

## جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل و بررسی تاثیر آن بر رشد سلول‌های سرطان معده

## چکیده

امیر محمودزاده<sup>۱</sup>علی مرادی<sup>۱\*</sup>، حنا زهرین نهاد<sup>۱</sup>کامران پوشنگ باقری<sup>۲</sup>پوریا قاسمی دهکردی<sup>۳</sup>مهدی مهدوی<sup>۴</sup>، دلاور شهباززاده<sup>۲</sup>حمیدرضا شاهمرادی<sup>۱</sup>

۱- گروه بیوشیمی، پردیس بین الملل، دانشگاه

علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

۲- گروه ونوم و توکسین، مرکز تحقیقات

بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران.

۳- گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی،

شهرکرد، ایران.

۴- گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور، تهران،

ایران.

\* نویسنده مسئول: یزد، خیابان شهدای گمنام، دانشگاه

علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پزشکی،

گروه بیوشیمی. تلفن: ۰۳۵۱-۸۲۰۲۶۳۳

E-mail: morady2008@gmail.com

## مقدمه

زهر زنبور عسل در پزشکی سنتی شرقی همواره به عنوان دارویی در درمان بیماری‌های مختلفی هم‌چون آرتریت روماتوئید و هم‌چنین جهت کاهش دردهای عضلانی مورد استفاده قرار می‌گرفته است.<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۹/۲۵

**زمینه و هدف:** سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان و ایران می‌باشد. از آن‌جا که روش‌های درمانی رایج مانند جراحی و شیمی‌درمانی به صورت تهاجمی و عوارض جانبی هستند، امروزه تحقیقات به منظور یافتن ترکیبات طبیعی با اثرات جانبی کم‌تر حایز اهمیت‌اند. در این مطالعه از سم زنبور عسل، پپتید ملیتین با ۲۶ اسید آمینه جداسازی و تخلیص شد و تاثیر آن بر میزان زنده بودن و تکثیر سلول‌های سرطانی معده مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** ابتدا ملیتین توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (RP-HPLC) و با استفاده از ستون C18 از زهر زنبور عسل استخراج گردید. فعالیت بیولوژیکی ملیتین به وسیله تست همولیتیک بر روی گلبول‌های قرمز نسبت به استاندارد ملیتین بررسی گردید. جهت بررسی تاثیر ملیتین بر زنده بودن و تکثیر سلول‌های سرطانی معده رده (AGS) Human Gastric Adenocarcinoma Cells، سلول‌های مربوطه در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و با غلظت‌های مختلف ملیتین در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت تیمار و میزان مرگ و میر سلول‌ها به روش رنگ سنجی غلظت‌های مختلف ملیتین در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت تیمار و میزان مرگ و میر سلول‌ها به روش رنگ سنجی MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide) در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید.

**یافته‌ها:** کروماتوگرام حاصل از RP-HPLC مشخص نمود ملیتین ۵۰٪ زهر مورد مطالعه را تشکیل می‌دهد. آنالیز فراکشن ملیتین توسط SDS-PAGE خالص بودن آن را تایید نمود. آزمون هولیتیک نشان داد ملیتین استخراج شده فعالیت همولیتیک بالایی (HD<sub>50</sub>=۰/۵μg/ml) از خود نشان می‌دهد. آزمون MTT نشان داد ملیتین در غلظت‌های بالاتر از ۲μg/ml به شدت رشد سلول‌های سرطانی معده را مهار می‌کند. این اثر مهار و وابسته به غلظت ملیتین و مدت زمان اثر می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که ملیتین مهار کننده قدرتمند رشد سلول‌های سرطان معده می‌باشد. هم‌چنین مشاهده گردید این اثر مهار با افزایش غلظت ملیتین و مدت زمان اثر، افزایش می‌یابد.

**کلمات کلیدی:** ملیتین، سرطان معده، کروماتوگرافی فاز معکوس.

این ماده حاوی ۱۸ ترکیب متفاوت هم‌چون آنزیم‌ها، پپتیدها و آمین‌های بیولوژیک می‌باشد. مهم‌ترین پپتیدهای موجود در زهر زنبور ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل می‌باشند و از آنزیم‌های موجود در آن می‌توان به فسفولیپاز A2 اشاره نمود. هم‌چنین از آمین‌های فعال بیولوژیکی زهر زنبور عسل از هیستامین و

## روش بررسی

مواد: در این مطالعه تری فلوروآستیک اسید (TFA)، استونیتریل (ACN)، (MTT)، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) و تریپان بلو از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و مواد مورد استفاده در کشت سلول از قبیل محیط کشت RPMI 1640، پنی سیلین و استرپتومایسین، FBS و تریپسین از شرکت گیکو (Gibco-BRL, Paisley, UK) خریداری گردید. سلول‌های آدنوکارسینوما می معده انسانی رده AGS از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری گردید. مطالعه حاضر به صورت آزمایشگاهی (In vitro) در آزمایشگاه نووم و توکسین انستیتو پاستور تهران از تابستان ۹۰ تا بهار ۹۱ طی مراحل زیر انجام گردید.

