

간배양 HepG2 세포의 지질대사에 미치는 Hesperidin 및 Naringin의 영향

김범규* · 차재영 · 조영수†

동아대학교 생명자원과학부
*경상대학교 유전공학 연구소

Effects of Citrus Flavonoid, Hesperidin and Naringin on Lipid Metabolism in HepG2 Cells

Beom-Kyu Kim*, Jae-Young Cha and Young-Su Cho†

Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

*Department of Genetic Engineering Research Institute, Kyungsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract

The effects of citrus flavonoids, hesperidin and naringin, on the lipid metabolism were investigated in cultured human hepatocyte HepG2 cells. HepG2 cells were cultured for 6 h and 24 h to the control medium or the media containing hesperidin and naringin, which concentrations were 0.5 and 5.0 mg/ml. There were no significant effects on cell proliferation and cellular protein content, except for increased in these parameters by adding both citrus flavonoids (0.5 mg/ml). The cellular content of triacylglycerol after 6 h incubation with 0.5 mg/ml hesperidin and naringin was markedly increased, and after 24 h incubation that was decreased in both citrus flavonoids supplementation. The supplementation of 5.0 mg/ml hesperidin caused a marked decrease in the cellular cholesterol content following 6 h incubation, and that was also reduced markedly, in a dose-dependent manner, during incubation for 24 h. However, there was no significant difference in the cellular cholesterol content in medium supplemented with naringin. The effect of hesperidin and naringin on acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) activity was studied *in vivo* and *in vitro*. The data confirmed that hesperidin inhibit ACAT activity *in vivo* and *in vitro*, whereas naringin had no such effect on ACAT activity *in vivo* but not *in vitro*. The present study suggests that hesperidin reduces the cellular triacylglycerol and cholesterol contents in human hepatocyte HepG2 cells.

Key words – Hesperidin, Naringin, HepG2 cell, Cholesterol, Triacylglycerol

서 론

플라보노이드는 야채와 과일 등의 식물에 널리 존재하

고, 벤젠핵 두 개를 탄소원자 3개로 연결된 C₆-C₃-C₆의 화학구조를 형성하고 있는 성분의 총칭으로서 식물색소의 본체로 알려져 있다 [19]. 플라보노이드를 구성하고 있는 두

† Corresponding author

개의 페닐기에 이중결합의 유무와 결합위치, hydroxyl group(-OH) 및 methoxyl group(-OCH₃)의 결합수 등에 의해 flavone, flavonol, flavanone, flavanonol 및 isoflavone 등으로 분류되며 현재까지 약 4000종 이상이 알려지고 있다 [19]. 한방약과 생약의 원료로 이용되고 있는 감귤류에도 지금까지 60 여종의 플라보노이드가 분리 되었으며, 이들의 기능성에 대한 평가도 여러 방향에서 검토되고 있다 [24,29]. 감귤류에는 이들 특유의 화학성분으로 알려지고 있는 flavanone 유도체인 hesperidin과 naringin이 비교적 다량으로 함유되어 있다 [24,29]. 최근 이들 두 성분의 기능성에 관한 연구로서는, 항산화 작용 [9,21], 항혈전 작용 [3], 고지혈증 억제작용 [10,11,16], 및 지방간 억제작용 [7] 등이 보고되어 있다. 또한, 역학적 연구조사에서 야채 및 과일 등의 플라보노이드 섭취량과 심근경색의 발증을 및 허혈성 심질환에 의한 사망률과의 사이에 역상관 관계를 나타내는 보고가 있어서, 플라보노이드의 유효성이 더욱 기대된다 [13,14,17]. 그러나, 감귤류 성분을 유효 적절하게 이용한다는 관점에서 볼 때 아직도 이에 대한 연구는 불충분한 것 같다.

