



Short Communication

Effect of hesperetin on interleukin-8 gene expression in MCF-7 cell line

Hamideh Dehghan ^{ID¹}, Milad Bideh ^{ID²}, Mahboobeh Sabeti Akbar Abad ^{ID³}, Fatemeh Zahra Biabani ^{ID¹},
Mohammed Zangooei ^{ID^{2*}}

ABSTRACT

Breast cancer is recognized as the most common cause of cancer deaths in women. So far, no definite treatment has been identified there is no certain cure for breast cancer. The over expression of interleukin-8 is associated with increased tumor growth and breast cancer metastasis. Hesperetin is a flavonone sub-group of flavonoids that is abundantly found in citrus fruits, including lemons and oranges. Considering the anti-cancer and anti-inflammatory role of hesperetin, as also, well as the role of interleukin-8 in cancer metastasis and progression, in this study the present study aimed to assess, the effect of hesperetin on the expression of the interleukin-8 gene in MCF-7 cell line has been investigated. The relative expression level of interleukin-8 gene in MCF-7 cell line at concentrations of 0, 25, 50, 100, and 200 μ M hesperetin and durations of 6, 24, and 48 hours (with the concentration of 100 μ M) was performed using the A real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)Real-time method PCR was performed. The obtained our results pointed out showed that the level of interleukin-8 gene expression decreases with an increase in by increasing the concentration of hesperetin (up to 100 μ M), the level of interleukin-8 gene expression decreases. Furthermore, the level of interleukin-8 gene expression in the 48-hour treatment was also lower than that in the 24- and 6-hour treatments. Considering its various properties, including anti-cancer and anti-inflammatory properties, hesperetin could be effective in reducing the risk of metastasis and progression of breast cancer by reducing the expression of the interleukin-8 gene.

Keywords: Breast cancer, Hesperetin, Interleukin-8, MCF-7 Cells



Citation: Dehghan H, Bideh M, Akbar Abad MS, Biabani FZ, Zangooei M. [Effect of hesperetin on interleukin-8 gene expression in MCF-7 cell line]. J Birjand Univ Med Sci. 2022; 29(4): 390-396. [Persian]

DOI <https://www.doi.org/10.34785/bums024.2022.029>

Received: November 7, 2022 **Accepted:** January 13, 2023

¹ Student Research Committee, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

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

³ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 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

بررسی اثر هسپرتین بر بیان ژن ایترلوكین-۸ در رده سلولی MCF-7

*^۱ حمیده دهقان ^{ID}^۲، میلاد بیده ^{ID}^۳، محبوبه ثابتی اکبرآباد ^{ID}^۴، فاطمه زهرا بیابانی ^{ID}^۵، محمد زنگوئی

چکیده

سرطان پستان شایع‌ترین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سلطان در زنان است. تاکنون درمان قطعی برای سلطان پستان مشخص نشده است. بیان بیش از حد ایترلوكین-۸ با افزایش رشد تومور و متاستاز سلطان پستان در ارتباط است. هسپرتین یک زیر گروه فلاونون از فلاونوئیدها است که به فراوانی در مرکبات، از جمله لیمو و پرتقال یافت می‌شود. با توجه به نقش ضد سلطان و ضد التهابی هسپرتین و همچنین نقش ایترلوكین-۸ در متاستاز و پیشرفت سلطان، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر هسپرتین بر بیان ژن ایترلوكین-۸ در رده سلولی MCF-7 پرداخته شده است. میزان بیان ژن ایترلوكین-۸ در رده سلولی MCF-7 در غلظت‌های $0\text{ }\mu\text{M}$ ، $50\text{ }\mu\text{M}$ ، $100\text{ }\mu\text{M}$ و $200\text{ }\mu\text{M}$ هسپرتین و مدت زمان‌های 6 و 48 ساعت (با غلظت ثابت $100\text{ }\mu\text{M}$) با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. نتایج ما نشان داد که با افزایش غلظت هسپرتین (تا غلظت $100\text{ }\mu\text{M}$) میزان بیان ژن ایترلوكین-۸ کاهش می‌یابد. همچنین میزان بیان ژن ایترلوكین-۸ در تیمار 48 ساعته کمتر از تیمارهای 24 و 6 ساعته بود. هسپرتین با توجه به خواص مختلف از جمله خاصیت‌های ضدسرطانی و ضدالتهابی، با کاهش بیان ژن ایترلوكین-۸ در کاهش خطر متاستاز و پیشرفت بیماری سلطان پستان توانست مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: سلطان پستان، هسپرتین، ایترلوكین-۸، سلول‌های MCF-7

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۱: ۳۹۰-۳۹۶.

دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۳

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

^۲ گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

^۳ گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

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

آدرس: بیرجند- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی- گروه بیوشیمی

تلفن: ۰۹۹۰۲۷۷۰۱۳۹ نامبر: ۰۵۶۳۲۴۳۰۰۴ پست الکترونیکی: zangooei65@gmail.com

مقدمه

تومور در گسترش سلول‌های سرطانی نقش دارد. ایترولوکین-۸ (IL-8) عضوی از خانواده سیتوکاین‌های پیش التهابی^۱ CXC است (۵). ایترولوکین-۸ دارای اثرات پیش التهابی زیادی است و به وسیله سلول‌های طبیعی از جمله فیبروبلاست‌ها و مونوسیت‌ها ترشح می‌شود، همچنین این سیتوکاین به وسیله انواع سلول‌های توموری از قبیل: پروستات، ریه، پستان، معده و رحم ترشح می‌شود (۶). هسپرتین یک زیر گروه فلاؤنون از فلاؤنوئیدها است به طور گسترده در میان مرکبات، از جمله لیمو یافت می‌شود، هسپرتین در طبیعت به صورت آگلیکون هسپریدین است (۷). در واقع هسپریدین یک فلاؤنون گلیکوزیله است که در مرکبات یافت می‌شود و پس از ورودش به مجرای گوارش به کمک یک آنزیم هیدرولیز می‌شود و بخش قندی خودش را از دست می‌دهد و تبدیل به هسپرتین می‌شود (۸). این پلی فنول به دلیل اثر ضد استروژنیک، به عنوان مهارکننده تکثیر سلول‌های سرطان پستان دیده شده که دارای خواص دارویی متعددی است از جمله: خواص ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی، القای آپوپتوز در سلول‌های تومور و محافظت از عملکردهای عصبی و فعال کردن سیگنالینگ آپوپتوز سلول‌های سرطانی است (۹). با توجه به نقش‌های هسپرتین به عنوان یک ماده با خواص مختلف از جمله خاصیت‌های خدسرطانی و ضدالتهابی و همچنین نقش بیان ژن ایترولوکین-۸ در متاستاز و پیشرفت بیماری سرطان پستان، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر هسپرتین بر بیان ژن ایترولوکین-۸ پرداخته‌ایم. نتایج این مطالعه علاوه بر کمک به شناخت سیگنالینگ ملکولی سرطان پستان، برای درک مکانیسم عمل هسپرتین و نقش ضد سرطانی آن، مؤثر است.

روش تحقیق مواد

محیط کشت RPMI-1640، آنتی بیوتیک‌ها و هسپرتین از شرکت sigma (آمریکا-سنتر لوئیس) تهیه شد. Master Mix Real-time RNA، کیت استخراج cDNA از شرکت پارس تووس (مشهد-ایران) تهیه شد. پرایمرهای Forward و

