Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

**Short Communication**

# Effect of Hesperetin on the level of reactive oxygen species (ROS) in gastric cancer stem cells

**Vahid Bagheri[1], Mohammad Zangooei[2]***

## ABSTRACT

Intracellular reactive oxygen species (ROS) play an important role in cancer stem cell (CSC) function. Hesperetin (Hst) is a flavonoid that has been shown to affect cellular ROS level. The goal of this study was to investigate the effect of Hst on the level of ROS in gastric CSCs (GCSCs). MTT assay was used to evaluate cell survival. Cellular ROS level was measured using 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate by flow cytometry. A significant decrease in the survival of GCSCs treated with Hst was observed. Hst decreased ROS level to about 47% and 40% at concentrations of 200 and 400 mM, respectively. It can be concluded that Hst reduces the survival and ROS level of GCSCs and may be influences the function of these cells such as proliferation and differentiation as well as response to chemotherapy by affecting cellular ROS level.

**Keywords:** Cancer stem cell, Cell survival, Hesperetin, Reactive oxygen species.

**Citation:** Bagheri V, Zangooei M. [Effect of Hesperetin on the level of reactive oxygen species (ROS) in gastric cancer stem cells]. J Birjand Univ Med Sci. 2022; 29(1): 50-56. [Persian]

**DOI** http://dx.doi.org/10.34785/bums024.2022.006

**Received:** March 13, 2021 **Accepted:** May 2, 2021

[1] Cellular and Molecular Research Center, Department of Medical Immunology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

[2] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

***Corresponding author:** Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Tel: +989902770129 Fax: +985632433004 E-mail: zangooei65@gmail.com

**مقاله کوتاه**

# اثر هسپرتین بر سطح گونه های فعال اکسیژن در سلول‌های بنیادی سرطان معده

**وحید باقری[۱]، محمد زنگوئی[۲]***

## چکیده

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) داخل سلولی نقش مهمی در عملکرد سلول‌های بنیادی سرطان (CSC) دارد. هسپرتین (HST) فلاونوئیدی است که مشخص شده است بر میزان ROS سلولی اثر دارد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر هسپرتین بر سطح ROS در سلول‌های CSC جدا شده از یک بیمار مبتلا به سرطان معده بود. به منظور بررسی بقای سلولی از آزمایش MTT استفاده شد. سطح ROS سلولی نیز با استفاده از دی کلروفلورسین با روش فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. در مطالعه حاضر کاهش معنی‌داری در بقای سلول‌های CSC معده تیمار شده با هسپرتین مشاهده شد. هسپرتین در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار سطح ROS داخل سلولی را به ترتیب تا حدود ۴۷ و ۴۰ درصد کاهش داد. این‌گونه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که هسپرتین بقای CSCهای معده و سطح ROS در این سلول‌ها را کاهش می‌دهد و ممکن است از طریق تأثیر بر سطح ROS سلولی بر عملکرد این سلول‌ها از قبیل تکثیر و تمایز و همچنین پاسخ به شیمی درمانی مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی سرطان، بقای سلولی، هسپرتین، گونه‌های فعال اکسیژن

**مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۱؛ ۲۹ (۱): ۵۰-۵۶.**

**دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۲**

[۱] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه ایمونولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۲] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: بیرجند- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی

