

## اثر زهر زنبور عسل بر روی قدرت تمایزی D-آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) در رده سلول سرطانی حاد پرومیلوسیت HL-60

محمد نبیونی<sup>۱\*</sup>، اعظم یاراحمدی<sup>۲</sup>، بهرام دلفان<sup>۴</sup>

- ۱- دانشیار، گروه علوم سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.
- ۲- دانشیار، گروه علوم سلولی و ملکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
- ۳- کارشناس ارشد، گروه علوم سلولی و ملکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
- ۴- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره پانزدهم / شماره ۴ / پاییز ۹۲ / مسلسل ۵۷

### چکیده

دریافت مقاله: ۹۱/۵/۲۱، پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۱۰

\* مقدمه: لوسمی حاد پرومیلوسیت بدخیم ترین نوع لوسمی حاد است که با جابجایی کروموزومی (۱۵:۱۷) و توقف سلولها در مرحله پرومیلوسیت مشخص می شود. امروزه از روش تمایز درمانی جهت درمان سرطان استفاده می شود. مطالعات قبلی نشان داده اند که ویتامین E سبب مهار تکثیر و القاء تمایز سلولهای HL-60 به سمت مونوسیت می شود. با توجه به اینکه استفاده از غلظت های بالای ویتامین E دارای اثرات جانبی بوده و استفاده از این غلظت ها جهت القاء تمایز امکان پذیر نیست، لذا سعی می شود با استفاده از ترکیبات که دارای خاصیت ضد تکثیری بر روی سلولها هستند، توان تمایزی آن را افزایش داد. از آنجایی که اثرات ضد تکثیری زهر زنبور عسل بر روی رده های سلولی گوناگون اثبات شده است، در این مطالعه اثر آن بر عملکرد تمایزی ویتامین E بررسی شد.

\* مواد و روش ها: در این بررسی از ایمونوسیتوشیمی، تست احیاء NBT و رنگ آمیزی رایت - گیمسا جهت بررسی تمایز سلولی استفاده شد. جهت تحلیل داده ها از نرم افزار Instate 3 و آزمون آماری one-way ANOVA استفاده گردید.

\* یافته ها: نتایج نشان داد که زهر زنبور عسل در غلظت های غیرسمی (۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) می تواند توان تمایزی ویتامین E را افزایش دهد.

\* بحث و نتیجه گیری: با توجه به اینکه زهر زنبور به تنهایی بر روی سلولهای HL-60 دارای اثر تمایزی نیست، مقایسه اثر تمایزی ویتامین E به تنهایی و در ترکیب با زهر زنبور بر روی سلولهای HL-60 نشان داد که زهر زنبور می تواند همراه با ویتامین E در پیشبرد اثر تمایزی آن موثر بوده و توان تمایزی آن را افزایش دهد. امید است در آینده بتوان از این ترکیب جهت افزایش توان تمایزی ترکیبات تمایز دهنده استفاده نمود.

\* واژه های کلیدی: رده سلولی سرطانی حاد پرومیلوسیت، زهر زنبور عسل، ویتامین E، تمایز درمانی.

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه خوارزمی، گروه علوم سلولی مولکولی

پست الکترونیک: nabiuni@tmu.ac.ir

## مقدمه

در تعداد معدودی از سرطان ها، سلول های سرطانی در مراحل اولیه رشد خود باقی مانده اند و مکانیسم کنترل رشد و تقسیم سلولی و تمایز را از دست داده اند و فاقد توانایی تبدیل به سلولهای بالغ می‌باشند، تا بر اساس مرگ برنامه ریزی شده سلولی از بین روند (۱). این سلولها، سلولهای بنیادی سرطانی نامیده می شوند و در بسیاری از سرطانها شناسایی شده‌اند (۲). از مهمترین ویژگیهای این سلولها می توان به خودنوسازی و دارا بودن پتانسیل القاء تمایز توسط ترکیبات مختلف به سمت سلول بالغ اشاره نمود (۳).

