



تأثیر زهر زنبور عسل بر بیان ژن VEGF A بر سلول‌های سرطان پرومیلوسیتی (HL-60)

دلبر دانش جو، جواد بهار آرا*، سعیده ظفر بالانژاد، خدیجه شاهرخ آبادی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

E-mail: baharara@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۰۱

چکیده

مطالعات مختلف بر اثرات ضد سرطانی زهر زنبور عسل تأکید دارد. آنژیوژن‌زا تشکیل رگ‌های خونی جدید که برای تکوین جنین و بسیاری از وقایع فیزیولوژیکی مورد نیاز است در بسیاری از شرایط پاتولوژیک نظیر رشد تومورها نیز ضروری است. یکی از ژن‌های فعال در روند رگ‌زایی VEGF-A می‌باشد. در این پژوهش تأثیر زهر زنبور عسل بر بیان این ژن بررسی گردید. سلول‌های HL-60 در محیط کشت RPMI1640 غنی شده با ۱۰٪ FBS کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها توسط زهر زنبور در غلظت‌های ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار گردیدند. ۴۸ ساعت پس از تیمار، RNA تام استخراج و cDNA با استفاده از توالی ژن مورد نظر سنتز شد و محصولات سنتز شده توسط Real Time PCR جهت بررسی سطح بیان ژن VEGF-A مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی آماری داده‌ها نشان داد که کاهش معنادار ($P < 0.05$) در میزان بیان ژن VEGF-A تیمار شده با غلظت‌های ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور عسل نسبت به سلول‌های گروه کنترل دیده می‌شود به نحوی که بیشترین تغییرات کاهش بیان ژن مربوط به غلظت ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ زهر زنبور بود. نتایج بیانگر کاهش بیان ژن VEGF-A، بیومارکر ویژه آنژیوژن در نمونه‌های تحت تیمار با زهر زنبور عسل در مقایسه با گروه کنترل است.

کلیدواژه‌ها: زهر زنبور عسل، آنژیوژن، VEGF-A، رده سلولی HL-60، سرطان

مقدمه

استفاده بوده است [10]. زهر زنبور حداقل حاوی ۱۸ نوع ترکیب فعال شامل انواع پپتیدها (ملیتین، آپامین، آدولاپین، پپتید MCD)، آنزیم‌هایی مثل فسفولیپاز A2، آمین‌های فعال بیولوژیک (مثل هیستامین، اپینفرین) و اجزا غیرپپتیدی است که دارای تنوعی از خاصیت دارویی می‌باشند. زهر زنبور دارای خاصیت ضدالتهابی بوده که یکی از ویژگی‌های داروهای ضدالتهابی

امروزه با توجه به اثرات جانبی برخی داروهای شیمیایی، استفاده از فراورده‌های طبیعی با حداقل اثرات جانبی و تداخل‌دار و بی‌مورد توجه قرار گرفته است. در این میان زهر زنبور عسل از دیرباز در درمان بیماری‌هایی مثل آرتریت، روماتیسم، تومورهای سرطانی، بیماری‌های پوستی و تسکین درد مورد

کنظیر رشد و متاستاز تومورهای سرطانی نقش مهمی ایفا می‌کند، لذا می‌تواند هدف درمان‌های ضد توموری نیز قرار گیرد [11]. این فرآیند به فعل و انفعالات وسیع بین سلول‌ها و ملکول‌های مختلفی وابسته است و توسط پپتیدها و فاکتورهای تعدیل کننده متنوعی کنترل می‌شود. فاکتورهای متعددی نظیر VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)، FGF (Fibroblast Growth Factor)، STAT3 (PTGFPlatelete-driven Growth Factor)، (Singal Transducer and Activator of Transcription) در این پدیده دخالت دارند [5].

یک‌یاز عوامل مؤثر در آنژیوژنز، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) می‌باشد که از فاکتورهای اصلی در روند جوانه زدن عروق خونی جدید از بستر عروقی اولیه و فاکتور کلیدی در سیستم سیگنال دهی است، VEGF هم ودايمری است که به دو رسپتور با تمایل بالا شامل VEGFR1 و VEGFR2 متصل می‌شود و عملکرد وابسته به دوز برای آن شناخته شده است [1]. در شرایط درون تنی VEGF نفوذ پذیری عروق را که برای شروع آنژیوژنز ضروری است، تنظیم می‌کند به همین دلیل به آن فاکتور نفوذپذیری عروق (Vascular Permeability Factor) گفته می‌شود و در این مورد چندین برابر قوی‌تر از هیستامین عمل می‌کند [6]. در فرایند رگ‌زایی، کاهش فشار اکسیژن (hypoxia) بافت مورد نظر از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. یکی از کاربردی‌ترین استفاده‌های time PCR Real بررسی بیان ژن هاست که با استفاده از روش‌هایی همچون کمیت سنجی نسبی (Relative Quantitative) انجام می‌شود. این روش در حال حاضر یکی از دقیق‌ترین روش‌های بررسی تغییرات بیان ژن هاست [9].

