

تأثیر زهر زنبور عسل در القاء تمایز رده سلولی K562 به دودمان اریترئیدی

کاظم پریور¹، محمد نبیونی²، همامحسنی کوچصفهانی³، طیبه رضانی⁴، الهام امینی⁵

- ¹ استاد تکوین جانوری، گروه زیست شناسی علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
- ² استادیار، زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
- ³ دانشیار تکوین جانوری، گروه زیست شناسی علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
- ⁴ دانشجوی دکتری تکوین جانوری، گروه زیست شناسی علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
- ⁵ کارشناس زیست شناسی سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: از زهر زنبور عسل (BV) در طب سنتی برای درمان بیماری‌هایی مانند ورم مفاصل و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود. BV حاوی ملیتین، فسفولیپاز A2، آپامین و دیگر مواد فعال بیولوژیک است. با توجه به ترکیبات BV، هدف این تحقیق بررسی اثرات آن بر القاء تمایز رده سلولی K562 به سمت دودمان دودمان اریترئیدی است.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی، میزان سمیت زهر BV با سنجش MTT اندازه گیری شد. نوع مرگ سلولی به وسیله ارزیابی بیان ژن Annexin-V با فلوسیتومتری تعیین و اثر BV بر القاء تمایز رده سلولی K562 به سمت دودمان اریترئید با رنگ آمیزی بنزیدین سنجیده شد. توانایی زهر زنبور عسل بر مهار کلونی زایی با سنجش کلونی و تغییرات مورفولوژی این رده سلولی در پی تیمار با زهر زنبور عسل با رنگ آمیزی رایت - گیمسا ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست MTT نشان داد BV در غلظت $5/5-6 \mu\text{g/ml}$ در 24 ساعت و غلظت‌های $3/5-4/5 \mu\text{g/ml}$ در 48 ساعت منجر به مرگ 50 درصد سلول‌ها می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از تست بنزیدین و بررسی های مورفولوژیک نشان داد دوزهای پایین تر BV در بازه زمانی طولانی موجب القاء تمایز این سلول‌ها می‌شوند. نتایج فلوسیتومتری افزایش بیان ژن Annexin-V در سلول‌ها تیمار شده با BV را در 24 ساعت نشان داد. سنجش کلونی نشان داد BV در غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ منجر به کاهش 50 درصد کلونی زایی این سلول‌ها می‌شود.

واژگان کلیدی: زهر زنبور عسل، تمایز، K562، اریترئید.

مقدمه

زهر درمانی (BVT: bee venom therapy) عبارت از استفاده از زهر زنبور عسل زنده برای اهداف درمانی است. BVT نوعی طب سنتی با روش‌های درمانی متنوع است که اعتقاد زیادی برای موثر بودن آن در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله

ورم مفاصل، Bursitis، MS، shingles، نقرس و عفونت‌ها وجود دارد (1). اخیراً BVT برای درمان انواع سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته است (2، 3). زهر زنبور عسل حاوی آنزیم‌های مختلف (فسفولیپاز، هیالورونیداز و ...) (4)، پپتیدهای مختلف (ملیتین، آپامین، آدولاپین و ...) و آمین‌های بیولوژیک (هیستامین و اپی‌نفرین) می‌باشد (5). تنوع ترکیبات زهر زنبور عسل لزوم مطالعات و بررسی‌های بیشتر در زمینه خواص درمانی و ضدسرطانی آن را نشان می‌دهد. در همین راستا، بررسی اثرات زهر زنبور عسل بر تمایز سلول‌های بنیادی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه زیست شناسی زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی،

دانشگاه خوارزمی، دکتر محمد نبیونی (email: Nabiuni@tmu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: 90/6/30

تاریخ پذیرش مقاله: 91/1/27

کننده تمایز می‌تواند جایگزین مناسبی برای عوامل القاء کننده دیگر باشد. Lozzio و همکاران در سال 1975 گزارش کردند که رده سلولی k562 را از مایع جنب زنی با بیماری سرطان خون مزمن در مرحله بلاست به دست آوردند. رده سلولی k562 بلاست‌های تمایز نیافته می‌باشند این سلول‌ها دارای سیتوپلاسم بازوفیلیک بدون گرانول و دارای دو یا تعداد بیشتر هستک هستند. این رده سلولی در حضور مواد مانند PMA (phorbolmeristatacetate), Herbimycin A, Guanine و Guanosine cytosine arabinoside بنزیدین مثبت می‌شوند و به دودمان اریترئیدی تمایز می‌یابند (21-19).