لوسمی حاد پرومیلوسیتی بدخیم ترین نوع لوسمی میلوئیدی حاد با خونریزی شدید و با شاخص جابجایی کروموزمی (۱۷:۱۵) است (۴) که این جابجایی منجر به اتصال ژن رسپتور رتینوئیک اسید  $RAR\alpha$  (cr17) به ژن  $PML$  (cr15) شده و باعث ایجاد یک پروتئین مرکب تحت عنوان  $PML-RAR\alpha$  می‌شود. هترودایمی شدن پروتئین  $PML$  و به دنبال آن تشکیل پروتئین مرکب که منجر به از دست رفتن عملکرد ژن  $PML$  (سرکوب کننده تومورو متوقف کننده تکثیر سلولی) و در نهایت منجر به ایجاد سرطان میلوئیدی می گردد. یکی از عملکردهای این ژن مرکب ( $PML-RAR-\alpha$ ) مهار تمایز سلولی در مرحله پرومیلوسیتی و تکثیر غیر قابل کنترل سلولهای نئوپلاست پرومیلوسیت در مغز استخوان است. در این لوسمی سلولهای پرومیلوسیت توانایی خود را در پاسخ به پیام های القاء کننده تمایز و بلوغ از دست داده‌اند (۶-۴). امروزه رایج ترین روش درمان سرطان شیمی درمانی می‌باشد، اما به دلیل غیرانتخابی بودن داروهای شیمی درمانی (۶،۵) در دهه اخیر روش جدیدی به نام تمایز درمانی توجه مطالعات آزمایشگاهی را به خود جلب نموده است. نظریه تمایز درمانی، اولین بار توسط ساچ در سال ۱۹۸۷ مطرح شد. وی توانست سلولهای میلوئیدی موش را در

شرایط آزمایشگاهی توسط فاکتوری به نام اینترکولین ۶ به سمت مونوسیت و گرانولوسیت تمایز دهد (۷).

در سالهای اخیر تحقیقات فراوانی اثر ویتامین E در مهار تکثیر و القاء آپوپتوز در سلولهای سرطانی نشان داده اند. آلفا توکوفرول فراوانترین فرم ویتامین E در طبیعت است. D- آلفا توکوفرول سوکسینات مشتق سنتزی ویتامین E می‌باشد (۸،۹). غلظتهای مورد استفاده این ترکیب جهت مهار تکثیر و القاء تمایز در سلولهای سرطانی سمی و دارای اثرات جانبی همچون عدم جذب ویتامین K و ایجاد زخم‌های گوارشی می‌باشد (۱۰). بنابراین این اثرات جانبی عامل محدود کننده در استفاده بالینی از ویتامین E و مشتقات آن می باشند.

رده سلولی HL-60 یک رده سلولی سرطان خون است، که از خون جنب یک زن قفقازی بیمار گرفته شده است. این سلولها دارای سیتوپلاسم بازوفیلی نسبت هسته به سیتوپلاسم تقریباً ۲ به ۱ و دارای ۴-۲ هستک هستند (۱۱). مطالعات قبلی نشان می دهد که D- آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) دارای اثر مهار تکثیر و القاء تمایز و بر رده سلولی HL-60 می باشد (۱۲). اما به دلیل اثرات جانبی غلظتهای بالای آن دست یابی به ترکیبی که بتواند توانایی غلظت های پائین ویتامین را در مهار تکثیر و القاء تمایز، افزایش دهد، به عنوان یک راهکار ارائه شده است. بدین صورت که موادی همچون زهر زنبور همراه با غلظتهای پائین ویتامین بکار برده شود. زهر زنبور دارای بیش از ۱۸ ترکیب فعال فیزیولوژی می‌باشد که مهمترین ترکیب آن ملیتین، آنزیم فسفولیپاز A2 است (۱۳). در سال ۱۹۵۰ برای اولین بار هاواس نشان داد، زهر زنبور عسل می تواند مرگ سلولی را در سلولهای سرطانی القا کند (۱۴). با توجه به اثرات ضد سرطانی زهر زنبور عسل، این مطالعه با این هدف انجام گرفت که آیا زهر زنبور عسل می تواند توان القاء تمایزی آلفا توکوفرول

سوکسینات را در غلظتهای غیر سمی که فاقد اثرات جانبی هستند، افزایش دهد.

## مواد و روش ها

این پژوهش تجربی در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقات سلولی تکوینی دردانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی انجام گرفت. رده ی سلولی HL-60 (NCBI Code C217) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI1640 (Sigma) حاوی FBS ۲۰٪ (Gibco) و ۱۰۰ U/ml پنی سیلین (Gibco) و ۱۰۰ استرپتومایسین (Gibco) در فشار CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷ درجه در فلاسک ۲۵ cm<sup>3</sup> کشت داده شد.

