



감귤 내 생리활성성분이 간암세포의 생존에 미치는 영향

김수정¹, 박덕배^{2,*}

제주대학교 의학전문대학원 ¹의학과, ²조직학교실

Effect of active ingredients in the *Citrus* fruits on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by Soo Jung Kim¹, Deok Bae Park^{2,*} (¹Department of Medicine, ²Laboratory of Histology, Jeju National University School of Medicine)

Abstract Previous studies have suggested that *Citrus* fruits might suppress the proliferation of various cancer cells. However, little is known about any specific ingredients in the extract of *Citrus* fruits to exert its anti-proliferative activity in cancer cells. The present study aimed to identify the active ingredients in *Citrus* fruits to suppress the proliferation of rat hepatocellular carcinoma cells. Among tested compounds, two polymethoxylated flavones (nobiletin and tangeritin) showed significant anti-proliferative activity whereas other compounds (synephrine, rutin, hesperidin) did not. Interestingly, nobiletin as well as tangeritin also decreased the protein amount of gluconeogenic enzymes, PEPCK and G6Pase. The possible involvement of gluconeogenic activity in the proliferation of hepatocellular carcinoma cells are further to be investigated.

Key words: *Citrus*, Anticancer activity, Gluconeogenic proteins

서 론

지난 20여 년 간의 연구결과들은 감귤류 과일(*Citrus* fruits)을 꾸준한 섭취한 사람들에서 암을 비롯한 여러 질병들의 발생률이 감소하였다는 증거들을 보여주고 있다.¹⁾ 감귤류 과일에 포함되어 있는 여러 생리활성성분들 중에 특히 플라보노이드 계열의 물질들이 암을 포함한 여러 질병을 예방하는 데 중요한 역할을 담당하리라고 추측되고 있다.²⁾ 감귤류 과일은 지중해식 식단에서 가장 많이 소비되는 과일로서 우리나라에서는 여러 과일 중 생산량과 소비량이 다른 과일에 비해 월등하게 높는데 특히 감귤류 과일은 제주지역에서 가장 많이 생산된다. 감귤류 과일은 플라보노이드 성분을 포함하고 있는 대표적인 과일로서, 이러한 플라보노이드 성분들은 항산화 활성과 같은 다양한 생리활성을 보유하여 퇴행성질환이나 암의

생성과 진행에 관계있는 세포 내 중요 조절인자들을 제어하는 것으로 알려지고 있다.³⁾ 음식을 통해 섭취된 플라보노이드 성분들은 발암 요인들이 활성화하는 것을 저해하거나 활성산소종을 제거하고 세포주기를 조절하며 세포사멸을 유발하기도 하는 동시에 신생혈관의 생성이나 암세포의 전이, 세포성장인자나 호르몬의 작용을 억제하기도 한다.⁴⁾

감귤류 과일들의 건강증진 효과나 질병예방 효과들은 여러 규모의 연구집단에서 주로 생과 또는 음료 형태로 섭취한 사람들을 대상으로 추적 관찰한 연구들에서 분석된 결과들인데, 특정 질환과 연관된 임상연구, 배양세포 또는 실험동물들에서 수행되었던 많은 연구결과들 역시 대부분 음료 또는 추출물 형태로 공급된 시료의 효과에 대한 분석들로부터 유래되었다. 이런 감귤류 과일의 효과를 구체적으로 증명하기 위해서는 추출물에 포함되어 있는 수많은 성분들 중에 어느 특정 성분이 이러한 생리활성 기능을 담당하고 있는지를 규명하여야 한다. 감귤류 과일에 포함되어 있는 주요성분들에는 페놀, 에센셜오일, 펙틴, 카로티노이드, 플라보노이드, 비타민 C 등이 있다. 플라보노이드 성분은 폴리페놀 계열의 화합물로서 감귤류에는 헤스페리딘(hesperidin), 나린진(naringin), 루틴(rutin)