در این مطالعه، اثر زهر زنبور عسل بر تمایز رده سلولی K562 به سمت اریترئید و تغییرات بیان ژن Annexin-V در طی القاء آپوپتوز به وسیله BV در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت و تکثیر رده سلولی K562

رده سلولی K562 از بانک سلولی پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco, UK) و FBS 10% (Gibco, UK) استرپتومایسین - پنی سیلین (Gibco, UK) در فشار 5% CO₂ کشت داده شد.

تعیین میزان سمیت و مهار تکثیر زهر زنبور عسل بر رده سلولی K562: برای این منظور سلول‌های K562 در پلیت 24 خانه (4×10⁴) در محیط کشت RPMI 1640 (10% FBS و 1% پنی سیلین - استرپتومایسین) کشت داده شدند. سپس غلظت‌های مختلف (1, 3, 6, 9 و 12) زهر زنبور عسل در 24 ساعت و 48 ساعت در محیط تنظیم شدند و بعد از طی زمان مورد نظر، تست MTT برای تعیین میزان سمیت زهر زنبور بر این رده سلولی به این ترتیب انجام گرفت که پس از زمان 24 و 48 ساعت مقدار 100μ از محلول MTT (sigma) به هر خانه اضافه گردید و بعد از طی 3-4 ساعت 1 ml ایزوپروپانول اسیدی به آن اضافه شد. با گذشت 8 ساعت محتوی هر خانه با اسپکترومتر در طول موج 570nm مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی اثر تمایزی زهر زنبور عسل بر تمایز به سمت اریترئیدی رده سلولی K562 به وسیله تست بنزیدین: برای بررسی اثر زهر زنبور در تمایز رده سلولی K562 به اریترئید از رنگ آمیزی بنزیدین استفاده شد. ابتدا تعداد 10⁵ سلول در پلیت 96 خانه کشت داده شدند و بعد از طی

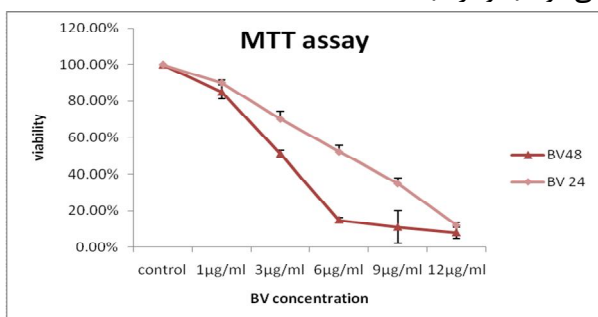
سرطانی امری لازم به نظر می‌رسد. سلول‌های بنیادی (Stem cell) نرمال سلول‌هایی اختصاصی هستند که دارای خصوصیات بیولوژیکی منحصر به فرد مانند توانایی خود نوسازی (Self renewal) می‌باشند. این سلول‌ها توانایی تمایز به همه نوع بافت و ارگان را دارند (6). آپوپتوز، مرگ سلولی برنامه ریزی شده فیزیولوژیک می‌باشد که نقش مهمی در هموستازی بافتی ایفا می‌کند. در مراحل اولیه آپوپتوز تغییراتی در سطح غشای پلاسمایی سلول اتفاق می‌افتد، یکی از این تغییرات جا به جایی فسفاتیدیل سرین (PS) از لایه داخلی غشای پلاسمایی به لایه خارجی آن است. Annexin-V پروتئین وابسته به کلسیم، باند شونده به فسفولیپیدها است که گرایش بالایی به (PS) دارد، از این رو می‌توان از این پروتئین به عنوان نشانه حساسی برای قرار گرفتن (PS) در سطح سلول استفاده کرد. باید توجه شود که جا به جایی (PS) منحصر به آپوپتوز نیست و در طی نکروز نیز به وقوع می‌پیوندد. تفاوت این دو نوع مرگ سلولی این است که در مراحل اولیه آپوپتوز غشای سلولی سالم و کامل است، ولی به محض وقوع نکروز غشای پلاسمایی تمامیت خود را از دست می‌دهد، بنابراین می‌توان از موادی مانند پروپودیوم یداید (PI) برای معرفی تخریب غشای پلاسمایی و تشخیص نکروز از آپوپتوز استفاده کرد (7).