Serotonin پستان یک بیماری شایع، بدخیم و پیش‌رونده، با میزان بروز ۱۱/۹٪ است. سرطان پستان علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان می‌باشد (۱). این سرطان شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان در سراسر جهان است و ۲۵٪ از سرطان‌های زنان را به خود اختصاص داده است. بر اساس آمار مرکز تحقیقات سرطان در ایران، سرطان پستان رایج‌ترین سرطان در بین زنان است و به طور تقریبی از هر ۱۰ زن ایرانی یک نفر احتمالاً به این بیماری مبتلا خواهد شد (۱). بر اساس یافته‌های پاتولوژیک، بسته به اینکه سلول‌های سرطانی در ابتدا در کدام قسمت پستان ایجاد می‌شوند، انواع سرطان پستان متفاوت می‌باشند. یک هدف مولکولی اصلی در پاتوژنیز سرطان پستان گیرنده استروژن است که در حدود ۷۰٪ سرطان‌های مهاجم سینه بیان می‌شود. گیرنده استروژن (ER)^۲ یک گیرنده هورمون استروئیدی و یک فاکتور رونویسی است که وقتی توسط استروژن فعال می‌شود، مسیرهای رشد انکوژن را در سلول‌های سرطان سینه فعال می‌کند (۲). مشخص شده است که ایترولوکین-۸ نقش کلیدی در میانجی‌گری فوتیپ‌های تهابی و واپسنهادکردن که هدف قرار دادن سیگنالینگ ایترولوکین-۸ است استراتژی امیدوارکننده برای درمان سرطان‌های پستان ER+ (۳،۴). تا به امروز به دلیل بروز مقاومت در برابر شیمی‌درمانی در بیشتر بیماران، مناسب‌ترین درمان سرطان پستان جراحی و برداشتن ضایعه می‌باشد (۳). بیش از ۹۰٪ از مرگ و میرهای ناشی از سرطان پستان، به عوارض ناشی از متاستاز نسبت داده می‌شود. متاستاز یک فرآیند ناشناخته است که با جدا شدن سلول‌های توموری اولیه و ورود آن‌ها به جریان خون آغاز می‌شود. این سلول‌های توموری در مویرگ اندام‌های دیگر متوقف می‌شوند و از طریق دیواره عروقی وارد اندام می‌شوند و منجر به تولید کلونی‌های متاستاتیک در سایر اندام‌ها می‌شوند. متاستاز سرطان پستان بیشتر در استخوان، مغز، کبد و ریه اتفاق می‌افتد (۳). التهاب نقش کلیدی در متاستاز تومورها ایفا می‌کند. بیان بیش از حد سیتوکاین‌های پیش التهابی در بافت

² Proinflammatory cytokine C-X-C chemokine

¹ Estrogen Receptor

روی ژل آگارز بردہ شد و نسبت شدت باند ۲۸S به ۱۸S محاسبه شد. نمونه‌هایی که این نسبت در آن‌ها در حدود ۲ به ۱ بوده و فاقد اسمیر بودند برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

cDNA سنتز
به طور کلی برای سنتز cDNA از روی RNA، از oligo dT به عنوان پرایمر استفاده می‌شود که به Random hexamer و یا الگوی RNA متصل شده و امکان رونویسی از RNA را توسط آنزیم رونویسی کننده معکوس در حضور dNTP ها فراهم می‌کند. در این مطالعه سنتز cDNA بر طبق دستورالعمل موجود در کیت cDNA شرکت پارس توس و بر اساس oligo dT انجام شد. سنتز شده تا انجام آزمایشات بعدی در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

Real-time PCR

ابتدا پرایمرهای Forward و Reverse اختصاصی مربوط به ژن ایترلوکین-۸ و ژن کنترل داخلی (B₂M) با استفاده از پایگاه‌های داده بیوانفورماتیک طراحی و بهینه‌سازی شد. پرایمرهای مورد استفاده ژن ایترلوکین-۸ و B2M در جدول ۱ آمده است. برای بررسی سطح mRNA مربوط به ژن ایترلوکین-۸ در Master Mix از Real-time PCR استفاده شد. SYBR Green شرکت پارس توس (مشهد-ایران) استفاده شد. mRNA داده‌های حاصل با روش $\Delta\Delta Ct$ آنالیز شد و مقادیر نسبی هدف در گروه‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بدست آمد.

Reverse ژن ایترلوکین-۸ و کنترل داخلی (B₂M) نیز از شرکت پیشگام (تهران-ایران) تهیه شد.

کشت و تیمار سلولی

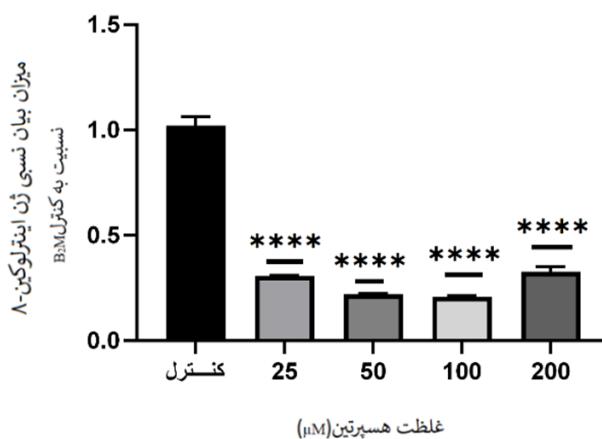
MCF-7 استروژن، پروژسترون و گلوكورتيکويد است که ما در این مطالعه استفاده کردیم. ابتدا سلول‌های MCF-7 در چاهک‌های پلیت شش خانه در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. بر اساس داده‌های حاصل از MTT که توسط گروه تحقیقاتی ما در یک مطالعه همسو با مطالعه حاضر انجام شد، سلول‌ها با پنج غلظت متفاوت از هسپرتین (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ μM) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. همچنین به منظور بررسی اثر هسپرتین بر بیان ژن ایترلوکین-۸ در زمان‌های مختلف، سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از هسپرتین در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند.

