۶±۰/۵۵	۹۱/۶۷±۰/۲۱**	۸۵/۳۴±۰/۴۳**
۵ µg/ml	۵۸/۶۵±۰/۶۱***	۳۸/۳۴±۰/۸۸***	۲۱/۳۳±۰/۵۴***
۷/۵ µg/ml	۴۰/۳۱±۰/۳۳***	۲۸/۱۲±۰/۶۶***	۱۶/۵۶±۰/۴۵***
۱۰ µg/ml	۲۲/۳۱±۰/۳۷***	۱۳±۰/۴۲***	۷±۰/۳۳***

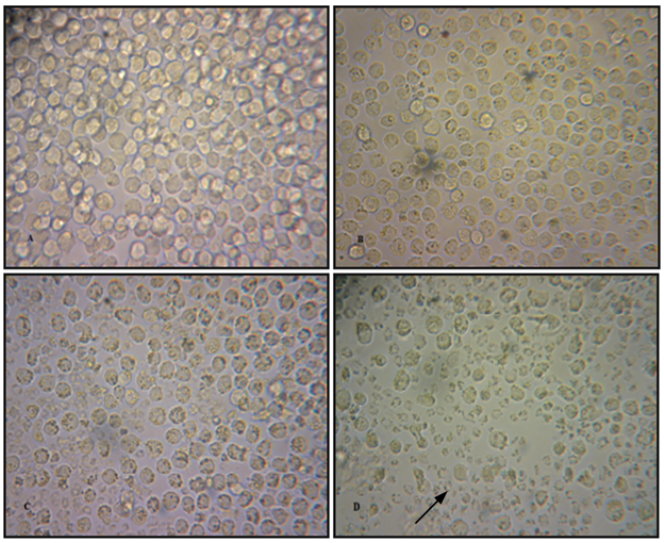
(Mean ± SEM، **P <۰/۰۱ ، ***P <۰/۰۰۱)

تعداد اولیهٔ سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود.



نمودار ۲. اثرغلظت‌های مختلف زهر زنبوعسل بر تکثیرسلول‌های HL-60 (تعداد سلول‌ها ×۱۰^{۴}) پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روشMTT (***P<۰/۰۰۱ ، **P<۰/۰۱، Mean ± SEM)، تعداد اولیهٔ سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]



شکل ۱. بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های HL-60 تیمار شده با غلظت‌های مختلف زهر زنبور پس از طی ۷۲ ساعت تیمار نسبت به نمونهٔ کنترل. A) نمونهٔ کنترل B) غلظت ۲/۵ C) غلظت ۷/۵ و D) غلظت ۱۰ µg/ml BV. پیکان لیزشدگی شدید سلول‌ها و اثر سیتوتوکسیک دوزهای بالای زهر زنبور را نشان می‌دهد. نمونه کنترل سلول‌هایی با هستهٔ درشت و مورفولوژی طبیعی هستند که هیچ گونه تیماری را دریافت نکرده است (بزرگ‌نمایی×۴۰۰)

اثر L- آسکوربیک‌اسید بر تکثیر سلول‌های HL-60:

نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت‌های مختلف L- آسکوربیک‌اسید بر روی رشد سلول‌های HL-60 با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو نشان داد که L- آسکوربیک‌اسید در غلظت‌های ۱ mM و ۱/۵ باعث لیز شدن شدید سلول‌ها می‌شود به‌طوری که پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول زنده‌ای در محیط مشاهده نشد. در غلظت‌های ۰/۳ mM و ۰/۵ L- آسکوربیک‌اسید در طول ۲۴ ساعت، بقایای سلول‌های مرده در محیط کشت بسیار چشمگیر بود. غلظت‌های ۰/۰۱ mM و ۰/۱ این ترکیب بدون ایجاد مرگ سلولی در الگویی وابسته به زمان و غلظت باعث مهار تکثیر گردید. L- آسکوربیک‌اسید به‌علت داشتن خاصیت اکسیداسیون- احیا باعث ایجاد تداخل در روش MTT گردید، بنا بر این فقط روش تریپان‌بلو استفاده شد و از این روش در بررسی اثرات سیتوتوکسیک L- آسکوربیک اسید بر روی سلول‌های HL-60 استفاده نشد (جدول۳، نمودار۳ و شکل ۲).

