

Avances en la regulación de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, tanto normales como leucémicas, por la caseína y sus componentes

Edelmiro Santiago-Osorio,* Edgar Ledesma-Martínez,** Benny Weiss-Steider,* Laura Muñoz-Galindo,* Vanihamín Domínguez-Meléndez,*** Itzen Aguiñiga-Sánchez,* Yolanda Córdova-Galaviz,* Leticia Moreno-Fierros,† Reynaldo Tiburcio-Félix*

RESUMEN

Se sabe que la hematopoyesis es regulada por diversas citocinas endógenas; sin embargo, recientemente se ha encontrado que otras moléculas exógenas pueden coparticipar en dicha actividad. En este trabajo se analizan los avances del conocimiento de la regulación de la proliferación y diferenciación por la caseína en líneas celulares mieloides tanto normales como leucémicas y en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón. Presentamos datos que indican que la caseína, sus subunidades y algunos de los péptidos bioactivos que la constituyen, tienen la propiedad de inhibir la proliferación de líneas de células leucémicas *in vitro*, así como de inducir su diferenciación. La caseína, por otro lado, favorece la proliferación de células hematopoyéticas normales tanto *in vitro* como *in vivo*; su administración promueve, incluso, la sobrevivencia en modelos de leucemia en ratón.

Palabras clave: Regulación de la hematopoyesis, caseína, biopéptidos, líneas leucémicas, sobrevivencia en un modelo de leucemia en ratón.

ABSTRACT

It is known that hematopoiesis is regulated by endogenous cytokines, however it has been recently found that other exogenous molecules can co-participate in this activity. This paper reviews the advances in the knowledge of the mechanisms involved in the regulation of the proliferation and differentiation of myeloid leukaemia cell lines and of normal mice mononuclear bone marrow cells by casein. We present evidence that casein, its subunits, as well as some of the bioactive peptides that it contains have the property of inhibiting the proliferation and to induce differentiation of leukemic cell lines *in vitro*. On the other hand, casein induces proliferation of normal hematopoietic cells *in vitro* and *in vivo*, and its administration promotes survival in a model of leukaemia in mice.

Key words: Regulation of hematopoiesis, casein, biopeptides, leukemic cell lines, survival in a model of leukaemia in mice

* Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, UIDCC, FES-Zaragoza, UNAM.

** Becario CONACYT.

† Laboratorio de Inmunidad en Mucosas, UBIMED, FES-Iztacala, UNAM.

Correspondencia. Benny Weiss-Steider, Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, UIDCC, FES-Zaragoza, UNAM. Batalla 5 de Mayo S/N, esq. Fuerte de Loreto. Ejercito de Oriente, 09230 Iztapalapa, Distrito Federal, México.

Recibido: julio, 2010. Aceptado: septiembre, 2010.

Este artículo debe citarse como: Santiago-Osorio E, Ledesma-Martínez E, Weiss-Steider B, Muñoz-Galindo L y cols. Avances en la regulación de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, tanto normales como leucémicas, por la caseína y sus componentes. Rev Hematol Mex 2010;11(4):193-198.

En condiciones normales la hematopoyesis es controlada por diversas citocinas,¹⁻³ sin embargo, existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta a éstas que también pueden llegar a modular la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas. Un ejemplo es el ácido retinoico (ATRA), que sin ser una citocina induce la diferenciación de blastos, tanto normales como leucémicos, a células del linaje granulocítico,^{4,5} propiedad que hoy se emplea con gran éxito en la terapia contra la leucemia promielocítica aguda.⁴ En varias publicaciones se ha sugerido que la caseína, o que algunos de sus componentes, producto de su digestión enzimática, pudiera también ser una biomolécula reguladora de la

