**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی**
سال هشتم، شماره سوم، پیاپی سی و یکم، زمستان ۱۳۹۸ (۸۵-۷۹)

# مقایسه اثرات آپوپتوزی عصاره هیدروالکلی برگ گونه‌های مرکبات بر تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی A549

**الهام حویزی***
استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۷– تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۳)

**چکیده**

سرطان ریه یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها در دنیا و ایران محسوب می‌گردد که سالانه سبب مرگ افراد زیادی می‌گردد. علی‌رغم تحقیقات فراوان، تابحال درمان مناسبی برای سرطان یافت نشده است. عصاره مرکبات دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدان فراوان است. در این تحقیق، اثر سمیت عصاره هیدروالکلی برگ گونه‌هایی از مرکبات بر تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی ریه رده A549 بررسی و مقایسه شد. عصاره برگ مرکبات با دستگاه سوکسله تهیه گردید. سلول‌های A549 تکثیر و سپس به مدت ۷۲ ساعت، با غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها تیمار شدند. در زمان‌های معینی بعد از تیمار، بقاء و مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از تست MTT و رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج ارزیابی شد. در این آزمایش غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد بقای سلولی را کاهش داد به‌عنوان IC50 برای هر نمونه در نظر گرفته شده که به‌ترتیب شامل ۲، ٦ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره برگ لیموترش، پرتقال و نارنج به‌دست آمد. همچنین سلول‌های آپوپتوز یافته در گروه تیمارشده با عصاره برگ لیمو نسبت به عصاره برگ نارنج و پرتقال به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر بود و همچنین تعداد سلول‌های آپوپتوزی در نمونه تیمارشده با عصاره برگ پرتقال به‌طور چشم‌گیری (P<۰/۰۵) بیشتر از نارنج مشاهده شد. عصاره هیدروالکلی مرگ لیموترش، پرتقال و نارنج قادر هستند آپوپتوز را به‌صورت وابسته به دوز و زمان در سلول‌های A549 القاء کند.

**واژه‌های کلیدی:** آپوپتوز، آنتی‌اکسیدان، رده سلولی A549، سرطان، مرکبات.

# Comparison of Apoptotic Effects of Citrus Leaves Hydroalcoholic Extracts on Proliferation and Viability of A549 Cancer Cells

**Elham Hoveizi***
Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
and Stem cells and transgenic technology research center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received: Sep. 18, 2018 - Accepted: Jan. 13, 2020)

## Abstract

Lung cancer is one the most common cancer in the world and Iran that lead to many deaths. Despite abundant researches, an appropriate cure has not been yet found for cancer. Citrus extract contains abundant anti-oxidative compounds. In this research evaluated and compared the toxic effect of Citrus leaves hydroalcoholic extracts on the proliferation and viability of A459 cancer cells. Citrus leaves extracts were prepared by soxhlet set. A549 cells were proliferated and treated with 0.05-10 mg/ml concentrations of extracts for 72h. Cell viability and morphology were evaluated by MTT assay and acridine orange staining on certain times after treatment. Comparison of the cell viability percent in experimental groups indicated that IC50 were 2, 6, and 8 respectively for *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, and *Citrus aurantium* leaves extract (P<0.05). Also, number of apoptotic cells was significantly (P<0.05) more in *C.lemon* group than *C. reticulata* and *C. aurantium* group and indeed, number of apoptotic cells were significantly (P<0.05) more in *C. reticulata* group than *C. aurantium* group. Citrus leaves hydroalcoholic extract can induce apoptosis in A549 cells in a dose and time-dependent manner.

**Keywords:** A549, Antioxidant, Apoptosis, Cancer, Citrus.

* نویسنده مسئول Email: e.hoveizi@yahoo.com

## مقدمه

با وجود پیشرفت‌های چشم‌گیر پزشکی و علوم سلولی مولکولی سرطان همچنان یکی از طاقت‌فرساترین و فراوانترین بیماری‌های قرن اخیر محسوب می‌شود. از قرون باستان تا به امروز منابع گیاهی همواره به عنوان منابع قابل اعتماد و در دسترس در درمان انواع بیماری‌ها و از جمله سرطان مورد توجه بشر بوده‌اند. مواد مغذی گیاهی با ترکیبات مختلف از ایجاد رادیکال‌های آزاد و تولید مواد شیمیایی مضر و سموم در بدن جلوگیری می‌کنند و بنابراین می توانند به عنوان ترکیبات مهارکننده سرطان مورد توجه باشند (Yamasaki *et al*., 2015; Marleau *et al*., 2012).