زهر زنبور عسل با غلظت اولیه ۱ میلی گرم تهیه شد و در ۱ میلی لیتر PBS حل گردید و در دمای ۴۰- درجه نگه داری شد. D-آلفا توکوفرول سوکسینات با غلظتهای اولیه ۲۰ میلی گرم تهیه شد و در ۴ میلی لیتر اتانول مطلق حل گردید و در شرایط بدون نور در ۴ درجه نگه داری شد. به منظور بررسی اثر زهر زنبور عسل و آلفا توکوفرول سوکسینات بر روی تمایز سلولهای HL-60، سلولها کشت داده شدند و پس از طی ۵ روز از تیمار جهت بررسی تمایز از روش از رنگ آمیزی رایت- گیمسا و جهت تایید تمایز از تست احیاء آنزیمی NBT (۱۶) و ایمونوسیتوشیمی جهت بررسی بیان آنتی ژن CD14 مارکر اختصاصی مونوسیتی (Abcam) استفاده شد. جهت بررسی بیان آنتی ژن CD14 توسط ایمونوسیتوشیمی، پس از کشت و تیمار سلولها به مدت ۵ روز، سلولهای توسط پلی لایزین چسبانده شدند و سپس سلولها توسط PBS شسته و در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه توسط فرمالین ۴٪ تثبیت شدند. در ادامه توسط آلبومین سرم گاوی (BSA) ۱٪ در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه بلوکه شده و سپس با آنتی بادی اولیه CD14 (رقعت ۱/۱۰۰) به مدت ۱ شبانه روز انکوبه

گشتند. پس از شستشو با PBST (PBS-Tween) ۰/۱٪ سلولها با آنتی بادی ثانویه مناسب و کونژوگه با FITC با رقت ۱/۱۶ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. به منظور رنگ آمیزی هسته، سلولها توسط رنگ DAPI به مدت ۱ دقیقه رنگ آمیزی شدند و پس از شستشو توسط PBS توسط میکروسکوپ فلئورسنت بررسی شد. سلولهای کنترل که با آنتی بادی اولیه انکوبه نشده و فقط آنتی بادی ثانویه را دریافت کردند به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شدند. تمامی تجربیات حداقل سه بار تکرار شدند. جهت آنالیز داده ها از نرم افزار Instate 3. از روش one-way ANOVA استفاده شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excell ترسیم شدند.

## یافته ها

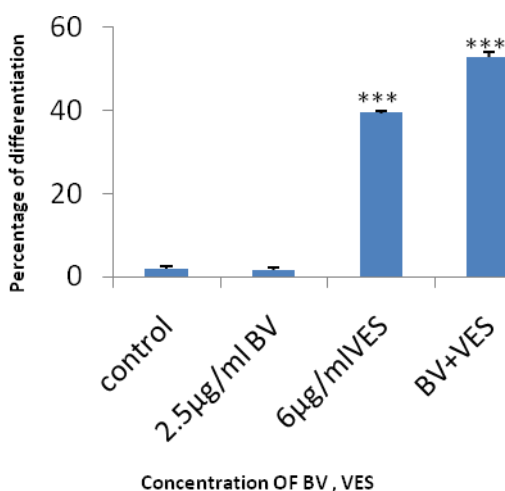
### اثر D-آلفا توکوفرول سوکسینات بر تمایز سلولهای HL-60

بررسی های اولیه که بر اساس تغییرات مورفولوژیکی از طریق رنگ آمیزی رایت گیمسا صورت گرفت ثابت شد که غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیتر D-آلفا توکوفرول سوکسینات توانایی القاء تمایز را در مدت ۵ روز در سلولهای مورد نظر دارد. از تست احیاء NBT به عنوان تایید کننده تمایز سلولی در حضور D-آلفا توکوفرول سوکسینات در مقایسه با نمونه کنترل استفاده شد.

### نتایج حاصل از هم افزایی زهر زنبور عسل و D-آلفا

#### توکوفرول سوکسینات بر تمایز سلول های HL-60

غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر از زهر زنبور به عنوان غلظت مهار تکثیر سلولی (۱۵) و ۶ میکروگرم در میلی لیتر از D-آلفا توکوفرول سوکسینات به عنوان غلظت مهار تکثیر و القاء کننده تمایز انتخاب شد و میزان تمایز سلولها در مدت زمان ۵ روز بررسی شد. (جداول و نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار ۲. درصد سلولهای تمایز یافته در غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل و غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیتر **D-آلفا** توکوفرول سوکسینات به تنهایی و به صورت ترکیب با همدیگر در طول ۵ روز کشت در مقایسه با کنترل بر اساس تست احیاء **NBT**  $P < 0.001$ \*\*\*

### نتایج حاصل از آزمون ایمونوسیتوشیمی

داده های ایمونوسیتوشیمی نشان دادند که زهر زنبور عسل سبب افزایش بیان پروتئین **CD14** در سلولهای بیمار شده با غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیتر **D-آلفا** توکوفرول سوکسینات نسبت به سلول های بیمار شده با غلظت ۶ میکروگرم **D-آلفا** توکوفرول سوکسینات به تنهایی می شود.