Received: May 31, 2018; Revised: June 11, 2018; Accepted: June 12, 2018

*Correspondence to : Deok Bae Park

Department of Histology, Jeju National University School of Medicine, 102

Jejudaehakno, Jeju 63243, Korea

Tel: 82-64-754-3827, Fax: 82-64-754-2593

E-mail: parkdb@jejunu.ac.kr

등이 포함되어 있고 다른 형태로써 메틸화플라보노이드인 두 종류의 폴리메톡시플라본(polymethoxylated flavones, PMFs) 성분인 노빌레틴(nobiletin)과 탄제레틴(tangeritin)들이 포함되어 있다. 이 밖에 알칼로이드 성분인 시네프린(synephrine)도 포함되어 있다. 각각의 성분들이 특정 암세포나 암질환에 미치는 영향에 대해서는 최근 다양한 연구들이 수행되어 왔다. 헤스페레틴의 변형체인 헤스페레틴(hesperetin)은 사람 유방암세포의 증식과정에서 G1 세포주기 진행을 억제하고⁵⁾ 나린진 또한 유방암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려졌다.⁶⁾ 탄제레틴과 노빌레틴 역시 사람의 유방암세포와 대장암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려졌다.⁷⁾ 그 밖에도 많은 연구들이 여러 다른 암세포의 증식에 미치는 플라보노이드 계열 화합물들의 효과를 분석하여 왔음에도 불구하고 암세포의 유형이나 돌연변이의 다양성에 따라 그 효과의 재현성에 대해서는 일관된 결론으로 이어지지 못하고 있다. 이는 암세포의 유전적 다양성과 계속 발생하는 변이, 또는 저항성의 획득 등에 따라 발생하는 현상으로 설명할 수밖에 없다.

본 연구에서는 감귤류 과일들에 포함되어 있는 화합물들 중 플라보노이드 성분에 해당되는 헤스페리딘, 루틴, 노빌레틴과 탄제레틴, 알칼로이드 성분인 시네프린이 흰쥐의 간세포암인 H4IIE 세포의 증식과 생존에 미치는 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에서는 흰쥐의 간암세포주인 H4IIE 세포를 한국세종연구소(Seoul, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 세포는 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Sigma, USA)이 포함된 Dulbecco's Minimal Essential Medium (D-Mem) 배양액을 사용하였으며 5% CO₂ 및 37°C가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포는 T75 배양 용기에서 계대배양하였다. 24-well 또는 6-well 배양접시에 옮겨 정지배양 한 후 혈청이 제거된 배양액에서 24시간 동안 전배양하고 난 뒤 여러 조건 아래 배양하고 난 뒤 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)로 2회 세척하여 분석실험에 사용하였다.

MTT assay

세포생존능의 지표인 mitochondria의 활성을 측정하기 위하여 MTT 측정법을 사용하였다. 시료의 처리가 끝난 뒤 세포 배양액과 동량의 MTT reagent (Sigma, 1 mg/mL in D-PBS)를

섞어 37°C에서 30분 동안 더 배양한 후 상층액을 제거하고 200 µL isopropanol을 넣어 발색반응을 유도하였으며 흡광도는 분광광도계(Sunrise, Tecan, Austria)를 사용하여 570 nm에서 측정하였다.

세포독성(Cytotoxicity) 측정

세포생존능을 나타내는 MTT 활성과 함께 세포에 미치는 독성을 나타내는 지표의 하나인 배양액 내 lactic dehydrogenase (LDH)의 농도를 측정하였다. 손상을 입은 세포로부터 배양액 내로 유출된 LDH 농도는 LDH 측정시약(LDH assay reagent, Takara, Japan)을 사용하여 측정하였다. 배양세포에 시료를 처리하고 일정 시간 후에 배양액과 LDH 측정시료를 동일한 분량으로 섞어 상온에서 15분간 반응시킨 뒤 분광광도계(Sunrise, Tecan, Austria)를 사용하여 492 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

포도당신생(gluconeogenesis) 활성 측정

24-well 배양접시에서 80~90% 정도 성장상태에 도달한 H4IIE 세포를 우태아혈청이 제거된 배양액에서 24시간 동안 사전배양하여 혈청에 포함되어 있는 성장인자들의 잔여효과를 배제하였다(serum-starvation). 사전배양 이후 포도당이 포함되어 있지 않은 대신 포도당신생 기질인 pyruvate (2 mM)와 lactate (20 mM)가 첨가된 D-Mem에서 배양하면서 여러 가지 시료를 처리한 뒤 일정 시간 후에 배양액 내에 존재하는 포도당 농도를 측정하여 포도당신생의 활성도로 삼았다. 배양액 내 포도당 농도는 glucose oxidase 활성을 이용한 측정키트(Asan Pharm., Korea)를 사용하여 측정하였다.