غیراستروئیدی است [15-16]. پیشنهاد کردند که اثرات سمی زهر زنبور از طریق فعالیت ملیتین بر روی فسفو لیپاز A2 صورت گرفته و الحاق پپتید لیز کننده سلولی ملیتین با گیرنده‌های هورمونی و ژن درمانی می‌تواند نوعی درمان هدف‌مند و مفید جهت درمان انواع سرطان‌ها باشد. انواع سلول‌های سرطانی مثل کلیه، ریه، کبد، پروستات، مثانه و سینه همانند سلول‌های لوکمیایی می‌توانند هدف ملیتین باشند [18.19].

سرطان حاد پرومیلوسیت، نوعی سرطان خون و مغز استخوان بوده که در نتیجه تجمع غیرطبیعی پرومیلوسیت‌ها به وجود می‌آید این بیماری در اثر یک جابجایی کروموزومی بین ژن گیرنده آلفا ترانس رتینوئیک اسید ($RAR\alpha$) روی کروموزوم شماره ۱۷ به ژن PML (Promyelocyte Leukemia)، روی کروموزوم شماره ۱۵ به صورت (q22;q12-21) $t(15:17)$ به وجود آمده و پروتئین مرکبی تحت عنوان PML- $RAR\alpha$ به وجود می‌آورد [22]. رده سلولی HL-60 یک دودمان سرطان حاد پرومیلوسیتی بوده که در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی جهت انجام مطالعات روی سلول‌های خونی کاربرد وسیعی دارد [17].

اولین رگ‌های خونی طی پدیده‌ای موسوم به واسکولوژنز به شکل نوپدید از سلول‌های پیش‌ساز آندوتلیال با آرایش خاص بوجود می‌آیند و به تدریج شروع به انتشار، توسعه و تشکیل شاخه‌های جدید می‌کنند، که به آن آنژیوژنز اطلاق می‌شود [21]. در افراد بالغ، تشکیل رگ‌های خونی جدید از رگ‌های قبلی به طور دقیقی کنترل می‌شود و رگ‌زایی فقط در شرایط فیزیولوژیکی خاص نظیر بارداری و شرایط پاتولوژیکی ویژه نظیر ترمیم زخم، رتینو پاتیدیاپتیک، پیوریازیس، آرتریتروماتوئید و یا سرطان‌ها اتفاق می‌افتد. از آنجا که آنژیوژنز در پدیده‌های پاتولوژی

نظر تراکم و عدم آلودگی باکتریایی به وسیله میکروسکوپ معکوس با زهر زنبور عسل با غلظت‌های ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اساس غلظت مهارى ۵۰٪ (IC₅₀= Inhibitory Concentration) زهر زنبور عسل تیمار شد. به منظور بررسی قابلیت حیات (viability) عکسبرداری برای ۳ روز متوالی به وسیله دوربین دیجیتال Dinocapre متصل به میکروسکوپ اینورت (Germany, Ziess) و تهیه تصاویری با بزرگنمایی 200x انجام پذیرفت.

جهت انجام تست تریپان‌بلو محیط کشت تخلیه و سلول‌ها توسط phosphate buffered saline (PBS) شست. سپس سلول‌ها با نسبت یک به یک به وسیله تریپان‌بلو رنگ‌آمیزی و شمارش سلولی بر روی لام ثوبار به کمک میکروسکوپ نوری انجام شد.