سرطان ریه یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها در دنیا و ایران محسوب می‌گردد که سالانه سبب مرگ افراد زیادی می‌گردد. نحوه مبارزه با این سرطان یکی از چالش‌های امروز دانشمندان و پزشکان محسوب می‌شود. طی سال‌های اخیر برای درمان این بیماری از روش‌های شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی استفاده شده است که نقاط ضعفی زیادی از جمله نرسیدن دارو با غلظت کافی به تومور و عدم دقت لازم، مقاوم‌شدن بدن در برابر دارو با این روش‌ها همراه است. بنابراین ابداع راه‌کارهای درمانی جدید، مؤثر و بدون عوارض جانبی، ضروری به نظر می رسد( Wu *et al*., 2016; Zhao *et al*., 2018).

از زمان‌های دور تا به امروز از طب سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده شده است. داروهای گیاهی از جمله داروهای مورداستفاده در طب سنتی هستند که به‌واسطه اثرات جانبی ناچیز در مقایسه با داروهای شیمیایی مورد توجه محققین علوم پزشکی و دارویی قرار دارند (Yoon *et al*., 2014). مرکبات حاوی انواع آنزیم‌ها و مواد آنتی‌اکسیدان، انواع ویتامین‌ها، فلاونوئید، بتاکاروتن و ... هستند که اثر ضد سرطانی بسیاری از این ترکیبات به‌صورت اختصاصی یا عمومی اثبات یا در دست بررسی می‌باشد. مرکبات یکی از مهم‌ترین سرده میوه‌های نیمه‌گرمسیری هستند، که خاستگاه اصلی آن ایران، هند، چین، ژاپن و برخی از کشورهای آسیای جنوب شرقی می‌باشد (Jafarpour *et al*., 2016; Azanchi *et al*., 2014). مرکبات مهم‌ترین سرده از تیره سدابیان هستند. از مهم‌ترین مرکبات می‌توان به پرتقال، نارنگی، لیمو ترش، لیمو شیرین، گریپ فروت، بطاوی، نارنج، ترنج، بکرایی، بالنگ و کام کوات اشاره کرد. یکی از منابع غنی ویتامین‌ها به‌ویژه ویتامین ث مرکبات می‌باشند، از گذشته تا به امروزه نقش اساسی این ویتامین در جلوگیری و درمان بسیاری از سرطان‌ها مورد تأیید بوده است و با توجه به این‌که مصرف این ویتامین نسبت به داروهای شیمیایی دیگر از نظر اقتصادی بسیار مقرون به‌صرفه است همواره مورد توجه محقیقین بوده است (Jaganathan *et al*., 2014; Liang *et al*., 2014).

برای مرکبات خواص گوناگون پزشکی از جمله مقوی قلب، مدر، ضد روماتیسم، ضد اسکوربوت، ضد تشنج و آرام‌بخش ذکر گردیده است و مطالعات قبلی نشان می‌دهد که عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس برگ نارنج شامل لینالول، لینالیل استات، آلفا ترپینئول، و در برگ لیموترش شامل ژرانیل استات، ژرانیال، بتا پینن، و لیمـونن می‌باشند( Ademosun *et al*., 2015).

تحقیقات دانشمندان نشان داده طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی با عوارض جانبی بسیار ناچیز نقش شگفت‌آوری در درمان انواع بیماری‌ها داشته است. یکی از شگفتی‌های دنیای گیاهان مرکبات هست و در میان آنها لیموترش به‌خاطر خواص بی‌نظیر خود به‌عنوان یکی از گیاهان معجزه‌گر شناخته شده است. لیموترش سبب تقویت سیستم ایمنی بدن شده و قدرت مقابله با سلول‌های سرطانی را دارد و همچنین به‌عنوان یک دارویی ضد میکروبی شناخته شده است (Yu *et al*., 2018).