تلفن: ۰۹۹۰۲۷۷۰۱۲۹ پست الکترونیکی:zangooei65@gmail.com

## مقدمه

سرطان معده پنجمین سرطان شایع و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان محسوب می‌شود. در سال ۲۰۱۸ بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ مورد جدید ابتلا به سرطان معده و حدوداً ۷۸۳۰۰۰ مرگ و میر ناشی از این سرطان گزارش شده است (۱). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که بسیاری از تومورهای جامد دارای زیر جمعیتی از سلول‌های شناخته شده به نام سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCها) هستند. CSCها مشخصات سلول‌های بنیادی از قبیل خود تجدید شوندگی را دارا می‌باشند و می‌توانند جمعیت هتروژنی از سلول‌های سرطانی شامل سلول‌های جد[1] و سلول‌های سرطانی کاملاً تمایز یافته را به‌وجود آورند. مطالعات اخیر نشان داده است که این سلول‌ها مسئول شروع تومور، پیشرفت، تهاجم، متاستاز و عود تومور و مقاومت به شیمی درمانی هستند. شواهد زیادی وجود دارد که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) برای عملکرد سلول‌های CSC نقش حیاتی دارد. از یک سو، سلول‌های بنیادی خاموشی که مقدار کمتری ROS دارند، ویژگی‌های بنیادی خود را حفظ می‌کنند و از سوی دیگر، افزایش محتوای ROS باعث تکثیر و تمایز این سلول‌ها می شود (۲). هسپریدین یک فلاوانون گلیکوزیله است که در مرکبات به فراوانی یافت می‌شود. هسپریدین پس از ورود به مجرای گوارش به‌صورت آنزیمی هیدرولیز شده، بخش قندی خود را از دست داده و تبدیل به هسپرتین می‌شود. اثرات ضد سرطانی هسپرتین در سال‌های اخیر مورد توجه بوده و مطالعات بسیاری نیز در رابطه با مسیرهای مولکولی مرتبط با این ترکیب انجام شده است. این فلاونوئید از یک سو سبب افزایش فعالیت آنزیمی مرتبط با دفاع آنتی اکسیدانی سلول‌ها شده و از سوی دیگر فعالیت ضد سرطانی از قبیل توقف چرخه ی سلولی در فاز G1، القای آپوپتوز و همچنین مهار رگزایی از خود نشان می‌دهد (۳). اثر هسپرتین بر روی سطح ROS در بسیاری از سلول‌های تمایز یافته مورد مطالعه قرار گرفته است (۴) اما تاکنون در این زمینه مطالعه‌ای بر روی سلول‌های بنیادی و به‌خصوص سلول‌های CSC معده انجام نشده است. با توجه به اهمیت نقش ROS در سلول‌های بنیادی سرطان، هدف از مطالعه ی حاضر بررسی اثر هسپرتین بر سطح ROS در CSCهای معده بود. سلول‌های مورد استفاده در مطالعه ی حاضر، در مطالعه‌ای که توسط باقری و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد، از بیماران مبتلا به سرطان معده جداسازی شدند. در آن مطالعه پس از تیمار مکانیکی و آنزیمی بافت توموری معده، سلول‌های تک سلولی شده در درون محیط کشت بدون سرم حاوی فاکتورهای رشد (EGF، bFGF، LIF) و تحت شرایط غیرچسبنده کشت داده شدند. پس از مدت زمان یک ماه و تحت این شرایط، سلول‌های تمایز یافته قادر به تکثیر نیستند و می‌میرند در صورتی که سلول های بنیادی سرطانی رشد کرده و تشکیل کلنی‌های اسفیر شکل می‌دهند. این سلول‌ها مولکول‌های سطح سلولی CD44، CD54 و EpCAM و فاکتورهای stemness OCT4، SOX2، SALL4 و Cripto-1 را بیان می‌کنند و همچنین توانایی تومورزایی داشته و قادر هستند در موش nude بافت توموری ایجاد کنند (۵).

## روش تحقیق

### مواد

محیط کشت DMEM/F12 و آنتی بیوتیک‌ها از شرکت Biosera فرانسه خریداری شدند. فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و مکمل B27 از شرکت Gibco آمریکا تهیه گردیدند. هسپرتین، دی کلرو فلورسین دی استات (DCF) و رنگ MTT از شرکت Sigma آمریکا خریداری شدند.

### کشت سلولی

در تمام مراحل این مطالعه کشت سلول‌های CSC معده در این شرایط انجام شده است: محیط کشت DMEM/F12 بدون سرم حاوی EGF (۱۰ ng/ml)، مکمل B27 (۱ درصد)، جنتامایسین (۰/۵ درصد)، پنی سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل انکوباتور حاوی ۵ درصد $CO_2$ و رطوبت ۹۰ درصد.

[1] Progenitor cells

### تست MTT

به منظور بررسی اثر هسپرتین بر میزان بقای سلولی، پس از تریپسینه کردن سلول‌های CSC و شمارش آن‌ها، سلول‌ها به صورت سوسپانسیون درآمده، سپس در درون هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه، تعداد ۲۰۰۰۰ سلول کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هسپرتین (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ یا ۷۲ ساعت تیمار شدند. میزان مرگ و میر سلولی با استفاده از تست رنگ سنجیMTT بررسی شد. بطور خلاصه، ۲۰ میکرولیتر محلولMTT (۵ میلی گرم در میلی‌لیتر) به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO[1] اضافه شد و پلیت برای مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. DMSO باعث حل شدن بلورهای فورمازان حاصل از افزودن رنگ MTT می‌گردد. میزان شدت رنگ تولید شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مورد خوانش قرار گرفت. بقای سلولی در هر یک از گروه‌ها به‌صورت درصد جذب در مقایسه با گروه کنترل گزارش شده است.