전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 직접 5%의 2-mercaptoethanol을 포함한 cell lysis buffer⁸⁾에 녹여 균질화시켰다. 70°C에서 10분간 가열하여 4~20%의 polyacrylamid gel에 전기영동하고 난 뒤 poly(vinylidene difluoride) (PVDF, Immovilon, Invitrogen, USA)에 흡착시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer (Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20) (TBS-T)으로 상온에서 1시간 동안 반응시키고 난 뒤 여러 가지 1차항체(1:1,000~1:3,000) (Santa Cruz, USA)가 들어있는 TBS-T에서 1시간(25°C) 또는 16시간(4°C) 동안 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고 HRP-conjugated 2차 항체(Santa Cruz, USA)와 상온에서 30분 반응시킨 뒤 Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Intron, Korea) 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

통계분석

대조군과 실험군 사이의 통계적 유의성은 student's t-test를 사용하였고 p 수치가 0.05 이하일 경우 통계적 유의성을 부여하였다.

결 과

감귤 성분들이 H4IIE 세포의 생존능에 미치는 효과

24-well 배양접시에서 80~90%의 밀도로 성장한 H4IIE 세포를 우태아혈청이 제거된 D-Mem (1 g/L glucose)에서 24시간 동안 사전배양(serum-deprived preincubation)하고 난 뒤 신선한 배양액(D-Mem, 1 g/L glucose)에 노빌레틴, 탄제레틴, 시네프린, 헤스페리딘을 최대 50 μ M까지 첨가하여 2일(48시간) 동안 정치배양하였다. 각 시료가 포함되어 있지 않은 배양액에서 배양된 세포에서의 MTT 활성도를 대조군으로 하여 각각 5 μ M, 50 μ M 농도의 시료를 포함한 배양액에서의 MTT 활성도

를 비교하였다(Fig. 1). 각 실험군들에서, 시네프린과 헤스페리딘을 48시간 동안 처리하였을 때 H4IIE 세포의 생존능은 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 유의할 만한 차이를 보이지 못하였다. 그러나 폴리메톡시플라본(polymethoxylated flavones) 성분인 노빌레틴(nobiletin)과 탄제레틴(tangeritin)을 50 μ M 농도로 48시간 동안 처리하였을 세포의 생존능이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 이 결과로부터, 감귤류 과일의 플라보노이드 성분들 중 PMFs가 다른 성분들에 비해 H4IIE 세포의 생존능을 저하시키는 활성이 상대적으로 높게 나타남을 알 수 있었다. 다음으로는 각 성분들의 상대적인 세포독성을 동일한 실험조건에서 비교하였다. 동일한 배양접시(24-well)에서 배양된 H4IIE 세포를 우태아혈청이 제거된 D-Mem (1 g/L glucose)에서 24시간 동안 사전배양하고 난 뒤 시네프린, 헤스페리딘, 루틴, 노빌레틴, 탄제레틴을 각각 50 μ M 농도에서 48시간 동안 처리한 후 세포생존능(MTT), 세포독성(LDH)을 측정하여 비교하였다(Fig. 2A, 2B). 그 결과, 이전 실험과 동일하게 시네프린과 헤스페리딘,