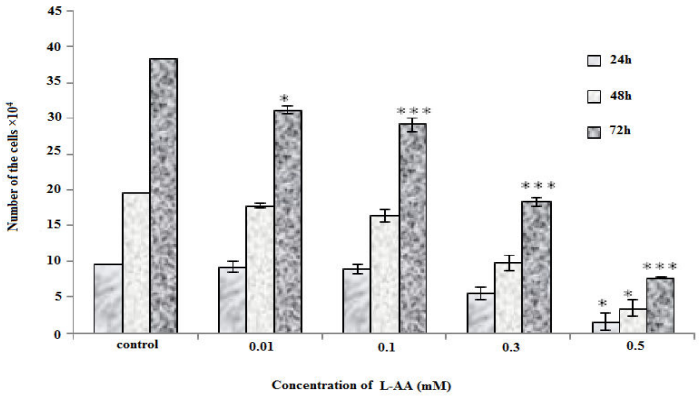
جدول۳. اثر غلظت‌های مختلف L- آسکوربیک‌اسید بر تکثیر سلول‌های HL-60 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از شمارش سلولی با تریپان‌بلو

	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
کنترل	۹/۶۷ ±۰/۷۵×۱۰^{۴}	۱۹/۷۰ ±۰/۳۳×۱۰^{۴}	۳۸/۳۳ ±۰/۵۴×۱۰^{۴}
۰/۰۱ mM	۹/۲۸±۰/۶۷×۱۰^{۴}	۱۷/۸۲ ±۰/۸۷×۱۰^{۴}	۳۱/۲۳±۰/۹۸×۱۰^{۴}**
۰/۱ mM	۹/۰۷±۰/۸۸×۱۰^{۴}	۱۶/۴۳ ±۱/۰۶×۱۰^{۴}	۲۹/۱۶ ±۰/۵۷×۱۰^{۴}***
۰/۳ mM	۵/۶۲±۱/۲۴×۱۰^{۴}	۹/۸۵ ±۱/۱×۱۰^{۴}	۱۸/۳۷ ±۰/۱۱×۱۰^{۴}***
۰/۵ mM	۱/۶۶±۰/۳۳×۱۰^{۴}**	۳/۵۶ ±۰/۵۵×۱۰^{۴}**	۷/۸۲±۰/۱۲×۱۰^{۴}***

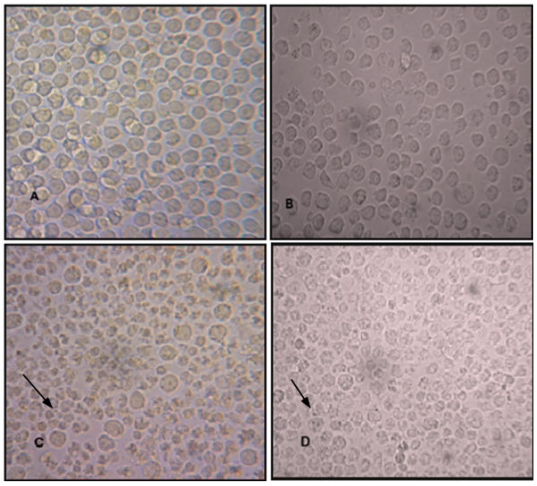
(Mean ± SEM، *P<۰/۰۵ ،*P<۰/۰۰۱)**

تعداد اولیهٔ سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]



نمودار ۳. اثر غلظت‌های مختلف L- آسکوربیک‌اسید بر تکثیرسلول‌های HL-60 (تعداد سلول‌ها ×$۱۰^{۴}$) پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از شمارش تریپان‌بلو (Mean ± SEM، *P<۰/۰۵ ، ***P<۰/۰۰۱)
تعداد اولیهٔ سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود



شکل ۲. بررسی مورفولوژی سلول‌های HL-60 تیمار شده با غلظت‌های مختلف L- آسکوربیک‌اسید پس از طی ۷۲ ساعت تیمار نسبت به نمونه کنترل. A) نمونه کنترل B) غلظت ۰/۱ C) غلظت ۰/۳ و D) غلظت ۱ mM L-AA. پیکان لیز شدگی شدید سلول‌ها و اثر سیتوتوکسیک دوزهای بالای زهر زنبور را نشان می‌دهد. نمونهٔ کنترل هیچ گونه تیماری را دریافت نکرده است (بزرگ‌نمایی×۴۰۰)