감귤류의 flavanone 유도체인 hesperidin 및 naringin에 의한 지질대사에 미치는 영향에 관한 연구는 몇몇 동물실험에 국한되어 있으며 [10,15,16,30], 인체의 지질대사에 관련된 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서, 본실험에서는 인체의 지질대사에 hesperidin 및 naringin이 어느 정도 영향을 미치는지를 검토하기 위하여 사람 간세포 유래의 HepG2 세포를 이용하여 간장 중성지질 및 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 한편, 간장에서 콜레스테롤 에스테르 합성의 중요한 조절효소로 알려진 acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) [31] 활성에 미치는 영향에 대하여 *in vivo* 및 *in vitro*계에서도 검토하였다.

본 실험에 사용한 HepG2 세포는 사람 간유래의 배양세포로서, 영양성분 및 약물 등에 대해서 사람 간 실제 세포와 동일한 반응 양상을 나타내고, VLDL 및 HDL의 리포단백질 합성과 분비가 이루어지고 있으며, LDL 수용체를 가지고 있고, 간성 리파제 및 콜레스테롤 전송에 관여하는 효소를 합성 분비하는 등의 보고가 있어서 사람간에서의 지질대사를 검토하는데 적절한 모델 세포로서 다양하게 연구가 이루어지고 있다 [31-34].

재료 및 방법

실험재료 및 시약

플라보노이드 (Hesperidin, Naringin) 및 우혈청 알부민 (Bovine serum albumin)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A)로부터 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS) 및 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Gibco (Grand Island, New York)으로부터, penicillin-G 및 streptomycin은 Meiji seiyaku (Tokyo, Japan)으로부터 구입하였다. [¹⁴C] oleoyl-CoA 및 scintillation Ex-H 용액은 각각 Amersham International (Amersham, England) 및 Toin kagaku (Kumamoto, Japan)으로부터 구입하였다.

세포배양

HepG2세포를 10% FBS, 0.1 mg/ml penicillin-G, 0.01 mg/ml streptomycin을 함유한 DMEM (기본배지) 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂, 95% 공기의 조건하에서 10 cm Falcon dish로 실험에 제공될 세포수가 되기까지 약 1주일 간 배양하고, 이때 배지는 2~3일에 한번씩 교환하였다. 실험 개시전 세포를 배양기에 2×10⁵개씩 접종하여 세포성장기 배양기 표면의 80~90% 정도 되었을 때 trypsin을 사용하여 세포를 수거하여 subculture를 하였다.

세포 생존율 측정

Hesperidin 및 naringin은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시키고, 이를 0.45 μm 필터 (Millex-HD, Millipore Co.)를 이용하여 여과 멸균시켜 최종농도가 0.5 mg/ml 및 5.0 mg/ml로 각각 배지에 첨가하였다. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide; thiazolyl blue)액은 인산완충액에 5 mg/ml 농도로 용해 시켰다. 세포수가 15×10⁴개 되도록 현탁한 배양액 0.1 ml를 배양용기에 접종하여 24 시간 배양한 후 배양액을 제거하고 DMEM (FBS free)로 세포를 씻어준 후, 각 농도별 hesperidin 및 naringin을 함유한 DMEM 배지에서 6 및 24 시간 각각 배양한 후 세포 생존율을 측정하였다. 세포 성장을 측정은 세포 독성실험 (MTT 방법)에 의하여 전보의 방법으로 하였다 [25].

세포내 지질추출 및 농도측정

각 배지에서 배양하여 회수한 배양세포는 초음파 발생기 (Sonifier 250, Bronson Co.)를 이용하여 파쇄시켜 homogenate 용액을 조제하였다. 조제액중 일부는 Lowry 방법 [22] 으로 단백질을 측정하였고, 나머지는 Bligh & Dyer의 방법 [4] 으로 세포내 총지질을 추출순화 하였다. 추출순화한 지질의 일정량을 농축하여 석유에테르에 용해시켜, 중성지질은 시판효소법 (Triglyceride-E test wako; Wako Junyaku, Osaka, Japan)으로 측정 하였다. 콜레스테롤 농도는 Sillicagel-G plate를 이용한 박층크로마토 그래피법 (TLC)으로 지질획분을 분획한후 GC로 정량하였다.

