

에스트로겐성 물질에 의해 자극된 인간 유방암 세포 증식에 대한 다이드제인, 바이칼레인, 헤스페리딘 및 우르솔산의 억제 효과

이미남 · 이수열 · 이현재 · 석정호 · 이충재[#]

충남대학교 의학전문대학원 약리학교실

(Received March 14, 2010; Revised March 29, 2010; Accepted March 29, 2010)

Anti-proliferative Effects of Daidzein, Baicalein, Hesperidin and Ursolic Acid on Human Breast Cancer Cells Stimulated by Estrogenic Compounds

Mi Nam Lee, Su Yel Lee, Hyun Jae Lee, Jeong Ho Seok and Choong Jae Lee[#]

Department of Pharmacology, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-131, Korea

Abstract — We investigated whether three flavonoids including daidzein, baicalein, hesperidin and ursolic acid, a triterpene acid, affect proliferation of MCF-7 human breast cancer cells stimulated by estrogenic compounds. Ursolic acid and baicalein inhibited proliferation of MCF-7 cells induced by PhIP, a food-derived carcinogen with estrogenic activity. Daidzein and hesperidin inhibited estradiol-induced proliferation of MCF-7 cells. These compounds should be further investigated for the possible involvement in signaling pathway after estrogen receptor binding in breast cancer cells.

Keywords □ flavonoids, triterpenoids, MCF-7, cytotoxicity

인체에 발병할 수 있는 다양한 악성종양 병변 중, 유방암은 악성종양으로 인한 사망 및 후유장애의 주요인으로 자리잡고 있다.^{1,2)} 유방암의 치료를 위하여 다수의 항암제들이 개발되어 현재 임상에서 활용되고 있지만 여전히 더 효능이 향상되고 부작용이 적은 새로운 유방암 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 잘 알려진 바와 같이, 에스트로겐성 물질은 여성 생식과 관련된 다양한 세포의 증식, 분화 및 정상적 기능 유지에 있어서 중요한 역할을 하고 있으며 에스트로겐 활성을 발현하는 물질 중 생리적으로 가장 중요한 물질은 17 β -estradiol로서, 이 물질은 유방암의 발병에 있어서도 주 위험요인으로 작용하고 있다.³⁾ 동시에, 인체 악성종양의 다양한 병인 중 식이, 특히 육식은 주요한 병인으로 작용할 수 있음이 역학적 연구에 의해 알려져 있으며, 우육, 계육, 생선 등의 고온 가열 조리과정에서 생성되는 다수의 복소환 이민성 화합물(heterocyclic amines) 중 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine(PhIP)는 돌연변이원성 및 발암성을 나타냄으로써 전립선, 대장, 유선 조직 등

에 악성종양 생성을 유발할 수 있음이 보고되어 있다.⁴⁾ PhIP는 특히 암컷 흰쥐에서 대장 조직 보다는 유선 조직에 우선적으로 악성종양을 유발하며, 기존에 알려진 것과 같이 유전독성(genotoxicity)을 발현함과 동시에 에스트로겐 수용체를 경유하는 세포 신호전달 경로를 활성화시킬 수 있음이 보고되어 있다.^{3,4)} 한편, 식이 중 채식(과일의 과육, 과피 및 야채)을 통하여 인체에 흡수되는 플라보노이드 및 트리테페노이드계 물질은 복수의 기전을 경유하여 항암작용을 나타낼 가능성이 많은 연구자들에 의해 보고되어 왔다.⁵⁻⁹⁾ 즉, daidzein 및 baicalein을 포함하여 hesperidin과 같은 플라보노이드는 항염증, 항산화, 특정한 암세포주에 대한 항증식(항암) 활성을 발현하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻¹²⁾ Pecking 등과 Cluzan 등은 hesperidin을 포함한 플라보노이드성 물질들이 유방암의 치료 후에 관찰되는 림프부종을 효과적으로 조절할 수 있음을 보고하였고,^{8,9)} So 등은 hesperidin 및 다양한 플라보노이드성 물질들이 인간 유방암 세포주의 증식을 억제하고, 유방암의 발병 과정을 지연시킬 수 있음을 보고하였다.⁶⁾ Choi 등은 hesperidin의 aglycone form인 hesperetin이 인간 유방암 세포의 세포주기를 G1-phase에서 정체시킴으로써 항증식 효과를 발현할 가능성을 제시하였다.⁵⁾ 또한, 트리테페노이드인 ursolic acid는 인간의 간암 세포,¹⁰⁾ 전립선암 세포,¹¹⁾ 난소암 세포¹²⁾ 등