با توجه به این‌که مطالعه عصاره برگ مرکبات کمتر مورد بررسی قرار گرفته، در تحقیق حاضر بر آن

شدیم تأثیرات عصاره استخراج‌شده از برگ‌های مختلف مرکبات مانند نارنج، لیموترش و پرتقال را بر سلول‌های سرطانی ریه انسانی رده A549 مورد بررسی قرار دهیم و خواص ضد سرطانی و سمیت سلولی آنها را مورد مقایسه قرار دهیم.

## مواد و روش‌ها

### عصاره گیری

در این آزمایش برگ‌های سه گیاه لیموترش، پرتقال و نارنج از باغ‌های اطراف شهرستان دزفول در بهار ۱۳۹۷جمع‌آوری گردید. برای عصاره‌گیری، در ابتدا برگ‌های درخت جمع‌آوری و با آب مقطر به‌خوبی شست‌وشو داده شدند. سپس در دمای اتاق خشک و پس از آن با قیچی خورد و توسط هاون پودر گردید. سپس ۵۰ گرم پودر از هر کدام در ۵۰۰ سی‌سی اتانول۵۰٪ حل گردید و به‌مدت ۳ شبانه‌روز روی استیرر قرار گرفت و سپس با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر و با استفاده از روتاری خشک گردید و پودر حاصله برای استفاده های بعدی در دمای یخچال نگهداری شد.

### آماده‌سازی محلول‌ها

ابتدا برای تهیه غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ه رکدام از برگ لیموترش، پرتقال و نارنج مقدار لازم از پودر تهیه‌شده برای هر غلظت، در محیط کشت حل و پس از فیلتر نمودن در دمای یخچال تا زمان استفاده نگهداری شدند.

### کشت و پاساژ سلولی

رده سلولی A459 از مؤسسه پاستور تهران تهیه و در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) محتوی ۱۰ درصد سرم گاوی FBS (Gibco, USA) در شرایط استاندارد ۵٪ $CO_2$ ، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ °C در انکوباتور (شرکت سینا، ایران) نگهداری شد. پاساژ سلولی با استفاده از ترپسین (Gibco, USA) انجام و سوسپانسیون سلولی با تعداد $۱۰^۳$×۱۰ در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت شدند. ۲۴ ساعت بعد، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره برگ لیموترش، پرتقال و نارنج تیمار و در زمان‌های ۱ و ۳ روز بعد بقای سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

### ارزیابی بقای سلولی

میزان کمی زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از روش MTT3-(4, 5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltertrazolium Bromide ارزیابی شد. برای انجام این آزمون از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT (Sigma, USA) استفاده شده به‌طوری‌که در روزهای یک و سه بعد از تیمار محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی MTT اضافه شد و به‌مدت چهار ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ °C نگهداری و سپس این محیط خارج و به‌دنبال شست‌وشو با PBS به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Merck, USA) اضافه شد و در نهایت با استفاده از دستگاه الیزا (Biotek، آلمان) و با طول موج ۵۷۰ نانومتر جذب نوری نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. لازم به‌ذکر است که در این آزمایش سلول‌های بدون تیمار به‌عنوان نمونه‌های کنترل در نظر گرفته شدند.

### رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج

جهت بررسی کیفی زنده ماندن سلول‌ها از رنگ امیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید استفاده شد. برای این منظور سلول‌ها با غلظت‌های ذکرشده و در زمان‌های ذکرشده با عصاره برگ‌های لیموترش، پرتقال و نارنج تیمار و بعد از ۲۴ ساعت رنگ‌آمیزی شدند. در ابتدا استوک ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ آکریدین اورنج و استوک ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ اتیدیوم بروماید تهیه و به نسبت مساوی ترکیب شدند. سپس سلول‌ها با این ترکیب رنگ و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت عکس‌برداری شدند.