hematopoyesis más allá del aporte de aminoácidos para la dieta humana.^{6,7} En este sentido llama la atención que recientemente se ha publicado que infantes que fueron amamantados presentaron una baja significativa en la frecuencia de desarrollo de leucemia en comparación con aquellos que no lo fueron,⁸ lo cual hace pensar que a través de la leche materna se transmiten algunos factores que pudieran prevenir el desarrollo de esta enfermedad.⁹ A este respecto mencionaremos que se ha encontrado que las subunidades alfa, beta y kappa-caseína, constituyentes de la caseína, contienen un número importante de péptidos bioactivos. Entre éstos se encuentran las casomorfina y las casoxinas.¹⁰⁻¹⁴ Por ejemplo, para la casoxina C, que es un decapeptido fragmento 25-34 liberado en la digestión enzimática de la kappa caseína y con actividad antagonista opioide, existen receptores en las células mieloides, tanto normales como de origen leucémico;^{14,15} además de que puede participar activamente en procesos inflamatorios, hasta se le ha considerado un homólogo del componente "a" del complemento C3 (C3a).¹⁶ Como también se ha encontrado que las células mieloides presentan receptores para las caseínas y para algunos otros péptidos bioactivos provenientes de éstas¹⁷ consideramos probable que este grupo de moléculas y péptidos puedan incidir en la regulación de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas normales, así como también en aquellas de origen leucémico; por tanto, podrían tener alguna aplicación terapéutica.

En este trabajo se revisa el efecto de la caseína y de algunos de sus componentes en la modulación de la proliferación y diferenciación, *in vitro*, de células hematopoyéticas, tanto normales como de origen leucémico; así como su papel en la sobrevivencia de ratones en un modelo de leucemia en ratón.

La caseína, sus subunidades y péptidos bioactivos modulan la proliferación y diferenciación de líneas celulares y de células normales hematopoyéticas de ratón *in vitro*

La caseína es la principal proteína de la leche integrada por 3 subunidades; alfa, beta y kappa-caseína. Además, tiene en su forma de sal (caseinato de sodio: CasNa) una importante aplicación en la industria alimentaria.^{18,19} Desde hace algunos años se tiene evidencia de que componentes de esta molécula (la beta-caseína) activan la producción de radicales libres en granulocitos e inducen la proliferación

de linfocitos de carnero *in vitro*¹⁰ y también de linfocitos T de pacientes con diabetes tipo 1 y 2.¹¹ Estudios de nuestro laboratorio permiten mostrar que la caseína, en su presentación como CasNa, acelera la diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares,²⁰ además de reducir la proliferación e inducir la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en la línea de células hematopoyéticas 32D en presencia de IL-3.²¹ Posteriormente encontramos que el efecto inhibitorio no estaba restringido solamente a una línea celular dependiente de factores de crecimiento, sino que también bloqueaba la proliferación, en forma dosis dependiente, de líneas leucémicas de ratón como WEHI-3, J774 y P388.²²

Con la finalidad de determinar la subunidad de la caseína responsable de la inhibición de la proliferación e inducción de diferenciación de la línea leucémica WEHI 3 se cultivaron éstas en presencia de alfa, beta y kappa-caseína. Encontramos que la principal molécula inhibidora era la kappa caseína aunque, por otro lado, con un potencial de inducción a la diferenciación similar a la mostrada por alfa y beta-caseína.²²

Se ha publicado que las caseínas liberan diversos péptidos biológicamente activos como producto de su degradación enzimática y funcionan como hematomoduladores, antitrombóticos, antitumorales, antimicrobiales, inmunomoduladores, agonistas y antagonistas opioides.^{12,13,23-26} Algunos péptidos derivados de la kappa caseína han sido ampliamente estudiados, como la casoxina C, un decapeptido fragmento 25-34, antagonista opioide que también ha mostrado ser un compuesto con importantes funciones hematopoyéticas. Además, este péptido presenta cierta homología con el componente C3a de la cadena del complemento, por lo que se le ha asociado con actividades biológicas análogas.¹⁶

Con la finalidad de explorar si las casoxinas podrían regular la proliferación y diferenciación de células mieloides leucémicas se evaluó si la casoxina A y la casoxina C presentaban algún efecto antiproliferativo en la línea WEHI-3. Encontramos que sólo la casoxina C presentó un efecto inhibitorio significativo de su proliferación (Figura 1) mientras que, por otro lado, ambas casoxinas indujeron la diferenciación hacia el linaje granulocítico pero en menor proporción que la molécula de caseína completa (Figura 2). Estos resultados sugieren que no todos los péptidos tienen el mismo efecto biológico y que además pudieran existir efectos complementarios de