نتایج حاصل از هم‌افزایی زهر زنبورعسل و L- آسکوربیک‌اسید بر روی تکثیر سلول‌های HL-60:

در این تحقیق اثر هم‌افزایی زهرزنبور و L- آسکوربیک‌اسید درغلظت‌های ۰/۰۱ mM و ۰/۱ L- آسکوربیک اسید و ۲/۵ µg/ml زهر زنبور بر روی مهار تکثیر سلول HL-60 بررسی گردید. هم‌افزایی غلظت ۲/۵ µg/ml زهر زنبور و ۰/۰۱ mM L- آسکوربیک‌اسید اثر مهار تکثیری قابل توجهی نشان نداد و بیش‌ترین مهار تکثیر سلولی در غلظت ۲/۵ µg/ml زهر زنبور و ۰/۱ mM L- آسکوربیک‌اسید در طی ۷۲ ساعت محاسبه شد. کاربرد همزمان زهر زنبور و L- آسکوربیک‌اسید نشان داد که میزان مهار تکثیر سلولی نسبت به زمان استفاده از هر یک به تنهایی افزایش می‌یابد. بنا بر این زهر زنبور همراه با L- آسکوربیک اثر هم‌افزایی در مهار تکثیر سلول‌های HL-60 دارد (جدول ۴ و نمودار ۴ و شکل ۳).

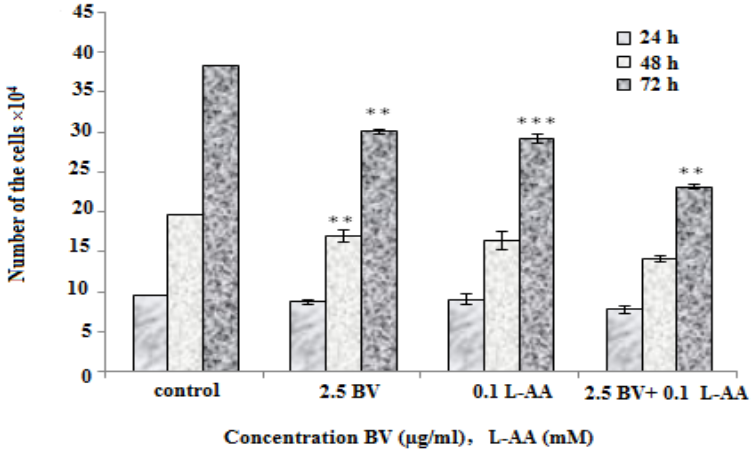
[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

جدول۴. اثر غلظت ۲/۵µ g/ml زهر زنبور، ۰/۱ mM L- آسکوربیک‌اسید و غلظت توأم این دو ترکیب بر تکثیر سلول‌های HL-60 با استفاده از شمارش سلولی توسط تریپان‌بلو

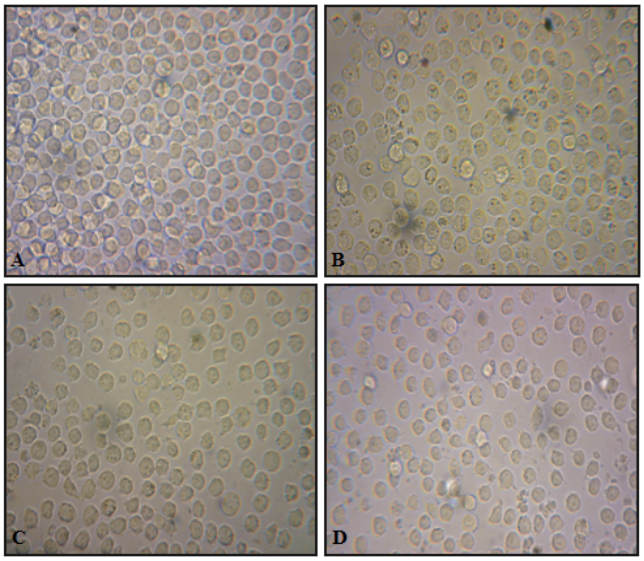
	کنترل	۰/۱ mM L- آسکوربیک‌اسید	۲/۵ µg/ml زهرزنبور	۲/۵ µg/ml زهر زنبور + ۰/۱ mM L-آسکوربیک‌اسید
۲۴ ساعت	۹/۶۷ ±۰/۷۵×۱۰^{۴}	۹/۰۷ ±۰/۶۷×۱۰^{۴}	۸/۷۸±۰/۲۵×۱۰^{۴}	۷/۸۱ ±۰/۴۵×۱۰^{۴}
۴۸ ساعت	۱۹/۷۰ ±۰/۳۳×۱۰^{۴}	۱۶/۴۳±۱/۰۶×۱۰^{۴}	۱۷/۰۳±۰/۷۵×۱۰^{۴***}	۱۴/۱۸ ±۰/۴۱×۱۰^{۴}
۷۲ ساعت	۳۸/۳۳ ±۰/۵۴×۱۰^{۴}	۲۹/۱۶±۰/۵۷×۱۰^{۴****}	۳۰/۱±۰/۳۳×۱۰^{۴***}	۲۳/۲۱ ±۰/۳۴×۱۰^{۴***}