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-580-8255 (팩스) 042-585-6627
(E-mail) LCJ123@cnu.ac.kr

에 대해 항증식 효과를 발현함이 보고되어있다. 그러나, 상기한 천연물들이 PhIP 등 에스트로겐성 활성을 지닌 물질에 의해 야기되는 유방암 세포의 증식에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지에 대해서는 지금까지 검증된 바가 없었다. 따라서, 본 연구에서는, daidzein, baicalein, hesperidin 등 3종의 플라보노이드와 ursolic acid와 같은 트리테르페노이드가 17beta-estradiol 또는 PhIP에 의해 자극된 MCF-7 인간 유방암 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보려고 하였다.

실험방법

세포주 및 시약

인간 유방암 세포인 MCF-7 세포주는 American Type Culture Collection사(Manassas, VA, U.S.A.)에서 구입하였다. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine(PhIP)은 Toronto Research Chemicals(North York, ON, Canada)에서, Sulforhodamine B(SRB), trypsin-EDTA, Trizma base, 17beta-estradiol, 5% charcoal stripped-fetal bovine serum(CS-FBS), trichloroacetic acid(TCA), hesperidin(purity: 90.0%), baicalein(purity: 95.0%), daidzein(purity: 95.0%), ursolic acid(purity: 90.0%), L-glutamine, sodium bicarbonate, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), RPMI 1640은 GIBCO-BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)에서 각각 구입하였고, 기타 시약들은 일급시약 등급 이상의 것들을 사용하였다.

인간 유방암 세포의 배양

MCF-7 세포는 습도가 충분히 유지되고 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37°C 조건의 배양기 내에서 L-glutamine(2 mM), sodium bicarbonate(44 mM), penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml), FBS(10%, V/V) 등이 첨가된 DMEM 배양액을 이용하여 배양되었으며, 1주에 2회 빈도로 subculture하였고 배양액은 2일마다 1회씩 교체해 주었다.

유방암 세포의 증식에 미치는 각 약물의 영향 검증

PhIP 및 17beta-estradiol 처리에 의한 MCF-7 세포의 증식 유발 효능과, 각 약물에 의한 증식 저해(억제) 효능을 정확하게 검증하기 위하여 direct cell counting 방법을 적용하였다. 즉, 6 well plate의 각 well에 1×10⁴개의 세포를 함유하는 DMEM 배양액(FBS 10% 함유) 1 ml를 가하여 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 72시간 동안 배양하였다. 세포에 약물을 처리하기 이전에, 세포에 가해지는 모든 에스트로겐성 영향을 차단하기 위하여 phenol red가 제거된 DMEM 배양액에 5% charcoal-stripped FBS를 첨

가한 배양액으로 교체하고 다시 72시간 동안 배양한 후, 10 nM의 17beta-estradiol 또는 100 nM의 PhIP 단독 처리 혹은 0.1~100 µM 농도의 hesperidin, baicalein, daidzein, ursolic acid를 각각 전처리 후 10 nM의 17beta-estradiol 또는 100 nM의 PhIP를 처리하였다. 이러한 약물 처리 방법을 적용하여 48시간 마다 약물을 함유한 배양액을 교체해 주는 방법으로 총 6일간(48시간×3회) 배양한 후, 각 well에 존재하는 세포의 수를 hemacytometer를 이용하여 직접 계수하였다.