ACAT 활성측정

ACAT 활성 측정의 효소원은 Zakim 및 Donald 방법 [35]으로 흰쥐의 간장으로부터 microsome을 조제하고, 단백질량은 Lowry 방법 [22]으로 측정 하였다. *In vivo*계 ACAT 활성 측정은 Krause 등의 방법 [18]에 준하여 측정 하였다. ACAT 활성 측정용 효소원은 hesperidin과 naringin을 각각 반합성 식이중에 1% 수준으로 첨가한 식이로 3 주간 사육한 흰쥐로부터 얻은 간장 microsome을 사용하였다. 효소활성 측정은 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 250 mM sucrose 및 3 mg/ml BSA를 함유한 반응액 0.14 ml에 효소액 0.05 ml (0.2 mg 단백질량)를 첨가하여 37°C에서 5 분간 전반응 시켰다. 이 반응액에 0.05 μ Ci [¹⁴C] oleoyl-CoA를 0.01 ml를 첨가하여 2 분간 반응시킨후, chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 혼합액 5 ml 및 0.04 N 염산을 가하여 반응을 정지 시켰다. 일정 시간 정지후 chloroform 하층을 회수하여 농축한 후, Sillicagel-G plate를 이용하여 석유에테르 : 초산 : 디에틸에테르 (82 : 1 : 18, v/v/v) 전개액으로 전개시켜 콜레스테롤 에스테르 획분을 분리하였다. 이 획분에 3.5 ml sintillation 용액을 가하여 잘 혼합 한 후 액체 sintillation counter (WALLAC, Pharmacia 1410, Sweden)에서 방사성 활성을 측정하였다. 생성된 [¹⁴C] 콜레스테롤 에스테르의 비방사능 활성으로부터 그 생성량을 구하여 ACAT 활성으로 하였다. 한편, *in vitro*계 ACAT 활성 측정은 *in vivo*계의 반응액에 각 농도의 hesperidin 및 naringin을 DMSO에 용해시킨 후 첨가하여 동일한 방법으로 측정하였다.

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 Duncan's multiple range test [12]를 이용하여 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

세포 증식에 미치는 hesperidin 및 naringin의 영향 사람 간중양 유래의 배양세포인 HepG2 세포의 증식에 미치는 hesperidin 및 naringin의 영향을 관찰하였다 (Table 1). 세포내의 미토콘드리아 내막중에 존재하면서 호흡쇄에 관여하는 효소인 dehydrogenase에 의해 MTT가 분해 되면서 생성되는 MTT formalzon 량은 대사적으로 활성이 있는 생세포수와 거의 비례하는 것으로 알려져 있다 [25]. 생성된 formalzon을 용해시켜 그 흡광도를 측정하는 원리를 이용한 결과, hesperidin 및 naringin 0.5 mg/ml 첨가, 24 시간 배양에서 세포증식이 유의적으로 증가하였다 (Table 1). 그러나, hesperidin 및 naringin 5.0 mg/ml 농도 첨가에서는 세포 생육이 다소 억제되는 경향을 나타내었다. 따라서, hesperidin 및 naringin 0.5 mg/ml 농도 첨가는 세포내 미토콘드리아 내막중의 호흡쇄에 관련되는 효소를 활성화 시키는 것으로 사료된다. 한편 배양세포의 단백질량은 측정된 결과, hesperidin 5.0 mg/ml 농도에서 약간의 증가경향을 나타내었고, 동일 농도의 naringin 첨가에 의한 영향은 없었다 (Table 2).