نظریه سلول‌های بنیادی سرطانی بیان می‌کند که سرطان‌هایی مانند سرطان سینه (8)، سرطان پروستات (9)، سرطان کبد (10) و لوکمی (11) از سلول‌های بنیادی بافتی موتانت که در ویژگی خود نوسازی دچار ناهنجاری هستند منشأ می‌گیرند (12) و هم چنین نشان داده شده که بیشتر سرطان‌های غیر کلونال داری جمعیت‌های سلولی هتروژن با خصوصیات مجزا هستند که برخی از این زیر جمعیت‌ها دارای سلسله مراتب مانند سلول‌های بنیادی هستند (13). سلول‌های سرطانی بنیادی مقاومت دارویی زیادی را نشان می‌دهند (14، 15). با توجه به این که تمایز نهایی در سلول‌های بنیادی نرمال موجب مهار تکثیر در آن‌ها می‌شود و سلول تمایز یافته پس از طی عمر طبیعی دچار مرگ سلولی می‌شوند، روش‌های فعال کردن مسیرهای طبیعی تمایز در سلول‌های سرطانی و پیش سرطانی بنیادی با استفاده از عوامل فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی (16، 17) که می‌توانند عوامل ژنتیکی و اپی ژنتیکی غیر نرمال که مانع تمایز می‌شوند را کنار بگذارند مورد توجه قرار گرفت؛ این روش نوین تمایز درمانی (differentiation therapy) نام دارد (18). در این میان زهر زنبور عسل به عنوان ترکیب طبیعی و به عنوان ماده القاء

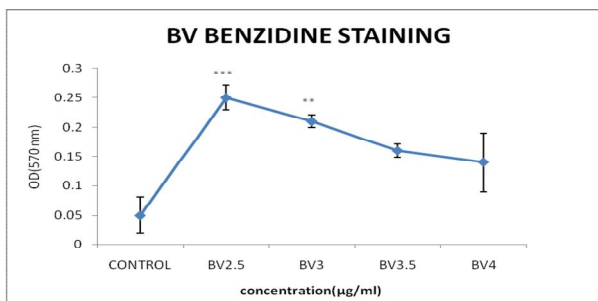
یافته‌ها

بررسی اثر زهر زنبور عسل بر میزان تکثیر رده سلولی K562

بررسی اثر زهر زنبور عسل بر میزان تکثیر رده سلولی K562 نشان داد که زهر زنبور عسل در الگوی وابسته به غلظت و زمان موجب مهار تکثیر در این رده سلولی می‌شود. زهر زنبور عسل در غلظت‌های بالاتر از $12 \mu\text{g/ml}$ منجر به لیز سلول‌ها می‌شود و غلظت‌های بین 5 و $6 \mu\text{g/ml}$ به صورت وابسته به زمان منجر به القاء مرگ سلولی در 24 ساعت در این رده سلولی می‌شود (نمودار 1).



نمودار 1- تست MTT و مقایسه در صد سلول‌های زنده نسبت به کنترل. کاهش معنی‌دار به صورت وابسته به زمان و غلظت در قابلیت زنده ماندن سلول‌ها مشهود است.



نمودار 2- مقایسه میزان جذب نوری سلول‌های تحت تیمار با BV و رنگ آمیزی شده با بنزیدین در دوره زمانی 96 ساعت با نمونه کنترل. در نمودار بالا نشان داده شده که میانگین میزان جذب نوری حاصل از رنگ آمیزی با محلول بنزیدین با افزایش دوز کاهش می‌یابد. * $p < 0/05$, ** $p < 0/01$ و $p < 0/001$ در تست ANOVA

نتایج بدست آمده از اثر زهر زنبور عسل بر تمایز رده

سلولی K562 به دودمان اریترئیدی با تست بنزیدین
Diaminobenzidine توسط هیدروژن پراکساید در حضور هموگلوبین اکسید شده و تولید رنگ آبی می‌کند؛ این رنگ در محیط آبی پایدار نیست و به سرعت به رنگ قهوه‌ای متمایل می‌شود. بنا براین تغییر رنگ محیط نشان دهنده وجود هموگلوبین می‌باشد. نتایج حاصل از این تست نشان داد که غلظت‌های بین $2/5$ و $4 \mu\text{g/ml}$ زهر زنبور عسل منجر به

شدن 96 ساعت تست بنزیدین انجام گرفت. به این ترتیب که مقدار 1 gr از پودر بنزیدین (sigma) در 14/6 ml آب مقطر و 0/485 ml اسید استیک حل شد. سپس نسبت 1:1 از سوسپانسیون سلولی و رنگ با هم مخلوط شدند و غلظت H_2O_2 در هر خانه طوری تنظیم شد که 2% حجم مایع در هر خانه را تشکیل دهد. 1-2 دقیقه به سلول‌ها استراحت داده شد. مشاهده رنگ آبی وجود هموگلوبین در محیط را نشان می‌داد. سپس جذب محتوی هر خانه در طول موج 570nm با اسپکتروفتومتر سنجیده شد (19,20).