زهر زنبور عسل به کمک دستگاه شوک الکتریکی جمع‌آوری زهر زنبور و مطابق با پروتکل Benton تهیه گردید.<sup>۱۵</sup> به این منظور صفحه شیشه‌ای دستگاه به گونه‌ای در برابر ورودی کندو قرار داده شد که زنبورهایی که قصد ورود به کندو را داشتند مجبور به فرود بر روی این صفحه شیشه‌ای پوشیده شده از سیم می‌شدند. پس از رسیدن زنبورهای موجود بر روی صفحه به تعداد مناسب، جریان الکتریکی ضعیفی در سیم‌ها برقرار گردید. زنبورهای عسل در پاسخ به این شوک الکتریکی ضعیف بلافاصله اقدام به گزش صفحه الکتریکی نمودند. زهر در معرض هوا به سرعت بر روی صفحه شیشه‌ای خشک می‌گردد و پس از خشک شدن از روی صفحه تراشیده و به آزمایشگاه منتقل گردید.

در این روش زهرگیری هیچ آسیبی به زنبور وارد نمی‌گردد. زهر استحصال شده در آب دیونیزه استریل حل گردیده و پس از فیلتراسیون توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتر آماده تزریق به دستگاه HPLC گردید.

جداسازی ملیتین توسط RP-HPLC: جهت جداسازی ملیتین از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (Knauer, Berlin, Germany) با پمپ K-1000، ردیاب UV مدل ۲۵۵۰ (Knauer, Berlin, Germany)، تزریق کننده دستی، لوپ ۲۰ میکرولیتری، ستون C<sub>18</sub> 100 (Germany)، تزریق کننده دستی، لوپ ۲۰ میکرولیتری، ستون C<sub>18</sub> 250×4.6 mm, Knauer, Berlin, Germany, Eurosfer) آنالیز Chrom Gate version 3.3.2 استفاده شد. جداسازی با ایجاد گرادیان بین دو محلول A و B انجام شد. آب دیونیزه حاوی ۰/۰۵٪

ابی نفرین نام برده می‌شود.<sup>۳،۴</sup> ملیتین (Melittin) یک پپتید ۲۶ اسید آمینه‌ای، کاتیونیک و آمفی‌پاتیک می‌باشد و اصلی‌ترین ترکیب موجود در زهر زنبور عسل محسوب می‌گردد.<sup>۵</sup> ملیتین ۴۰ تا ۵۰ درصد وزن خشک زهر زنبور را تشکیل داده و مقدار ترشح آن در زهر بسته به تغذیه و نژاد زنبور متغیر است. از ۲۶ اسید آمینه موجود در ساختمان ملیتین ۲۰ اسید آمینه انتهای آمین پپتید به طور عمده آب‌گریز بوده در حالی که اسیدهای آمینه انتهای کربوکسیل آن (اسیدهای آمینه ۲۱ تا ۲۶) بیش‌تر آب‌دوست می‌باشند. این ساختمان دوگانه دوست به ملیتین امکان واکنش با غشاهای فسفولیپیدی و تخریب آن‌ها را می‌دهد.<sup>۵،۶</sup>

تاکنون خواص مختلفی برای ملیتین گزارش شده است که از این قبیل می‌توان به اثرات ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد سرطانی اشاره نمود.<sup>۷</sup> در سال‌های اخیر مهار سلول‌های سرطانی تخمدان، سینه، کبد و ریه توسط زهر زنبور عسل و ملیتین گزارش شده است.<sup>۸،۹</sup> علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که اثرات سمی ملیتین بر سلول‌های سرطانی بسیار بیش‌تر از سلول‌های طبیعی بدن می‌باشد.<sup>۱۰</sup> در سال ۲۰۰۰ سرطان معده دومین سرطان کشنده و چهارمین سرطان شایع در سراسر جهان بوده است. سالانه ۶۵۰ هزار مرگ در اثر این بیماری و ۸۸۰۰۰۰ مورد جدید آن گزارش می‌گردد. حدود دو سوم این موارد در کشورهای در حال توسعه می‌باشد.<sup>۱۱</sup> در ایران سرطان معده در رتبه دوم ابتلا به سرطان‌ها قرار دارد و شایع‌ترین سرطان در میان مردان و سومین در میان زنان محسوب می‌گردد.<sup>۱۲</sup> پراکنش این بیماری در سراسر کشور یک‌نواخت نبوده، به گونه‌ای که استان‌های شمالی و شمال غربی بیش‌ترین و استان‌های مرکزی کم‌ترین آمار ابتلا را دارا می‌باشند.<sup>۱۳</sup> جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی از جمله روش‌های مورد استفاده در درمان سرطان معده محسوب می‌گردند که در بیش‌تر موارد به علت تشخیص در مراحل پیشرفته بیماری، با شکست مواجه می‌گردند و هم‌چنین روش‌هایی تهاجمی و دارای عواقب جانبی زیاد هستند.<sup>۱۴</sup>

