

## *Effect of Royal Jelly on Peripheral Blood Mononuclear Cells Cytotoxicity against the K562 Erythroleukemia Cell Line*

Seyed Ehsan Hosseini<sup>1</sup>,

Norouz Delerezh<sup>2</sup>,

Nahid Afzal Ahangaran<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received March 1, 2014 ; Accepted June 21, 2014)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Royal jelly (RJ) is a substance synthesized by worker bee- is shown to have various biological activities on different cells and tissues of the human body. In this study the effect of RJ on peripheral blood mononuclear cells cytotoxicity against the K562 Erythroleukemia cell line was investigated.

**Material and methods:** In this experimental study human PBMCs (106 cells/ml) were separately cultured in standard conditions. The cells were then incubated with different concentrations of RJ (5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml) for 72 hours. Subsequently, cytotoxic effect of PBMCs pulsed with RJ on K562 was evaluated by Annexin PI test (Flow cytometry).

**Results:** In the Annexin PI test, apoptotic property and cytotoxic effect of PBMCs pulsed with RJ on K562 increased significantly compared to those of the control group.

**Conclusion:** PBMCs pulsed with RJ increased survival rate of PBMCs after treatment with RJ. This compound could be beneficial in preventing and controlling carcinoma cells.

**Keywords:** Royal jelly, K562, peripheral blood mononuclear cell

# تأثیر ژل رویال بر میزان سیتو توکسیته سلول های تک هسته ای خون محیطی علیه سلول های اریترو لوسمی رده K562

سید احسان حسینی<sup>۱</sup>  
نوروز دلیرز<sup>۲</sup>  
ناهید افضل آهنگران<sup>۳</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** ژل رویال که توسط زنبورهای کارگر ترشح می شود، دارای فعالیت های زیستی مختلفی در سلول ها و بافت های بدن می باشد. در این مطالعه تأثیر ژل رویال بر سلول های تک هسته ای خون محیطی و رویارویی این سلول ها با سلول سرطانی K562 مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، سلول (PBMC 106 سلول) انسانی با غلظت های متفاوت از ژل رویال (۵ mg/ml، ۱۰ mg/ml، ۲۵ mg/ml) به طور جداگانه و در شرایط استاندارد برای مدت زمان ۷۲ ساعت کشت داده شد. سپس در تست Annexin PI (فلوسایتمتری) تأثیر ژل رویال بر میزان سلول کشی سلول های PBMC، علیه سلول های سرطانی K562 مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت. در این آزمایش از آزمون آنالیزی واریانس نیز به منظور ارزیابی اختلاف بین گروه ها استفاده شد.

**یافته ها:** در تست Annexin PI (فلوسایتمتری) و مجاورسازی رقت های مشخصی از این ژل، با سلول های PBMC و رویارویی این سلول ها با سلول های سرطانی ما شاهد افزایش میزان آپوپتوز و سلول کشی سلول های سرطانی، نسبت به گروه کنترل بودیم.

**استنتاج:** با توجه به افزایش میزان آپوپتوز سلول های سرطانی مواجه شده با سلول های PBMC که با ژل رویال رو به رو شده اند می توان نتیجه گرفت که ژل رویال می تواند در تقویت سیستم ایمنی بر علیه سلول های سرطانی و نابودی بیش تر آن ها مؤثر واقع شود.

**واژه های کلیدی:** ژل رویال، K562، سلول های تک هسته ای خون محیطی

## مقدمه

می آید (۲،۱). رده سلولی K562 به عنوان یک نمونه سرطانی جهت مطالعه لوسمی میلوئیدی مزمن مطرح می باشد (۳).