استخراج RNA

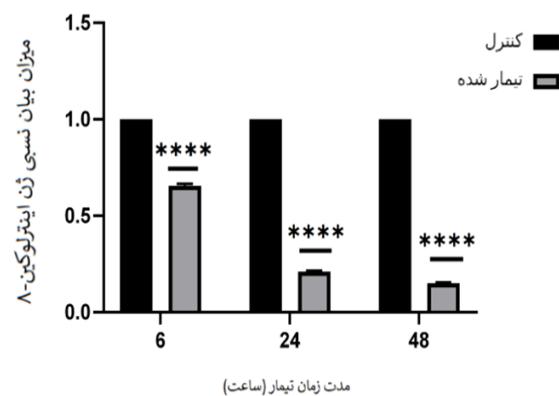
استخراج RNA از سلول با استفاده از کیت شرکت پارس توس (مشهد، ایران) و طبق پرتلکل مربوطه انجام شد. غلظت استخراج شده با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودرآپ به دست آمد. همچنین برای بررسی میزان آلودگی RNA استخراج شده نسبت ۲۶۰/۲۸۰ محاسبه شد. به منظور بررسی کیفیت RNA، مقداری از نمونه استخراج شده بر

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

برایmer reverse	برایmer forward	ژن
TGGGGTGGAAAGGTTGGAG	CAGCTCTGTGTGAAGGTGC	IL8
CCAGACACATAGCAATTCAAGG	GGAGGCTATCCAGCGTACT	B2M



نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف هسپرتین بر بیان نسبی ژن ایترولوکین-۸ در رده سلولی MCF-7. اختلاف هر گروه با گروه کنترل با استفاده از تست Dunnett مشخص شد. داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده‌است. *** $P<0.001$.



نمودار ۲- تأثیر مدت زمان تیمار سلول‌ها با هسپرتین (۱۰۰ μM) بر بیان نسبی ژن ایترولوکین-۸. اختلاف هر گروه با گروه کنترل با استفاده از تست Dunnett مشخص شد. داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده‌است. *** $P<0.001$.

بحث

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است و متاستاز در این سرطان باعث افزایش بدخیمی همراه با مرگ و میر بسیار بالا می‌شود. با این حال، تقریباً هیچ روش مؤثری برای مهار کامل متاستاز سرطان پستان به دلیل فرآیند چند مرحله‌ای و با وجود مسیرهای پیچیده و محل وقوع پراکنده وجود ندارد. بررسی ارتباط بین سطح ایترولوکین-۸ سرمی و حجم تومور نشان داده است که

روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام آزمایشات حداقل سه بار تکرار شد. وجود اختلاف بین گروه‌ها توسط روش آماری One way ANOVA با نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸.۴۳ مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین میزان اختلاف هر گروه با گروه کنترل از تست Dunnett استفاده شد. دامنه اطمینان ۹۵٪ و $P<0.05$ به عنوان تفاوت آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

این مقاله بر اساس طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی بیرونی با کد ۵۹۰۶ و کد اخلاق IR.BUMS.REC.1401.108 نگارش شده است.

یافته‌ها

میزان بیان نسبی ژن ایترولوکین-۸ در رده سلولی MCF-7 در غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۲۰۰ μM هسپرتین و مدت زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت (با غلظت ثابت ۱۰۰ μM) با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد. با توجه به نمودار (۱) میزان بیان ژن ایترولوکین-۸ با افزایش غلظت هسپرتین تا ۱۰۰ μM نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0.001$). علاوه بر این همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده، میزان بیان ژن ایترولوکین-۸ در تیمار ۴۸ ساعته کمتر از تیمارهای ۲۴ و ۶ ساعته بوده است. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۲۰۰ μM هسپرتین به مدت ۲۴ ساعت، و سپس ۱۰۰ μM هسپرتین به مدت ۶ و ۲۴ ساعت، RNA استخراج شد و در بررسی اسپکتروفوتومتری، نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ آن‌ها بالاتر از ۱/۸ به دست آمد که نشان دهنده خلوص RNA و عدم آلودگی آن با DNA می‌باشد. پس از سنتری cDNA و سنجش بیان ایترولوکین-۸، داده‌های حاصل از Real-time PCR در آزمون ANOVA way-One Prism8.43 نشان داده شد که میانگین بیان ژن ایترولوکین-۸ در رده سلولی MCF-7 تیمار شده با هسپرتین نسبت به گروه کنترل در حالت وابسته به دوز کاهش معنی‌داری داشته است و کمترین میزان بیان ژن ایترولوکین-۸ در غلظت ۱۰۰ μM ۴۸ ساعته بوده است ($P<0.001$).