통계처리

모든 측정 결과는 Mean±S.E.M.으로 환산된 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 one-way ANOVA 및 unpaired Student's *t*-test로 하였으며, p<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

MCF-7 세포에 대한 17beta-estradiol의 증식 유발(자극) 효과

Fig. 1에서 볼 수 있는 것처럼, 17beta-estradiol(E2로 약칭)은 0.1~10 nM 범위에서 농도의존적으로 MCF-7 세포의 증식을 유발함을 관찰하였다. 처리 농도별 세포수는 대조군, E2 0.1 nM, E2 1 nM, E2 10 nM, E2 100 nM 처리군에서 각각 100±7%, 113±8%, 137±8%, 259±15%, 228±12%이었다. E2 10 nM 처리군과 E2 100 nM 처리군에서 세포 증식 유발효과가 거의 유사하므로 이후의 실험에서 E2를 처리하여 세포 증식을 유발하고

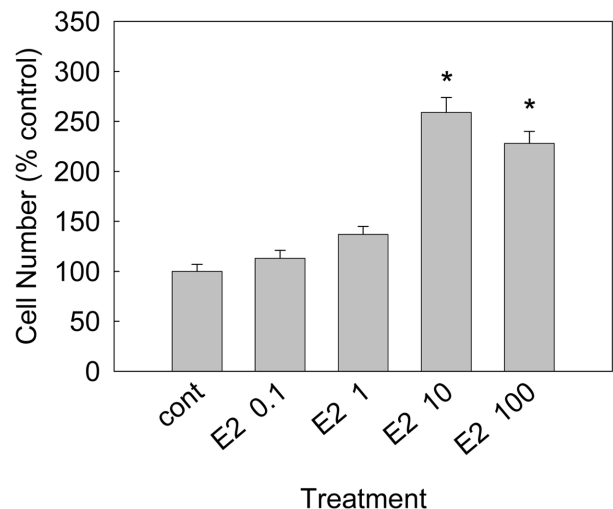


Fig. 1 – Effect of 17beta-estradiol on proliferation of MCF-7 cells. Each bar represents a mean±S.E.M. of three independent experiments in comparison with that of the control set at 100%. The number of cells in control well was 145,000±10,150 (E2; 17beta-estradiol). * Significantly different from control (p<0.05).

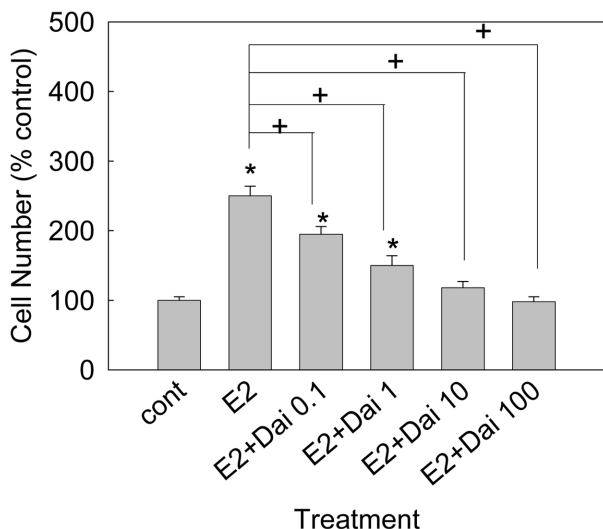


Fig. 2 – Effect of daidzein on 17beta-estradiol-induced proliferation of MCF-7 cells. Each bar represents a mean±S.E.M. of three independent experiments in comparison with that of the control set at 100%. The number of cells in control well was 128,000±6,400 (E2; 17beta-estradiol, Dai; daidzein). * Significantly different from control (p<0.05). + Significantly different from 17beta-estradiol-only treatment (p<0.05).

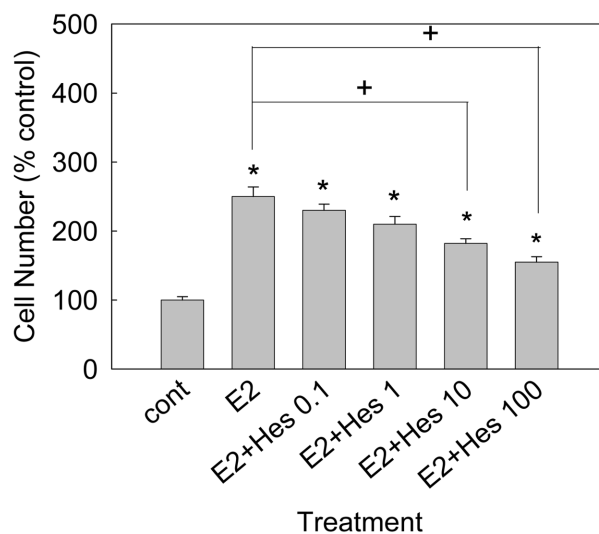


Fig. 3 – Effect of hesperidin on 17beta-estradiol-induced proliferation of MCF-7 cells. Each bar represents a mean±S.E.M. of three independent experiments in comparison with that of the control set at 100%. The number of cells in control well was 114,000±5,700 (E2; 17beta-estradiol, Hes; hesperidin). * Significantly different from control (p<0.05). + Significantly different from 17beta-estradiol-only treatment (p<0.05).