ج- استخراج RNA:

استخراج RNA توسط total RNA purification kit شرکت Jena Bioscience ساخت آلمان پس از ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌های سرطانی مطابق پروتوکول ۵ مرحله‌ای ضمیمه کیت انجام پذیرفت. جهت حذف آنزیم RNase که بر سطح پوست و کلیه وسایل موجود می‌باشد از DEPC water در سطح محیط کار، تجهیزات، ابزار و دستکش‌ها استفاده شد. علاوه بر این از نوک سمپلرها و میکروتیوپ‌های RNase free جهت بازدهی مثبت کار در مراحل مختلف استفاده گردید. سلول‌های هر فلاسک توسط سانتریفوژ پلیت سلولی تخلیص شد. این سلول‌ها به یک میکروتیوپ RNase free انتقال یافت. سپس ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به محلول سلولی لیز شده اضافه و میکروتیوپ ورتکس شد. ستون اسپین از جنس سیلیکاژل در تیوپ جمع‌آوری قرار گرفت و

از آنجا که بیشتر مطالعات بر خواص ضدسرطانی و ضدآپوپتوزی زهر زنبور عسل تاکید دارند. در مطالعه حاضر تاثیر زهر زنبور عسل بر بیان ژن VEGF-A به عنوان فاکتور محرک آنژیوژنز بر رده سلولی سرطان پرومیلوسیتی (HL-60) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

الف- تهیه محلول زهر زنبور عسل

غلظت‌های مورد استفاده از زهر در این طرح تحقیقاتی ۲، ۴، ۸ و ۱۰ µg/ml بودند. جهت تهیه ۳۰ میلی‌لیتر محلول استوک زهر زنبور عسل، ۳۰ میلی‌گرم از پودر خالص در ۳۰ میلی‌لیتر PBS (فسفات بافرسالین) حل گردید. غلظت نهایی محلول زهر در ۳۰ میلی‌لیتر pbs برابر با ۳۰ µg می‌باشد. بدین ترتیب، جهت تهیه غلظت ۲ µg/ml محلول زهر، ۲۰ µl از محلول استوک با ۹۹۸۰ میکرولیتر pbs رقیق گردید و جهت ساخت سایر غلظت‌ها نیز از همین روش استفاده گردید.

ب- کشت سلول

رده سلول‌های سرطان پرومیلوسیتی انسانی (HL-60) که سلول‌هایی نامیرا (immortal)، مدل و با منشأ انسانی هستند از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری و در محیط کشت RPMI1640 (Biosera) غنی شده با ده درصد Fetal Bovine Serum (Gibco) به همراه یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین شرکت Sigma در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO₂ کشت گردید. پس از دو بار پاساژ سلولی و تکثیر آن‌ها، ۵ میلیون سلول در هر فلاسک فیلتردار T5 کشت گردید. ۲۴ ساعت پس از کشت و اطمینان و بررسی از

د- بررسی میزان RNA تام استخراج شده به منظور ارزیابی و سنجش

میزان RNA استخراج شده، ۲ میکرولیتر از بافر تخلیص به همراه RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر سنجش و آنالیز گردید. از این داده‌ها که معرف میزان غلظت RNA استخراج شده می‌باشد در سنتز cDNA استفاده شد:

$$\text{RNA غلظت} = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times 100 \times 40$$

ه- سنتز cDNA

سنتز cDNA توسط کیت Accu Power Racket Script™ RT Pre Mix (Korea) و پروتوکل ضمیمه کیت انجام شد. عملیات سنتز تحت شرایط دمایی مطابق جدول ۱ انجام شد. سنتز پرایمرها توالی ژن‌های یادشده در سایت NCBI چک شد و توالی پرایمر در BLASTGENE تأیید و توسط شرکت کره‌ای Bioneer طراحی شد. پرایمرها مطابق جدول ۲ طراحی شد.

مخلوط ایزوپروپانول به همراه سلول‌های لیز شده به آن انتقال پیدا کرد و در ۱۲۰۰۰g به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ گردید و محلول زیرین حذف شد. در ادامه ۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده اولیه به ستون اسپین اضافه و مجدداً به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شده و محلول زیرین خارج گردید. در مرحله بعد به ستون اسپین ۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده ثانویه اضافه و سانتریفوژ شد و محلول زیرین حذف شد. به منظور حذف اتانول اضافی یک بار دیگر سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰g به مدت یک دقیقه انجام گردید و اتانول مازاد از ستون اسپین حذف شد و نهایتاً ستون اسپین به میکروتیوپ RNAase free جمع‌آوری RNA منتقل شد و ۵۰ میکرولیتر بافر جمع‌آوری کننده به آن اضافه شد. سپس در دمای اتاق به مدت یک دقیقه انکوبه گردید و در نهایت در ۱۲۰۰۰g به مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید و RNA تام تخلیص شده در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان سنتز cDNA نگهداری گردید.