بررسی تغییرات مورفولوژی K562 تحت تیمار با BV

برای بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های تحت تیمار در 96 ساعت، BV با رنگ رایت-گیمسا رنگ آمیزی شد و تغییرات آن با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

سنجش کلونی (Colony assay)

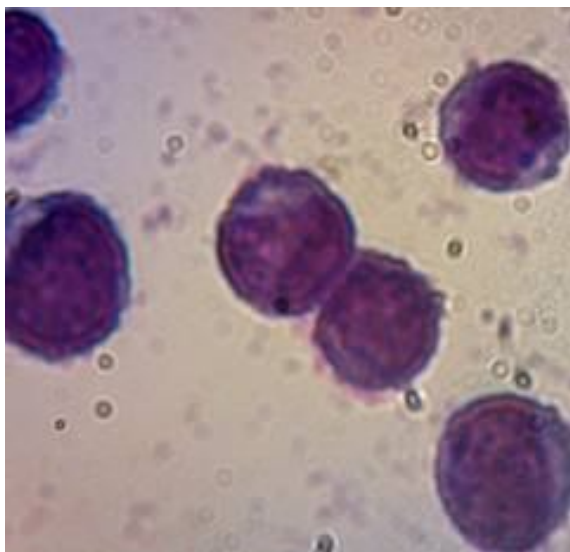
اساس این تکنیک بر کشت سلول‌ها بر روی محیط نیمه جامد می‌باشد تا نقطه اتکایی برای سلول‌ها باشد و هم چنین سلول‌ها آزادی حرکت نداشته باشند و کلونی‌های تشکیل شده به صورت مجتمع باقی بمانند. برای انجام این روش، 10^3 سلول در محیط نیمه جامد دارای آگار 0/3% و 20% FBS تحت تیمار با زهر زنبور عسل قرار گرفتند. بعد از طی شدن زمان تیمار که به طور معمول 7 روز می‌باشد، کلونی‌های تشکیل شده با میکروسکوپ معکوس شمارش شدند. نسبت تعداد کلونی‌های نمونه تیمار به کنترل محاسبه شد و در نهایت دوزی که باعث مهار 50% کلونی زایی در سلول‌های k562 گردید گزارش شد.

بررسی اثر تمایزی زهر زنبور عسل بر بیان ژن

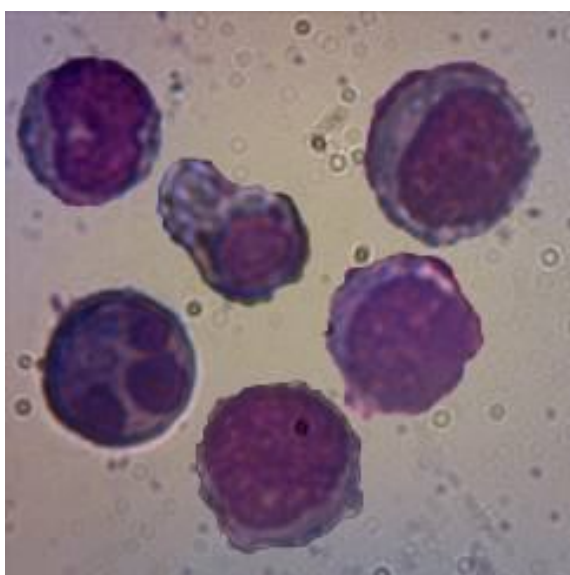
Annexin-V در رده سلولی K562

برای بررسی تغییرات ژن Annexin-V در سلول‌های تیمار شده با BV، تعداد 10^6 سلول در پلیت 24 خانه و با غلظت $6 \mu\text{g/ml}$ زهر زنبور عسل برای 24 ساعت تیمار شد. طبق دستور عمل Annexin-V kit (fluos staining kit Annexin-V Roche Cat.No.11858777001t) عمل شد. بدین صورت که سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و در دور 200xg برای 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در annexin-V- FLUOS labeling solution حل گردید و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس با دستگاه فلوسیتومتر مورد آنالیز قرار گرفت.