자 할 때에는 10 nM 농도로 처리하기로 하였다.

17beta-estradiol로 유발된 세포 증식에 대한 daidzein의 억제 효과

Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼, daidzein은 0.1~100 μM 범위에서 10 nM의 E2로 유발된 유방암 세포의 증식을 농도의존적으로 억제함을 관찰하였다. 처리 농도별 세포수는 대조군, E2 10 nM 단독, E2 10 nM+daidzein 0.1 μM, E2 10 nM+daidzein 1 μM, E2 10 nM+daidzein 10 μM, E2 10 nM+daidzein 100 μM 처리군에서 각각 100±5%, 250±14%, 195±11%, 150±14%, 118±9%, 98±7%이었다.

17beta-estradiol로 유발된 세포 증식에 대한 hesperidin의 억제 효과

Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼, hesperidin도 역시 0.1~100 μM 범위에서 10 nM의 E2로 유발된 유방암 세포의 증식을 농도의존적으로 억제함을 관찰하였다. 처리 농도별 세포수는 대조군, E2 10 nM 단독, E2 10 nM+hesperidin 0.1 μM, E2 10 nM+hesperidin 1 μM, E2 10 nM+hesperidin 10 μM, E2 10 nM+hesperidin 100 μM 처리군에서 각각 100±5%, 250±14%, 230±9%, 210±11%, 182±7%, 155±8%이었다.

MCF-7 세포에 대한 PhIP의 증식 유발(자극) 효과

Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼, PhIP는 100 nM과 1 μM 농도

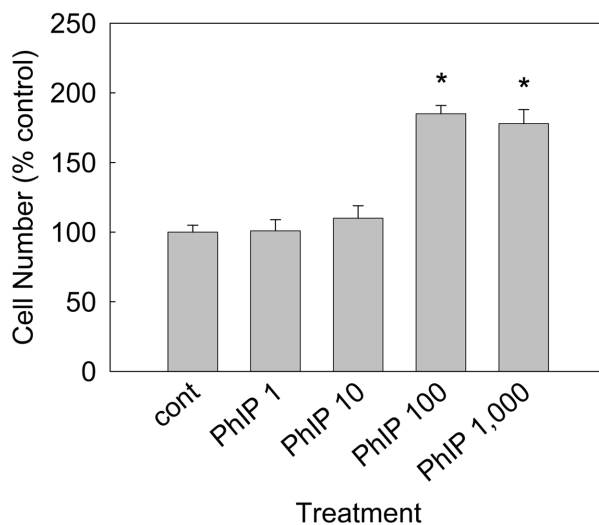


Fig. 4 – Effect of PhIP on proliferation of MCF-7 cells. Each bar represents a mean±S.E.M. of three independent experiments in comparison with that of the control set at 100%. The number of cells in control well was 135,000±6,750. * Significantly different from control (p<0.05).

에서 MCF-7 세포의 증식을 유발함을 관찰하였다. 처리 농도별 세포수는 대조군, PhIP 1 nM, PhIP 10 nM, PhIP 100 nM, PhIP 1,000 nM(1 μM) 처리군에서 각각 100±5%, 101±8%, 110±9%, 185±6%, 178±10%이었다. PhIP 100 nM 처리군과 1 μM 처리군에서 세포 증식 유발효과가 거의 유사하므로 이후

의 실험에서 PhIP를 처리하여 세포 증식을 유발하고자 할 때에는 100 nM 농도로 처리하기로 하였다.