جدول ۱- برنامه دمایی مورد نیاز برای سنتز cDNA

Step	Temperature	Time
Primer annealing	T _m of specific primer	Min ۱
cDNA synthesis	۴۲-۷۰C	Min ۱۰-۶۰
Heat inactivation	۹۵C	Min ۵

جدول ۲- توالی ژن‌های مورد بررسی

Gene	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
Vascular Endothelial Growth Factor A	CCT GCC TTG CTG CTC TAC C	CAC ACA GGA TGG CTT GAA G
B.actin	CCC GCC GCC AGC TCA CCA TGG	AAG GTC TCA AAC ATG ATC TGG GTC

qPCR Master Mix مطابق پروتوکل ۶ مرحله‌ای ضمیمه توسط دستگاه Applied Biosystems بررسی شد. براساس پروتوکل ابتدا Master Mix مواد تهیه و به میکروتیوپ‌های strip cap مخصوص دستگاه منتقل

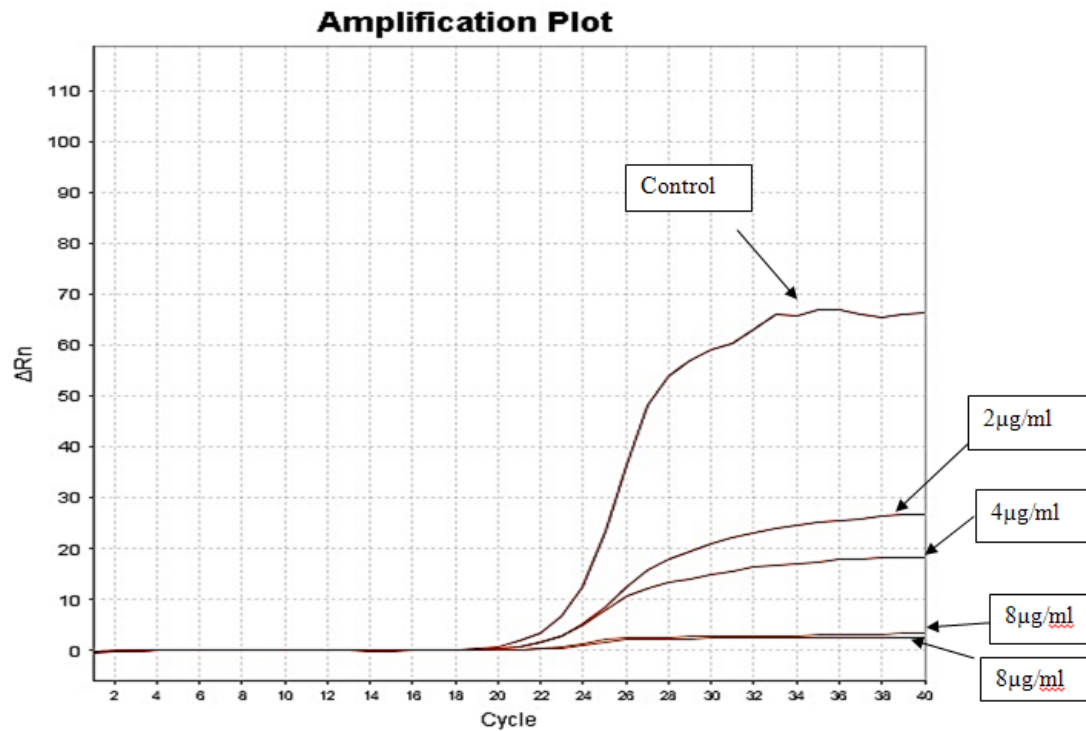
ز- بررسی بیان ژن با استفاده از Real Time PCR مراحل انجام real time PCR به منظور بررسی بیان ژن مورد بررسی به وسیله کیت Bioneer ساخت کره جنوبی و به نام تجاری Accu Power 2X Greenstar

این امر با استفاده از منحنی ذوب از طریق یک پیک منفرد قابل تأیید می‌باشد.