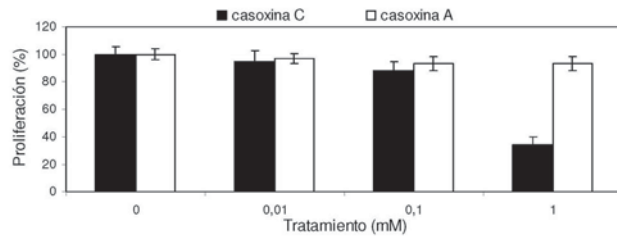


Figura 1. Porcentaje de proliferación de la línea de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3 en presencia de péptidos de kappa caseína fragmentos 25-34 (casoxina c) y 58-62 (casoxina a).

varios de éstos que, en forma conjunta, pudieran inducir el efecto observado con la molécula completa. Es interesante mencionar que se han identificado varios de estos péptidos productos de la digestión de la caseína que cruzan hacia el torrente sanguíneo.²⁷ Esta diversidad de propiedades de biopéptidos encontradas en una línea mieloide se conservan incluso cuando se emplean las subunidades completas de caseína ya que, por ejemplo, encontramos que aunque la alfa y beta caseína inducen la diferenciación hacia el linaje monocítico-macrofágico en células 32D, sólo la alfa caseína presentó la capacidad de inducir la expresión de

la proteína M-CSF en estas células.²² Sorprendentemente encontramos también que la caseína, en comparación con sus unidades constituyentes, ejerce una actividad biológica más completa, ya que además de inhibir la proliferación de líneas celulares e inducir su diferenciación, también fue la única con capacidad de promover la expresión de receptores de M-CSF e inducir la secreción de niveles más altos de este factor de crecimiento.²² Lo anterior sugiere que la caseína puede ejercer un importante efecto biológico en células hematopoyéticas, ya sea como molécula completa o a través de sus subunidades, o por los péptidos bioactivos que contiene. Por otro lado nuestro grupo ha encontrado recientemente que la caseína, además de inhibir la proliferación de manera sostenida hasta las 120 horas de cultivo en las líneas WEHI-3, J774 y 32D, disminuye también de manera significativa la viabilidad celular (Figura 3), lo cual indica que la caseína es citostática y citotóxica para estas líneas celulares. Es de llamar la atención que en las mismas condiciones de cultivo, pero empleando células mononucleadas de médula ósea normal de ratón en presencia de IL-3, encontramos que esta molécula no las inhibe sino que, por el contrario, induce