هسته به کل سلول بیش از 90% بود. 96 ساعت بعد از افزودن BV، کروماتین فشرده تر بود و مقدار سیتوپلاسم در مقایسه با کنترل افزایش داشت (شکل 2، 3 و 4).



شکل 3- نمونه سلول‌های K562 تحت تیمار با غلظت 1 $\mu\text{g/ml}$ رنگ شده با راییت - گیمسا. هسته حدود 86% حجم سلول را اشغال کرده است و مقدار سیتوپلاسم افزایش یافته و رنگ سیتوپلاسم آبی - خاکستری می‌باشد. میکروسکوپ نوری بزرگنمایی 600x

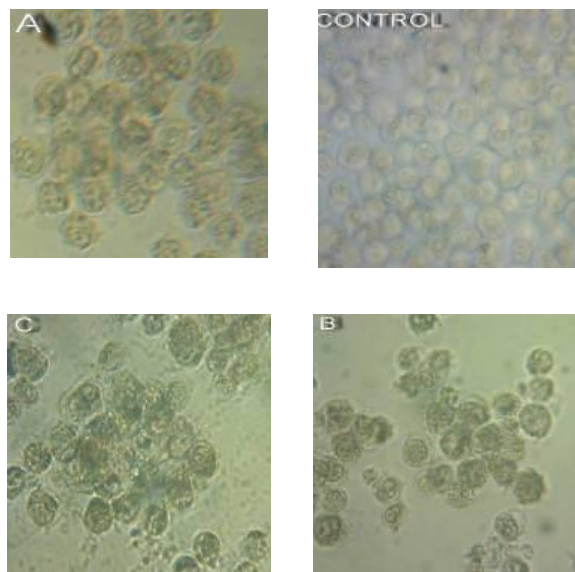


شکل 4- نمونه سلول‌های K562 تحت تیمار با غلظت 2 $\mu\text{g/ml}$ رنگ شده با راییت - گیمسا. هسته حدود 70% حجم سلول را اشغال کرده است و مقدار سیتوپلاسم افزایش یافته و رنگ سیتوپلاسم آبی - خاکستری می‌باشد. میکروسکوپ نوری بزرگنمایی 600x

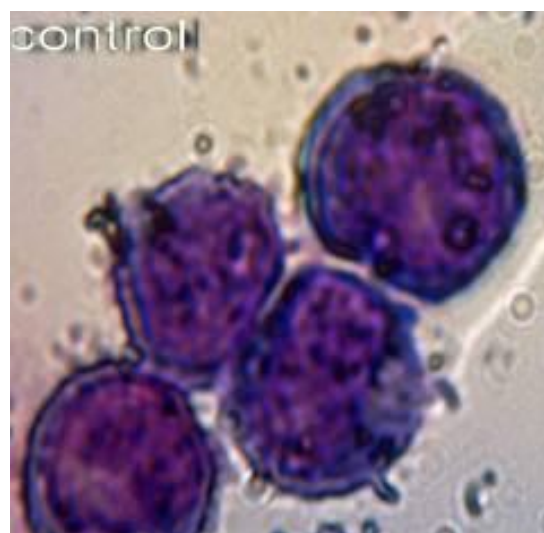
سنجش کلونی‌ها

برای بررسی اثر زهر زنبور بر مهار کلونی زایی سلول‌های K562 از روش سنجش کلونی استفاده شد. نتایج

تمایز این رده سلولی به سمت دودمان اریترئیدی در مدت زمان تیمار 96 ساعت می‌شود (نمودار 2، شکل 1).



شکل 1- مقایسه سلول‌های تحت تیمار با BV در 96 ساعت با نمونه بدون تیمار. به تشکیل دانه‌های تیره رنگ در نمونه‌های A (3 $\mu\text{g/ml}$)، B (3 $\mu\text{g/ml}$) و C (4 $\mu\text{g/ml}$) توجه کنید. بزرگنمایی 400 x