نتیجه‌گیری

نتایج بررسی ما نشان می‌دهد که هسپرتین به عنوان یک ماده با خاصیت‌های ضدسرطانی و ضدالتهابی، با کاهش بیان ژن ایترولوکین-۸ در کاهش خطر متاستاز و پیشرفت بیماری سرطان پستان ER+ می‌تواند مؤثر باشد. همچنین نتایج مربوط به این مطالعه در شناخت هر چه بیشتر مکانیسم‌های مولکولی اثر هسپرتین بر سرطان پستان کمک کننده است و در کنار سایر مطالعات نویدی برای ارائه راهکارهای جدید مقابله با سرطان پستان می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر اساس طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد ۵۹۰۶ و کد اخلاق IR.BUMS.REC.1401.108 بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از دانشگاه علوم پزشکی بیرجند و آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند که ما را در انجام این پژوهش یاری دادند، اعلام کنند.

تضاد منافع

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

هرچه سطح ایترولوکین-۸ افزایش یابد، حجم تومور نیز بزرگتر می‌شود. در واقع بیان بیش از حد ایترولوکین-۸ با افزایش رشد تومور، پیشرفت بیماری و عود سرطان پستان رابطه مستقیم دارد (۱۰). بیان ایترولوکین-۸ با آنژیوژن، تومورزایی و متاستاز تومورها در داخل بدن ارتباط دارد. مطالعات متعددی بیانگر اثر مهاری فلاؤنوتیدهای مختلف بر روی مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌باشد (۱۱، ۹). التهاب به پیشرفت تومور کمک می‌کند و می‌تواند با تولید بیش از حد سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند ایترولوکین-۶، ایترولوکین-۸ ایجاد شود. اولین عارضه ایجاد شده در فرد مبتلا به سرطان پستان، التهاب در ناحیه تومور و بافت‌های سرطانی می‌باشد (۱۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت هسپرتین تا غلظت $100\text{ }\mu\text{M}$ میزان بیان ژن ایترولوکین-۸ به صورت واپسی به دوز کاهش می‌باشد. همچنین میزان بیان ژن ایترولوکین-۸ در تیمار ۴۸ ساعته کمتر از تیمارهای ۲۴ و ۶ ساعته بود. در این بررسی در غلظت $200\text{ }\mu\text{M}$ با وجود کاهش قابل توجه بیان نسبی ژن ایترولوکین-۸ نسبت به کنترل، میزان بیان نسبی ژن ایترولوکین-۸ بیشتر از غلظت $100\text{ }\mu\text{M}$ بود. در مطالعه Polat و همکاران مشخص شد، هسپرتین از طریق اثرات ضد التهابی (کاهش بیان ۶-IL)، آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوز در مدل‌های کولیت ناشی از^۱ TNBS محافظت می‌کند (۱۳). در مطالعه Ren و همکاران که اثر محافظتی هسپرتین بر پاسخ‌های التهابی در سلول‌های RAW264.7 ناشی از لیپوپلی‌ساکارید (LPS)^۲ بررسی شد، مشخص شد که درمان با هسپرتین به طور چشمگیری ترشح فاکتور نکروز تومور^۳ TNF- α ، ایترولوکین-۶ و ایترولوکین-۱ β را سرکوب کرد. همچنین احتمالاً اثر ضد التهابی هسپرتین با مهار^۴ NF-kB^۵ و فعال‌سازی^۶ Nrf2/HO-1 مرتبط است (۱۴).