(Mean ± SEM، **P <۰/۰۱ ، ***P <۰/۰۰۱)

تعداد اولیهٔ سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود.



نمودار ۴. اثر ۲/۵ µg/ml زهر زنبور، ۰/۱ mM L- آسکوربیک‌اسید و در غلظت توأم این دو ترکیب بر تکثیر سلول‌های HL- 60 با استفاده از شمارش سلولی توسط تریپان‌بلو (Mean ± SEM،P<۰/۰۱ ، ***P<۰/۰۰۱)**
تعداد اولیهٔ سلول‌ها ۵×۱۰^{۴} در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود



شکل ۳. سلول‌های HL-60 تیمار شده با غلظت ۲/۵ µg/ml زهر زنبور (B) و غلظت ۰/۱ mM L- آسکوربیک اسید (C) و هم‌افزایی دو ترکیب فوق (D) نسبت به نمونه کنترل (A)، پس از طی ۷۲ ساعت تیمار. نمونه کنترل هیچ گونه تیماری را دریافت نکرده است (بزرگ‌نمایی ×۴۰۰)

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

بحث

در تحقیق حاضر غلظت‌های مختلف زهر زنبور و L- آسکوربیک‌اسید به‌صورت منفرد و همچنین توأم در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های HL-60 اثر داده شدند. نتایج نشان می‌دهد که زهر زنبور در غلظت بالا موجب مرگ سلولی و در غلظت پایین موجب مهار تکثیر سلول‌ها می‌شود. زهر زنبور در غلظت‌های بالای µg/ml ۱۰ دارای اثر کشندگی شدیدی بر روی سلول‌های HL-60 است. زهر زنبور در دوزهای ۵، ۷/۵ و µg/ml ۱۰ به‌صورت وابسته به زمان و غلظت، باعث کاهش بقای سلولی گردید و بعد از طی ۷۲ ساعت واکوئله شدن شدید سلول‌ها و کاهش شدید درصد سلول‌های زنده در محیط کشت مشاهده شد. زهر زنبور در غلظت µg/ml ۲/۵ در طی ۷۲ ساعت بدون القای مرگ سلولی باعث کاهش معنی‌داری در میزان سلول‌های زنده نسبت به نمونهٔ کنترل گردید و بقایای سلول‌های مرده در محیط تفاوتی با نمونهٔ کنترل نداشت و به نظر می‌رسد این کاهش بیش‌تر مرتبط با مهار تکثیر بوده باشد نه مرگ سلولی. در بررسی اثر L- آسکوربیک اسید بر روی سلول‌های HL-60 مشاهده شد که L- آسکوربیک‌اسید در غلظت‌های بالاتر از mM ۰/۵ دارای اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های HL-60 است، به طوری که بعد از ۲۴ ساعت سلول زنده‌ای در محیط مشاهده نشد. غلظت‌های mM ۰/۳ و L- ۰/۵ آسکوربیک‌اسید به‌صورت وابسته به زمان و غلظت دارای اثر هستند و در طول ۲۴ ساعت بقای سلولی به‌شدت کاهش یافت. بیش‌ترین اثر مهار تکثیری L- آسکوربیک‌اسید در غلظت mM ۰/۱ مشاهده شد. با افزایش غلظت L- آسکوربیک‌اسید لیزشدگی شدید سلول‌ها مشاهده شد و درصد بیش‌تری از سلول‌ها دچار مرگ شدند. با توجه خاصیت ضدتکثیری زهر زنبور دراین تحقیق زهر به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای کاهش اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های بالای L- آسکوربیک اسید مورد توجه قرار گرفت. بدین‌منظور زهر زنبور به‌صورت توأم با غلظت غیرسمی L- آسکوربیک‌اسید، برای افزایش مهار تکثیر سلول‌های HL-60 و کاهش اثرات جانبی غلظت بالای L- آسکوربیک‌اسید به‌کار گرفته شد. نتایج این هم‌افزایی نشان داد که استفاده از زهر زنبور با غلظت µg/ml ۲/۵ و L- آسکوربیک‌اسید با غلظت mM ۰/۱ به‌صورت هم‌زمان بدون داشتن اثر سیتوتوکسیک باعث افزایش مهار تکثیر سلول‌های HL-60 می‌شود. در سال ۲۰۰۳، کانگ[۱] اثر L- آسکوربیک‌اسید را بروی رشد سلول‌های HL- 60 بر پایهٔ القای آپوپتوز بررسی کرد و نشان داد که L- آسکوربیک‌اسید در غلظت‌های $M^{-۴}۱۰\geq$ دارای بیش‌ترین اثر مهار تکثیری بر روی رشد سلول‌های HL-60 است [۱۲] که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. پارک[۲] و همکارانش در سال ۲۰۰۴، اثر L- آسکوربیک‌اسید را بر روی سلول‌های لوسمی بررسی کردند و نشان دادند که L- آسکوربیک‌اسید در غلظت mM ۱-۰/۲۵ به‌صورت وابسته به زمان و غلظت موجب مهار تکثیر سلول‌های لوسمی حاد میلوئیدی می‌شود و به‌طور اساسی موجب القای آپوپتوز می‌گردد [۱۶]. به هرحال مکانیسم‌های مولکولی سیگنالینگ سلولی که طی آن‌ها L- آسکوربیک اسید منجر به آغاز مرگ سلولی می‌شود، به‌طور کامل واضح نیست. در سال ۲۰۰۴، هان[۳]