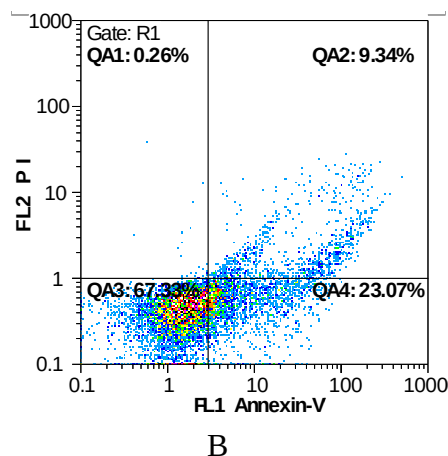
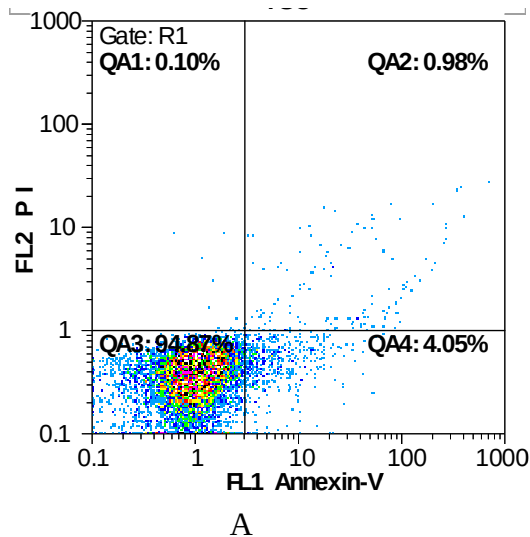


شکل 2- نمونه کنترل با رنگ آمیزی راییت - گیمسا. دقت شود که نسبت هسته به کل سلول بسیار زیاد است و در کل هسته بیش از 96% درصد حجم سلول را اشغال کرده است و سیتوپلاسم به صورت نوار باریکی در اطراف هسته قرار دارد. تصویر میکروسکوپ نوری بزرگنمایی 600x

بررسی تغییرات مورفولوژی

سلول‌های تیمار نشده K562، سلول‌های پرومیلوبلاست با هسته بزرگ مرکزی و سیتوپلاسم بازوفیلیک بودند و نسبت

ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با $6 \mu\text{gr/ml}$ زهر زنبور عسل، درصد سلول‌های Annexin-V مثبت به $32/4\%$ افزایش پیدا کرد که نشان دهنده القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوز با واسطه BV در این رده سلولی می‌باشد (شکل 6).



شکل 6- آنالیز دو متغیره PI/annexin V سلول‌های کنترل که هیچ گونه تیماری را دریافت نکردند (A) و نمونه تحت تیمار با غلظت $6 \mu\text{gr/ml}$ زهر زنبور عسل، سلول‌های زنده PI و Vannexin منفی هستند و در QA3 قرار دارند، سلول‌های آپوپتتیک PI منفی و Vannexin مثبت هستند و در QA4 قرار دارند، سلول‌هایی که در مرحله انتهایی آپوپتوز هستند برای PI و Vannexin مثبت هستند و در منطقه QA2 قرار دارند، همچنین در نمودار بالا مشاهده می‌شود که میزان سلول‌های نکروتیک (QA2) و آپوپتتیک (QA4) در نمونه تیمار شده با BV در مقایسه با نمونه کنترل افزایش یافته است.

بحث

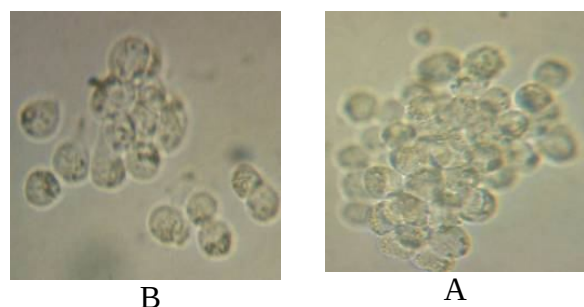
القاء تمایز در سلول‌های سرطانی بنیادی موضوع مهمی در شیوه‌های جدید برای درمان سرطان است، مواد و عوامل القاء

حاصل از شمارش تعداد کلونی‌ها در جدول 1 و شکل 5 نشان داده شده است.

جدول 1- شمارش تعداد کلونی‌های تشکیل شده توسط سلول‌های تیمار شده با BV در بازه زمانی 7 روز*

غلظت‌های BV ($\mu\text{g/ml}$)	تعداد کلونی
کنترل	680
0/5	520
1	406
6	-
9	-

* تعداد کلونی‌های تشکیل شده در غلظت BV $1 \mu\text{g/ml}$ در بازه زمانی 7 روز حدود نصف تعداد کلونی‌های موجود در کنترل بود و کلونی‌های تشکیل شده از نظر تعداد سلول کوچک‌تر بودند، در حالی که در دوزهای بالاتر کلونی سلولی وجود نداشت.