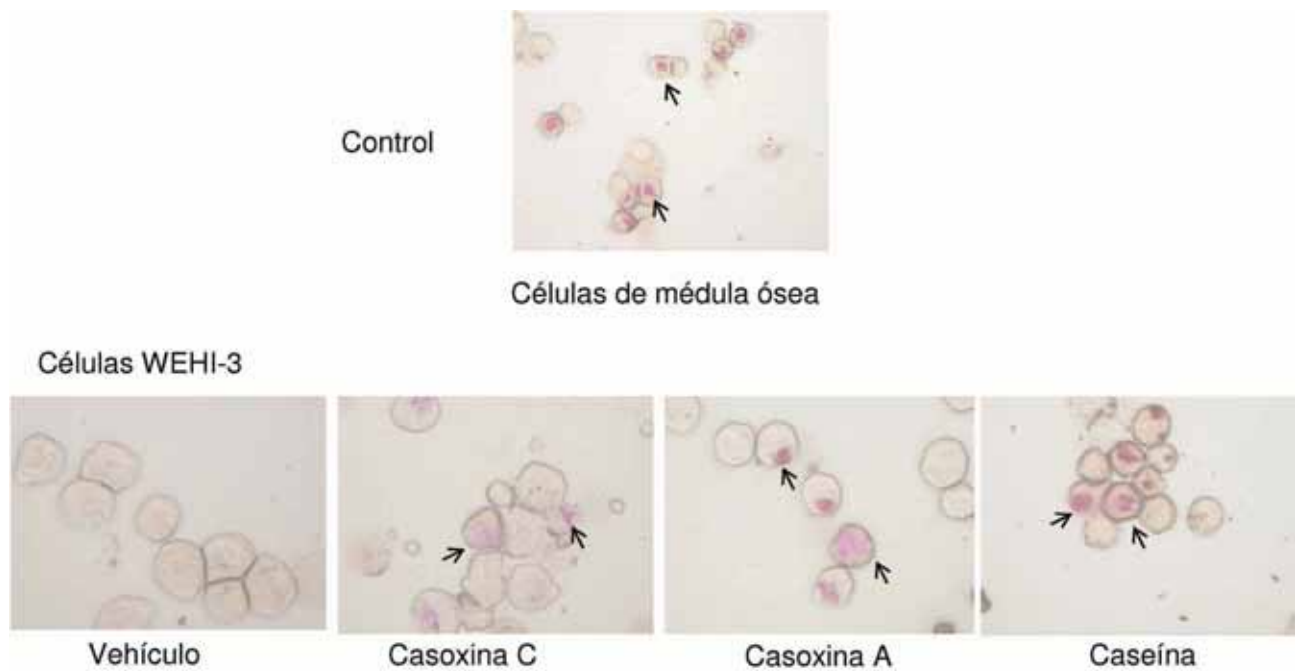


Figura 2. Tinción citoquímica en la línea de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3 (400X). Tinción con cloroacetato esterasa específica para el linaje granulocítico en presencia de péptidos de kappa caseína fragmentos 25-34 (casoxina c) y 58-62 (casoxina a) y caseína, empleando como control células de médula ósea de ratón. ↑ granulocito.

su proliferación al aumentar el número de células vivas en más de 80% respecto al cultivo con sólo IL-3 (Figura 3). Creemos interesante este hallazgo en donde, por un lado, la caseína resulta ser citotóxica para las células leucémicas y, por el otro, es promotora de la proliferación mieloide normal; consideramos pertinente continuar con el estudio de la caseína y de la posible existencia de péptidos con actividad biológica contenidos en ésta (además de los descritos actualmente) que pudieran tener un efecto en la hematopoyesis y su posible aplicación terapéutica.

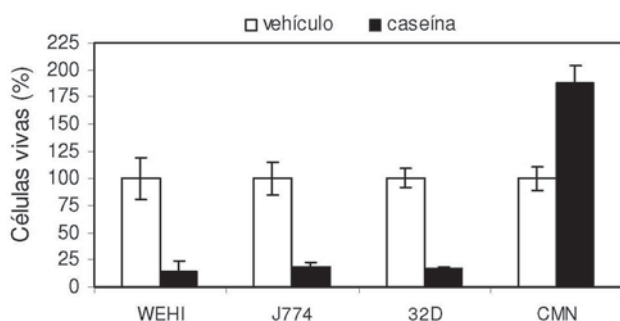


Figura 3. Porcentaje de células vivas, después de 120 h de cultivo en ausencia (vehículo) o presencia de caseína, de diferentes líneas celulares mieloides normal (32D) y leucémicas (WEHI-3, J774) y células mononucleadas de médula ósea normal de ratón con IL-3 (CMN).

La administración de caseína promueve la hematopoyesis normal *in vivo*

Los estudios del efecto de la caseína en la hematopoyesis *in vivo* son limitados. Por ejemplo, se ha mostrado que la inyección intraperitoneal de CasNa, además de inducir quimiotaxis de granulocitos y monocitos,^{28,29} favorece la acumulación de células progenitoras mieloides en la médula ósea de ratón,³⁰ indispensable en el desarrollo del sistema inmunitario de mucosas de ratones neonatos;³¹ además, se sabe que su eliminación en la dieta reduce la producción de leucocitos, mientras que su adición elimina la mielosupresión.⁶ En este sentido, se conoce que una dieta privada de proteínas y sólo suplementada con caseína muestra un nivel normal de células hematopoyéticas.³² Por otro lado, también se ha mostrado que a pesar de la presencia de aminoácidos la eliminación de caseína de la dieta conduce a una producción deficiente de eritropoyetina (EPO) y, en consecuencia, a una reducción en la eritropoyesis.⁶ En este sentido, nuestro grupo encontró que la inyección intraperitoneal de caseína a ratones BALB/c

promueve también un incremento en la incorporación de BrdU, detectada por citometría de flujo, en las células mononucleadas de médula ósea, lo cual es un indicativo de proliferación mieloide (Figura 4).

