اثر زهر زنبور عسل برروی قدرت تمایزیD- آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) در رده سلول سرطانی حاد پرومیلوسیت HL-60

محمد نبیونی[۱و۲]، اعظم یاراحمدی[۳]، بهرام دلفان[۴]

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 می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده‌اندکه ویتامین E سبب مهار تکثیر و القاء تمایز سلول‌های HL-60 به سمت مونوسیت می‌شود. با توجه به اینکه استفاده از غلظت‌های بالای ویتامین E دارای اثرات جانبی بوده و استفاده از این غلظت‌ها جهت القاء تمایز امکان پذیر نیست، لذا سعی می‌شود با استفاده از ترکیبات که دارای خاصیت ضد تکثیری بر روی سلول‌ها هستند، توان تمایزی آن را افزایش داد. از آنجایی‌که اثرات ضد تکثیری زهر زنبور عسل بر روی رده های سلولی گوناگون اثبات شده است، در این مطالعه اثر آن برعملکرد تمایزی ویتامین E بررسی شد.

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

یافته‌ها: نتایج نشان داد که زهر زنبور عسل در غلظت‌های غیرسمی(۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) می‌تواند توان تمایزی ویتامین E را افزایش دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه زهر زنبور به تنهایی بر روی سلول‌هایHL-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 می‌تواند 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.

واژه‌های کلیدی: رده سلولی سرطانی حاد پرومیلوسیت، زهر زنبور عسل، ویتامینE، تمایزدرمانی.

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه خوارزمی، گروه علوم سلولی مولکولی
پست الکترونیک: nabiuni@tmu.ac.ir

مقدمه

در تعداد معدودی ازسرطان ها، سلول های سرطانی در مراحل اولیه رشد خود باقی مانده اند و مکانیسم کنترل رشد و تقسیم سلولی و تمایزرا ازدست داده اند وفاقد 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 ازسرطانها شناسایی شده‌اند (۲). از مهمترین ویژگیهای این سلولها می توان به خودنوسازی و دارا بودن پتانسیل القاء تمایزتوسط 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 (۱۵:۱۷) است (۴) که این جابجایی منجر به اتصال ژن رسپتور رتینوئیک اسید RARα (cr17) به ژن PML (cr15) شده و باعث ایجاد یک پروتئین مرکب تحت عنوان PML-RARα می‌شود. هترودایمری 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-α) 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 در درمان سرطان شیمی درمانی می‌باشد، اما به دلیل غیرانتخابی بودن داروهای شیمی درمانی (۵،۶) 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 اینترکولین۶ به سمت مونوسیت و گرانولوسیت تمایز دهد (۷).

درسال‌های اخیرتحقیقات 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 ویتامینK 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 ازخون جنب یک زن قفقازی بیمار گرفته شده است. این سلولها دارای سیتوپلاسم بازوفیلی نسبت هسته به سیتوپلاسم تقریباً ۲ به ۱ و دارای۴-۲ هستک هستند (۱۱). مطالعات قبلی نشان می دهد که D- آلفا توکوفرول سوکسینات (ویتامینE) دارای اثر مهار تکثیر و القاء تمایز و بر رده سلولی HL-60 می باشد (۱۲). اما به دلیل اثرات جانبی غلطتهای بالای آن دست یابی به ترکیبی که بتواند توانایی غلظت های پائین ویتامین را در مهار تکثیر والقاء 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 زنبورعسل 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 ۲۰٪ FBS (Gibco) و ۱۰۰ U/ml پنی سیلین (Gibco) و µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین (Gibco) در فشار CO2 ۵٪ و دمای ۳۷ درجه در فلاسک cm^3 ۲۵ 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 در۴ درجه نگه داری شد. به منظور بررسی اثر زهر زنبور عسل و آلفاتوکوفرول سوکسینات برروی 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 آنتیژن CD14 توسط ایمونوسیتوشیمی، پس از کشت و تیمارسلولها به مدت ۵ روز، سلولهای توسط پلی‌لایزین چسبانده شدند و سپس سلولها توسط PBS شسته و در دمای۴ 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 (رقت ۱/۱۰۰) به مدت۱ 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 رنگ‌آمیزی هسته، سلولها توسط رنگ DAPI به مدت ۱ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و پس از شستشو توسط PBS توسط میکروسکوپ فلوئورسنت بررسی شد. سلولهای کنترل که با آنتی‌بادی اولیه انکوبه نشده و فقط آنتی‌بادی ثانویه را دریافت کردند به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شدند. تمامی تجربیات حداقل سه بار تکرار شدند. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Instate 3، از روش one-way ANOVA استفاده شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excell ترسیم شدند.

یافته‌ها

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 میلی‌گرم در میلی لیتر از زهر زنبور به عنوان غلطت مهار تکثیر سلولی (۱۵) و۶ 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).