شکل 5- تصویری از کلونی‌های تشکیل شده به وسیله سلول‌های K562 در محیط نیمه جامد آگار، در نمونه کنترل (A)، سلول‌ها که هیچ نوع تیماری دریافت نکرده‌اند کلونی‌های بزرگی را تشکیل داده‌اند که به صورت چسبیده به هم در محیط نیمه جامد آگار مشخص هستند، نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های کمتر BV $2 \mu\text{g/ml}$ (B) کلونی‌های کوچک‌تری را تشکیل دادند و همین‌طور در این دوزهای و در برخی از سلول‌ها کلونی زایی کاملاً مهار شده و سلول در محیط نیمه جامد بدون تشکیل کلونی و به صورت تک حضور دارند و یا دچار آپوپتوز شده‌اند، میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی $400\times$

نتایج حاصل از فلوسیتومتری بیان Annexin-V

در مورد آنالیز دو متغیره PI/annexin V و سلول‌های اریترولوکیمیایی K562، آپوپتوز به وسیله تیمار سلول‌ها با $6 \mu\text{gr/ml}$ زهر زنبور عسل در 24 ساعت القاء شد، سپس سلول‌ها با Annexin-V-fluos staining kit انکوبه شده و با فلوسیتومتری آنالیز گردیدند، نتایج حاصله نشان داد که 24

کننده مرگ مانند TNF (tumor necrosis factor) را از بین برده و حساسیت به آپوپتوز را در این سلول افزایش دهد (23). نتایج ما نیز نشان داد که تمایز، سلول‌ها را به زهر زنبور عسل حساس‌تر می‌کند و علایم مربوط به آپوپتوز در دوزهای پایین ظاهر می‌شود.

نتایج حاصل از آنالیزهای فلوسیتومتری نشان داد که در دوز 6 µg/ml زهر زنبور عسل، بیان Annexin-V به میزان قابل توجهی نسبت به نمونه کنترل افزایش می‌یابد که دلیلی بر القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس می‌باشد. مطالعات ما نشان داد که زهر زنبور عسل در غلظت 1 µg/ml باعث مهار 50 درصدی تشکیل کلونی در رده سلولی K562 می‌شود. بررسی مورفولوژیک با رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا تغییر شکل در هسته و افزایش نسبت سیتوپلاسم به هسته را به وضوح نشان داد که با بررسی‌های Cioe و همکاران در سال 1981 همخوانی دارد (22). در مجموع، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که زهر زنبور عسل توانایی القاء تمایز رده سلولی میلوئیدی K562 به دودمان اریتروئیدی را دارد؛ از طرف دیگر در این تحقیق نشان داده شد که نوع مرگ سلولی القاء شده توسط BV در این رده سلولی آپوپتوز است. با توجه به تحقیق حاضر می‌توان به اهمیت زهر زنبور عسل به عنوان ماده طبیعی دارای ویژگی‌های ضد سرطانی پی برد و هم‌چنین لزوم مطالعات بیشتر در این زمینه به خوبی احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی

صمیمانه از ریاست محترم دانشکده علوم زیستی و همکاران محترم مرکز نگهداری، تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی و همه کسانی که در انجام این پروژه ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می‌نماییم.