۱. Kang ۲. Park ۳. Han

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

و همکارانش پیشنهاد نمودند که L- آسکوربیک‌اسید از طریق مهار فعالیت فاکتور هسته‌ای kappa-β ($NF\text{-}_k\beta$) و مهار بیان آنزیم سیکلواکسیژناز-۲(COX-2) دارای فعالیت ضدتوموری است. پروموتور ژن سیکلواکسیژناز-۲ دارای یک جایگاه اتصالی برای فاکتور هسته‌ای kappa-β است و بیان ژن سیکلواکسیژناز-۲ به فاکتور هسته‌ای kappa-β وابسته است [۱۷]. فاکتور هسته‌ای kappa-β به‌عنوان تنظیم کنندهٔ بیان بسیاری از ژن‌ها شناخته می‌شود و در تکثیر سلولی، پاسخ‌های التهابی و آپوپتوز دخیل است [۱۸]. افزایش بیان این فاکتور در بسیاری از سلول‌های سرطانی دیده می‌شود که منجر به مقاوم شدن در برابر عوامل متوقف کنندهٔ تکثیر و یا القای آپوپتوز می‌گردد [۱۹]. محققان بیان بالای آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ را در سلول‌های سرطانی متنوعی از جمله سرطان سینه، شش، پانکراس و معده نشان داده‌اند و پیشنهاد کرده‌اند که اثر مهاری L- آسکوربیک‌اسید روی سلول‌های سرطانی از طریق مهار بیان فاکتور هسته‌ای kappa-β و در نتیجه مهار بیان آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ باشد [۱۷]. بسیاری از داروهایی که اخیراً در درمان سرطان از آن‌ها استفاده می‌شود، با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز، می‌توانند باعث توقف رشد تومورهای خاص شوند [۲۰]. اثر مهاری L- آسکوربیک‌اسید بر روی فاکتور هسته‌ای kappa-β به تولید H_2O_2 و گلوتاتیون وابسته است. L- آسکوربیک‌اسید با مهار گلوتاتیون باعث تجمع H_2O_2 تولید شده در درون سلول می‌شود و این تجمع H_2O_2 نقش مهمی در مهار تکثیر با L- آسکوربیک ایفا می‌کند [۱۲]، [۱۷]. در سال ۱۹۹۱، ساکا گامی[۱] نشان داد که (SBA)[۲] در افراد سرطانی حجم تومور را بدون هیچ اثر جانبی کاهش می‌دهد [۲۱]. محققان اثر آرسنیک تری اکسید (As_2O_3) را روی سلول‌های سرطانی بررسی کردند و نشان دادند اثر مهار رشد آرسنیک تری اکسید بر روی سلول‌های سرطانی در صورت استفادهٔ توأم با L- آسکوربیک‌اسید افزایش می‌یابد [۱۷]. بررسی‌های متعدد پارک وهمکارانش نشان داد که L- آسکوربیک‌اسید رشد سلول‌های پروژنیتور لوسمی در افراد با لوسمی میلوئیدی حاد و یا سندرم میلوئیداسپلاتیک[۳] را به‌طور چشمگیری تنظیم می‌کند و یک تنظیم کنندهٔ رشد کلونی سلول‌های میلوئیدی موش در محیط *invitro* است. درمان‌های اخیر نشان دادند که به‌کار بردن L- آسکوربیک‌اسید در افراد با لوسمی میلوئیدی حاد و تومورهای بدخیم به‌صورت *invivo* می‌تواند مفید باشد [۱۰]، [۱۶]. زهر زنبورعسل دارای خاصیت ضدسرطانی است. آپوپتوز، نکروز و لیزشدن سلول‌های توموری مکانیسم‌هایی هستند که برای مهار رشد تومور توسط زهر زنبور پیشنهاد می‌شوند [۲۲]، [۲۳]. فعال شدن فسفولیپاز- A_2 با ملیتین مکانیسمی مهم برای فعالیت ضدسرطانی زهر زنبور است. کیم[۴] پیشنهاد می‌کند که ملیتین موجود در زهر زنبور به‌دلیل فعال کردن فسفولیپاز - A_2 دارای اثرات سمی بر ضد سلول‌های سرطانی است [۲۴]. در سال ۱۹۸۵، هیت[۵] اولین بار اثر مهاری ملیتین را در محیط *in vitro* گزارش کرد و نشان داد که ملیتین به‌عنوان یک مهار کنندهٔ کالمودولین، رشد را در سلول‌های لوسمی انسان و موش مهار می‌کند. لی[۶] و هیت در سال ۱۹۸۵ اثر مهاری