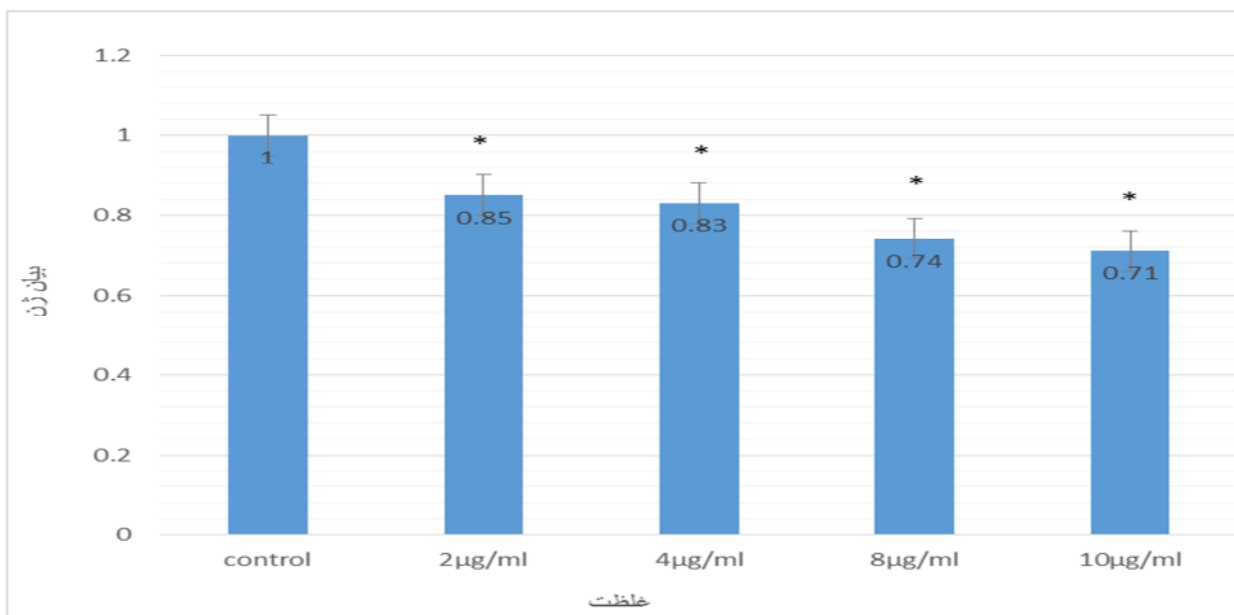
یافته‌ها

نتایج تست تریپان بلو زنده بودن ۹۵ درصد سلول‌های تحت بررسی را مشخص کرد و از این سلول‌ها در بخش‌های مختلف کار استفاده شد. منحنی تکثیر (amplification plot) تحت تیمار مختلف با زهر زنبور عسل رسم شد (نمودار ۱). نتایج بررسی سلول‌های تیمار شده تحت‌تأثیر زهر زنبور، تفاوت‌های بسیار بارز و وابسته به غلظت را نشان داد به طوری که به تدریج در دوزهای بالاتر تغییرات به صورت کم شدن تراکم سلولی، قطعه قطعه شدن هسته، مهار رشد سلول‌ها و تحلیل‌رفتگی سلولی قابل مشاهده بود. از سوی دیگر با توجه به این که بازدهی واکنش PCR بین ژن هدف و ژن خانه‌دار (House Keeping Gene) مورد استفاده یعنی بتا اکتین یکسان بود، از مقایسه چرخه آستانه (CT) استفاده شد. در روش مقایسه چرخه آستانه در Real Time PCR مبتنی بر تغییرات چرخه آستانه نمونه‌های تحت تیمار با نمونه کنترل است که به کمک آن نسبت افزایشی یا کاهش‌ی بیان ژن در مقایسه با نمونه کنترل (فاقد تیمار) مشخص می‌شود. نتایج بررسی‌های بیان ژنی نشان داد که کاهش معنادار در میزان بیان ژن VEGF-A تیمار شده با غلظت‌های ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به سلول‌های گروه کنترل دیده می‌شود به نحوی که بیشترین تغییرات کاهش‌ی بیان ژن مربوط به بیشترین غلظت زهر زنبور عسل بود.