لوسمی میلوئیدی مزمن Chronic Myeloid Leukemia (CML) یکی از شناخته شده ترین سرطان های خون می باشد که در سلول های بنیادی چند توان به وجود

E-mail: hosseiniseyedehsan@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** سید احسان حسینی - ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی

۱. کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

۲. دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

۳. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۱/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۳/۳۱

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده که در سال ۱۳۹۱ و در شرایط استاندارد کشت سلول، در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه صورت گرفت. برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، ابتدا خون هپارینه با محیط کشت RPMI-1640 رقیق شده را به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده است اضافه کرده سپس با سرعت ۸۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. سلول‌های PBMC که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده را به آرامی جمع‌آوری کرده و PBMC به دست آمده را با پیپت پاستور استریل برداشته شده و بعد از سه بار شست و شو در RPMI 1640، برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. تعداد و میزان سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به دست آمده با استفاده از رنگ تری پان بلو<sup>۹</sup> (TB) تعیین گردید<sup>(۹)</sup>؛ سپس رده سلولی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه، و در شرایط In Vitro محیط کشت RPMI1640 و FBS<sub>۱۰</sub> درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد کشت داده شد. ژل رویال از زنبورداران آذربایجان غربی شهرستان ارومیه به صورت تازه خریداری، و در شرایط استاندارد نگهداری شد؛ سپس برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه غلظت‌های متفاوت، ژل رویال را با بافر<sup>۱۱</sup> PBS به نسبت ۲۰ mg/ml رقیق کرده و بعد از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰g، قسمت مومی شکل آن را جدا کرده و با فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرون استریل گردید. سپس رقت‌های مورد نیاز از آن به وسیله محلول بافر PBS تهیه و به میزان مورد نیاز (۲۵mg/ml، ۱۰mg/ml، ۵ mg/ml) جهت انجام هر آزمایش در لوله‌های استریل در ۲۰-۰ درجه نگهداری شد<sup>(۱۲)</sup>. سلول‌ها به تعداد ۱۰۶ از PBMCs در شرایط رشد

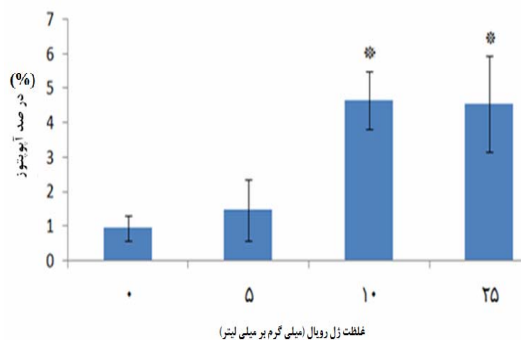
آپوپتوز<sup>۱</sup>، یک فرآیند تنظیم شده مرگ سلولی می‌باشد که باعث حذف سلول‌های ناخواسته شده که بدون ایجاد آسیب در ارگان‌های چند سلولی می‌گردد و سبب کنترل رشد و ثابت نگاه داشتن شرایط محیط داخل بدن می‌شود<sup>(۴)</sup>. روش‌های بیولوژیک<sup>۲</sup>، غیرتهاجمی و موثر می‌باشند<sup>(۵)</sup>. استفاده از ایمنی درمانی در درمان سرطان یکی از روش‌های مورد مطالعه و موثر محسوب می‌شود که در این روش تمرکز بر روی تقویت سیستم ایمنی می‌باشد. تقویت سیستم ایمنی موجب کاهش رشد و جلوگیری از گسترش سلول‌های سرطانی می‌گردد. در این میان ژل رویال یکی از موادی است که به نظر می‌رسد می‌تواند در تقویت سیستم ایمنی موثر باشد<sup>(۶-۷)</sup>. طی مطالعه‌ای که دز سال ۲۰۰۵ توسط Bincoletto و همکاران صورت گرفت نشان‌دهنده تاثیر ژل رویال بر تعدیل سیستم ایمنی بدن و پاسخ ضد توموری این ژل در بیماری بدخیم از جمله فیرو سارکوما همراه با رژیم درمانی می‌باشد<sup>(۸)</sup>. ژل رویال حاوی ویتامین‌های گروه B محلول در آب مانند تیامین، ریبوفلاوین، پیرویدوکسین، نیاسین<sup>۳</sup>، بیوتین<sup>۴</sup>، اسید فولیک<sup>۵</sup>، اینوزیتول<sup>۶</sup> و مواد معدنی می‌باشد. هم چنین دارای<sup>(۹)</sup> اسید آمینه ضروری، قند، استرول<sup>۷</sup>، ترکیبات فسفردار، اسید کولین<sup>۸</sup> و دیگر ترکیبات مورد نیاز برای سلامتی می‌باشد<sup>(۱۰-۱۱)</sup>. از دیگر ترکیبات موثر ژل رویال که در بحث تقویت سیستم ایمنی و تعدیل سیستم ایمنی مطرح می‌باشد ترکیبی به نام ۱۰ هیدروکسی دیستئوئیک اسید<sup>(۶)</sup> می‌باشد که در این ژل وجود دارد<sup>(۷)</sup>. رفرانس‌ها باید به ترتیب باشد.