۱. Sakagami ۲. sodium benzylidene ascorbate ۳. Myelodsplatic ۴. kim
۵. Hait ۶. Lee

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

ملیتین بر روی رشد سلول‌های آستروسیتوما C6 بررسی کردند. آن‌ها نتایج جالبی را در مورد ارتباط بین مهارکننده‌های کالمودولین و مهار رشد سلول گزارش کردند. لزو[۱] در سال ۱۹۸۵، مکانیسم‌های مشابهی را برای اثر سمی ملیتین بر روی سلول‌های لوسمی L1210 گزارش کرد. دوون[۲] و کلیون[۳] در سال ۱۹۸۶ نشان دادند که سلول‌های لوسمی سرطانی L1210 نسبت به سلول‌های سالم DBA/2 طحال موش ۲ تا ۴ بار بیش‌تر به اثرات سمی ملیتین حساس‌اند [۸]. زهر زنبور به دلیل دارا بودن ترکیبات فعالی از قبیل ملیتین و فسفولیپاز- A_2 در غلظت‌های غیرسمی، باعث مهار فعالیت فاکتور هسته‌ای kappa-β و مهار m-RNA سیکلواکسیژناز-۲ می‌شود. فعالیت مهاری ملیتین بر روی فاکتور هسته‌ای kappa-β برای اثر ضد سرطانی زهر زنبور ضروری است [۸]، [۲۴]. چو[۴] در سال ۲۰۱۰، اثر زهر زنبور را بر روی متاستاز سلول‌های سرطانی سینه بررسی کرد و نشان داد که مهار شدن فاکتور هسته‌ای kappa-β با زهر زنبور برای خاصیت ضدسرطانی زهر و جلوگیری متاستاز ضروری است [۲۵]. پارک و همکارانش در سال ۲۰۰۴، اثر ضد التهابی زهر زنبور را بر روی سلول‌های Raw 264.7 گزارش کردند و نشان دادند که زهر زنبور با مهار فاکتور هسته‌ای kappa-β باعث کاهش بیان آنزیم COX-2 و NO می‌شود [۲۶]. در سال ۲۰۰۶ سون[۵] و همکارانش نشان دادند که ملیتین موجود در زهر زنبور در الگویی وابسته به غلظت از طریق مهار فعالیت سیگنال‌های Akt و فاکتور هسته‌ای kappa-β و همچنین بالا بردن بیان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز باعث مهار تکثیر سلول‌های عضلهٔ صاف جدارهٔ عروق می‌گردد [۲۷]. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که زهر تکثیر را در ردهٔ سلولی HL-60 مهار می‌کند که با تحقیقات انجام گرفته در رابطه با توانایی مهار تکثیر زهر زنبور مطابقت دارد. در سال ۲۰۱۰، هو[۶] اثر زهر زنبور را به‌عنوان مهار کنندهٔ آنژیوژنز بر روی سلول‌های سرطانی ریه گزارش کرد و بیان کرد که زهر فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VGEF) و Akt را مهار می‌کند و آنژیوژنز تومور را به‌صورت چشمگیری متوقف می‌کند [۲۸]. زو[۷] و همکارانش در سال ۱۹۹۱ گزارش کردند که ملیتین در غلظتی که تکثیر را در سلول‌های سرطانی مهار می‌کند، بر روی مهار رشد سلول‌های نرمال مؤثر نیست [۲۹]. اورسولیک[۸] در سال ۲۰۰۱ نشان داد که زهر زنبور رشد را بر روی رده‌های سلولی V79 و Hela مهار و القای تمایز را در این سلول‌ها تحریک می‌کند [۲۲]. پژوهش‌های اخیر فعالیت ضدتوموری زهر زنبور را در محیط *invivo* و *invitro* نشان داده‌اند و بیان می‌کنند که زهر زنبور