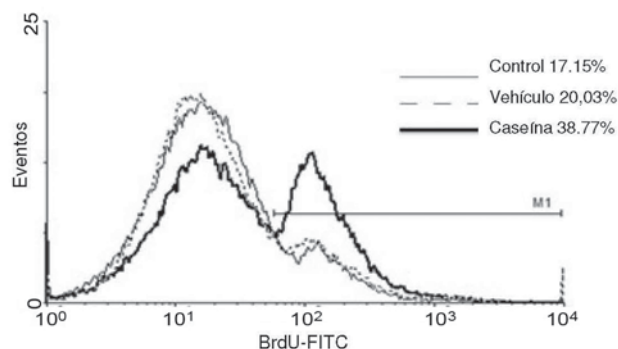


Figura 4. Proliferación mieloide evaluada por incorporación de BrdU, en células mononucleadas de médula ósea provenientes de ratones sin tratamiento (control) o tratados con vehículo o caseína.

La administración de caseína incrementa significativamente la sobrevivencia de ratones inyectados intraperitonealmente con células leucémicas WEHI-3

Dentro de los modelos de leucemia *in vivo* empleados en la actualidad la inoculación intraperitoneal de la línea celular WEHI-3 a ratones BALB/c está bien establecida y de hecho es considerada como un buen sistema para el estudio de compuestos con posible acción antileucémica, como lo ya publicado para ATRA, aclacinomicina A, IL-6, G-CSF y vitamina D3.³³⁻³⁸

Bajo nuestras condiciones experimentales, observamos que, de manera reproducible, podíamos utilizar a las células WEHI-3 para inducir en el ratón BALB/c esplenomegalia, hepatomegalia, además del desarrollo de tumores sólidos semejante a lo ya publicado³⁹⁻⁴² y que de manera invariable conducían a la muerte. Con base en lo anterior, y para evaluar el posible papel de la caseína en la sobrevivencia de estos ratones, inoculamos intraperitonealmente células leucémicas WEHI-3 en ratones BALB/c y posteriormente administramos, por la misma vía, ya sea caseína, lipopolisacárido (LPS) como control proinflamatorio, sólo vehículo (PBS) como control positivo de formación de tumores o sólo caseína sin células leucémicas como control negativo, después de lo cual evaluamos la inducción de tumores sólidos y la sobrevivencia de los animales.

Los resultados muestran que únicamente el tratamiento con caseína evita la muerte de más de 30% de ratones ($n=15$) inoculados con células WEHI-3, sin evidencia de formación de tumores en los ratones sobrevivientes hasta por 4 meses de seguimiento (Figura 5). En contraste, todos aquellos inoculados con el mismo número de células leucémicas y que recibieron tratamiento con sólo LPS o PBS, desarrollaron tumores y fallecieron a los 2 meses. Los ratones que fueron solamente inoculados con caseína presentaron una supervivencia de 100%.

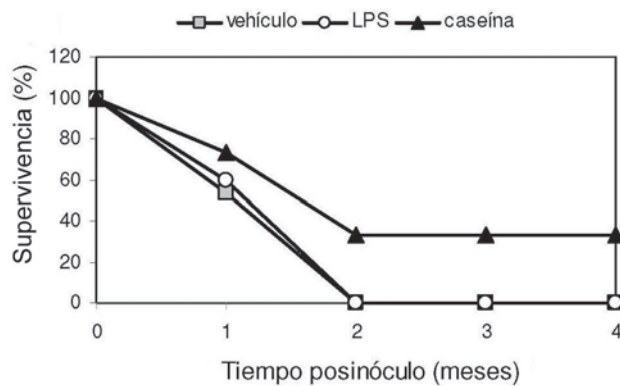


Figura 5. Porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c inoculados con una dosis letal de células WEHI-3 (2.5×10^5 células) y además tratados con vehículo (PBS), lipopolisacárido (LPS) o caseína.