### بررسی اثر هسپرتین بر میزان ROS داخل سلولی

به منظور بررسی اثر هسپرتین بر میزان ROS داخل سلولی، پس از تریپسینه کردن سلول‌های CSC و شمارش آن‌ها، سلول‌ها به صورت سوسپانسیون درآمده و تعداد ۱۰۰۰۰۰۰ سلول در هر فلاسک $cm^3$ ۲۵ (ultralow) کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هسپرتین (۰، ۵۰، ۱۰۰،۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای اندازه‌گیری میزان ROS داخل سلولی از ترکیب دی کلرو فلورسین دی استات (DCF) استفاده شد. به‌طور خلاصه، سلول‌های CSC معده پس از تیمار ۲۴ ساعته، در فالکون ml ۱۵ جمع‌آوری شده و به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر تریپسین به پلیت سلولی اضافه شد و توده ی سلولی بطور کامل حل و سلول‌ها از یکدیگر جدا شدند. پس از شمارش سلولی، تعداد ۱۵۰۰۰۰ سلول به میکروتیوب ml ۱/۵ منتقل گردید. سپس، DCF به هر یک از گروه‌های سلولی اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از دو بار شستشوی سلول‌ها با بافر نمکی فسفات، شدت فلورسانس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری ( CyFlow Cube 6, Sysmex Partec, Germany) در کانال F1 اندازه‌گیری و داده‌ها توسط نرم‌افزار فلوجو (FlowJo software) پردازش گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری

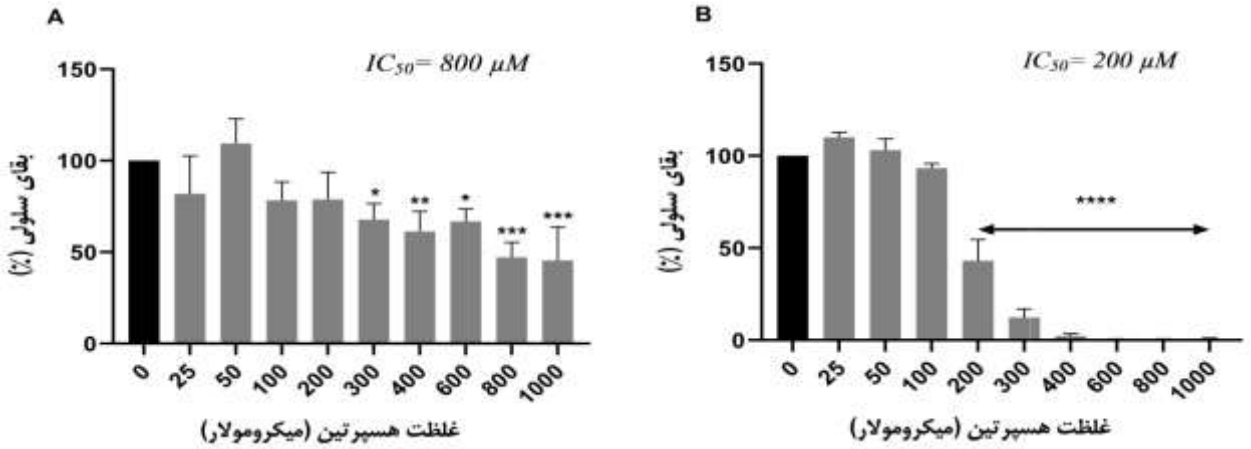
هر یک از آزمایشات حداقل سه بار تکرار شد. نتایج به‌صورت Mean±SD گزارش شده است. نرم افزار GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و برای مقایسه هر یک از گروه‌ها با گروه کنترل از آزمون دانت (Dunnett) استفاده شد. معنی‌دار بودن داده‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