می‌تواند به‌عنوان عاملی برای درمان تومورهای بدخیم استفاده شود [۷]، [۲۳]. با توجه به مسیرهای مولکولی دخیل در تکثیر سلولی می‌توان گفت که زهر زنبور بر عمل‌کرد L- آسکوربیک‌اسید تأثیرگذار است. این ترکیب در غلظت‌های غیرسمی و مهاری می‌تواند از طریق مهار فعالیت فاکتور هسته‌ای kappa-β و کاهش بیان COX-2، موجب افزایش اثر مهار تکثیری L- آسکوربیک‌اسید بر روی سلول‌های سرطانی HL-60 شود.

۱. Lazo ۲. Dunn ۳. Killion ۴. Cho ۵. Son ۶. Huh ۷. Zhu

۸. Orsolic

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل از این پژوهش تأئیدکنندهٔ اثر مهاری زهر زنبورعسل و L- آسکوربیک‌اسید بر تکثیر ردهٔ سلولی HL-60 است. مقایسهٔ اثر همزمان زهر زنبور و L- آسکوربیک‌اسید با اثر منفرد هر کدام نشان داد که زهر زنبور موجب افزایش اثر مهار تکثیری L- آسکوربیک‌اسید می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد، در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکدهٔ علوم‌زیستی دانشگاه تربیت معلم تهران اجرا شده است. از اساتید محترم و تمام کسانی که در اجرای این پروژه کمک کرده‌اند، و نیز از جناب آقای دکتر ایمانی که ما را در تهیهٔ زهر زنبور یاری کردند، سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

1. D. Hanahan, R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer cell", *Cell J*, 144 (2011) 646-674.
2. G. Opdenakker, J. Damme, "The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines", *Int Development Biology J*, 48 (2004) 519-527.
3. S. Kitada, I. Pedersen, A. Schimmer, J. Reed, "Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies", *Oncogene J*, 21 (2002) 3459-3474.
4. L. Altucci, E. Wilhelm, H. Gronemeyer, "Leukemia: beneficial actions of retinoids and rexinoids", *Biochemistry and Cell Biology J,* 36 (2003) 178-182.
5. R. Gallagher, S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, et al, "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia", *Blood J*, 54 (1979) 713-733.
6. M. H. Jang, M. C. Shin, S. Limi, S. M. Han, H. J. Park, I. Shin, "Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299", *Pharmacol Sci J*, 91 (2003) 95-104.
7. N. Orsolic, L. Sever, S. Verstovsek, S. Terzic, I. Basic, "Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom", *Toxicon J*, 41 (2003) 861-870.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

8. D. J. Son, J. W. Lee, Y. H. Lee, H. S. Song, C. K. Lee, J. T. Hong, "Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds", *Pharmacology & Therapeutics J*, 115 (2007) 246-270.