El hecho de que la caseína haya favorecido la supervivencia de ratones inoculados con células leucémicas abre la posibilidad de considerar a esta molécula como candidato terapéutico. Además, sería interesante estudiar aquellos componentes que pudieran ser los responsables de dicha actividad y conocer si existe algún péptido capaz de cruzar hacia el torrente sanguíneo para su posible aplicación tanto profiláctica como terapéutica en leucemias.

CONCLUSIONES

La caseína, la principal proteína de la leche, sus subunidades, así como algunos de los biopéptidos que la constituyen inhiben la proliferación de líneas de células leucémicas de ratón *in vitro* y, en las mismas condiciones, la caseína induce la proliferación de células de médula ósea normal. La administración de caseína *in vivo* promueve la proliferación de células de médula ósea y, por lo tanto, promueve la hematopoyesis medular. Además, su inyección en ra-

tones inoculados con dosis letales de células leucémicas promueve la supervivencia en comparación con los ratones control, característica que la perfila como una molécula con posible aplicación en neoplasias hematológicas, sin olvidar el estudio de los componentes bioactivos que contiene.

Agradecimientos

Se agradece al Sr. Javier Rivera Rosales por su asistencia técnica. La realización de este trabajo fue apoyado en parte por PAPIIT (IN217407, IN225610), UNAM y CONACYT (104025, 104232).

REFERENCIAS

1. Socolovsky M, Constantinescu SN, Bergelson S, Sirotkin A, Lodish H. Cytokines in hematopoiesis: specificity and redundancy in receptor function. *Adv Protein Chem* 1998;52:141-198.
2. Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol* 1999;27:1113-1123.
3. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 2006; 354:2034-2045.
4. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol* 2001;38:13-25.
5. Dawson MI, Elstner E, Kizaki M, Chen DL, Pakkala S, Kerner B, *et al.* Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway. *Blood* 1994;84:446-452.
6. Okano M, Ohnata H, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursors cells. *J Nutr* 1992;122:1376-1383.
7. Cross ML, Gill HS. Immunomodulatory properties of milk. *Br J Nutr* 2000; 84:(Suppl 1): S81-S89.
8. Shu XO, Linet MS, Steinbuch M, Wen WQ, Buckley JD, Neglia JP, *et al.* Breast-feeding and risk of childhood acute leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1765-1772.
9. Martin RM, Gunnell D, Owen CG, Smith GD. Breast-feeding and childhood cancer: A systematic review with metaanalysis. *Int J Cancer* 2005;117:1020-1031.
10. Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune responses by bovine beta-casein. *Immunol Cell Biol* 1996;74:323-329.
11. Cavallo MG, Fava D, Monetini L, Barone F, Pozzilli P. Cell-mediated immune response to beta-casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* 1996;348:926-928.
12. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin PM, Castanas E. Antiproliferative and receptor binding properties of alpha- and beta-casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* 1996;310:217-223.
13. Zucht HD, Raida M, Adermann K, Magert HJ, Forssmann WG. Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett* 1995;372:185-188.