### بحث و نتیجه گیری

به منظور بررسی اثر توأم زهر زنبور و **آلفا** توکوفرول سوکسینات بر القاء تمایز سلولهای **HL-60**، سلولها با غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر زهر زنبور و ۶ میکروگرم در میلی لیتر **D-آلفا** توکوفرول سوکسینات تیمار شدند. حضور زهر زنبور موجب افزایش در میزان تمایز القاء شده توسط **آلفا** توکوفرول سوکسینات گردید به طوری که تست احیاء **NBT** و رنگ آمیزی راییت گیمسا تایید کننده این موضوع بودند.

جدول ۱. تعداد سلولهای تمایز یافته در غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل و غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیتر **D-آلفا** توکوفرول سوکسینات به تنهایی و به صورت ترکیب با همدیگر در طول ۵ روز کشت در مقایسه با کنترل بر اساس رنگ آمیزی راییت گیمسا

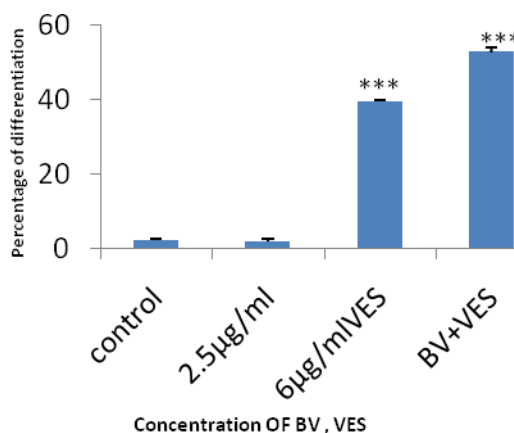
انحراف معیار تخمینانگین	
کنترل	۲±۰/۵۷
۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل	۱/۶۶±۰/۱۶۶
۶ میکروگرم در میلی لیتر <b>D-آلفا</b> توکوفرول سوکسینات	۳۹/۳۳±۰/۳۳***
زهر زنبور + <b>آلفا</b> توکوفرول سوکسینات	۵۲/۶۶±۱/۳۳***

$P < 0.001$ \*\*\*

جدول ۲. تعداد سلولهای تمایز یافته در غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل و غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیتر **D-آلفا** توکوفرول سوکسینات به تنهایی و به صورت ترکیب با همدیگر در طول ۵ روز کشت در مقایسه با کنترل بر اساس تست احیاء **NBT**

انحراف معیار تخمینانگین	
کنترل	۲/۳۳±۰/۱۸۸
۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل	۱/۶۶±۰/۱۶۶
۶ میکروگرم در میلی لیتر <b>D-آلفا</b> توکوفرول سوکسینات	۴۱±۰/۱۸۸***
زهر زنبور عسل + <b>D-آلفا</b> توکوفرول سوکسینات	۵۴/۶۶±۱/۱۵***

$P < 0.001$ \*\*\*



نمودار ۱. درصد سلولهای تمایز یافته در غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل و غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیتر **D-آلفا** توکوفرول سوکسینات به تنهایی و به صورت ترکیب با همدیگر در طول ۵ روز کشت در مقایسه با کنترل بر اساس رنگ آمیزی راییت گیمسا  $P < 0.001$ \*\*\*

شود (۱۷-۱۵). Sokoloski نشان داد که NF-kB، یک فاکتور تنظیم کننده تمایز سلول‌های لوسمی میلوئیدی است و سبب القاء تمایز این سلول‌ها می‌شود (۱۹). همچنین Neuzil و همکاران نشان دادند که توکوفرول سوکسینات سبب فعال سازی پروتئین فسفاتازی می‌شود که این ترکیب منجر به دفسفوریلاسیون و غیر فعال شدن PKC $\alpha$  می‌شود. در نهایت غیر فعال شدن PKC $\alpha$  سبب دفسفوریلاسیون و غیر فعال شدن پروتئین Bcl-2 و فعال شدن پروتئین P21 می‌شود (۲۰).

نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که زهر تکثیر را در رده سلولی HL-60 مهار می‌کند که با تحقیقات انجام گرفته در رابطه با توانایی مهار تکثیر زهر زنبور مطابقت دارد. همچنین Moon و همکاران نشان دادند که زهر زنبور سبب کاهش بیان پروتئین Bcl-2 و افزایش بیان P21 در سلول‌های سرطانی از جمله رده سلولی HL-60 می‌شود (۲۱).

با توجه به اینکه بیان پروتئین P21 در طول تمایز سلول‌های لوسمی به سمت مونوسیت افزایش می‌یابد و همچنین با توجه به یکسان بودن برخی مسیرهای مولکولی دخیل در مهار تکثیر سلولی و القاء مرگ سلولی توسط زهر زنبور و D-آلفا توکوفرول سوکسینات می‌توان بیان نمود که زهر زنبور با مهار فعالیت NF-kB و کاهش بیان COX-2 و Bcl2 و افزایش بیان P21 موجب افزایش اثر مهار تکثیری D-آلفا توکوفرول سوکسینات بر روی سلول‌های سرطانی HL-60 می‌شود (۲۲-۲۰). بنابراین می‌توان پیشنهاد نمود که زهر زنبور با افزایش توان مهار تکثیری D-آلفا توکوفرول سوکسینات توان تمایزی این ترکیب را افزایش می‌دهد.

زهر زنبور عسل احتمالاً از طریق مهار فعالیت NF-kB و COX-2 و افزایش بیان P21 توان تمایزی D-آلفا توکوفرول سوکسینات را افزایش می‌دهد و موجب افزایش توان تمایزی

همچنین مقایسه اثر هم افزایی این دو ماده با اثر منفرد هریک به تنهایی توسط روش ملکولی نشان داد که حضور زهر زنبور توان تمایزی دوزهای پائین و غیر رسمی D-آلفا توکوفرول سوکسینات را افزایش می‌دهد.

با توجه به این که تکثیر سلولی، تمایز سلولی (بلوغ) و مرگ سلولی سه فرایند وابسته به هم هستند. چنانچه بلوغ سلولی رخ دهد، تکثیر می‌تواند تا حد بسیار زیادی در سلول‌ها کاهش یابد (۱۴). تاکنون مطالعات زیادی اثر مواد مختلف همچون رتینوئیک اسید، ویتامین D، DMSO و ... را بر القاء تمایز سلول‌های HL-60 به سمت گرانولوسیت-مونوسیت اثبات نموده‌اند (۱۶). به هر حال مکانیسم‌های مولکولی سیگنالینگ سلولی که طی آنها آلفا توکوفرول سوکسینات سبب مهار تکثیر و القاء تمایز و مرگ سلولی در رده‌های مختلف سلولی می‌شود، به طور واضح مشخص نیست. تاکنون اثر هم‌افزایی زهر زنبور و D-آلفا توکوفرول سوکسینات بر روی هیچ رده سلول سرطانی بررسی نشده است.

مطالعات قبلی نشان داده اند که سلول سرطانی به دلیل دارا بودن PH اسیدی تر نسبت به سلول‌های سالم بدن میزان بیشتری از ویتامین را جذب می‌کند (۱۷). Kozin و همکاران نشان دادند که D-آلفا توکوفرول سوکسینات می‌تواند به طور قوی به صورت وابسته به PH مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی پستان و خون القاء کند. هم چنین نشان دادند که فعالیت پروآپوپتوتیک این ترکیب با کاهش PH افزایش می‌یابد (۱۸).

تحقیقات نشان داده اند که D-آلفا توکوفرول سوکسینات از طریق مهار فعالیت فاکتور هسته‌ای NF-kB (تنظیم کننده بیان بسیاری از ژنها از جمله ژنهای دخیل در تمایز سلول‌های لوسمی میلوئیدی و هدف داروهای ضد سرطان) و COX-2 سبب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌

**D-آلفا** توکوفرول سوکسینات بر روی سلول های **HL-60** به سمت مونوسیت می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه زیست شناسی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی تهران انجام شده لذا

مولفین بر خود لازم می‌دانند از ریاست محترم دانشکده و پرسنل آزمایشگاه سپاسگزاری نمایند. همچنین از دانشگاه علوم پزشکی لرستان که هزینه‌های این طرح تحقیقاتی را تأمین نموده‌اند، صمیمانه سپاسگزاریم.