Table 1. Effects of hesperidin and naringin on cell proliferation of HepG2 cells

	6 hour	24 hour
	(%)	
Control	100.0±0.01 ^a	100.0±0.01 ^a
Hesperidin		
0.5 mg/ml	102.3±0.01 ^a	125.8±0.02 ^b
5.0 mg/ml	92.4±0.04 ^a	89.1±0.01
Naringin		
0.5 mg/ml	110.0±0.02 ^a	119.6±0.02 ^{ab}
5.0 mg/ml	86.9±0.01 ^{ab}	103.7±0.01 ^a

HepG2 cells were incubated in the medium with or without each component (0.5 and 5.0 mg/ml) for 6 and 24 hours and then growth inhibitory effect was monitored by MTT method (17, 18). Values are the means ± SE of three samples. Values not sharing the same letter are significantly different at *p*<0.05.

Table 2. Effects of hesperidin and naringin on protein concentration in HepG2 cells

	0 hour	6 hour	24 hour
		(μg/dish)	
Control	0.81 ± 0.05	0.75 ± 0.02 ^a	0.88 ± 0.02 ^a
Hesperidin			
0.5 mg/ml		0.87 ± 0.02 ^a	0.80 ± 0.03 ^a
5.0 mg/ml		1.13 ± 0.08 ^b	1.47 ± 0.09 ^b
Naringin			
0.5 mg/ml		0.88 ± 0.01 ^a	0.83 ± 0.01 ^a
5.0 mg/ml		0.86 ± 0.04 ^a	0.87 ± 0.05 ^a

HepG2 cells were incubated in the medium with or without each component (0.5 and 5.0 mg/ml) for 6 and 24 hours. Values are the means ± SE of three samples. Values not sharing the same letter are significantly different at $p < 0.05$

세포내 중성지질 농도에 미치는 hesperidin 및 naringin의 영향

세포내 중성지질 농도는 hesperidin 및 naringin 0.5 mg/ml 첨가, 6 시간 배양에서는 대조군에 비교하여 현저하게 증가 하였으나, 5.0 mg/ml 첨가에서는 대조군과 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 1). 그러나, hesperidin 0.5 mg/ml 및 5.0 mg/ml 첨가에 의한 24 시간 배양에서는 유의적으로 감소하였다. 한편, naringin의 첨가에 의해서는 5.0 mg/ml 농도에서 보다 0.5 mg/ml 의 낮은 농도에서 더욱 저

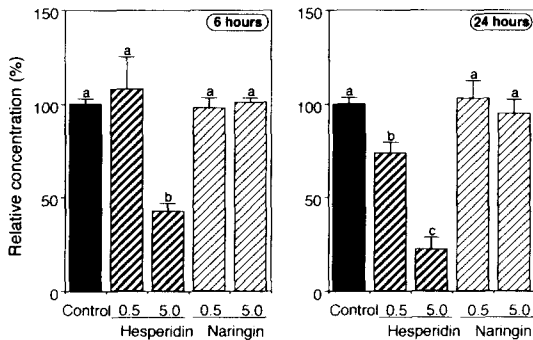


Fig. 1. Effect of hesperidin and naringin on the relative concentration of cholesterol in HepG2 cells.

HepG2 cells were incubated in the medium with or without flavonoid (0.5 mg/ml and 5.0 mg/ml) for 6 and 24 hours. Values are the means ± SE of three samples. Values not sharing the same letter are significantly different at $p < 0.05$.

하되었다.

최근 저자들은 간장에서 중성지질 합성의 중요한 조절 효소로 알려진 막 결합형 phosphatidate phosphohydrolase [8,20] 활성이 감귤류 플라보노이드, hesperidin, naringin 및 naringenin (naringin의 aglycone)에 의해서는 아무런 저해 효과가 없었으나, hesperetin (hesperidin의 aglycone)에 의해서는 농도 의존적으로 저해된 결과를 보고 한바 있다 [6]. 이들 감귤류의 배당체 플라보노이드가 인체내에 흡수될 때 장내 세균에 의해 당의 가수분해를 받아서 이들의 aglycone 형태의 플라보노이드인 hesperetin과 naringenin으로 혈액과 간장등에서 검출 된바 있다 [1]. 그러나, 최근에는 플라보노이드에 당이 결합된 배당체 형태 그대로 흡수되어지고, 또한 흡수된 플라보노이드는 몇 단계의 분해작용을 받아서 만들어진 대사산물의 형태로도 세포의 생리기능에 영향을 미치는 것으로도 시사 되고 있다 [26]. 따라서, 본 실험에서 간배양 세포에 배당체 플라보노이드를 첨가하여 배양한 세포내의 지질대사에 어떤 형태의 화합물로 존재하면서 영향을 미치는지는 정확하게 알 수 없으나, hesperidin과 naringin은 간세포의 중성지질 대사에 상당히 다른 양상으로 영향을 미치는 것으로 생각된다.