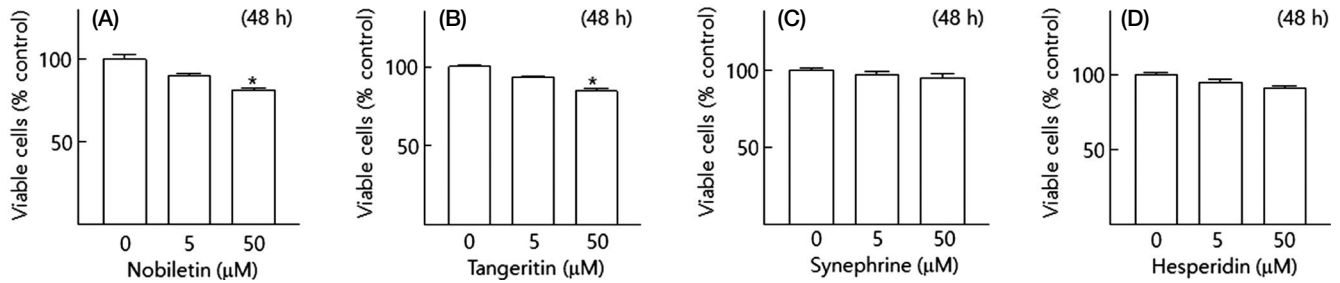


Figure 1. Effect of flavonoids on the viability of H4IIE rat hepatocellular carcinoma cells. H4IIE cells were grown in 24-well culture plates in D-Mem (1 g/L glucose and 5% fetal bovine serum) up to 80-90% in confluency. Before treatment, cells were pre-incubated in serum-free D-Mem for 24 h (serum-starvation) then further incubated for an additional 48 h in fresh media containing different doses of compounds as shown in the figure. The degree of cellular viability was determined by MTT assay as described in materials and methods. Each bar represents the mean \pm SE (n = 3). * $p < 0.05$ vs control (non-treated with each compound, respectively).

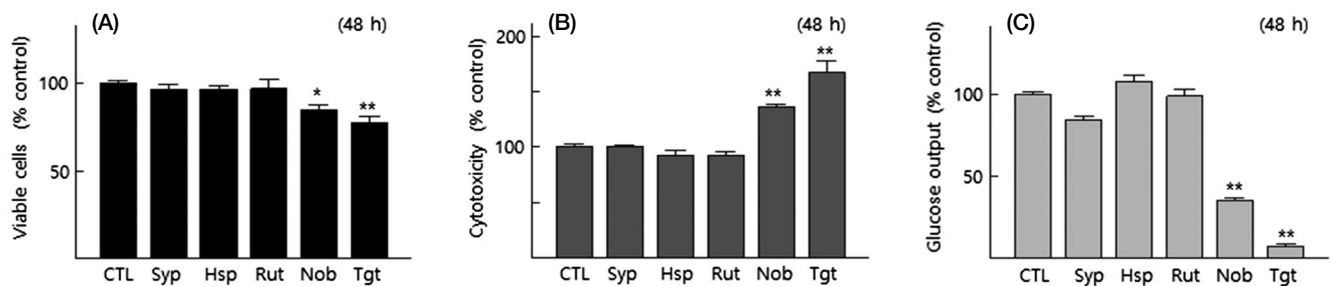


Figure 2. Effect of flavonoids on the viability (A), cytotoxicity (B) and glucose output (gluconeogenesis) (C) in H4IIE rat hepatocellular carcinoma cells. H4IIE cells were grown in 24-well culture plates in D-Mem (1 g/L glucose and 5% fetal bovine serum) up to 80-90% in confluency. Before treatment, cells were pre-incubated in serum-free D-Mem for 24 h (serum-starvation) then further incubated for an additional 48 h in fresh media containing different compounds (50 μ M). Each bar represents the mean \pm SE (n = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control. CTL, control; Syp, synephrine; Hsp, hesperidin; Rut, rutin; Nob, nobiletin; Tgt, tangeritin

또 다른 플라보노이드성분인 루틴은 50 μM 농도에서 세포의 생존능을 변화시키지 못하였으나 노빌레틴과 탄제레틴 처리는 유의하게 세포의 생존능을 저하시켰다. 노빌레틴과 탄제레틴 처리는 세포생존능(MTT)을 저하시킴과 동시에 세포독성(LDH)을 유의하게 증가시킴으로써 PMFs가 다른 플라보노이드 성분에서는 보이지 않는 암세포 성장억제(또는 사멸) 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

또한 이들 시료의 처리가 간세포의 주요기능 중 하나인 포도당신생에 미치는 영향을 비교하기 위하여 H4IIE 세포를 우태아혈청이 제거된 D-Mem (1 g/L glucose)에서 24시간 동안 전배양하고 난 뒤 포도당이 결핍되어있는 대신 pyruvate와 lactate가 포함되어 있는 배양액에서 시네프린, 헤스페리딘, 루틴, 노빌레틴, 탄제레틴을 각각 50 μM 농도에서 48시간 동안 처리한 후 배양액 내 포도당의 농도를 측정하였다(Fig. 2C). 세포생존능 비교에서 관찰하였던 결과와 유사하게 시네프린, 헤스페리딘, 루틴은 간세포의 포도당신생능에 별다른 영향을 보이지 못하였으나 노빌레틴과 탄제레틴은 현저하게 H4IIE 세포의 포도당신생능을 감소시켰다.