## References

1. Kitada S, Pedersen I, Schimmer A, Reed J. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* J.2002; 21: 3459-3474.
2. Jean CY, Dick W, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *TRENDS in Cell Biology* J. 2005; 15 (9): 494-501.
3. Gil J, Stembalska A, Pesz K, Sasiadek M. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *App Genet J.* 2008 ; 49 (2): 193-199.
4. Dong S, Geng J, Tong J, Wu Y, Cai J, Sun G, Chen S, Wang Z, Laresen C, Berger R, Chen S, Chen Z. Breakpoint clusters of PML gene in acute promyelocytic leukemia :primary structure of the reciprocal products ofPML-RARA gene in patient with t(15:17)gene Chromosome. *Cancer.*1993 ; 6: 133-139.
5. Chen Z, Wang ZY, Chen SJ. Acute promyelocytic leukemia: Cellular and Molecular basis of differentiation and apoptosis. *Pharmacol Ther* 1997; 76: 141-149.
6. Burnett AK, Eden OB. The treatment of acute leukemi. *Lancet* .1997; 349: 270-275.
7. Sharon J, Williams M, Newland A, Colston K. Leukemia Cell Differentiation: Cellular and Molecular Interactions of Retinoids and Vitamin D. *General Pharmacology J.* 1999; 32(1):143-154.
8. Kedar N, Kumar B, Yan XD, Amy J. Hanson. MS, William C.  $\alpha$ -Tocopheryl succinate , the most Effective from of Vitamin E for Adjuvante Cancer Treatment :A Review.2003; 22(2): 108-117.
9. Kline K, Yu w, Sanders BG. Vitamin E :mechanisms of action as tumor cell growth inhibitors. *J Nutr* .2001 ; 131: 161S -163S.
10. Alexander G, Suttic J. The effect of vitamin E on vitamin K activity. *FASEB J.* 1999; 13:A535.
11. Gallaghe R, Collins r, Trujillo SJ, KAhearn. M, Tsai S, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood J.* 1979; 54: 713-733.
12. 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. *Pharmacology & Therapeutics J.* 2007; 115:246-270.
13. Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, et al. Phospholipase A2-independent Ca<sup>2+</sup> entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. *Life Science.* 2007; 80(4): 364-369.
14. Koeffler HP, Golde DW. Human Myeloid Leukemia Cell Lines. *Blood J.* 1980; 56:344-350.
15. Mohseni kuchesfahani H, Parivar K, Nabiuni M, Rahimi M. Synergistic Effect of Honey Bee Venom and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on the Induction of HL-60 Promyelocytic Leukemia Cell Line Differentiation. *Scientific journal of scinces hamedan of university medical* .1388;4:5-12.
16. Crispin PL, Uzzo RG, Golovine K, et al. Vitamin E succinate inhibitis NF -kappaB and prevents the development of metastatic phenotype in prostate cancer calls :implication

- for chemoprevention. *Prostate*. 2007 ;67 :582-590.
17. Miller C, Koffler PH. The molecular biology of differentiation and proliferation using human myelogenous leukemia cells. *Bio Essays J*. 1986.;5 (1): 18-21.
  18. Kozin SV, Shkarin P, Gerweck LE. The cell transmembrane PH gradient in tumors enhances cytotoxicity of specific weak acid chemotherapeutics. *Cancer Res*. 2001; 61 : 4740-4743.
  19. Sokoloski J, Hodnick W, Mayne S, Cinquina C, KimC, Sartorelli A. Induction of the Differentiation of HL-60 Promyelocytic Leukemia Cells By Vitamin E and Other Antioxidants In Combination With Low Levels of Vitamin D3. *Leukemia J*. 1997;11: 1546-1553.
  20. Neuzil J, Weber T, Gellert N, et al. Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate. *Br J Cancer*.2001 ;84 :87-89.
  21. Moon DO, Park SY, Heo MS, Kim KC, Park C, Ko W, Chio YH, Kim GY. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int Immunopharmacol J*. 2006; 6 (12): 1796-1807.
  22. Lee JK, Jung JC, Chun JS, Kang SS, Bang OS. Expression of 21 Is Dependent on the Activation of ERK during Vitamin E – Succinate –induced Monocytic Differentiation. *Molecules and Cells*. 2001 ;13:125.
  23. Son DJ, Ha SJ, Song HS, Lim Y, Yun YP, Lee JW, et al. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappa B and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *Pharmacol Experimental Therapeutics J*. 2006; 317 :627-634.