세포내 콜레스테롤 농도 및 ACAT 활성에 미치는 hesperidin 및 naringin의 영향

콜레스테롤은 세포막 성분, steroid hormone, 담즙산 등의 전구물질로서 생체에 있어서 필수 성분이다 [5]. 그러나, 과잉의 콜레스테롤 섭취 또는 생체 내에서의 생합성은 고지혈증을 유발시키는 원인이 되며, 관동맥경화 질환 및 뇌경색의 발증 원인으로 지적되고 있다 [2,23]. 천연에 존재하는 플라보노이드는 일상적으로 섭취하는 과일, 채소, 홍차 및 포도주 등에 비교적 많이 함유되어 있으며, aglycone flavonoid 량으로서 하루 적게 섭취하는 사람은 5 mg, 많이 섭취하는 사람에게서는 500 mg 이상인 것으로 나타났다 [13,14,19]. 최근 「French Paradox」, 「Zutphen Elderly Study」 및 「유럽과 일본등의 7개국에 있어서의 플라보노이드 섭취량과 CHD와의 관계」 등의 역학적 연구 보고에서 플라보노이드의 섭취량과 심혈관계 질환에 의한 사망률과의 사이에 높은 상관관계가 있는 것으로 나타나 [13,14,28], 심장질환 등의 혈관계 질환의 예방에 있어서 이들 플라보노이드의 역할이 크게 주목받게 되었다. 본 실험

에서는 간배양세포의 콜레스테롤 농도에 미치는 hesperidin 과 naringin의 영향을 Fig. 2에 나타내었다. HepG2 세포내 콜레스테롤 농도는 hesperidin 5.0 mg/ml 첨가, 6 시간 배양에서 무첨가의 대조군에 비해 약 50% 감소하였다. 그러나, 0.5 mg/ml 첨가에서는 현저한 영향은 관찰되지 않았다. Hesperidin 0.5 mg/ml 및 5.0 mg/ml를 각각 첨가하여 24 시간 배양한 세포내의 콜레스테롤 농도는 첨가농도에 의존적으로 현저한 감소를 보였다. 그러나, HepG2 세포내 콜레스테롤 농도에 미치는 naringin 첨가에 의한 영향은 없었다. 동물 실험에서도 hesperidin에 의한 간장 콜레스테롤 농도 저하가 보고 된바 있다 [10,11,16].

체내의 콜레스테롤은 유리형과 에스테르형으로 존재하며, 콜레스테롤 에스테르는 극성분자를 가지고 있으므로 해서 막중의 콜레스테롤과는 별도로 저장형으로서 세포질 중에 지방적으로서 저장된다. 간장내 ACAT는 세포의 microsome막에 존재하며, 유리형 콜레스테롤에 지방산을 에스테르화 시켜 콜레스테롤 에스테르 생성을 촉진하는 중요한 조절효소로 여겨지고 있다 [31-33]. 따라서, 플라보노이드에 의한 간배양 세포내 콜레스테롤 농도의 저하 기작을 밝혀내기 위하여 ACAT 활성을 측정하였다. Hesperidin 및 naringin을 반합성식이에 1% 수준에서 첨가한 식이를 3주간 섭취시켜 사육한 흰쥐의 간장으로부터 microsome을 분리하여 *in vivo*계에서 ACAT 활성측정에 이용하였