감귤 성분들이 H4IIE 세포의 포도당신생능에 미치는 효과

생체에서는 식후 포도당의 혈중농도가 증가하면 췌장베타세포에서의 인슐린분비가 증가하고 근육, 지방, 간세포 조직에서는 인슐린의 작용으로 여분의 포도당 흡수를 촉진하는 동시에 간세포에서 기저 포도당신생을 억제하여 다시 혈중 포도당 농도를 정상적으로 회복시킨다. 간세포에서 포도당신생이 노빌레틴, 탄제레틴에 의해 억제되는 현상과 세포의 생존능 사이에 어떠한 관련성이 있는지를 알아보기 위해 포도당이 결핍되어 있는 배양조건에서 실험적으로 기저 포도당신생을 자극하도록 8-cpt-cyclic AMP (100 μM)와 dexamethasone (500 nM)을 처리⁹⁾하고 동시에 시네프린, 헤스페리딘, 루틴, 노빌레틴, 탄제레틴을 처리하여 8시간 및 24시간 후 배양액 내 포도당의 농도를 측정하였다. 8-cpt-cyclic AMP와 dexamethasone 처리 후 8시간째에는 H4IIE 세포의 기저 포도당신생을 증가시켰으나 24시간 후에는 반대로 유의하게 억제하였다(Fig. 3A, 3B). 앞의 실험에서 노빌레틴과 탄제레틴 모두 48시간 후에 기저 포도당신생을 억제하였으나(Fig. 2C), 그 이전인 8시간 및 24시간 처리군에서는 탄제