PhIP로 유발된 세포 증식에 대한 ursolic acid의 억제 효과

Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼, ursolic acid는 1~100 μM 범위

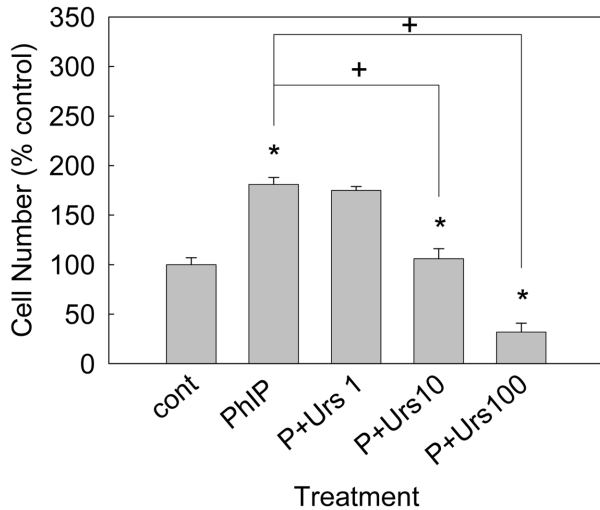


Fig. 5 – Effect of ursolic acid on PhIP-induced proliferation of MCF-7 cells. Each bar represents a mean±S.E.M. of three independent experiments in comparison with that of the control set at 100%. The number of cells in control well was 155,000±10,850 (P; PhIP, Urs; ursolic acid). * Significantly different from control (p<0.05). + Significantly different from PhIP-only treatment (p<0.05).

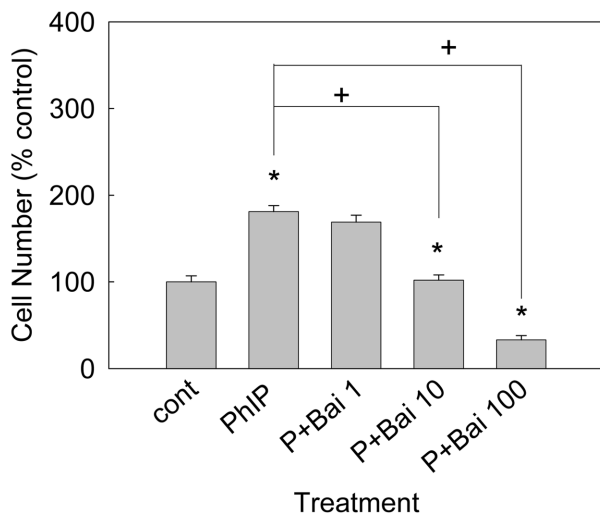


Fig. 6 – Effect of baicalein on PhIP-induced proliferation of MCF-7 cells. Each bar represents a mean±S.E.M. of three independent experiments in comparison with that of the control set at 100%. The number of cells in control well was 115,000±8,050 (P; PhIP, Bai; baicalein). * Significantly different from control (p<0.05). + Significantly different from PhIP-only treatment (p<0.05).

에서 100 nM의 PhIP로 유발된 유방암 세포의 증식을 농도의존적으로 억제함을 관찰하였다. 처리 농도별 세포수는 대조군, PhIP 100 nM 단독, PhIP 100 nM+ursolic acid 1 μM, PhIP 100 nM+ursolic acid 10 μM, PhIP 100 nM+ursolic acid 100 μM 처리군에서 각각 100±7%, 181±7%, 175±4%, 106±10%, 32±9%이었다.

PhIP로 유발된 세포 증식에 대한 baicalein의 억제 효과

Fig. 6에서 볼 수 있는 것처럼, baicalein은 1~100 μM 범위에서 100 nM의 PhIP로 유발된 유방암 세포의 증식을 농도의존적으로 억제함을 관찰하였다. 처리 농도별 세포수는 대조군, PhIP 100 nM 단독, PhIP 100 nM+baicalein 1 μM, PhIP 100 nM+baicalein 10 μM, PhIP 100 nM+baicalein 100 μM 처리군에서 각각 100±7%, 181±7%, 169±8%, 102±6%, 33±5%이었다.