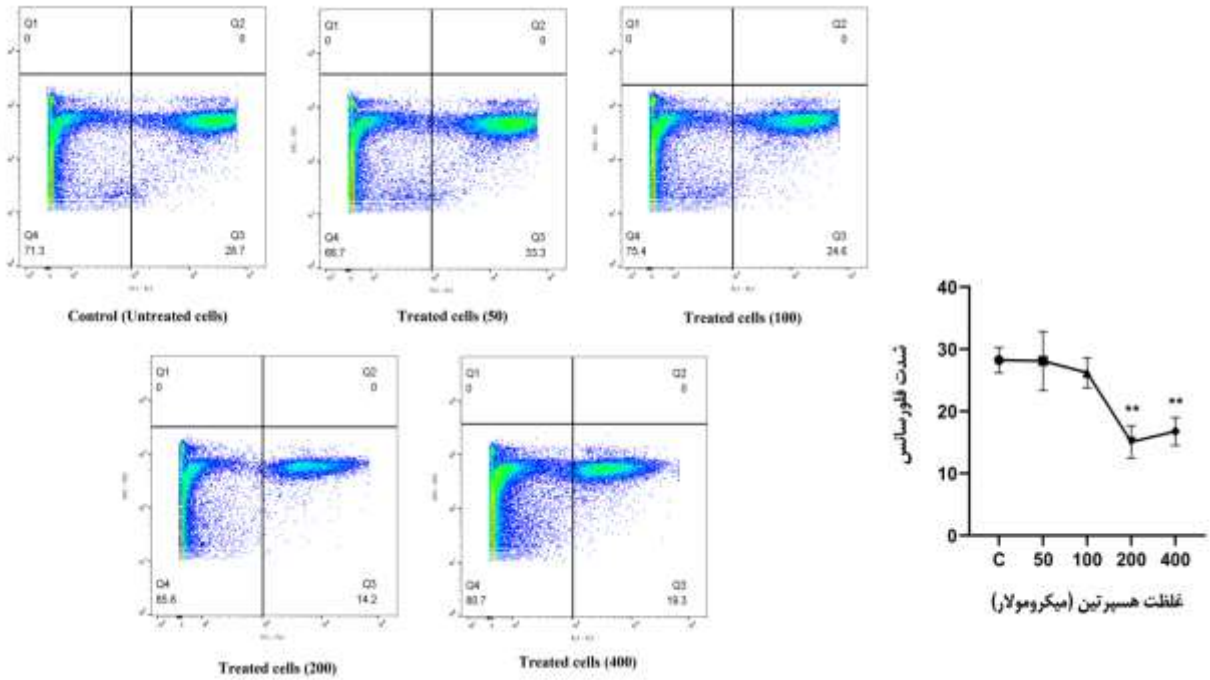
نتایج مربوط به اثر هسپرتین بر میزان بقای سلول‌های CSC معده در شکل ۱ نشان داده شده است. هسپرتین تا غلظت ۲۰۰ میکرومولار اثر معنی‌داری بر بقای سلول‌ها در مدت زمان ۲۴ ساعت نداشت و بر اساس نتایج بدست آمده میزان $IC_{50}$ در این زمان غلظت ۸۰۰ میکرومولار می‌باشد (شکل A۱). در تیمار ۷۲ ساعت تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار اثر معنی‌داری بر بقای سلولی مشاهده نمی‌شود. هرچند افزایش زمان باعث تقویت اثر هسپرتین در مرگ CSCهای معده شده است. به‌طوریکه میزان IC50 به غلظت ۲۰۰ میکرومولار در تیمار ۷۲ ساعته کاهش یافته است (شکل B۱). در تیمار ۲۴ ساعت در غلظت ۸۰۰ میکرومولار بقای سلولی نسبت به گروه کنترل ۸/۲۵±۴۷/۲ درصد است، در حالی‌که در تیمار ۷۲ ساعت در غلظت ۲۰۰ میکرومولار میزان بقای سلولی نسبت به گروه کنترل ۱۱/۵۳±۴۳ می‌باشد.

[1] Dimethyl sulfoxide

نتایج مربوط به فلوسایتومتری نشان داد که هسپرتین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اثر معنی‌داری بر سطح ROS داخل سلولی ندارد. در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار سطح ROS به ترتیب تا حدود ۴۷ و ۴۰ درصد کاهش نشان داد (شکل۲).




**شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف هسپرتین بر بقای سلول‌های CSC معده.** تعداد ۲۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هسپرتین (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) تیمار شدند. میزان بقای سلولی پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت (شکل A) یا ۷۲ ساعت (شکل B) با استفاده از تست MTT اندازه‌گیری شد.




**شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف هسپرتین بر میزان ROS داخل سلولی.** تعداد ۱۰۰۰۰۰۰ سلول در هر فلاسک ۲۵ $cm^3$ (ultralow) کشت داده شد و سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هسپرتین (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. میزان ROS داخل سلولی با استفاده از ترکیب دی کلرو فلورسین دی استات با تکنیک فلوسایتومتری و در کانال F1 اندازه‌گیری شد.