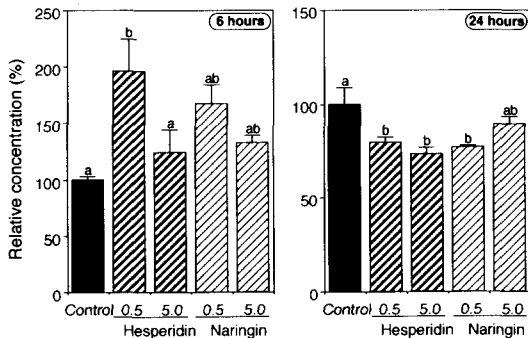


Fig. 2. Effect of hesperidin and naringin on the relative concentration of cholesterol in HepG2 cells. HepG2 cells were incubated in the medium with or without flavonoid (0.5 mg/ml and 5.0 mg/ml) for 6 and 24 hours. Values are the means \pm SE of three samples. Values not sharing the same letter are significantly different at $p < 0.05$.

다. 그 결과, hesperidin을 섭취한 동물의 간장에서 얻어진 ACAT 활성은 무첨가의 대조군에 비교해서 억제 되었으나, naringin의 섭취에 의해서는 이러한 억제는 관찰되지 않았다. 한편, *in vitro*계에서의 본 효소 활성은 hesperidin 및 naringin 10^{-5} M 농도에서 유의적으로 억제되었다 (Table 3). 플라보노이드의 한종류인 baicalein도 HepG2 세포내의 ACAT 활성을 억제시킴으로서 세포내의 콜레스테롤 에스테르 생성을 감소시켜 총 콜레스테롤 농도를 감소시켰다고 보고 한바 있다 [15]. 또한, 동물 실험에서도 hesperidin에 의한 총 콜레스테롤 농도의 저하가 콜레스테롤 에스테르 저하에 기인하는 것으로 보고 되어져있다 [27]. 따라서, 감귤류 플라보노이드인 hesperidin에 의한 HepG2 세포내 콜레스테롤 농도의 저하는 ACAT 활성 저해에 의한 콜레스테롤 생합성의 억제에 의한 것으로 시사된다. 그러나, 본 HepG2 세포에서 직접 ACAT 활성을 측정하지 않았기 때문에 직접적인 활성의 측정이 요구된다.

이상의 결과에서, 감귤류 플라보노이드인 hesperidin은 사람 간세포 유래의 HepG2 세포내 중성지질 및 콜레스테롤 농도를 저하시켰다. 본 실험에서는 일상 생활에서 손쉽게 얻을 수 있는 감귤류에서 건강증진 효과를 나타내는 기능성 성분을 유효적절하게 이용 할 수 있다는 면에서 매

Table 3. Effects of hesperidin and naringin on the activity of hepatic microsomal acyl-CoA: cholesterol acyltransferase *in vivo* and *in vitro*

Activity (pmol/min/mg protein)	
<i>in vivo</i>	
Control	281 \pm 13 ^a
Hesperidin	198 \pm 23 ^b
Naringin	262 \pm 5 ^a
<i>in vitro</i>	
Control	138 \pm 4 ^a
Hesperidin 10^{-7} M	127 \pm 4 ^{ab}
Hesperidin 10^{-5} M	117 \pm 6 ^b
Naringin 10^{-7} M	127 \pm 3 ^{ab}
Naringin 10^{-5} M	121 \pm 6 ^{ab}

The enzyme source isolated from rats fed on semipurified diets containing hesperidin or naringin at the 1% level for 3 weeks. Values are the means \pm SE of six rats *in vivo* experiment and three samples *in vitro* experiment. Values not sharing the same letter are significantly different at $p < 0.05$.

우 흥미있을 것으로 기대된다.