کننده تمایز که تا امروز مورد استفاده قرار گرفته‌اند، چندان امید بخش نبوده‌اند به عنوان مثال، phorbol ester به عنوان ماده القاء کننده تمایز، خود نوعی عامل سرطان‌زا می‌باشد (19، 20). BV به عنوان ترکیبی طبیعی و فاقد اثرات مخرب القاء کننده‌ای شیمیایی می‌باشد و می‌تواند در زمینه از بین بردن سلول‌های سرطانی از طریق آپوپتوز و یا تمایز امید بخش باشد. در این تحقیق، اثرات BV بر القاء تمایز به سمت دودمان اریتروئیدی بر رده سلولی K562، القاء مرگ سلولی و تعیین نوع مرگ سلولی ایجاد شده توسط آن بر این رده سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. رده سلولی K562 به عنوان مدلی مناسب برای بررسی توانایی القاء تمایز مواد مختلف به دودمان اریتروئیدی در *in vivo* مطرح است (21). مطالعات ما نشان داد BV به صورت وابسته به زمان در غلظت‌های بالا موجب مرگ سلولی و در غلظت‌های پایین موجب مهار تکثیر و القاء تمایز در رده سلولی K562 می‌شود، به طوری که زهر زنبور عسل در محدوده غلظت 2/5 µg/ml تا 4 در طول 96 ساعت منجر به تمایز سلول‌ها و مثبت شدن تست بنزیدین و افزایش آشکار جذب نمونه تیمار نسبت به کنترل شد. غلظت 6 µg/ml منجر به مرگ 50% سلول‌ها در 24 ساعت می‌شود. کوچصفهانی و همکاران (2010) نشان دادند که دوزهای پایین‌تر از IC_{50} (Inhibitor Concentration) منجر به القاء تمایز در رده سلولی P19 می‌شود (22). این تحقیق نشان دهنده توانایی BV در القاء تمایز است که با مطالعات ما هم‌خوانی دارد. همان‌طور که در نمودار 2 مشخص است، بیشترین جذب مشاهده شده در محدوده 2/5 µg/ml تا 4 زهر زنبور عسل می‌باشد که پس از طی دوره زمانی مورد نظر سلول‌ها ظاهری آپوپتوتیک دارند که می‌تواند به علت حساس‌تر شدن سلول‌ها به علت تمایز باشد. Hietakangas و همکاران در سال 2003 نشان دادند که القاء تمایز به سمت رده‌های اریتروئیدی در سلول‌های k562 می‌تواند مقاومت آن‌ها به فاکتورهای القاء

REFERENCES

1. Chen J, Lariviere WR. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: a double-edged sword. *Prog Neurobiol* 2010; 92:151-83.
2. Park MH, Choi MS, Kwak DH, Oh KW, Yoon do Y, Han SB, Song HS, et al. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-κB. *Prostate* 2011;71:801-12.
3. Ip SW, Liao SS, Lin SY, Lin JP, Yang JS, Lin ML, Chen GW, et al. The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo* 2008; 22:237-45.
4. Gauldie J, Hanson MJ, Rumganek DF, Shipolini AR, Vernon C. The Peptide Components of Bee Venom. *Eur J Biochem* 1976; 71:369-76.
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; 115:246-70.

6. Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest* 2006; 86:1203-207.
7. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184:39-51.
8. Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:3547-49.
9. Brown MD, Gilmore PE, Hart CA, Samuel JD, Ramani VA, George NJ, et al. Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations. *Prostate* 2007; 67:1384-96.
10. Alison MR, Lovell MJ. Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Proliferation* 2005; 38: 407-21.
11. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 2004; 23:7164-77.
12. Chumsri S, Phatak P, Edelman J, Khakpour N, Hamburger WA, Burger WA. Cancer stem cells and individualized therapy. *Cancer Genomics Proteomics* 2007; 4: 165-174.
13. Lotan R. Differentiation therapy. *Cancer Res* 1990; 50:3377-3382.
14. Yu J, Lemas V, Page T, Connor JD, Yu AL. Induction of erythroid differentiation in K562 cells by inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase. *Cancer Res* 1989; 49:5555-60.
15. Meshkini A, Yazdanparast R. Induction of megakaryocytic differentiation in chronic myelogenous leukemia cell K562 by 3-hydrogenkwadaphnin. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40:944-51.
16. Olah D, Natsumedat Y, Ikegamit T, Kote Z, Horanyit M, Szelenyit J, et al. Induction of erythroid differentiation and modulation of gene expression by tiazofurin in K-562 leukemia cells. *Proc Nall Acad* 1988; 85: 6533-6537.
17. Rangwala F, Omenetti A, Mae DA. Cancer Stem Cells: Repair Gone Awry? *J Oncol* 2011; 2011: 465343.
18. Michor F. Mathematical models of cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008; 26:2854-61.
19. Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther* 2001; 90:105-56.
20. He Q, Yuan LB. Dopamine inhibits proliferation, induces differentiation and apoptosis of K562 leukaemia cells. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120:970-4.
21. Tonini GP, Radzioch D, Gronberg A. Expression myc erythroid differentiation and modulation of c- myc expression induced by antineoplastic drugs in the human leukemic cell line K562. *Cancer Res* 1987; 47: 4544-47.
22. Kouchesfahani MH, Nabiuni M, Parivar K, Ebrahimi S. Effect of honey bee venom on differentiation of cholinergic neurons. *Venom Res* 2010; 1:29-36.
23. Hietakangas V, Poukkula M, Heiskanen KM, Karvinen JT, Sistonen L, Eriksson JE. Erythroid differentiation sensitizes K562 leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by downregulation of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 2003 23:1278-91.