## بحث

شواهد مختلف بیانگر آن است که سلول‌های CSC با استفاده از مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی مختلف میزان ROS را در داخل سلول پایین نگه می‌دارند، که این امر برای حفظ خصوصیات بنیادی‌شان ضروری است. این موضوع نیز به‌خوبی ثابت شده است که تجمع ROS در داخل سلول، مرگ سلول سرطانی را تحریک می‌کند، به‌طوری‌که از این استراتژی در کلینیک‌های شیمی درمانی و پرتو درمانی به طور گسترده استفاده می‌شود. با این حال، شواهد اخیر نشان می‌دهد که این روش ممکن است به دلیل پتانسیل بالای آنتی اکسیدانی که در سلول‌های CSC وجود دارد، برای این سلول‌ها مؤثر نباشد. علاوه بر این، ROS می‌تواند یک شمشیر دو لبه باشد، زیرا ممکن است بقا و توانایی‌های تهاجمی سلول‌های CSC را تقویت کند (۶).

هسپرتین یکی از فراوان‌ترین فلاونوئیدهای موجود در مرکبات است که خواص داروئی مختلفی از خود نشان می‌دهد. نتایج مربوط به مطالعه ی حاضر نشان می‌دهد که هسپرتین باعث کاهش بقای سلول‌های CSC معده می‌شود و این اثر وابسته به زمان است. به‌طوری‌که در زمان ۲۴ ساعت در غلظت ۸۰۰ میکرومولار بقای سلولی نسبت به گروه کنترل ۸/۲۵±۴۷/۲ درصد است، در حالی‌که در زمان ۷۲ ساعت در غلظت ۲۰۰ میکرومولار میزان بقای سلولی نسبت به گروه کنترل ۱۱/۵۳±۴۳ می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که هسپرتین در زمان ۷۲ ساعت در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت در غلظت‌های پایین‌تر باعث مرگ حدوداً نیمی از سلول‌ها می‌گردد. همچنین نتایج مربوط به این مطالعه در مقایسه با مطالعاتی که بر روی رده‌های سلولی تمایز یافته معده انجام شده است، بیانگر این مطلب است که غلظت‌های بالاتری از هسپرتین برای مرگ نیمی از سلول‌های بنیادی معده نسبت به برخی از سلول‌های تمایز یافته در زمان‌های مشابه مورد نیاز است. برای مثال در مطالعه Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۵ هسپرتین در غلظت ۸۰ میکرومولار باعث مرگ نیمی از سلول‌های SGC-7901 (یک رده سلول سرطان معده) در زمان ۷۲ ساعت شد (۴). البته این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط کشت سلول در دو مطالعه باشد. با توجه به اینکه سلول‌های CSC معده مورد مطالعه سلول‌های مقاوم به شیمی درمانی هستند، می‌توان گفت که هسپرتین ممکن است در کاهش بقای سلول‌های مقاوم به شیمی درمانی مؤثر باشد. در تأیید این احتمال Susidarti و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که هسپرتین حساسیت سلول‌های MCF-7/DOX (سلول‌های MCF-7 مقاوم به دوکسوروبیسین) به داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین را افزایش می دهد (۷). برخی مطالعات بیانگر نقش آنتی اکسیدانی هسپرتین هستند (۸)، از طرفی در برخی مطالعات این‌طور گزارش شده است که هسپرتین می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدان‌هایی از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز را کاهش دهد و منجر به عدم توازن اکسیدان/آنتی‌اکسیدانی سلول گردد (۹). نتایج مطالعه‌ی حاضر در ارتباط با اثر هسپرتین بر میزان ROS در سلول‌های CSC معده بر خلاف اکثر مطالعاتی که بر روی رده‌های سلولی تمایز یافته انجام شده است، بیانگر این مطلب است که هسپرتین سطح ROS را در سلول‌های بنیادی سرطان معده به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهد. Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۵ با مطالعه بر روی سه رده ی سلول تمایز یافته سرطان معده شامل SCG-7901، HGC-27 و MGC-803 نشان دادند که هسپرتین باعث تجمع ROS در این سلول‌ها می‌شود و این اثر وابسته به دوز و زمان است (۴). این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در پروفایل بیانی و تفاوت‌های اپی ژنتیکی سلول‌های بنیادی با سلول‌های تمایز یافته باشد (۱۰). Lee و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که هسپرتین تولید ROS در سلولهای 3T3-L1 را در طول فرآیند تمایز آدیپوسیت کاهش می‌دهد (۱۱) که این نتایج هم راستا با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر است. با توجه به اینکه افزایش ROS در تمایز سلول‌های بنیادی مؤثر است، این احتمال نیز وجود دارد که هسپرتین با کاهش سطح ROS در حفظ خصوصیات بنیادی سلول‌های CSC معده و کاهش تمایز آن‌ها اثر داشته باشد که اثبات این موضوع نیاز به تحقیق دارد. در تأیید این احتمال Subash-Babu و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که هسپرتین تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول‌های آدیپوسیت را مهار می کند. البته در