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 رایت گیمسا

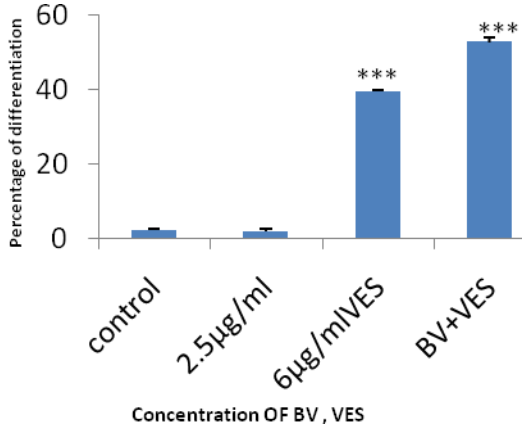
	انحراف معیار±میانگین
کنترل	۲±۰/۵۷
۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل	۱/۶۶±.۰/۶۶
۶ میکروگرم در نیلی لیتر آلفا توکوفرول سوکسینات	۳۹/۳۳±۰/۳۳***
زهر زنبور + الفا توکوفرول سوکسینات	۵۲/۶۶±۱/۳۳***

P <۰/۰۰۱***

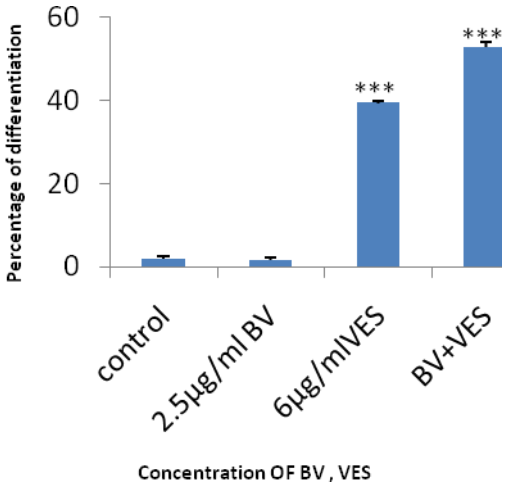
جدول ۲. تعداد سلولهای تمایز یافته در غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل و غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیترD- آلفا توکوفرول سوکسینات به تنهایی و به صورت ترکیب با همدیگر در طول ۵روز کشت در مقایسه با کنترل بر اساس تست احیاء NBT

	انحراف معیار±میانگین
کنترل	۲/۳۳±۰/۸۸
۲/۵ میکروگرم در میلی لیترزهر زنبور عسل	۱/۶۶±۰/۶۶
۶ میکروگرم در میلی لیتر آلفاتوکوفرول سوکسینات	۴۱±۰/۸۸***
زهر زنبور عسل+آلفاتوکوفرول سوکسینات	۵۴/۶۶±۱/۱۵***

P <۰/۰۰۱***



نمودار۱. درصد سلولهای تمایز یافته در غلظت ۲/۵میکروگرم در میلی لیتر زهر زنبور عسل و غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیترD- آلفا توکوفرول سوکسینات به تنهایی و به صورت ترکیب با همدیگر در طول ۵ روز کشت در مقایسه با کنترل بر اساس رنگ آمیزی رایت گیمسا ***P <۰/۰۰۱



نمودار۲. 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 ۵روز کشت در مقایسه با کنترل بر اساس تست احیاء NBT ***P <۰/۰۰۱

نتایج حاصل از آزمون ایمونوسیتوشیمی

داده های ایمونوسیتوشیمی نشان دادند که زهر زنبور عسل سبب افزایش بیان پروتئین CD14 در سلولهای تیمار شده با غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیتر D- آلفا توکوفرول سوکسینات نسبت به سلول های تیمار 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 درمیلی 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 رایت گیمسا تایید کننده این موضوع بودند.

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 غیرسمی D- آلفا توکوفرول سوکسینات را افزایش می دهد.

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 تووفرول 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 بروی هیچ رده سلول سرطانی بررسی نشده است.

مطالعات قبلی نشان داده اند که سلول سرطانی به دلیل دارا بودن PH اسیدی‌تر نسبت به سلولهای سالم بدن میزان بیشتری از ویتامین را جذب می‌کند (۱۷). Kozin و همکاران نشان دادند که D- آلفا توکوفرول سوکسینات می تواند 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 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 می شود که این ترکیب منجر به دفسفوریلاسیون و غیر فعال شدن PKCα می شود. در نهایت غیر فعال شدن PKCα سبب دفسفوریلاسیون و غیر فعال شدن پروتئین Bcl-2 و فعال شدن پروتئین P21 می شود (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 درسلول های 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 فعالیتNF-kB و کاهش بیان COX-2 و Bcl2 و افزایش بیان P21 موجب افزایش اثر مهار تکثیری D- آلفا توکوفرول سوکسینات برروی 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 می دهد.

زهر زنبور عسل احتمالاً از طریق مهارفعالیتNF-kB و COX-2 و افزایش بیان P21 توان تمایزی D-آلفا توکوفرول سوکسینات را افزایش می دهد و موجب افزایش توان تمایزی

D- آلفا توکوفرول سوکسینات برروی 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 برخود لازم می دانند از ریاست محترم دانشکده و پرسنل آزمایشگاه سپاسگزاری نمایند. همچنین از دانشگاه علوم پزشکی لرستان که هزینه‌های این طرح تحقیقاتی را تآمین نموده اند، 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 differentation 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. α-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 Ca2+ 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. Crispen 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 transmembrance 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.