**بررسی آماری**

جهت آنالیز آماری نتایج کمی، از نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA استفاده شد. نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel (2016) رسم و تفاوت‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

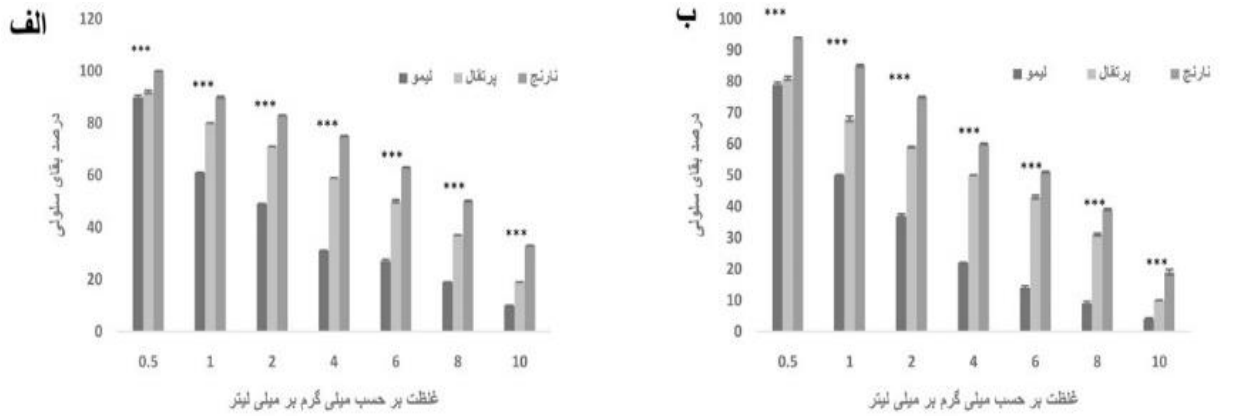
## نتایج

**نتایج حاصل از تست MTT**

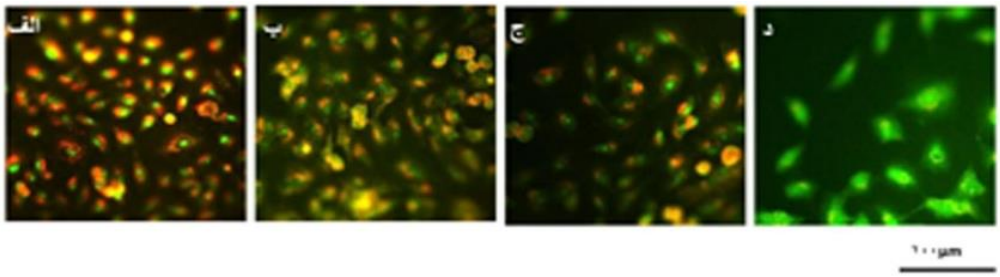
برای بررسی و مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره‌های آماده‌شده بر رده سرطانی A549 از تست بررسی بقای MTT استفاده شد. نتایج این تست نشان داد که جذب‌های خوانده‌شده در غلظت‌های به‌کار برده‌شده در هر سه عصاره اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) با نمونه‌های کنترل داشته است. در این آزمایش غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد بقای سلولی را کاهش داد به‌عنوان IC50 برای هر نمونه در نظر گرفته شده که به‌ترتیب شامل ۲، ۶ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره برگ لیموترش، پرتقال و نارنج به‌دست آمد. نتایج نشان داد که در سلول‌های A549 عصاره برگ درخت لیموترش در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در عصاره برگ درخت پرتقال در غلظت‌های ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در عصاره برگ درخت نارنج در غلظت‌های ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بقای سلول‌ها را بعد از ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با نمونه کنترل به‌ترتیب برای عصاره لیموترش به ۶۱، ۴۹ و ۳۱٪ و برای عصاره پرتقال به‌ترتیب ۶۹، ۵۰، ۳۷ و ۱۹٪ و برای عصاره نارنج به‌ترتیب به ۶۳، ۵۰، ۳۳٪ کاهش داد (شکل ۱).

**نتایج رنگ‌آمیزی آکریدین اوزنج/ اتیدیوم بروماید**

رنگ‌آمیزی آکریدین اوزنج/ اتیدیوم بروماید برای بررسی مورفولوژی سلول‌های سالم و آپوپتوز یافته انجام شد. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های اپوپتوز یافته به رنگ نارنجی دیده می‌شوند با هسته منقبض شده و غشای آسیب‌دیده درحالی‌که سلول‌های سالم با غشای دست‌نخورده و رنگ سبز مشاهده می‌شوند. مشاهدات ما همسو با نتایج MTT بود به‌طوری‌که سلول‌های اپوپتوزیافته در گروه تیمارشده با عصاره برگ لیمو نسبت به عصاره برگ نارنج و پرتقال بیشتر بود و همچنین تعداد سلول‌های آپوپتوزی در نمونه تیمارشده با عصاره برگ پرتقال بیشتر از نارنج مشاهده شد (شکل ۲).