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

کشت سلول: سلول‌های آدنوکارسینوما معده Human Gastric Adenocarcinoma Cells (AGS) در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در انکوباتور °C ۳۷ با ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت داده شد. پس از رسیدن سلول‌ها به رشد مناسب، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک کشت سلول به کمک محلول حاوی ۰/۲۵ آنزیم تریپسین و ۰/۰۱ EDTA جدا شده و با رنگ‌آمیزی با تریپان بلو شمارش گردیدند.

بررسی اثر ملیتین بر رشد سلول‌های AGS به کمک MTT: جهت انجام آزمون MTT سلول‌های AGS با جمعیت  $4 \times 10^4$  سلول در هر خانه به پلیت‌های ۹۶- خانه تخت منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> در °C ۳۷ نگهداری شدند. پس از پایان مدت زمان انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف (۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) ملیتین به مدت شش و ۱۲ ساعت تیمار گردیدند.

چهار ساعت پیش از پایان مدت زمان انکوباسیون ۲۰ میکرولیتر از محلول ۲/۵mg/ml MTT به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید. در این روش نمک MTT توسط سلول‌های زنده احیا و به رسوب بنفش رنگی به نام فورمازان (Formazan) تبدیل می‌گردد. شدت رنگ تولیدی با تعداد سلول‌های زنده ارتباط مستقیم دارد.

پس از پایان مدت زمان انکوباسیون (شش و ۱۲ ساعت) پلیت‌ها تحت شرایط (۱۰ دقیقه، rpm 3000) سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. جهت انحلال رسوب رنگی فورمازان ۱۰۰ μl DMSO به هر کدام از خانه‌ها اضافه و شدت نور جذب شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. از سلول‌های تیمار نشده با ملیتین به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. از روابط زیر برای محاسبه درصد اثر بازدارندگی ملیتین بر رشد سلول‌های AGS استفاده شد:

$$\begin{aligned} \text{A) } \% \text{ Viability} &= (\text{OD sample} / \text{OD negative control}) \times 100 \\ \text{B) } \% \text{ Inhibition} &= 100 - \text{Viability} \end{aligned}$$

تمام آزمایشات انجام شده در این تحقیق سه بار تکرار گردیده و داده‌ها به صورت Mean±SD بیان شدند. در تمام آنالیزها سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SigmaPlot ویراست ۱۱ رسم شدند.

TFA به عنوان محلول A و استونیتریل خالص حاوی ۰/۰۵٪ TFA به عنوان محلول B انتخاب و جهت جداسازی ملیتین شیب خطی صفر تا ۶۰ درصد محلول B به مدت ۶۰ دقیقه اعمال گردید. خروجی ستون در طول موج ۲۱۴ نانومتر رصد گردید.

زمان خروج (Retention time) ملیتین به کمک استاندارد خریداری شده از شرکت سیگما تعیین و فراکشن آن به صورت دستی جمع‌آوری و پس از لیوفیلیزه شدن و تایید خلوص به کمک SDS-PAGE، تعیین غلظت گردیده و جهت انجام آزمایشات بعدی در °C ۲۰- نگهداری شد.

به منظور بررسی فعالیت همولیتیک ملیتین استخراج شده، یکی از خواصی که تاکنون در رابطه با ملیتین گزارش گردیده است مربوط به توانایی ملیتین در لیز گلبول‌های قرمز خون (فعالیت همولیتیک) می‌باشد.<sup>۱۶</sup> در این تحقیق، آزمون فعالیت همولیتیک مطابق با پروتکل AL-Badri انجام گردید.<sup>۱۷</sup>

اریتروسیت‌ها از خون تازه هپارینه به‌وسیله سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه rpm 3000) جدا و با بافر فسفات (PBS) شستشو شدند. سپس رسوب گلبول‌های قرمز (RBC) به گونه‌ای در PBS رقیق گردید تا سوسپانسیون ۲٪ از RBC حاصل شود. سوسپانسیون تهیه شده به هشت خانه از یک پلیت ۹۶ خانه تخت (۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه) منتقل و با هشت غلظت سریالی رقیق شده ملیتین (۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار گردیدند. به عنوان کنترل مثبت و منفی از همان مقدار RBC با تیمار با تریتون X-100 و PBS به ترتیب استفاده شد.