요 약

감귤류의 플라보노이드인 hesperidin과 naringin이 사람 간세포 유래의 배양세포인 HepG2 에서의 지질대사에 미치는 영향을 검토하였다. 간배양 세포는 hesperidin과 naringin 0.5 및 5.0 mg/ml의 농도를 첨가 또는 무첨가(대조군)하여 각각 6 및 24시간 배양하였다. 그 결과, 세포성장에는 hesperidin 및 naringin의 첨가에 의한 현저한 영향은 없었으나, 0.5 mg/ml 농도에서 다소 세포성장률이 촉진되는 것으로 나타났다. 세포내 중성지질 농도는 hesperidin 및 naringin의 0.5 mg/ml 첨가, 6시간 배양에서는 증가하였고, 24시간 배양에서는 감소하였다. 세포내 콜레스테롤 농도는 hesperidin 5.0 mg/ml의 농도로 첨가하여 6 및 24시간 배양시 유의적으로 감소하였다. 그러나, 세포내 콜레스테롤 농도에 미치는 naringin에 의한 영향은 없었다. 콜레스테롤 에스테르 합성을 촉매하는 효소인 acyl-CoA; cholesterol acyltransferase (ACAT) 활성은 *in vivo* 및 *in vitro*계에서 hesperidin에 의해서는 저해되었고, naringin에 의해서는 *in vitro*계에서만 저해되었다. 이상의 결과에서, hesperidin은 간세포 유래의 HepG2 세포내의 중성지질 및 콜레스테롤 농도를 저하시키는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Ameer, B., Weintraub R. and Johnson, J. 1995. Metabolism of naringin and hesperidin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **57**, 186.
2. Assmann, G. and Schulth, H. 1992. Relation of HDL cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (The PROCAM Experiment). *Am. J. Cardiol.* **70**, 733-737.
3. Basarkar, P. W. and Nath, N. 1981. Cholesterol lowering action of vitamin P-like compounds in rats. *Indian J. Exp. Biol.* **19**, 787-789.
4. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
5. Brown, M. S., Kovanen, P. T. and Goldstein, J. L. 1979. Receptor mediated uptake of lipoprotein cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the

- adrenal cortex. *Recent Prog. Hormone Res.* **35**, 215-258.
6. Cha, J.-Y. and Cho, Y.-S. 1997. Effects of hesperidin, naringin and their aglycones on the *in vitro* assay phosphatidate phosphohydrolase, and on the proliferation in cultured human hepatocytes HepG2 cells. *Agri. Chem. Biotech.* **40**, 577-582.
7. Cha, J.-Y., Mameda, Y., Furukawa, J., Rahman, M., Anno, N. and Yanagita, T. 1997. Preventive effect of hesperetin on orotic acid-induced fatty liver. *51th annual Meeting of Japanese Society of Nutrition and Food Science(Japan,Tokyo)*. p.114.
8. Cha, J.-Y., Maeda, Y., Oogami, K., Yamamoto, K. and Yanagita, T. 1998. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 508-513.
9. Chen, Y. T., Zheng, R. L., Jia, Z. J. and Ju, J. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biol. Med.*, **9**, 19-21.
10. Choi, J. S., Yokozawa, T. and Oura, H. 1991. Anti-hyperlipidemic effects of flavonoids from *Prunus Davidiana*. *J. Natl. Product.* **54**, 218-224.
11. Curto, R. B. L. 1995. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (note II) : Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *IL Farmaco.* **50**, 595-599.
12. Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **1**, 1-42.
13. Hertog, M. G. L., Fesken, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* **342**, 1007-1011.
14. Hertog, M. G. L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B. S., Toshima, H., Fesken, E. J. M., Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* **155**, 381-386.
15. Hisatomi, T., Hara, E., Furukawa, J., Cha, J.-Y., Anno, N. and Yanagita, T. 1995. Effect of dietary hesperidin and their aglycone on the lipid metabolism in rats. *Annual Regional Meeting of Agricultural Chemical Society of Japan(Japan, Hirishima)*. p. 121.
16. Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K., and Uchino, K. 1997. Hesperidine as an inhibitor of lipases from