**شکل ۱.** اثرات غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی برگ لیمو، پرتقال و نارنج بر بقای سلول‌های A459. بررسی بقا با روش MTT در روزهای ۱ و ۳ بعد از تیمار انجام گرفت. الف) روز یک بعد از تیمار، ب) روز سوم بعد از تیمار. هر آزمایش سه بار تکرار شد و در هر تکرار برای هر غلظت چهار چاهک در نظر گرفته شد. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)




**شکل ۲.** رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید برای بررسی مورفولوژی سلول‌های A459 تیمارشده با عصاره هیدروالکلی برگ لیمو، پرتقال و نارنج با غلظت IC50 با استفاده از میکروسکوپ معکوس اینورت ۲۴ ساعت بعد از تیمار. الف) سلول‌های در حال آپوپتوز در نمونه تیمارشده با عصاره برگ لیمو، ب) سلول‌های در حال آپوپتوز در نمونه تیمارشده با عصاره برگ پرتقال، ج) سلول‌های در حال آپوپتوز در نمونه تیمارشده با عصاره برگ نارنج، د) نمونه کنترل

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق خواص ضد سرطانی عصاره برگ مرکبات را نشان می‌دهد که به‌صورت وابسته به غلظت و زمان افزایش می‌یابد. در این مطالعه تأثیر عصاره برگ لیموترش برای مهار رشد سلول‌های سرطانی A549 در غلظت‌های معین قوی‌تر از عصاره برگ‌های پرتقال و نارنج بوده و همچنین عصاره برگ پرتقال اثر کشندگی بیشتری نسبت به عصاره برگ‌های نارنج در این سلول‌ها نشان داد. همچنین شایان ذکر است که این عصاره‌ها و به‌ویژه عصاره برگ‌های لیموترش در غلظت‌های پایین نیز دارای اثرات کشندکی در سلول‌های مذکور بودند. در همین راستا در سال ۱۳۹۴ نیز دهپور جویباری و همکاران اثر سمیت عصاره پوست چندین گونه مرکبات شامل پرتقال و لیموترش را بر سلول‌های سرطانی سینه انسان رده MCF-7 مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها با استفاده از تست MTT پس از ۷۲ ساعت نشان داد که عصاره پوست این مرکبات در مقایسه با نمونه کنترل سبب کاهش معنی‌داری در بقای سلول‌های سرطان پستانی شده و همچنین مطالعه آنان نشان داد که عصاره پوست لیموترش به‌طور معنی‌داری قوی‌تر از عصاره پوست پرتقال اثر داشته اشت.

فرایند آپوپتوز روند فیزیولوژیک پیچیده‌ای است که با مکانیسم‌های مختلفی در سلول‌ها اتفاق می‌افتد عصاره‌های گیاهی غالباً به‌واسطه ترکیبات ضداکسیدانی می‌توانند نقش مؤثری در مهار روند رشد سلول‌های سرطانی باشند. غالباً خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان با محتوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارند (Boeing *et al*., 2014; Bonner & Arbiser, 2014). تیم تحقیقاتی Soong *et al*. (2014) میزان ترکیبات فنولی در گیاه جو دو سر را با روش‌های فیتوشیمیایی اندازه‌گیری کردند و آنان اعلام کردند که ارتباط تنگاتنگی بین میزان فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی وجود دارد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ترکیبات فنولی غالباً بیشترین ترکیبات استخراج‌شده در عصاره‌های گیاهی می‌باشند و غالب فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی به‌واسطه همین ترکیبات فنولی می‌باشد. ترکیبات فنولی ترکیباتی هستند که به‌عنوان دهنده هیدروژن رفتار کرده و بنابراین می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر عمل کنند و از سوی دیگر نقش اساسی ترکیبات فنولی در مهار و حذف رادیکال‌های آزاد به‌وضوح گزارش گردیده است(Bonner & Arbiser, 2014; Levings *et al*., 2018; Khorasani Esmaeili *et al*., 2015). همسو با مطالعات ما، Kim *et al*. (2010) اثرات ضد سرطانی عصاره برگ‌های نوعی لیمو را بر سلول‌های سرطانی HeLa مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که این عصاره به‌طور چشم‌گیری دارای اثرات توکسیک بر سلول‌های سرطانی می‌باشد ( Kim