پلیت ۹۶ خانه حاوی نمونه‌های مورد آزمایش و کنترل‌های مثبت و منفی در انکوباتور °C ۳۷ به مدت دو ساعت قرار داده شد و پس از پایان این مدت سانتریفیوژ شده (۱۰ دقیقه rpm 3000) و ۶۰ μl از محلول رویی هر یک از خانه‌ها به پلیت دیگری منتقل گردید. میزان جذب نمونه‌ها (Optical Density, OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر (Biotech, EPOCH, USA) اندازه‌گیری گردید. درصد فعالیت همولیتیک نمونه‌ها در مقایسه با کنترل مثبت از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد همولیتیک} = \frac{(\text{نمونه OD} - \text{کنترل منفی OD})}{(\text{کنترل مثبت OD} - \text{کنترل منفی OD})} \times 100$$

این آزمایش سه بار تکرار گردیده و داده‌ها به صورت Mean±SD بیان گردیده‌اند.

## یافته‌ها

تایید گردید (شکل ۲). پس از تعیین غلظت، ملیتین جهت استفاده در آزمایشات بعدی در  $20^{\circ}\text{C}$  - نگه‌داری گردید. فعالیت همولیتیک ملیتین: ملیتین از طریق تخریب غشاء گلبول‌های قرمز و آزادسازی هموگلوبین موجب افزایش جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر می‌گردد. از این افزایش شدت جذب نور می‌تواند به عنوان نشانه‌ای از میزان فعالیت لیزکنندگی ملیتین باشد.

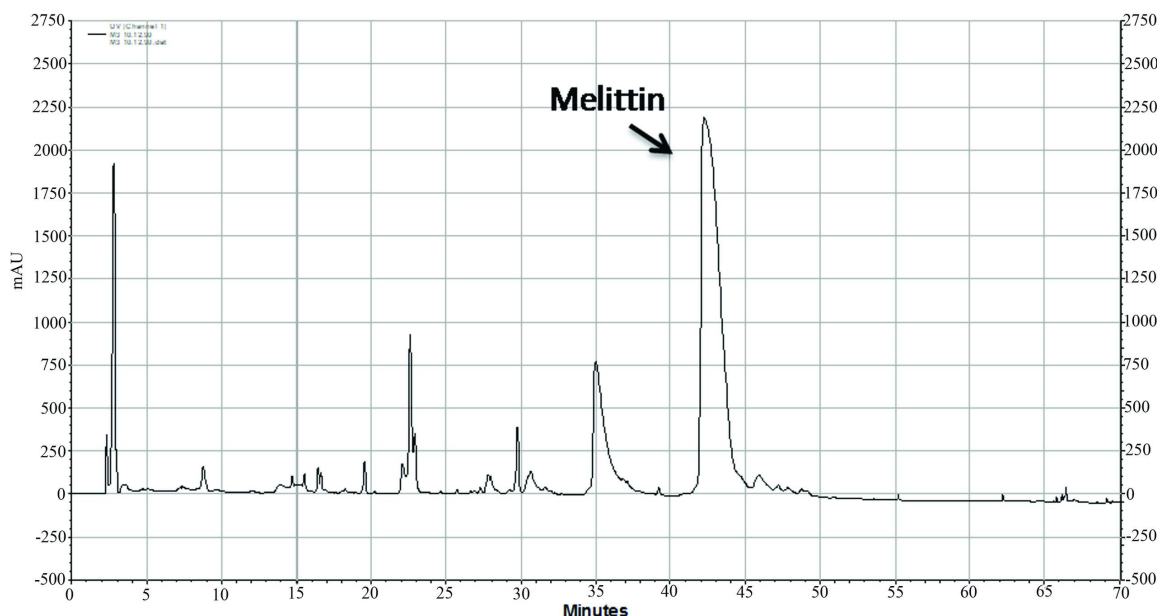
بر اساس نتایج حاصل از آزمایش همولیتیک انجام شده در این مطالعه، مشاهده گردید ملیتین در غلظت‌های بسیار پایین ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر فاقد فعالیت چشمگیری بوده در حالی که در غلظت‌های بالاتر به طور کامل دارای فعالیت همولیتیک می‌باشد. غلظتی از ملیتین که باعث لیز ۵۰٪ گلبول‌های قرمز در مقایسه با کنترل مثبت (ترایتون X-100) شده است (HD50) برابر  $0.05\mu\text{g/ml}$  تعیین گردید (نمودار ۱).