این مطالعه ارتباط بین کاهش تمایز با سطح ROS داخل سلولی مورد بررسی قرار نگرفته است (۱۲).

## نتیجه‌گیری

هسپرتین بقای سلول‌های CSC معده و سطح ROS در این سلول‌ها را کاهش می دهد و ممکن است از طریق تأثیر بر سطح ROS سلولی بر عملکرد این سلول‌ها از قبیل تکثیر و تمایز و همچنین پاسخ به شیمی درمانی مؤثر باشد.


## تقدیر و تشکّر

مطالعه حاضر از منابع حاصل از طرح تحقیقاتی با کد رهگیری ۵۱۳۳ و کد اخلاق IR.BUMS.REC.1398.244 که در دانشگاه علوم پزشکی بیرجند تصویب شده است استخراج گردید.


## تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

## منابع:


1- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018; 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492

2- Zhou D, Shao L, Spitz DR. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. Adv Cancer Res. 2014; 122: 1-67. DOI: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00001-3

3- Ye L, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. J Nutr Biochem. 2012; 23(10): 1230-7. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2011.07.003

4- Zhang J, Wu D, Song J, Wang J, Yi J, Dong W. Hesperetin induces the apoptosis of gastric cancer cells via activating mitochondrial pathway by increasing reactive oxygen species. Dig Dis Sci. 2015; 60(10): 2985-95. DOI: 10.1007/s10620-015-3696-7

5- Bagheri V, Memar B, Behzadi R, Aliakbarian M, Jangjoo A, Bahar MM, et al. Isolation and identification of chemotherapy-enriched sphere-forming cells from a patient with gastric cancer. J Cell Physiol. 2018; 233(10): 7036-46. DOI: 10.1002/jcp.26627

6- Jagust P, de Luxán-Delgado B, Parejo-Alonso B, Sancho P. Metabolism-based therapeutic strategies targeting cancer stem cells. Front Pharmacol. 2019; 10: 203. DOI: 10.3389/fphar.2019.00203

7- Susidarti RA, Nugroho AE, Meiyanto E. Increasing sensitivity of MCF-7/DOX cells towards doxorubicin by hesperetin through suppression of P-glycoprotein expression. Indones J Pharm. 2014; 25(2): 84-90. DOI: 10.14499/indonesianjpharm25iss2pp84

8- De Souza VT, De Franco ÉPD, De Araújo MEMB, Messias MCF, Priviero FBM, Frankland Sawaya AC, et al. Characterization of the antioxidant activity of aglycone and glycosylated derivatives of hesperetin: an in vitro and in vivo study. J Mol Recognit. 2016; 29(2): 80-7. DOI: 10.1002/jmr.2509

9- Sivagami G, Vinothkumar R, Preethy CP, Riyasdeen A, Akbarsha MA, Menon VP, et al. Role of hesperetin (a natural flavonoid) and its analogue on apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cell line–A comparative study. Food Chem Toxicol. 2012; 50(3-4): 660-71. DOI: 10.1016/j.fct.2011.11.038

10- Ghasemi S, Xu S, Nabavi SM, Amirkhani MA, Sureda A, Tejada S, et al. Epigenetic targeting of cancer stem cells by polyphenols (cancer stem cells targeting). Phytother Res. 2021. DOI: 10.1002/ptr.7059

11- Lee YJ, Seo MJ, Lee OH, Kim KJ, Lee BY. Hesperetin inhibits lipid accumulation and ROS production during adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. J Food Biochem. 2017; 41(3): e12348. DOI: 10.1111/jfbc.12348

12- Subash-Babu P, Alshatwi AA. Hesperetin Inhibit Adipocyte Differentiation and Enhance Bax-and p21-Mediated Adipolysis in Human Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis. J Biochem Mol Toxicol. 2015; 29(3): 99-108. DOI: 10.1002/jbt.21672