고 찰

잘 알려져 있는 것처럼, 유방암 세포에 대한 에스트로겐의 주 작용은 nuclear receptor superfamily에 속하는 에스트로겐 수용체-α(ER-α)와 에스트로겐 수용체-β(ER-β)에 의해 매개된다. Gene knockout technic을 이용한 연구에 의해 밝혀진 바, ER-α는 정상적인 유선의 발육을 포함하여 여성 생식계통의 발달을 위해 필수적이며, ER-β 유전자를 녹아웃시킬 경우에는 유선의 정상적 발달에는 외관상 지장이 없는 것처럼 보이나, 유선 말단부의 정상적 분화에 문제가 생길 수 있음이 보고되어 있다.³⁾ 대부분의 유방암에서 ER-β 수용체의 존재가 확인되나, 유방암 발병에 있어서의 명확한 역할에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. ER-α는 유방암의 진행에도 중요한 역할을 하지만, 유방암의 개시 과정(initiation)에서도 중요한 역할을 할 가능성이 제시되었다. 본 연구에서 사용된 PhIP는 유방암 세포에 존재하는 ER-α 수용체를 자극함으로써 에스트로겐에 의해 조절되는 유전자의 활성화 및 세포의 증식을 야기하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 한편, 플라보노이드는 복수의 기전을 경유하여 인간 암세포의 증식을 억제할 수 있는 것으로 보고되어 있다.^{5,13-16)} 플라바논 화합물인 hesperidin을 포함한 다수의 플라보노이드들은 발암원(carcinogen)이 생체 내에서 결정적인 발암 개시 부위에 접근하는 과정을 차단하거나, 발암원의 독성을 무독화시키는 등의 기전을 경유하여 발암원에 의한 새로운 악성종양의 형성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ Park 등은 hesperidin이 caspase-3의 활성화를 통하여 대장암 세포에 대하여 세포자멸사를 유도함을 보고하였다.¹³⁾ Yeh 등은 hesperidin이 matrix metalloproteinase-9의 유전자 발현 억제 기전을 경유하여 간암 세포의 거동에 영향을 줄 가능성이 있다고 보고하였으며,¹⁴⁾ hesperidin은 폐암 세포¹⁵⁾에 대해서도 항증식 효과를 발현

함이 보고되어 있다. Fukutake 등은 생약인 황금(*Scutellariae Radix*)에서 유래된 플라보노이드 성분인 baicalin 등이 흰쥐의 직장에서 cyclooxygenase-1을 억제하는 기전을 경유하여 효과적인 발암예방 약물로 작용할 가능성을 제시¹⁷⁾하였으며, Chuang 등은 baicalin 및 baicalein이 암세포의 세포자멸사를 유도할 수 있는 TGF(transforming growth factor) beta-1 유전자의 발현을 촉진시킴을 보고하였다.¹⁸⁾ 또한, ursolic acid와 같은 triterpenoids는 다양한 기전을 경유하여 인체 악성종양 세포의 증식을 억제함이 보고되어 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 그러나, 서론에서 언급한 바와 같이 이러한 천연물들이 PhIP 등 육식 섭취를 통하여 인체에 유입될 수 있는 에스트로겐성 활성을 지닌 물질에 의해 유도되는 유방암 세포의 증식에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지에 대해서는 지금까지 검증된 바가 없었다. Daidzein 및 hesperidin은 각각 에스트로겐 수용체에 대하여 selective estrogen receptor modulator (SERM)로서 작용할 가능성^{19,20)}이 제시되었으므로 17beta-estradiol에 의해 자극된 암세포의 증식에 대한 영향이 검증되었으며, baicalein과 ursolic acid는 PhIP에 의해 발암과정이 자극될 수 있는 또다른 주요 인체 악성종양인 전립선 암세포의 증식을 억제할 수 있는 것으로 보고되어 있으므로,^{21,22)} PhIP에 의해 자극된 유방암 세포의 증식에 대한 영향이 검증되었다. 실험 결과에서 알 수 있듯이, 17beta-estradiol 및 PhIP는 각각 MCF-7 세포의 증식을 유발하였으며, daidzein 및 hesperidin은 17beta-estradiol에 의해 자극된 암세포의 증식을 유의하게 억제하였고, baicalein과 ursolic acid는 PhIP에 의해 자극된 암세포의 증식을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 일상적인 식생활 중 육식을 통하여 인체에 흡수되는 PhIP 등 발암물질의 작용을, 식이 내용물 중 채소, 과일 등에 함유된 플라보노이드 및 트리테르페노이드 등이 억제할 가능성을 일부나마 시사하는 연구결과라고 생각된다. 따라서, 향후의 연구를 통하여 daidzein, hesperidin, baicalein 및 ursolic acid 등이 PhIP에 의한 수용체 자극단계 혹은 여타의 신호전달 과정에서 어떠한 영향을 미침으로써 세포증식 억제작용을 발현하는 지를 탐색함으로써 상기의 물질들이 효과적인 발암 예방약물로 응용될 가능성을 지속적으로 규명해 나아가야 할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

This study was financially supported by research fund of Chungnam National University in 2008.