شد و در نهایت cDNA به آن اضافه گردید. برنامه دمایی براساس T_m پرایمرهای طراحی شده و منطبق بر ویژگی‌های مراحل مختلف واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز تعیین شد. سطح بیان ژن VEGF-A در نمونه‌های تحت تیمار با زهر زنبور عسل در مقایسه با نمونه کنترل توسط نرم‌افزار آماری SPSS 16 تحلیل شد. در آزمون فیشر $P < 0/05$ و فاصله اطمینان ۹۵ درصد (Confidence Interval) به‌عنوان معناداری پذیرفته شد. پس از اتمام PCR خط آستانه توسط نرم‌افزار دستگاه Applied Biosystem تعیین گردید. تحلیل اطلاعات برای تعیین بازدهی ژن هدف پس از تهیه رقت‌های متوالی از ژن خانه‌دار (House Keeping Gene) به‌منظور تهیه نمودار استاندارد Ct انجام پذیرفت. میزان بیان ژن VEGF-A پس از ۴۸ ساعت از انکوباسیون سلول‌ها به‌وسیله غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل اندازه‌گیری شد. میزان بیان ژن مورد نظر با نمونه کنترل بدون تأثیر عصاره مذکور مورد مقایسه قرار گرفت. در این پژوهش آزمایشگاهی از کمیت‌سنجی نسبی (Relative Quantitative) که اساس آن بر مبنای نسبت بیان ژن هدف به ژن مرجع استوار است استفاده گردید که از طریق مقایسه کارایی (efficiency) ژن هدف به نمونه کنترل و اختلاف Ct می‌باشد. مقدار پرایمر و دمای مرحله اتصال پرایمر فاکتورهای اساسی در بهینه کردن واکنش Real Time PCR هستند. شرایط بهینه طوری فراهم گردید که بازدهی واکنش در بهترین حالت ممکن بوده و هیچ محصول غیراختصاصی در طول واکنش تولید نشود.



نمودار ۱ - منحنی تکثیر Real Time PCR مربوط به بیان ژن VEGF-A در نمونه کنترل در مقایسه با نمونه های تحت تیمار با زهر زنبور عسل



نمودار ۲) بررسی میزان بیان ژن VEGF A پس از نرمالایز کردن نسبت به ژن بتا اکتین

بحث

سال های اخیر توسعه چشمگیری یافته است. نتایج تحقیقات مختلف نشان می دهد بازگشت مجدد به فرآورده های طبیعی در کنار استفاده از داروهای سنتتیک می تواند رویکرد مثبتی در خصوص کنترل و

دستیابی به روش های پیش گیری و درمان سرطان ها و نیز شناسایی مکانیسم های دخیل در روند پیشرفت آنها با توجه به گسترش این دسته از بیماری ها در

درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها باشد [7]. از آنجا که استفاده از زهر زنبور عسل و

ترکیبات مؤثره آن مثل ملیتین به عنوان دارویی با ویژگی‌های ضدسرطانی بیشتر به اثبات رسیده است و با توجه به این که تا کنون مقاله‌ای درخصوص ویژگی آنتی‌آنژیوژنیک زهر زنبور عسل بر روی رده سلولی HL-60 مطرح نشده است. نویسندگان مقاله به بررسی مکانیسم‌های احتمالی آن از طریق بررسی میزان بیان ژن VEGF A (به عنوان بیومارکر ویژه رگ‌زایی) در نمونه تحت تیمار با زهر زنبور عسل با نمونه کنترل در سلول‌های سرطان پرومیلوسیتی انسان به عنوان مدل مطالعه پرداختند.

نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از زهر زنبور عسل در دوزهای یاد شده در نمونه‌های تیمار شده VEGF A منجر به کاهش بیان ژن نسبت به نمونه شاهد می‌شود. این کاهش بیان ژن در غلظت‌های ۲ و ۴ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل معنادار بود گرچه کاهش بیان ژن در این دو غلظت نسبت به یکدیگر تفاوت چشمگیری نشان نداد. در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر (بالاترین غلظت مورد استفاده) حداکثر کاهش بیان ژن دیده شد.

Jang و همکاران گزارش کردند که زهر زنبور عسل قادر به القاء آپوپتوز و مهار بیان سیکلو اکسیژناز ۲ (COX-2: cyclooxygenase 2) در رده سلولی سرطان ریه انسانی NCI-H 1299 می‌باشد و آنها نشان دادند که غلظت مشخصی از زهر زنبور عسل قادر به

قطعۀ قطعۀ DNA به دنبال فعال شدن اندونوکلازها، القاء تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با آپوپتوز مانند تشکیل اجسام آپوپتیک، افزایش بیان Bax و کاسپاز ۳ و کاهش بیان Bcl-2، مهار انتخابی بیان COX-2 و کاهش تولید پروستاگلاندین‌ها

کلیدی در سنتز PGS هستند [8].