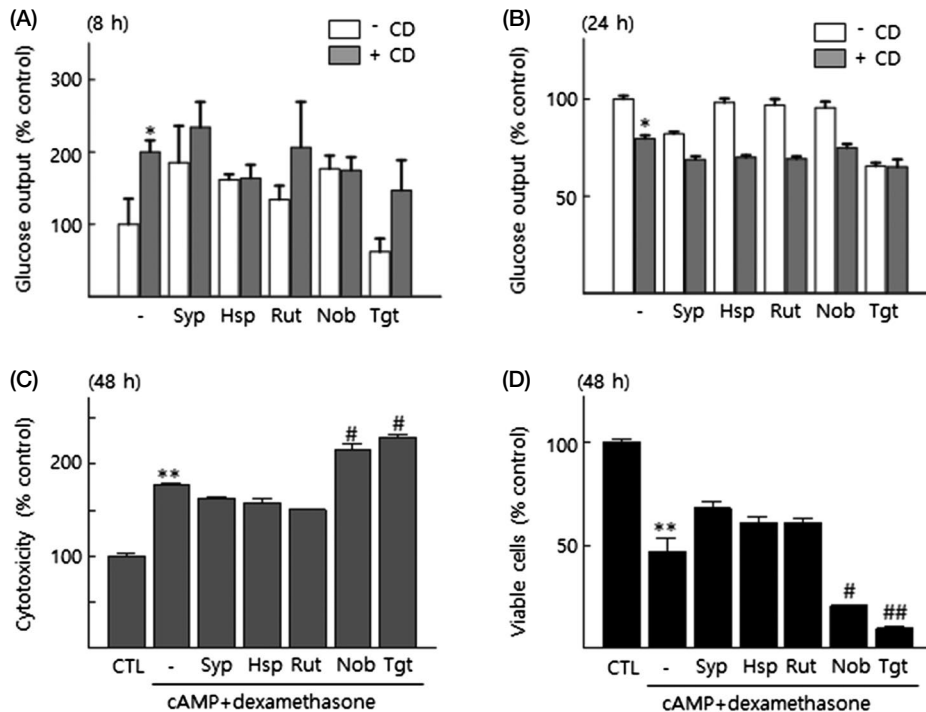


Figure 3. Effect of flavonoids on the basal- or CD-induced glucose output (gluconeogenesis) (A-B), cytotoxicity (C) and viability (D) in H4IIE rat hepatocellular carcinoma cells. H4IIE cells were grown in 24-well culture plates in D-Mem (1 g/L glucose and 5% fetal bovine serum) up to 80-90% in confluency. Before treatment, cells were pre-incubated in serum-free D-Mem for 24 h (serum-starvation) then further incubated for an additional 8 h (A), 24 h (B), and 48 h (C-D) in fresh media (glucose-free D-Mem) containing different compounds (50 μM) together with 8-cpt-cyclic AMP (100 μM) and dexamethasone (500 nM) (C-D). Each bar represents the mean \pm SE (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01 vs control (A-D). # p < 0.05, ## p < 0.01 vs cAMP + dexamethasone (C, D). CTL, control; Syp, synephrine; Hsp, hesperidin; Rut, rutin; Nob, nobiletin; Tgt, tangeritin; cAMP, 8-cpt-cyclic AMP; CD, cAMP + dexamethasone

레틴만이 기저포도당신생을 억제하였고 8-cpt-cyclic AMP와 dexamethasone 처리유발 포도당신생에는 노빌레틴-탄제레틴 모두 유의한 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 3A, 3B). 8-cpt-cyclic AMP와 dexamethasone 처리(48시간)는 H4IIE 세포의 생존능(MTT)을 감소시켰으며 세포독성(LDH)을 증가시켰는데 노빌레틴과 탄제레틴은 8-cpt-cyclic AMP와 dexamethasone의 이러한 효과에 부가적으로 작용하였다(Fig. 3C, 3D).

노빌레틴과 탄제레틴에 의해 포도당신생이 억제되는 현상이 간세포 내 포도당신생경로에서 중요한 조절작용을 담당하는 두 효소단백질인 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)와 glucose-6-phosphatase (G6Pase)에 직접 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 앞서의 포도당신생 실험과 동일한 환경에서 24시간 배양 후 Western blot 실험을 통해 PEPCK와 G6Pase 단백질 함량을 비교하였다(Fig. 4). 노빌레틴과 탄제레틴은 기저 PEPCK와 G6Pase 단백질 함량을 감소시켰고 8-cpt-cyclic AMP와 dexamethasone 처리 조건에

서도 PEPCK 단백질 함량의 감소에 부가적으로 작용하였다. 그러나, 노빌레틴과 탄제레틴 모두 포도당신생 조절인자인 PEPCK, G6Pase 단백질 수준을 낮추었음에도 불구하고 실제로 배양액의 포도당 농도는 탄제레틴에 의해서만 억제되었는데 그 이유를 설명할 수 있는 직접적인 증거는 아직 없다. 다만 간세포에서 합성된 포도당이 세포 외부로 분비되는 과정도 복잡한 조절경로를 거치게 되는데 본 실험의 결과로부터 예상되는 가능성 중의 하나로는 탄제레틴은 포도당합성과 분비과정 모두를 억제할 수 있는 반면 노빌레틴은 세포 내 포도당합성을 저해하나 일부 합성된 포도당의 분비에는 관여하지 않기 때문에 결과적으로 탄제레틴에 의해서만 배양액 내 포도당의 농도가 감소하였을 수 있다. 이를 위해서는 세포 내 포도당 농도와 배양액 내 포도당 농도를 모두 측정하여 비교하는 것이 필요하며 후속연구에서 시행할 계획이다.