در این مطالعه با توجه به اثرات ضد توموری در راستای تعدیل سیستم ایمنی ژل رویال، میزان سلول کشی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نرمال رویارویی شده با ژل رویال بر علیه سلول‌های سرطانی K562 مورد بررسی قرار گرفته است.

9. Trypan blue  
10. Fetal Bovine Serum  
11. Phosphate-Buffered Saline

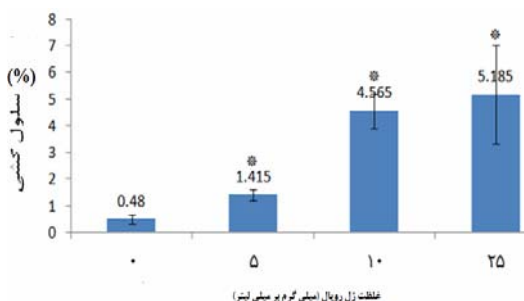
1. Apoptosis  
2. Biologic  
3. Niacin  
4. Biotin  
5. Folic acid  
6. Inositol  
7. Estrol  
8. Coliin acid

بوده ایم (نمودار شماره ۲). سلول های PBMC که با غلظت 25 mg/ml از ژل رویال مواجه شده اند اثرات سلول کشی بیش تری نسبت به دیگر غلظت ها بر علیه سلول های سرطانی از خود نشان داد. همان طور که (تصویر شماره ۱) نشان داده شده سلول های سرطانی و PBMC در جداسازی توسط دستگاه فلو سیتومتری در دو منطقه گیت شده جدا گانه از هم تفکیک شدند که بر اساس قرار گیری سلول ها در دو منطقه گیت شده متفاوت ما به راحتی می توانیم سلول های PBMC مواجه شده با سلول های سرطانی را از همدیگر تفکیک کنیم (تصویر شماره ۲). در نمونه شاهد مثبت نیز (تصویر شماره ۳) که هیچ گونه مواجه ای صورت نگرفته ما شاهد زنده بودن بیش از ۹۹ درصد سلول های سرطانی می باشیم، که Q1 شامل سلول های آپوپتوز اولیه، Q2: آپوپتوز ثانویه، Q3: سلول های زنده و Q4: شامل سلول های نکروز شده می باشد.



نمودار شماره ۱: اثر ژل رویال بر میزان آپوپتوز سلول های K562 مواجه شده با PBMC در سنجش با تست Anxin PI.

\* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0.05$  نسبت به گروه شاهد می باشد



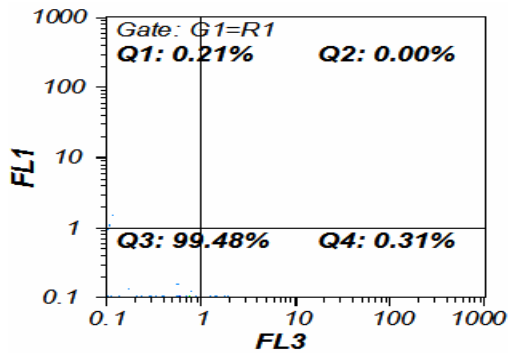
نمودار شماره ۲: اثر ژل رویال بر میزان سلول کشی PBMC بر علیه سلول های K562 در سنجش با تست Anxin PI.

\* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0.05$  نسبت به گروه شاهد می باشد

بهینه و به طور جدا گانه در پلیت های کشت ۲۴ خانه در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۵ درصد FBS کشت داده شدند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و گروه های سلولی PBMCs در مجاورت غلظت های مختلف از ژل رویال (5mg/ml، 10mg/ml، 25mg/ml) به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. سپس سلول های PBMCs مواجه شده با ژل رویال، به مدت ۵ ساعت با سلول سرطانی K562 و به تعداد ۱۰۴ سلول به طور هم زمان کشت داده شدند (نسبت تقریبی ۱:۱۰۰ PBMC : K562). سوسپانسیون سلول را جدا کرده و با بافر PBS و به وسیله سانتریفیوژ با سرعت  $650 \times g$  به مدت ۵ دقیقه شست و شو صورت گرفت. سپس سلول های شست و شو داده شده در ۱ میلی لیتر بایندینگ بافر حل گردید. ۱۰۰ میکرو لیتر از آن را برداشته و ۸ میکرو لیتر Annexin PI به محلول اضافه گردید. سلول ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریک خانه قرار داده شد. در مرحله آخر، ۴۰۰ میکرو لیتر از محلول باندینگ بافر به آن اضافه و با دستگاه فلو سیتومتری سنجش گردید. میزان مرگ سلولی و تعداد سلول های سالم، توسط دستگاه فلو سیتومتری DACO USA و نرم افزار Flow Max مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش به منظور ارزیابی اختلاف بین گروه ها، از آزمون آنالیزی واریانس استفاده شد.

## یافته ها

در سنجش میزان آپوپتوز و نکروز سلول های k562 مواجه شده با سلول های تک هسته ای خون محیطی که قبلا با غلظت های مختلف ژل رویال انکوبه شده بودند، نتایج به دست آمده نشان داد که ژل رویال در غلظت های 5 mg/ml و 10 mg/ml، سبب افزایش میزان آپوپتوز سلول های سرطانی در مواجه با سلول های PBMC می شوند (نمودار شماره ۱). هم چنین ما شاهد افزایش میزان قدرت سلول کشی (شامل نکروز و آپوپتوز) سلول های PBMC مواجه شده با این ژل

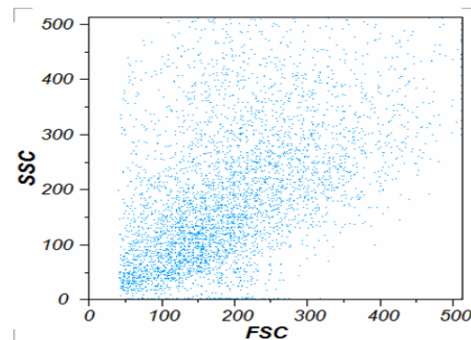
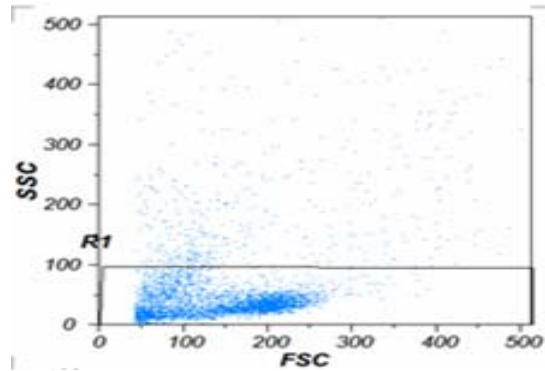


تصویر شماره ۳: نمونه شاهد آپوپتوز سلول های K562 تیمار نشده همراه با درصد سلول های زنده (رنگ آمیزی شده با Annexin PI)