مهار رشد سلول‌های AGS توسط ملیتین: میزان اثر مهاری ملیتین بر رشد سلول‌های سرطانی معده (AGS) به روش MTT تعیین گردید. بر اساس نتایج حاصل، ملیتین باعث کنترل رشد سلول‌های سرطانی شده است. این اثر مهاری در هر دو زمان شش و ۱۲ ساعت به طور

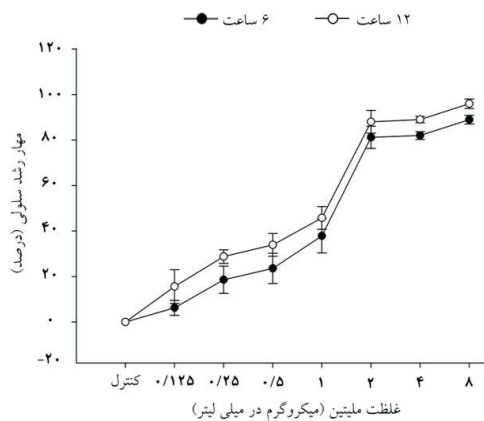
نتایج حاصل از کروماتوگرافی: بر اساس کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه زهر زنبور عسل مورد استفاده در این مطالعه توسط دستگاه RP-HPLC (Knauer, Berlin, Germany) با ستون C18 در طول موج ۲۱۴ نانومتر بیش از صد پیک بزرگ و کوچک مشاهده گردید. از این تعداد حدود ۲۰ پیک اصلی در کروماتوگرام قابل تشخیص بود. زمان خروج ملیتین با استفاده از استاندارد تهیه شده از شرکت سیگما، دقیقه ۴۲ تعیین گردید.

با مشاهده آغاز خروج آن از ستون به طور دستی جمع‌آوری گردید. سطح زیر منحنی فراکشن ملیتین در حدود ۵۰ درصد (۴۹/۸۵٪) کل ترکیبات زهر زنبور عسل بود که این موضوع مطابق با گزارشات پیشین در مورد میزان ملیتین در زهر زنبور عسل می‌باشد.<sup>۱۸،۱۹</sup> (شکل ۱).

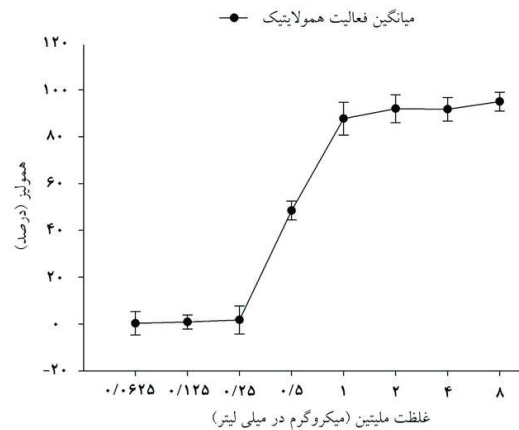
همان‌گونه که در تصویر ژل الکتروفورز مشخص است ملیتین بدون ناخالصی استخراج شده است. فراکشن ملیتین پس از جمع‌آوری لیوفیلیزه گردیده و خلوص آن با ژل SDS-PAGE ۱۵٪



شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه زهر زنبور عسل بومی ایران مورد استفاده در این مطالعه توسط دستگاه RP-HPLC با ستون C18 در طول موج ۲۱۴ نانومتر.



نمودار ۲: اثر غلظت‌های مختلف ملیتین بر رشد سلول‌های سرطانی معده (AGS).



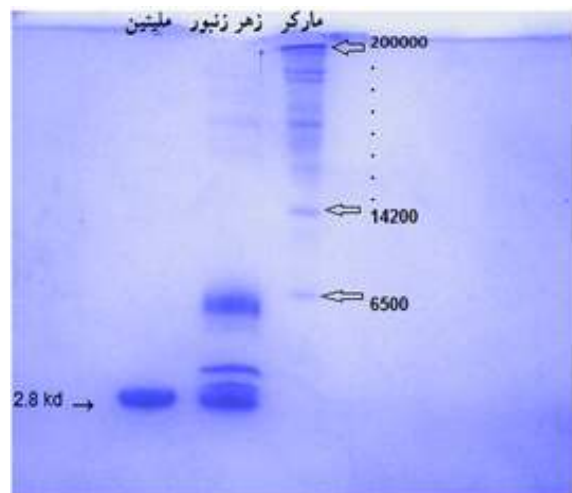
نمودار ۱: افزایش میزان فعالیت همولیتیک ملیتین با افزایش غلظت آن.