برخی مطالعات نشان داد که زهر زنبور عسل باعث کاهش بیان VEGF-A در رده‌ی سلولی LLC سرطان ریه و سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند نافی انسان (HUVECs) می‌شود [3].

همچنین در گزارشی بیان شد که تغییرات مورفولوژیکی اینگونه به نظر می‌رسند که در سطح مولکولی زهر زنبور عسل سنتز اسید نوکلئیک را مهار می‌کند. سلول‌ها قبل از تیمار با زهر زنبور به صورت سالم و یکپارچه با هسته کاملاً طبیعی ظاهر شدند. در این سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های بالاتر، سیتوپلاسم به صورت حبابدار شده و هسته به صورت متراکم و قطعۀ قطعۀ مشاهده شد [13].

Hamedani بررسی کرد که زهر زنبور عسل در غلظت ۰/۵-۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث تحریک MMP-2 و MMP-9 و در غلظت‌های بیشتر از ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر باعث مهار این دو می‌شود [4].

از آنجا که در تحقیق حاضر زهر زنبور عسل منجر به کاهش بیان ژن VEGF-A به عنوان یکی از مارکرهای مهم سیر سیگنالینگ آنژیوژنز می‌شد. به نظر می‌رسد نتایج هم راستا با نتایج تحقیقات متعدد در ارتباط با سایتوتوکسیسیته و آثار ضدسرطانی زهر زنبور عسل است. مکانیسم پیشنهادی احتمالی برای پژوهش حاضر را اینگونه می‌توان بیان کرد که، زهر زنبور عسل می‌تواند باعث غیر فعال کردن کالمودولین در سلول شود در حالیکه اتصال کلسیم کالمودولین باعث فعال شدن (Hypoxia-inducible factor 1) HIF-1 شده و در نتیجه باعث القای بیان فاکتورهای پیش آنژیوژنزی مثل VEGF می‌شود. پس غیر فعال کردن کالمودولین می‌تواند باعث مهار

عسل، می‌تواند بخشی از پتانسیل ضد سرطانی این فرآورده را از خلال مسیرهای ضد رگزایی نشان دهد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً عملکرد زهر زنبور عسل در خصوص ویژگی‌های ضدسرطانی با کاهش آنژیوژنز نیز می‌تواند مرتبط باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر بیانگر اثرات کاهش دهنده آنژیوژنزی زهر زنبور عسل از طریق اثر کاهش بر بیان ژن VEGF-A می‌باشد که می‌تواند کمکی به درک اثرات ضدتوموری و آثار ضد سرطانی این فرآورده طبیعی باشد، هر چند مطالعات بیشتر و پژوهش‌های بالینی برای درک چگونگی عملکرد و شناسایی ترکیبات مؤثر در روند کاهش بیان این ژن ضروری است.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در اجرای این طرح صمیمانه همکاری داشته‌اند سپاسگزار می‌نمایم.

منابع

- [1] Breier G. Vasculogenesis. In: Unsicker K, Kriegstein K. 2006. Cell signaling and growth factors in development. Weinheim: Wiley & Wang; 909-17.
- [2] Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, et al. 2007. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer biology staging beyond tumor burden. Clin Breast Cancer; 7(6): 471-9.
- [3] Eun Huh J, Hyeon Baek Y, Ho Lee M, Young D and et al. 2010. Bee venom inhibit tumor angiogenesis and metastasis

آنژیوژنز شود [14]. هم چنین تحقیقات پیشنهاد می‌کند که فعالیت‌های ضد آنژیوژنزی زهر زنبور عسل در طی مراحل مختلف پیشرفت تومور با بلوکه کردن فسفریلاسیون VEGFR-2 دیده می‌شوند [3].