고 찰

노빌레틴과 탄제레틴은 감귤류 과일의 과피에 주로 함유되어 있으며 여러 가지 유형의 항염증, 항암활성을 갖고 있다는 실험증거들이 제시되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 노빌레틴은 전립선암세포의 세포생존을 억제하고,¹³⁾ 골육종세포의 전이를 억제하며¹⁴⁾ 다른 유형의 암세포들에서도 성장을 억제한다는 연구결과들이 지속적으로 알려지고 있는데 간암세포에서의 항암활성과 그 기전에 대해서는 상대적으로 해당 연구결과들이 많이 알려지지 않았다. 탄제레틴 역시 백혈병세포,¹⁵⁾ 난소암세포¹⁶⁾ 등에서 항암활성이 있다고 알려진 바 있다. 그러나 노빌레틴이나 탄제레틴이 어떤 세포 내 표적물질을 통해 이러한 항암활성을 나타내는지에 대해서는 아직 완전히 이해되고 있지 못하다. 노빌레틴은 간세포에서 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 활성화시켜 중성지방합성을 억제한다는 연구결과¹⁷⁾로부터 간암세포에서 노빌레틴이 AMPK를 활성화시키는 것이 암세포의 성장을 억제하거나 암세포의 사멸을 유발할 수 있는 가능성을 배제할 수 없다. 실제로 제2형 당뇨병의 경구약제로 가장 많이 처방되는 메트포르민(metformin)은 대표적인 AMPK 자극제이며 이를 통해 간세포의 포도당신생 억제를 통해 혈중 포도당 농도를 감소시킬 수 있다.¹⁸⁾ 정상 간세포뿐 아니라 간암세포에서도 AMPK 활성이 노빌레틴이나 탄제레틴에 의해서 활성화되어 포도당신생을 억제한다면 포도당이 세포증식에 필요한 주에너지원인 암세포의 대사특성(Warburg effect)을 고려할 때 포도당 공급제한을 통한 간암세포의 성장억제는 설명할 수 있는 항암기전의 하나일 수 있

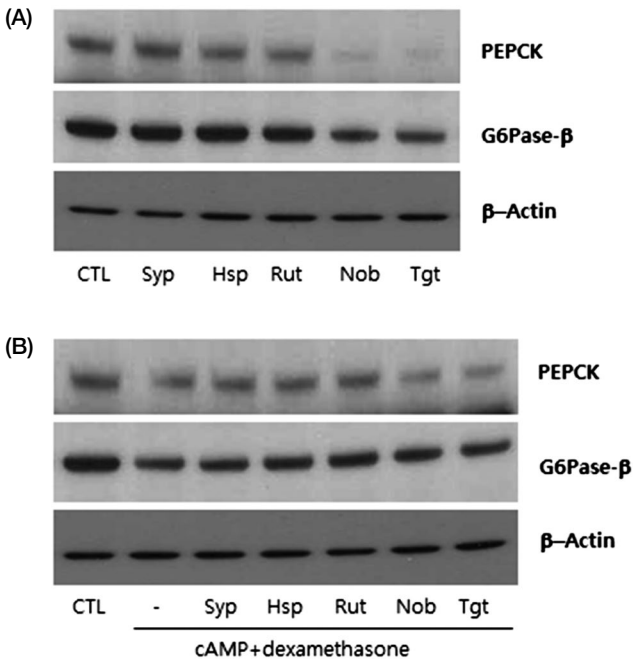


Figure 4. Effect of flavonoids on the protein levels of gluconeogenic enzymes in H4IIE rat hepatocellular carcinoma cells. H4IIE cells were grown in 24-well culture plates in D-Mem (1 g/L glucose and 5% fetal bovine serum) up to 80-90% in confluency. Before treatment, cells were pre-incubated in serum-free D-Mem for 24 h (serum-starvation) then further incubated for an additional 24 h in fresh media (glucose-free D-Mem) containing different compounds (50 μ M) together with 8-cpt-cyclic AMP (100 μ M) and dexamethasone (500 nM). CTL, control; Syp, synephrine; Hsp, hesperidin; Rut, rutin; Nob, nobiletin; Tgt, tangeritin; cAMP, 8-cpt-cyclic AMP

다. 다른 한편으로는 노빌레틴이 ERK나 JNK같은 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성을 직접 저해하여 세포의 성장을 억제할 수도 있다.¹⁴⁾ 유방암세포의 경우 PMFs는 메트포르민과 함께 PI3K/AKT 신호전달 경로를 저해하여 암세포의 사멸을 유발하기도 한다.¹⁹⁾