## بحث

این پژوهش به منظور بررسی اثر ملیتین جدا شده از زهر زنبور عسل بر رشد سلول‌های سرطانی معده رده AGS انجام گردید. گرچه پیش از این گزارشاتی مبنی بر مهار انواعی از سلول‌های سرطانی توسط زهر زنبور عسل یا ترکیب اصلی آن (ملیتین) ارائه شده است ولی گزارشی در رابطه با اثر ملیتین بر سلول‌های سرطانی معده (AGS) توسط مجریان این مطالعه مشاهده نگردیده است.

نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده در این مطالعه به خوبی نشان‌دهنده مهار رشد سلول‌های سرطانی معده توسط ملیتین می‌باشد. سرطان معده یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان محسوب می‌گردد.<sup>۲۰،۲۱</sup> عدم توفیق روش‌های درمان این بیماری، نیاز به تحقیق بیش‌تر جهت معرفی مواد موثرتر و روش‌های درمانی کارآمدتر را بیش از گذشته حایز اهمیت نموده است.<sup>۲۲</sup>

تاکنون اثر ترکیبات متعددی بر سلول‌های سرطانی مختلف بررسی شده است و ترکیبات بسیاری وجود دارد که خواص ضد سرطانی آن‌ها گزارش شده است. از جمله ترکیبات مورد بررسی، مواد طبیعی موجود در طبیعت مانند بعضی از انواع گیاهان و خوراکی‌ها می‌باشد. از جمله این ترکیبات طبیعی که خواص ضد سرطانی آن‌ها به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است، زهر زنبور عسل و ترکیب اصلی موجود در آن، ملیتین، می‌باشد. زهر



شکل ۲: آنالیز الکتروفورزی (SDS-PAGE 15%) فراکشن ملیتین.

کامل مشهود می‌باشد. غلظتی از ملیتین که موجب مرگ ۵۰ درصدی سلول‌های سرطانی شده است (IC50) برای شش ساعت  $1/2 \mu\text{g/ml}$  و در ۱۲ ساعت برابر  $1 \mu\text{g/ml}$  می‌باشد (نمودار ۲).

این نتایج نشان می‌دهند ملیتین اثر قدرت‌مندی بر رشد سلول‌های سرطانی معده از خود نشان می‌دهد. این اثر مهاری با افزایش غلظت ملیتین و مدت زمان تیمار سلول‌ها با آن افزایش می‌یابد.

حاصل از آزمایش بررسی فعالیت همولیتیک اثبات نمودند که ملیتین مورد استفاده در این تحقیق دارای فعالیت همولیتیک می‌باشد. بر اساس این نتایج می‌توان گفت که اصلی‌ترین مانع در راه استفاده از ملیتین در درمان سرطان فعالیت همولیتیک آن می‌باشد. لذا در طراحی روش‌های درمان سرطان با استفاده از ملیتین باید این نکته در نظر گرفته شود که ورود ملیتین به جریان خون موجب آسیب گلبول‌های قرمز می‌گردد. از این رو به نظر می‌رسد راه‌های مناسب‌تر درمان سرطان به کمک ملیتین استفاده از ژن درمانی (انتقال ژن ملیتین به سلول‌های سرطانی) یا تحویل اختصاصی ملیتین مانند لیپوزوم به سلول‌های سرطانی باشد.

تعیین میزان مهار رشد سلول‌های AGS تیمار شده با ملیتین از طریق روش MTT نشان داد ملیتین دارای سمیت زیادی بر روی این سلول‌ها می‌باشد این اثر مهار و وابسته به زمان و غلظت می‌باشد. این وابستگی به آن معنی است که با افزایش غلظت ملیتین و مدت زمان تیمار سلول‌ها مقدار بیش‌تری از مهار رشد سلولی می‌گردد. در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بالاتر از  $2\mu\text{g/ml}$  میزان بالایی از مهار رشد سلولی (بیش از ۸۰٪) مشاهده گردید که نشان‌دهنده قدرت بالای ملیتین در نابودی سلول‌های سرطانی معده دارد.