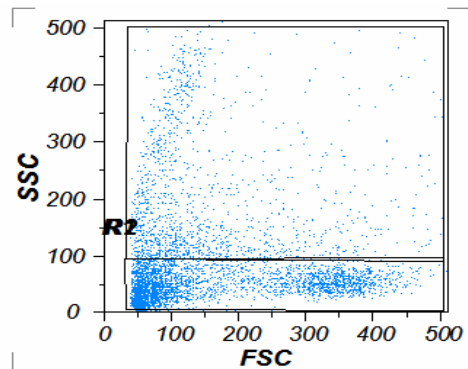
### بحث

ژل رویال دارای خواص آنتی اکسیدانی (۱۳)، حفاظتی علیه آسیب های DNA (11) و فعالیت های ضد توموری می باشد (۱۴). هم چنین در مطالعات گذشته نشان داده شده است که ژل رویال از طریق افزایش تعداد لوکوسیت ها سبب تقویت سیستم ایمنی می شود (۱۵). مطالعات آزمایشگاهی و مطالعه روی حیوانات آزمایشگاهی نیز نشان از اثرات ضد توموری و ضد التهابی این ماده دارد (۱۷).

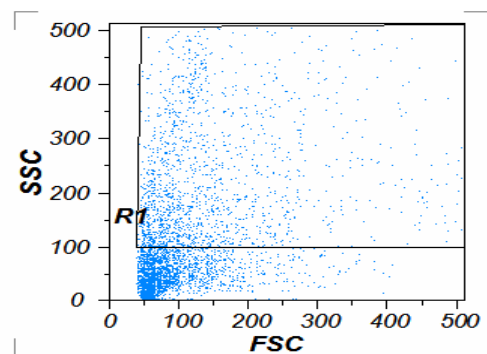
سلول های تک هسته ای خون محیطی نقش مهمی در دفاع علیه عوامل بیگانه و تومورها به همراه دارد که می تواند در تقویت سیستم ایمنی بسیار حائز اهمیت باشد. تقویت سیستم ایمنی موجب کاهش رشد و جلوگیری از گسترش سلول های سرطانی می گردد (۷). در این مواجهه سلولی، به علت عدم تحریک لنفوسیت های B و T در مواجهه تکراری با سلول سرطانی، سلول خاطرهای B و T ایجاد نشده و ما تنها شاهد تأثیر سلول های NK که سلول های کشنده طبیعی ایمنی ذاتی هستند می باشیم (۱۸). سلول های NK که تا ۲۰ درصد از سلول های تک هسته ای خون را شامل می شوند، سلول های سرطانی را شناسایی کرده و با کشتن مستقیم این سلول ها و یا با ترشح سایتوکاین های التهابی، در جهت تحریک دیگر سلول های سیستم ایمنی بر علیه سلول های سرطانی پاسخ می دهند (۱۹).



تصویر شماره ۱: نمایی از محل قرارگیری سلول های PBMC (نمودار بالایی) و محل قرارگیری سلول های K562 (نمودار پایینی) در سنجش فلوسایتومتری



تصویر شماره ۲: نمونه ای از نمودار فلوسایتومتری سلول های سرطان K562 که به طور هم زمان با سلول های PBMC مواجه شده است



شرایط *In vitro* همراه با افزایش فعالیت لنفوسیت ها در بهبود عملکرد سیستم ایمنی، مورد تأیید قرار گرفت (۲۰، ۱۴). نتایج این مطالعه و تاحدودی مطالعات دیگر نشان دهنده آن است که تیمار PBMC با ژل رویال می تواند سبب افزایش میزان سلول کشی آن ها بر علیه سلول های K562 شود که سلول هدف، سلول NK می باشد که می تواند در نابودی سلول های سرطانی بیش ترین نقش را ایفا کند. از آن جا که تقویت سیستم ایمنی موجب کاهش رشد و جلوگیری از گسترش سلول های سرطانی می شود، ژل رویال می تواند به عنوان یک ترکیب مکمل در درمان لوسمی، و هم چنین جهت جبران عوارض جانبی ناشی از شیمی درمانی همراه با بحث تقویت سیستم ایمنی بدن مطرح گردد.

### سپاسگزاری

این مطالعه حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه بوده و با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شد. بدین وسیله نیز از مساعدت و همکاری آقایان دکتر سید میثم ابطحی، کارشناس آزمایشگاه آقای اصغر علیاری و کارشناس ارشد ایمنی شناسی سرکار خانم هامون نورد تقدیر و تشکر به عمل می آید.