- porcine pancreas and pseudomonas. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 102-104.
17. Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. and Maatela, J. 1997. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland : a cohort study. *Br. Med. J.* **312**, 478-481.
 18. Krause, B. R., Anderson, M., Bisgaier, C. L., Bocan, T., Bousley, S., DeHart, S., Essenburg, A., Hamelehle, K., Homan, R., Kieft, K., McNally, W., Stanfield, R. and Newton, R. S. 1993. *In vivo* evidence that lipid-regulating activity of the ACAT inhibitor CI-976 in rats is due to inhibition of both intestinal and liver ACAT. *J. Lipid Res.* **34**, 279-297.
 19. Kuhnán, J. 1976. The Flavonoids. A class of semi-essential food components : their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet* **24**, 117-191.
 20. Lamb, R. G. and Fallon, H. J. 1974. Glycerolipid formation from sn-glycerol-3-phosphate by rat liver cell fractions. *Biochem. Biophys. Acta* **348**, 166-178.
 21. Laughton, M. J., Evana, P. J. Moroney, M. A., Hoult, J. R. S. and Halliwell, B. 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pham.*, **42**, 1673-1681.
 22. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Ranll, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 23. Manninen, V., Tenkanen, L., Koskinen, P., Huttunen, J. K., Manntari, M., Heinonen, O. P. and Frick, M. H. 1992. Triglycerides and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentration on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. *Circulation* **85**, 37-45.
 24. Mouly, P. P. M., Arzouyan, C. G., Gaydou, E. M. and Estienne, J. M. 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *J. Agric. Food. Chem.* **42**, 70-79.
 25. Oka, K., Maeda, S., Koga, N., Kato, K. and Saito, T. 1992. A modified colorimetric MTT assay adapted for primary cultured hepatocytes : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1472-1473.
 26. Pagana, G. and Rice-Evans, C.A. 1997. *FEBS Lett.* **401**, 78.
 27. Rathi, A. B., Nath, N. and Chari, S. N. 1983. Action of vitamin P like components on lysosomal status in hypercholesterolemic rats. *Acta Vitaminol. Enzymol.* **5**, 255-261.
 28. Renand, S. and de Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**, 1523-1526.
 29. Rousff, R. L., Martin, S. F. and Youtsey, C. O. 1987. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in citrus. *J. Agric. Food. Chem.* **35**, 1027-1030.
 30. Yanagita, T., Hisatomi, T., Nunez, J. F., Cha, J.-Y. and Anno, N. 1995. The effect of naringin and it aglycon on the lipid metabolismes in rats. *49th annual Meeting of Japanese Society of Nutrition and Food Science(Japan,Kifu)*, p.21.
 31. Yanagita, T., Sonda, K., Yamamoto, K., Yotsumoto, H., Nunez, H.J. and Murakami, S. 1995. Effect of a new acly-coenzyme A : cholesterol aclytransferase inhibitor, HL-004, on cholesterol esterification and lipid metabolism in HepG2 cells. *Cur. Therapeutic Res.* **56**, 787-795.
 32. Yanagita, T., Yamamoto, K., Ishida, S., Sonda, K., Morito, F., Saku, K. and Sakai, T. 1994. Effect of simvastatin, a cholesterol synthesis inhibitor, on phosphatidylcholine synthesis in HepG2 cells. *Cli. Therapeutics.* **16**, 200-208.
 33. Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, J.-Y. and Mori, Y. 1997. Inhibitory effect of Oren-Gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells : Evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Med.* **63**, 141-145.
 34. Yotsumoto, H., Hara, E., Hu, Y., Nunez, J. F., Cha, J.-Y. and Yanagita, T. 1996. Effects of *cis*, *cis*-octadecadienoic acid and serum albumin on lipid metabolism in HepG2 cells. *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.* **81**, 47-54.
 35. Zakim, D. and Donald, V.A. 1973. Techniques for the characterization of UDP-glucuronyltransferase, glucose-6-phosphate, and other tightly bound microsomal enzymes. *Methods Biochem. Anal.* **21**, 1-37.