به طور خلاصه، این پژوهش نشان داد که ملیتین اثر مهار قدرت‌مندی را بر رشد سلول‌های سرطانی معده از خود نشان می‌دهد و این اثر مهار و وابسته به غلظت ملیتین و مدت زمان تیمار سلول‌ها می‌باشد. این مطالعه می‌تواند به عنوان شروعی برای مطالعات بیش‌تر در راستای استفاده از ملیتین جهت رایج روش‌های کارآمدتر درمان سرطان معده محسوب می‌گردد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی اثر ملیتین در القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۱ می‌باشد که با حمایت انستیتو پاستور تهران و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی یزد اجرا شده است.

زنبور عسل به طور سنتی در پزشکی سنتی شرقی به عنوان دارویی برای درمان آرتروز روماتوئید و تسکین درد مفاصل مورد استفاده قرار می‌گرفته است. علاوه بر آن در سال‌های گذشته گزارشات متعددی از اثرات درمانی زهر زنبور عسل در بیماری‌های مختلف گزارش شده است. تاکنون خواص متعددی از ملیتین گزارش شده است، از جمله می‌توان به خواص ضد درد، ضد التهابی، آنتی‌میکروبیال، همولیتیک و غیره اشاره کرد.

مطالعه بر روی زهر زنبورعسل و ملیتین از سال‌های دور مورد توجه بوده است. حدود ۶۰ سال پیش Havas اثر زهر زنبور عسل را بر نوعی تومور القا شده توسط کلشی‌سین بررسی کرد. Havas نشان داد که زهر زنبور عسل دارای اثرات توکسیک بر سلول‌های تومور می‌باشد. در سال‌های اخیر خواص ضد سرطانی ملیتین توجه دانشمندان را به خود جلب نموده و گزارشات متعددی در این رابطه ارائه شده است. گزارش شده است ملیتین با القا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) موجب مهار سلول‌های سرطانی هم‌چون سرطان ریه و پروستات می‌گردد.<sup>۳۳</sup>

به نظر می‌رسد القا آپوپتوز توسط ملیتین در سلول‌های سرطانی از طریق مسیر وابسته به کاسپاز (Caspase)، پروتئازهای دخیل در آپوپتوز، انجام می‌گیرد.<sup>۳۴</sup> اکثر داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی موجب القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردند و با توجه به گزارشات فوق به نظر می‌رسد، ملیتین از این لحاظ در مطالعات آینده گزینه مناسبی برای استفاده در درمان سرطان به حساب آید. خاصیت دوگانه دوستی (Amphiphilic) ملیتین موجب گشته این پپتید با غشاهای فسفولیپیدی واکنش داده و موجب تخریب آن‌ها شود. این اثرات تخریبی ملیتین با ایجاد کانال در سطح غشا انجام می‌گیرد.<sup>۲۶، ۲۵، ۶</sup>

ملیتین ترکیبی بسیار پر قدرت می‌باشد و در صورت استفاده از آن در درمان انواع سرطان از طریق روش‌هایی با اثرات جانبی کم‌تر، انقلابی در مبارزه بشر علیه سرطان به وجود خواهد آورد. نتایج

## References

1. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer

effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 2007;115(2):246-70.