본 연구에서도 노빌레틴과 탄제레틴은 흰쥐 간암세포의 생존능을 감소시키고 세포독성을 증가시켰으며 간세포의 기저 활성인 포도당신생을 억제하였다. 이러한 결과들은 다른 종류의 암세포 또는 실험동물들에서 보여졌던 PMFs의 항암활성이 간암세포에서도 동일하게 작동되고 있을 가능성을 보여주고 있다. 그러나 간암세포에서 포도당신생의 억제만으로 세포 성장을 충분히 억제하는지에 대해서는 아직 구체적인 증거와 관련 기전이 밝혀져 있지 않다. 따라서 노빌레틴과 탄제레틴이 간암세포의 AMPK나 MAPK, PI3K/AKT 등 여러 표적물질의 발현이나 활성조절에 실제로 관여하는 지, 실제로 관여한다면 이런 일련의 현상들이 어떠한 상호작용을 통해 포도당신생과 같은 에너지대사를 제어하며 궁극적으로 암세포의 성장을 억제하거나 사멸을 유도하는 지에 대해서는 지속적인 연구가 필요할 것이다.

REFERENCES

- Santa C, Alessandro M, Nadia F, Sebastiano G, Gioacchino, Udo S, et al. Anticancer Potential of Citrus Juices and Their Extracts: A Systematic Review of Both Preclinical and Clinical Studies. *Front Pharmacol* 2017;8:420.
- Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:2821-31.
- Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids-food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakł Hig* 2014;65:79-85.
- Clere N, Faure S, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2011;9:62-77.
- Choi EJ. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. *Nutrition and Cancer* 2007;59:115-9.
- Li H, Yang B, Huang J, Xiang T, Yin X, Wan J, Luo F, Zhang L, Li H, Ren G, Huang YJ. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting beta-catenin signaling pathway. *Toxicol Lett* 2013;220:219-28.
- Morley KL, Ferguson PJ, Koropatnick J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett* 2007;251:168-78.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Harmelin MB, Anavi S, Madar Z, Tirosh O. Fatty acids-stress attenuates gluconeogenesis induction and glucose production in primary hepatocytes. *Lipids Health Dis* 2012;11:66.
- Yukihiro A, Ryo H, Hiroshi H, Kazuhisa S. Use of silkworms for identification of drug candidates having appropriate pharmacokinetics from plant sources. *BMC Pharmacol* 2010;10:7.
- Carrington J, Morwood ML. The Citrus Flavone Nobiletin Reduces Pro-Inflammatory and Pro-Labour Mediators in Fetal Membranes and Myometrium: Implications for Preterm Birth. *PLoS One* 2014;9(9):e108390.
- Santa C, Nadia F, Giovanni E, Lombardo AM, Gioacchino C, Sebastiano G, et al. Chemopreventive Agents and Inhibitors of Cancer Hallmarks: May Citrus Offer New Perspectives? *Nutrients* 2016;8(11):698.
- Jianchu C, Ashley C, Allen YC, Haizhi H, Zhaoliang L, Gary OR, et al. Nobiletin suppresses cell viability through AKT Pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells. *BMC Pharmacol Toxicol* 2014;15:59.
- Cheng HL, Hsieh MJ, Yang JS, Lin CW, Lue KH, Lu KH, et al. Nobiletin inhibits human osteosarcoma cells metastasis by blocking ERK and JNK-mediated MMPs expression. *Oncotarget* 2016;7(23):35208-23.
- Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br J Cancer* 1995;72(6):1380-8.
- Arafa EA, Zhu Q, Barakat BM, Wani G, Zhao Q, El-Mahdy MA, et al. Tangeretin Sensitizes Cisplatin-resistant Human Ovarian Cancer Cells through Down-regulation of PI3K/Akt Signaling Pathway. *Cancer Res* 2009;69(23):8910-7.
- Yuk T, Kim Y, Yang J, Sung J, Jeong HS, Lee J. Nobiletin Inhibits Hepatic Lipogenesis via Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018;2018:7420265.
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK-a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(4):251-62.
- Zheng Z, Zhu W, Yang B, Chai R, Liu T, Li F, et al. The co-treatment of metformin with flavone synergistically induces apoptosis through inhibition of PI3K/AKT pathway in breast cancer cells. *Oncol Lett* 2018;15(4):5952-8.