9. J. Sebastian, A. Katz, P. Eck, O. Kwon, J. Lee, Sh. Chen, et al, "Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention", *American College of Nutrition J*, 22 (2003) 18-35.

10. S. Park, Ch. Park, E. Hahm, K. Kim, B. Kimler, et al, "Activation of Raf1 and the ERK pathway in response to L-ascorbic acid in acute myeloid leukemia cells", *Cellular Signalling J*, 17 (2005) 111-119.

11. F. Harrison, J. May, "Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2", *Free Radical Biology & Medicine J*, 46 (2009) 719-730.

12. H. Kang, J. Suh, J. Lee, S. Yoon, J. Hyun, S. Choi, et al, "Induction of the Differentiation of HL-60 Promyelocytic Leukemia Cells by L-Ascorbic Acid", *Free Radical Research J*, 37 (2003) 773-779.

13. A. Naidu, "Vitamin C in human health and disease is still a mystery? *Nutrition J*", 2 (2003) 10-20.

14. M. Levine, R. Daruwala, J. Park, S. Rumsey, Y. Wang, "Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature J*", 395 (1998) 231-232.

15. Qi. Chen, M. Espey, M. Krishna, J. Mitchell, Ch. Corpe, G. Buettner, et al, "Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues", *National Acad of Sciences J*, 102 (2005) 13604-13609.

16. S. Park, S. Han, Ch. Park, E. Hahm, S. Lee, H. Park, et al, "L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms", *Biochemistry & Cell Biology J*, 36 (2004) 2180-2195.

17. S. Han, K. Kim, E. Hahm, S. Lee, Y. Surh, H. Park, et al, "L-Ascorbic Acid Represses Constitutive Activation of NF-k β and COX-2 Expression in Human Acute Myeloid Leukemia, HL-60", *Cellular Biochemistry J*, 93 (2004) 257-270.

18. A. A. Beg, D. Baltimore, "An essential role for NF-kappa β in preventing TNF-alpha-induced cell death", *Science J*, 274 (1996) 782-784.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]

19. D. Colloni, G. Martinelli, F. Messa, M. Baccarani, G. Saglio, "Nuclear factor k β as a target for new drug development in myeloid malignancies", *Hematologica J*, 92 (2007) 1224-1229.

20. KK. Wu, "Cyclooxygenase-2 induction: Molecular mechanism and pathophysiologic roles", *Lab Clin Med J*, 128 (1996) 242-245.

21. H. Sakagami, K. Asano, K. Fukuchi, K. Gomi, H. Ota, K. Kazama, et al, "Induction of tumor degeneration by sodium benzylideneascorbate", *Anticancer Res J*, 11 (1991) 1533-1538.

22. N. Orsolic, L. Sver, K. Bendelja, "Basic antitumor activity of bee venom", *Periodicum Biologorum J*, 103 (2001) 49-54.

23. X. Liu, D. Chen, "Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo", *Pharmacy and Pharmacology J*, 54 (2002) 1083-1089.

24. H. W. Kim, Y. B. Kwon, T. W. Ham, D. H. Roh, S. Y. Yoon, S. Y. Kang, et al. "General pharmacological profiles of bee venom and its water soluble fractions in rodent models", *Vet Sci J,* 5 (2004) 309-318.

25. H. Cho, Y. Jeong, K. Park, Y. Park, K. Chung, K. Lee, et a, "Bee venom suppresses PMA-mediated MMP-9 gene activation via JNK/p38 and NF-B-dependent mechanisms", *Ethnopharmacology J*, 127 (2010) 662-668.

26. H. J. Park, S. H. Lee, D. J. Son, K. W. Oh, K. H. Kim, H. S. Song, et al, "Anti-arthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappa β through interaction with the p50 subunit", *Arthritis Rheum J*, 50 (2004) 3504-3515.

27. D. J. Son, S. J. Ha, H. S. Song, Y. Lim, Y. P. Yun, J. W. Lee, et al, "Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappa β and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression", *Pharmacol Experimental Therapeutics* J, 317 (2006) 627-634.

28. J. Huh, Y. Baek, "Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice", *Cancer Lett J*, 292 (2010) 98-110.

29. H. Zhu, I. Tayeh, L. Israel, M. Castagna, "Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation", *Biol Regul Homeost Agents J,*

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-02]