در این مطالعه که با هدف بررسی اثرات غلظت های مختلف ژل رویال بر سلول های PBMC انجام شد، غلظت های مختلف ژل رویال را با سلول های PBMC مواجه کردیم؛ سپس قدرت سلول کشی سلول های PBMC تیمار شده را بر سلول سرطانی K562 مورد سنجش قرار دادیم. نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش دوز، میزان سلول کشی این سلول ها بر علیه سلول های سرطانی اعم از آپوپتوز و نکروز، نسبت به نمونه شاهد افزایش می یابد (نمودارهای شماره ۱ و ۲). مطالعات زیادی در مورد تاثیر ژل رویال بر فعالیت سلول های PBMC انجام نگرفته است، با این وجود Erem و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ژل رویال باعث افزایش ترشح اینترفرون گاما از لنفوسیت ها می گردد (۱۲). اکثر سلول های PBMC را لنفوسیت های T و NK تشکیل می دهند که مولد اینترفرون گاما نیز هستند. افزایش ترشح اینترفون گاما از جمله عواملی است که موجب بهبود دهنده عملکرد سیستم ایمنی و تقویت عملکرد سلول های NK در برابر سرطان ها می شود. در مطالعات دیگری که توسط Gasic و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Oka و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، اثرات تقویت کننده ژل رویال در

### References

1. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(10): 3343-3356.
2. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksa OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 1996; 88(9): 3522-3527.
3. Lozzio BB, Lozzio CB. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1977; 19(1): 136.
4. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38(4): 391-398.
5. Mattil-Fritz S, Scharner D, Piuko K, Thönes N, Gissmann L, Müller H, et al. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric

- papillomavirus-like particles. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 1): 138-147.
6. Sver L, Orsolić N, Tadić Z, Njari B, Valpotić I, Basić I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1996; 19(1): 31-38.
  7. Vucevic D, Melliou E, Vasilijic S, Gasic S, Ivanovski P, Chinou I, et al. Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(9): 1211-1220.
  8. Kobayashi N, Unten S, Kakuta H, Komatsu N, Fujimaki M, Satoh K, et al. Diverse biological activities of healthy foods. *In Vivo* 2001; 15(1): 17-23.
  9. Abtahi Froushani SM, Delirezh N, Hobbenaghi R, Mosayebi Gh. Therapeutic effects of all-trans retinoic acid on experimental autoimmune encephalomyelitis and its role in T-helper lymphocyte responses. *Tehran Univ Med J* 2012; 69(11): 710-717.
  10. Kobayashi N, Unten S, Kakuta H, Komatsu N, Fujimaki M, Satoh K, et al. Diverse biological activities of healthy foods. *In Vivo* 2001; 15(1): 17-23.
  11. Ishii R, Horie M, Murayama M, Maitani T. Analysis of tetracyclines in honey and royal jelly by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2006; 47(6): 277-283.
  12. Erem C, Deger O, Ovali E, Barlak Y. The effects of royal jelly on autoimmunity in Graves' disease. *Endocrine* 2006; 30(2): 175-183.
  13. Inoue S, Koya-Miyata S, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. *Exp Gerontol* 2003; 38(9): 965-969.
  14. Oka H, Emori Y, Kobayashi N, Hayashi Y, Nomoto K. Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(3): 521-532.
  15. Kaftanoglu, O; Tanyeli, A. The use of royal jelly during threatment of childhood malignancies, Bee Products. Properties, Aplication, and Apitherapy 1997; PP179-183.
  16. Al-Mufarrej SI, El-Sarag MSA. Effects of royal jelly on the humoral antibody response and blood chemistry of chickens. *J Appl Anim Res* 1997; 12(1): 41-47.
  17. Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, et al. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68(1): 138-145.
  18. Janeway CA Jr. Approaching the asymptote Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54(Pt 1): 1-13.
  19. Paul WE. *Fundamental Immunology*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 483-539.
  20. Gasic S, Vucevic D, Vasilijic S, Antunovic M, Chinou I, Colic M. Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2007; 29(3-4): 521-536.