(*et al*., 2010). همچنین Chiang *et al*. (2012) اعلام کردند که عصاره برگ‌های لیمو به‌واسطه مسیر سیگنالینک STAT و با افزایش ژن‌های آپوپتوزی از جمله Bax و Bad سبب القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی پروستات می‌گردند (Chiang *et al*., 2012). به‌علاوه Ki *et al*. (2017) عصاره الکلی پوست تعدادی از مرکبات را بر رده سرطانی مثانه T24 تأثیر داده و اعلام داشتند مرکبات به‌واسطه تولید گونه‌های اکسیژن آزاد و همراه با مهار مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT سبب القای آپوپتوز و مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌گردند (Ahn *et al*., 2017). همچنین Kim *et al*. (2018) اثرات ضدتکثیری عصاره آبی پوست نارنگی را بر رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که این عصاره سبب کاهش بقای سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز به‌واسطه افزایش ژن‌های درگیر در آپوپتوز و افزایش کاسپازها می‌گردد (Kim *et al*., 2018). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره برگ‌های مرکباتی مانند لیموترش، پرتقال و نارنج دارای اثرات مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی ریه می‌باشند، که این اثرات توکسیک به‌صورت وابسته به غلظت و زمان افزایش می‌یابد و حتی در غلظت‌های پایین به‌ویژه در مورد لیموترش نیز اثرات مهاری وجود داشته است. البته این مطالعه گام کوچکی در مسیر پیچیده تحقیقات بوده و مطالعات بیشتر از جمله استخراج ماده مؤثره و مقایسه با سایر مرکبات و یا مقایسه با قسمت‌های متنوع از جمله عصاره پوست مرکبات و غیره پیشنهاد می‌گردد.

## سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق از محل گرنت پژوهشی نویسنده تأمین شده است که بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## REFERENCES

Ademosun, A.O.; Oboh, G.; Passamonti, S.; Tramer, F.; Ziberna, L.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L. ()2015. Inhibition of metalloproteinase and proteasome activities in colon cancer cells by citrus peel extracts. J Basic Clin Physiol Pharmacol; 26(5): 471-477.

Ahn, K.I.; Choi, E.O.; Kwon, D.H.; HwangBo, H.; Kim, M.Y.; Kim, H.J.; Ji, S.Y.; Hong, S.H.; Jeong, J.W.; Park, C.; Kim, N.D.; Kim, W.J.; Choi, Y.H. (2017). Induction of apoptosis by ethanol extract of Citrus unshiu Markovich peel in human bladder cancer T24 cells through ROS-mediated inactivation of the PI3K/Akt pathway. Biosci Trends; 11(5): 565-573.

Azanchi, T.; Shafaroodi, H.; Asgarpanah, J. (2014). Anticonvulsant activity of Citrus aurantium blossom essential oil (neroli): involvment of the GABAergic system. Nat Prod Commun; 9(11): 1615-1618.

Boeing, J.S.; Barizao, E.O.; BC, E.S.; Montanher, P.F.; de Cinque Almeida, V.; Visentainer, J.V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. Chem Cent J; 8 (1):48.

Bonner, M.Y.; Arbiser, J.L. (2014). The antioxidant paradox: what are antioxidants and how should they be used in a therapeutic context for cancer. Future Med Chem; 6(12): 1413-1422.

Chiang, S.Y.; Kim, S.M.; Kim, C.; Um, J.Y.; Park, K.R.; Kim, S.W.; Lee, S.G.; Jang, H.J.; Nam, D.; Ahn, K.S.; Kim, S.H.; Choi, S.H.; Shim, B.S.; Na, Y.C.; Jeong, E.K.; Cho, S.K.; (2012). Antiproliferative effects of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) leaves through suppression of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation in human

prostate carcinoma DU145 cells. J Med Food; 15(2): 152-160.

Dehpour Jobari, A.; Hasabpour, Z. (2016). Cytotoxicity Effects of Citrus Skin Extrct on Cancer Cell line MCF-7. J of Animal Biology; 8(2): 19-25.