از آنجا اغلب سرطان‌های انسانی در نتیجه نقص در ارتباطات بیوشیمیایی و بیولوژیکی در سطح ملکولی سلول ایجاد می‌شود و از طرفی اطلاعات بسیار کمی درباره مکانیسم‌های کنترل کننده رشد سلول‌ها وجود دارد به نظر می‌رسد انجام آزمایشات دقیق با هدف شناسایی مکانیسم‌ها و مسیرهای ملکولی سرطان‌ها ضروری باشد [2]. گروه ژنی خانواده VEGF خانواده‌ی بزرگی از ژن‌های وابسته به یکدیگر هستند که در بسیاری از مسیرهای تمایزی همچون رشد و انشعاب آلوئول‌های تنفسی و جوانه‌های میزبانی کلیه اثر دارند. ضمناً اعضای این خانواده نقش‌های تحریکی متنوعی به ویژه VEGF-A، نقش‌های تحریکی متنوعی را در سلول سرطانی بر عهده دارند؛ پاسخ‌های سلولی نظیر تکثیر، مهاجرت و بیان پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی از جمله فعالیت‌های ناشی از این ژن‌ها می‌باشد. علاوه بر این، فعالیت این دسته از ژن‌ها منجر به فعال‌سازی دسته دیگری از ژن‌ها می‌گردد که از طریق آبشار راه اندازی شده مذکور، سلول سرطانی را قادر می‌سازد تا رگ‌های عملکردی خون‌رسان را به سوی خود جلب کرده و به تبع آن تغذیه و اکسیژن رسانی و رشد و تکثیر سلول‌های توموری امکان‌پذیر می‌گردد [20]. بهترین استراتژی مهار لیگاندهای VEGF استو می‌تواند به عنوان هدف در مانی مؤثر برای درمان بسیاری از بدخیمی‌های شایع مورد توجه قرار گیرد [12]. کاهش بیان این دسته از ژن‌ها در سلول‌های سرطانی کشت شده در شرایط برون‌تنی تحت تیمار با زهر زنبور

- by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice; *Cancer Letters*; 292(1): 98–110.
- [4] Hamedani M, Mirshafiey A, Vatanpour H, Khorramizadeh MR, et al. 2005. In vitro assessment of Bee Venom effects on Matrix Metalloproteinase Activity and Interferon Production. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*; 27(4): 1-6.
- [5] Hendrix M, Seftor E, Seftor R. 2006. Vasculogenic mimicry: angiogenesis in disguise. *New Frontiers in Angiogenesis*; 5: 97-109.
- [6] Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*; 56(4): 549-80.
- [7] Hoshyar R, Bathaie SZ, Sadeghizadeh M. 2013. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, cells. *DNA Cell Biol*; 32(2): 50-7.
- [8] Jang MH, Shin MC, Sabina LS, Han SM, et al. 2003. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line CIH1299. *Pharmacology Science*; 91: 95–104.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*; 25(4): 402-408.
- [10] Mansouri K, Mostafaei A, Mohammadi Motlagh HR. 2010. Angiogenesis and tumor. *Behbod Journal*; 14(4) 305-315.
- [11] Mostafaei A, Mohammadi Motlagh H, Mansori K. 2009. Angiogenesis and the models to study angiogenesis. *J Yakhteh Med*; 11(4): 381-79.
- [12] Mousavi M, Baharara J, Zafar-Balanejad S and Shahrokhbadi K. 2014. Effect of Saffron extract on VEGF-A expression in MCF7. *Journal of Keranshah University of medical sciences*; 17(12):55-58.
- [13] Nabuini M, Pariva K, Divsalar A, Safayinejad Z, Nazari Z. 2012. A review on antineoplastic effects of honey bee venom. *Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS)*. 13(9): 1-7.
- [14] Oršolić N. 2012. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*; 31(2):173-194.20.
- [15] Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, et al. 2004. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF- κ B through interaction with the p50 subunit. *Arthritis and Rheumatism*; 50: 3504-3515.
- [16] Peiren N, Vanrobaeys F, Graf DC, Devreese B, et al. 2005. The protein composition of honey bee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochemical Biophysical*; 1752: 1-5.
- [17] Ratanachoo K, Gascoyne PRC, Ruchirawat M. 2002. Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis. *Biochim Biophys Acta*; 1564 (2): 449–458.
- [18] Son DJ, Ha SJ, Song HS, Lim Y, et al. 2006. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor- κ B and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 317(2): 627-34.
- [19] Terra RM, Guimaraes JA, Verli H. 2007. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *Molecular graphics and modeling*; 25(6): 767-72.
- [20] Tugues S, Koch S, Gualandi L, Li X. 2011. Vascular endothelial growth factor and receptor: anti-angiogenic therapy in treatment of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*; 32: 88-111.
- [21] Wu Y, Hooper AT, Zhong Z, Witte L, Bohlen P, Rafii S, et al. 2006. The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. *Int J Cancer*; 119(7): 1519-29.
- [22] Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, et al. 2001. Translocations of the RAR α gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*; 20:7186–7203.