¹ Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)

² Lipopolysaccharides (LPS)

³ Tumour necrosis factor α (TNF- α)

⁴ Nuclear factor- κ B (NF- κ B)

⁵ Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase 1 (Nrf2/HO-1)

منابع:

- 1- Devericks EN, Carson MS, McCullough LE, Coleman MF, Hursting SD. The obesity-breast cancer link: a multidisciplinary perspective. *Cancer Metastasis Rev.* 2022; 41(3): 607-625. DOI: [10.1007/s10555-022-10043-5](https://doi.org/10.1007/s10555-022-10043-5).
- 2- Majeed AI, Hafeez A, Khan SA. Strengthening Breast Cancer Screening Mammography Services in Pakistan Using Islamabad Capital Territory as a Pilot Public Health Intervention. *Healthcare*; 2022; 10(6), 1106. DOI: [10.3390/healthcare10061106](https://doi.org/10.3390/healthcare10061106)
- 3- Medeiros B, Allan AL. Molecular mechanisms of breast cancer metastasis to the lung: clinical and experimental perspectives. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(9): 2272. DOI: [10.3390/ijms20092272](https://doi.org/10.3390/ijms20092272)
- 4- Fu X, Jeselsohn R, Pereira R, Hollingsworth EF, Creighton CJ, Li F, et al. FOXA1 overexpression mediates endocrine resistance by altering the ER transcriptome and IL-8 expression in ER-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2016; 113(43): E6600-E9. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1612835113>
- 5- Li W, Zhou X, Cai J, Zhao F, Cao T, Ning L, et al. Recombinant *Treponema pallidum* protein Tp0768 promotes proinflammatory cytokine secretion of macrophages through ER stress and ROS/NF-κB pathway. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021; 105(1): 353-66. DOI:[10.1007/s00253-020-11018-8](https://doi.org/10.1007/s00253-020-11018-8)
- 6- Salari N, Kazeminia M, Hosseiniyan-Far A, Mansouri K, Mohammadi M, Noodeh FA. The Effect of Polymorphism A/T 251 of the IL-8 Gene on Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Indian J. Gynecol. Oncol.* 2021; 19(4): 1-12. DOI:[10.1007/s40944-021-00571-3](https://doi.org/10.1007/s40944-021-00571-3)
- 7- Sohel M, Sultana H, Sultana T, Al Amin M, Aktar S, Ali MC, et al. Chemotherapeutic potential of hesperetin for cancer treatment, with mechanistic insights: a comprehensive review. *Heliyon.* 2022; 8(1): e08815. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08815>
- 8- 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): 50-6. DOI: [10.34785/bums024.2022.006](https://doi.org/10.34785/bums024.2022.006) [Persian]
- 9- Jo SH, Kim ME, Cho JH, Lee Y, Lee J, Park Y-D, et al. Hesperetin inhibits neuroinflammation on microglia by suppressing inflammatory cytokines and MAPK pathways. *Arch Pharm Res.* 2019; 42(8): 695-703. DOI: [10.1007/s12272-019-01174-5](https://doi.org/10.1007/s12272-019-01174-5)
- 10- Teijeira A, Garasa S, Ochoa MC, Villalba M, Olivera I, Cirella A, et al. IL8, Neutrophils, and NETs in a Collusion against Cancer Immunity and ImmunotherapyIL8 and NETs in Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2021; 27(9): 2383-93. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-20-1319](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1319)
- 11- de Oliveira JMPF, Santos C, Fernandes E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models. *Phytomedicine.* 2020; 73: 152887. DOI: [10.1016/j.phymed.2019.152887](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152887)
- 12- Deshmukh SK, Srivastava SK, Poosarla T, Dyess DL, Holliday NP, Singh AP, et al. Inflammation, immunosuppressive microenvironment and breast cancer: opportunities for cancer prevention and therapy.. *Ann Transl Med.* 2019; 7(20): 593. DOI: [10.21037/atm.2019.09.68](https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.68)
- 13- Polat FR, Karaboğa İ, Polat MS, Erboğa ZF, Yılmaz A, Güzel S. Effect of hesperetin on inflammatory and oxidative status in trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis model. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2018; 64(11): 58-65. <http://acikerisim.nku.edu.tr/xmlui/handle/20.500.11776/4437> PMID: 30213290
- 14- Ren H, Hao J, Liu T, Zhang D, Lv H, Song E, et al. Hesperetin suppresses inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells via the inhibition of NF-κB and activation of Nrf2/HO-1 pathways. *Inflammation.* 2016; 39(3): 964-73. DOI: [10.1007/s10753-016-0311-9](https://doi.org/10.1007/s10753-016-0311-9)