2. Lee JD, Park HJ, Chae Y, Lim S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2(1):79-84.
3. Ghabili K, Shoja MM, Parvizi M. Bee venom therapy: a probable etiology of aneurysm formation in aorta. *Med Hypotheses* 2009; 73(3):459-60.
4. Gauldie J, Hanson JM, Rumjanek FD, Shipolini RA, Vernon CA. The peptide components of bee venom. *Eur J Biochem* 1976;61(2):369-76.
5. Bazzo R, Tappin MJ, Pastore A, Harvey TS, Carver JA, Campbell ID. The structure of melittin. A 1H-NMR study in methanol. *Eur J Biochem* 1988;173(1):139-46.
6. Dempsey CE. The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1990;1031(2):143-61.
7. Tichy J, Novak J. Detection of antimicrobials in bee products with activity against viridans streptococci. *J Altern Complement Med* 2000;6(5):383-9.
8. Ip SW, Liao SS, Lin SY, Lin JP, Yang JS, Lin ML, et al. The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo* 2008;22(2):237-45.
9. Wang C, Chen T, Zhang N, Yang M, Li B, Lü X, et al. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I $\kappa$ B $\alpha$  kinase-NF $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2009;284(6):3804-13.
10. Killion JJ, Dunn JD. Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;139(1):222-7.
11. Plummer M, Franceschi S, Muñoz N. Epidemiology of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004;(157):311-26.
12. Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. *Arch Iran Med* 2009; 12(6):576-83.
13. Taghavi N, Nasrollahzadeh D, Merat S, Yazdanbod A, Hormazdi M, Sotoudeh M, et al. Epidemiology of upper gastrointestinal cancers in Iran: a sub site analysis of 761 cases. *World J Gastroenterol* 2007;13(40):5367-70.
14. Bornschein J, Rokkas T, Selgrad M, Malfertheiner P. Gastric cancer: clinical aspects, epidemiology and molecular background. *Helicobacter* 2011;16 Suppl 1:45-52.
15. Benton AW, Morse RA, Stewart JD. Venom Collection from Honey Bees. *Science* 1963;142(3589):228-30.
16. Tosteson MT, Holmes SJ, Razin M, Tosteson DC. Melittin lysis of red cells. *J Membr Biol* 1985;87(1):35-44.
17. Al-Badri ZM, Som A, Lyon S, Nelson CF, Nüsslein K, Tew GN. Investigating the effect of increasing charge density on the hemolytic activity of synthetic antimicrobial polymers. *Biomacromolecules* 2008;9(10):2805-10.
18. Rybak-Chmielewska H, Szczêsna T. HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *J Apicultural Sci* 2004;48(2):103-9.
19. Sciani JM, Marques-Porto R, Lourenço Junior A, Orsi Rde O, Ferreira Junior RS, Barraviera B, et al. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. *Peptides* 2010;31(8):1473-9.
20. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12(3):354-62.
21. Shah MA, Khanin R, Tang L, Janjigian YY, Klimstra DS, Gerdes H, et al. Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res* 2011;17(9):2693-701.
22. Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Ann Oncol* 2003;14 Suppl 2: ii31-6.
23. Maher S, McClean S. Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol. *Biochem Pharmacol* 2008;75(5):1104-14.
24. Moon DO, Park SY, Choi YH, Kim ND, Lee C, Kim GY. Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. *Toxicol* 2008;51(1):112-20.
25. Vogel H, Jähnig F. The structure of melittin in membranes. *Biophys J* 1986;50(4):573-82.
26. Dawson CR, Drake AF, Helliwell J, Hider RC. The interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 1978;510(1):75-86.

## Isolation of melittin from bee venom and evaluation of its effect on proliferation of gastric cancer cells

### Abstract

Received: August 27, 2012 Accepted: December 15, 2012

Amir Mahmoodzadeh M.Sc.<sup>1,2</sup>  
 Ali Morady Ph.D.<sup>1\*</sup>  
 Hannaneh Zarrinnahad M.Sc.<sup>1,2</sup>  
 Kamran Pooshang Bagheri Ph.D.<sup>2</sup>  
 Pooria Ghasemi-Dehkordi D.V.M.<sup>3</sup>  
 Mahdi Mahdavi Ph.D.<sup>4</sup>  
 Delavar Shahbazzadeh Ph.D.<sup>2</sup>  
 Hamidreza Shahmorady M.Sc.<sup>1</sup>

1- Department of Biochemistry, International Campus of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

2- Venom and Toxin Laboratory, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

3- Department of Veterinary, Azad University, Shahre kord, Iran.

4- Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

\* Corresponding author: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.  
 P.O.Box 8915173149  
 Tel: +98- 351- 8202633  
 E-mail: morady2008@gmail.com

**Background:** Gastric cancer (GC) is one of the most common cancers worldwide and in Iran. Conventional therapies are surgery and chemotherapy. Current studies are evaluating natural compounds in inhibiting growth of cancer cell. In this study isolated peptide melittin with 26 amino acids from bee venom and its impact on the viability and proliferation of gastric cancer cells was investigated.

**Methods:** At first melittin was purified from honeybee venom using a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP- HPLC) and C18 column. In order to investigate whether melittin, a 26 amino acids peptide which is the main components of honeybee venom, inhibits proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line (AGS cells), MTT ((3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide) assay was performed. Hemolytic assay carried out in order to confirm the biologic activity of the isolated melittin. AGS cells were plated in a 96-well plate and treated with serially diluted concentrations of melittin for 6 and 12 hours. The mortality of the cells was measured via MTT assay at 540 nm.

**Results:** The obtained chromatogram from RP-HPLC showed that melittin comprises 50% of the studied bee venom. SDS-PAGE analysis of melittin fraction confirmed purity of isolated melittin. Hemolytic activity assay indicates that isolated melittin shows a strong hemolytic activity (HD50=0.5). MTT assay showed that melittin strongly inhibits proliferation of gastric cancer cells at concentrations more than 2µg/ml. This inhibitory effect is dependent to melittin concentration and incubation time.

**Conclusion:** This study provides evidence that melittin inhibits proliferation of the gastric cancer cells. Results showed that isolated melittin from honey bee venom have cytotoxic effect on AGS cell line with a trend of increasing cytotoxicity with increasing concentration and incubation time.

**Keywords:** Melittin, reverse-phase chromatography, stomach neoplasm.