14. Read LC, Lord AP, Brantl V, Koch G. Absorption of beta-casomorphins from autoperfused lamb and piglet small intestine. *Am J Physiol* 1990;259(3 Pt 1):443-452.
15. Jinsmaa Y, Yoshikawa M. Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. *Peptides* 1999;20:957-962.
16. Takahashi M, Moriguchi S, Suganuma H, Shiota A, Tani F, Usui H, *et al.* Identification of casoxin C, an ileum-contracting peptide derived from bovine k-casein, as an agonist for C3a receptors. *Peptides* 1997;18:329-336.
17. Lewis SL, Van Epps DE. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation* 1983;7:363-375.
18. Walstra P, Jenness R. Dairy chemistry and physics. New York: John Wiley and Sons, 1984; pp:467.
19. Warner JN. Principios de la tecnología de lácteos. México: AGT editor, 1979; pp:256.
20. Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martínez I, Ramos-Mandujano G, *et al.* Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology* 2010;215:332-339.
21. Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces expression and secretion of murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. *Arch Med Res* 2004;35:109-113.
22. Ramos-Mandujano G, Weiss-Steider B, Melo B, Córdova Y, Ledesma-Martínez E, Bustos S, *et al.* Alpha-, beta- and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology* 2008;213:133-141.
23. Jollès P, Lévy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillessen D, Thomaidis A, *et al.* Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *Eur J Biochem* 1986;158:379-382.
24. Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin P, Castanas E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr- Val-Pro-Phe-Pro) derived from human alpha S1 casein (alpha S1-casomorphin, and alpha S1-casomorphin amide). *Biochem J* 1996;319 (Pt 3):903-908.
25. Heddleson RA, Park O, Allen JC. Immunogenicity of casein phosphopeptides derived from tryptic hydrolysis of beta-casein. *J Dairy Sci* 1997;80:1971-1976.
26. Chiba H, Tani F, Yoshikawa M. Opioid antagonist peptides derived from kappa-casein. *J Dairy Res* 1989;56:363-366.
27. Chabance B, Marteau P, Rambaud J, Migliore D, Boynard M, Perrotin P, *et al.* Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 1998;80:155-165.
28. Lotem J, Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer* 1985;35:93-100.
29. Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S, Di Rago L. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 1996;88:3755-3764.
30. Liebermann DA, Hoffman-Liebermann B. Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade. *Oncogene* 1989;4:583-592.
31. Menezes JS, Mucida DS, Cara DC, Alvarez-Leite JI, Russo M, Vaz NM, *et al.* Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol* 2003;3:447-455.
32. Aschkenasy A. Comparative effects of casein and various mixtures of amino-acids on the restoration of erythropoiesis, neutropoiesis and lymphopoiesis in rats prepared by a prolonged protein. *New studies. Arch Sci Physiol* 1971;25:415-430.
33. He Q, Na X. The effects and mechanisms of a novel 2-aminosteroid on murine WEHI-3B leukemia cells in vitro and *in vivo*. *Leuk Res* 2001;25:455-461.
34. Gamba-Vitalo C, Blair OC, Keyes SR, Sartorelli AC. Differentiation of WEHI-3B D+ monomyelocytic leukemia cells by retinoic acid and aclacinomycin A. *Cancer Res* 1986;46:1189-1194.
35. Burgess AW, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer* 1980;26:647-654.
36. Li J, Sartorelli AC. Synergistic induction of the differentiation of WEHI-3B D+ myelomonocytic leukemia cells by retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Leuk Res* 1992;16:571-576.
37. Shabtay A, Sharabani H, Barvish Z, Kafka M, Amichay D, Levy J, *et al.* Synergistic antileukemic activity of carnosic acid-rich rosemary extract and the 19-nor Gemini vitamin D analogue in mouse model of systemic acute myeloid leukemia. *Oncology* 2008;75:203-214.
38. Yu FS, Wu CC, Chen CT, Huang SP, Yang JS, Hsu YM, *et al.* Diallyl sulfide inhibits murine WEHI-3 leukemia cells in BALB/c mice in vitro and in vivo. *Hum Exp Toxicol* 2009;28:785-790.
39. Tsou MF, Peng CT, Shih MC, Yang JS, Lu CC, Chiang JH, *et al.* Benzyl isothiocyanate inhibits murine WEHI-3 leukemia cells in vitro and promotes phagocytosis in BALB/c mice in vivo. *Leuk Res* 2009;33:1505-1511.
40. Su CC, Yang JS, Lin SY, Lu HF, Lin SS, Chang YH, *et al.* Curcumin inhibits WEHI-3 leukemia cells in BALB/c mice in vivo. *In Vivo* 2008;22:63-68.
41. Lu HF, Liu JY, Hsueh SC, Yang YY, Yang JS, Tan TW, *et al.* (-)-Menthol inhibits WEHI-3 leukemia cells in vitro and in vivo. *In Vivo* 2007;21:285-289.
42. Yang JS, Kok LF, Lin YH, Kuo TC, Yang JL, Lin CC, *et al.* Diallyl disulfide inhibits WEHI-3 leukemia cells in vivo. *Anticancer Res* 2006;26:219-225.