Jafarpour, M.; Yousefi, G.; Hamedi, A.; Shariat, A.; Salehi, A.; Heydari, M. (2016). Effect of a traditional syrup from *Citrus medica* L. fruit juice on migraine headache: A randomized double blind placebo controlled clinical trial. J Ethnopharmacol; 179: 170-176.

Jaganathan, S.K.; Vellayappan, M.V.; Narasimhan, G.; Supriyanto, E. (2014). Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention. World J Gastroenterol; 20(16): 4618-4625.

Khorasani Esmaeili, A.; Mat Taha, R.; Mohajer, S.; Banisalam, B. (2015). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and in Vitro Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). Biomed Res Int; 643285.

Kim, H.; Moon, J.Y.; Mosaddik, A.; Cho, S.K. (2010). Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) leaf extract. Food Chem Toxicol; 48(8-9): 2435-2442.

Kim, M.Y.; Bo, H.H.; Choi, E.O.; Kwon, D.H.; Kim, H.J.; Ahn, K.I.; Ji, S.Y.; Jeong, J.W.; Park, S.H.; Hong, S.H.; Kim, G.Y.; Park, C.; Kim, H.S.; Moon, S.K.; Yun, S.J.; Kim, W.J.; Choi, Y.H. (2018). Induction of Apoptosis by Citrus unshiu Peel in Human Breast Cancer MCF-7 Cells: Involvement of ROS-Dependent Activation of AMPK. Biol Pharm Bull; 41(5): 713-721.

Levings, D.C.; Wang, X.; Kohlhase, D.; Bell, D.A.; Slattery, M. (2018). A distinct class of antioxidant response elements is consistently activated in tumors with NRF2 mutations. Redox Biol; 19: 235-249.

Liang, S.; Lv, G.; Chen, W.; Jiang, J.; Wang, J. (2014). Citrus fruit intake and bladder cancer risk: a meta-analysis of observational studies. Int J Food Sci Nutr; 65(7): 893-898.

Marleau, A.M.; McDonald, G.; Koropatnick, J.; Chen, C.S.; Koos, D. (2012). Reduction of tumorigenicity by placental extracts. Anticancer Res; 32(4): 1153-1161.

Soong, Y.Y.; Tan, S.P.; Leong, L.P.; Henry, J.K. (2014). Total antioxidant capacity and starch digestibility of muffins baked with rice, wheat, oat, corn and barley flour. Food Chem; 164: 462-469.

Wu, M.F.; Jian, Z.H.; Huang, J.Y.; Jan, C.F.; Nfor, O.N.; Jhang, K.M.; Ku, W.Y.; Ho, C.C.; Lung, C.C.; Pan, H.H.; Wu, M.C.; Liaw; Y.P. (2016). Post-inhaled corticosteroid pulmonary tuberculosis and pneumonia increases lung cancer in patients with COPD. BMC Cancer; 16 (1): 778.

Yamasaki, M.; Hasegawa, S.; Takahashi, H.; Kobayashi, Y.; Sakai, C.; Ashizawa, Y.; Asai, Y.; Kanzaki, M.; Fukui, T. (2015). Placental extracts induce the expression of antioxidant enzyme genes and suppress melanogenesis in B16 melanoma cells. Nat Prod Res; 29(22): 2103-2106.

Yoon, S.W.; Jeong, J.S.; Kim, J.H.; Aggarwal, B.B. (2014). Cancer Prevention and Therapy: Integrating Traditional Korean Medicine Into Modern Cancer Care. Integr Cancer Ther; 13(4): 310-331.

Yu, X.; Sun, S.; Guo, Y.; Liu, Y.; Yang, D.; Li, G.; Lu, S. (2018). Citri Reticulatae Pericarpium (Chenpi): Botany, ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of a frequently used traditional Chinese medicine. J Ethnopharmacol; 220: 265-282.

Zhao, X.; Dai, X.; Wang, S.; Yang, T.; Yan, Y.; Zhu, G.; Feng, J.; Pan, B.; Sunagawa, M.; Zhang, X.; Qian, Y.; Liu, Y. (2018). Traditional Chinese Medicine Integrated with Chemotherapy for Stage II-IIIA Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer after Radical Surgery: A Retrospective Clinical Analysis with Small Sample Size. Evid Based Complement Alternat Med. 4369027.