참고문헌

1) Muñoz, M., Estévez, L. G., Alvarez, I., Fernández, Y., Margelí, M., Tusquets, I., Seguí, M. A. and Lluch, A. : Evaluation of

- international treatment guidelines and prognostic tests for the treatment of early breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* **34**(8), 701 (2008).
- 2) Long, B. J., Grigoryev, D. N., Nnane, I. P., Liu, Y., Ling, Y. Z. and Brodie, A. M. : Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors on hormone-dependent prostate cancer. *Cancer Res.* **60**(23), 6630 (2000).
- 3) Lauber, S. N., Ali, S. and Gooderham, N. J. : The cooked food derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine is a potent oestrogen: a mechanistic basis for its tissue-specific carcinogenicity. *Carcinogenesis* **25**(12), 2509 (2004).
- 4) Lauber, S. N. and Gooderham, N. J. : The cooked meat derived genotoxic carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-b]pyridine has potent hormone-like activity: mechanistic support for a role in breast cancer. *Cancer Res.* **67**(19), 9597 (2007).
- 5) Choi, E. J. : Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. *Nutr. Cancer* **59**(1), 115 (2007).
- 6) So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F., Moussa, M. and Carroll, K. K. : Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. Cancer* **26**(2), 167 (1996).
- 7) Franke, A. A., Cooney, R. V., Custer, L. J., Mordan, L. J. and Tanaka, Y. : Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**, 237 (1998).
- 8) Pecking, A. P., Février, B., Wargon, C. and Pillion, G. : Efficacy of Daflon 500 mg in the treatment of lymphedema (secondary to conventional therapy of breast cancer). *Angiology* **48**(1), 93 (1997).
- 9) Cluzan, R. V., Alliot, F., Ghabboun, S. and Pascot, M. : Treatment of secondary lymphedema of the upper limb with CYCLO 3 FORT. *Lymphology* **29**(1), 29 (1996).
- 10) Yan, S. L., Huang, C. Y., Wu, S. T. and Yin, M. C. : Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicol. In Vitro* 2009 Dec 22. [Epub ahead of print].
- 11) Deeb, D., Gao, X., Jiang, H., Janic, B., Arbab, A. S., Rojanasakul, Y., Dulchavsky, S. A. and Gautam, S. C. : Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **79**(3), 350 (2010).
- 12) Petronelli, A., Saulle, E., Pasquini, L., Petrucci, E., Mariani, G., Biffoni, M., Ferretti, G., Scambia, G., Benedetti-Panici, P., Greggi, S., Cognetti, F., Russo, M. A., Sporn, M. and Testa, U. : High sensitivity of ovarian cancer cells to the synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolide. *Cancer Lett.* **282**(2), 214 (2009).

- 13) Park, H. J., Kim, M. J., Ha, E. and Chung, J. H. : Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine* **15**, 147 (2008).
- 14) Yeh, M. H., Kao, S. T., Hung, C. M., Liu, C. J., Lee, K. H. and Yeh, C. C. : Hesperidin inhibited acetaldehyde-induced matrix metalloproteinase-9 gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol. Lett.* **184**(3), 204 (2009).
- 15) Kamaraj, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Jagan, S. and Devaki, T. : Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Invest. New Drugs* **27**(3), 214 (2009).
- 16) Benavente-García, O. and Castillo, J. : Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* **56**(15), 6185 (2008).
- 17) Fukutake, M., Yokota, S., Kawamura, H., Iizuka, A., Amagaya, S., Fukuda, K. and Komatsu, Y. : Inhibitory effect of *Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix* on azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in rat colon. *Biol. Pharm. Bull.* **21**(8), 814 (1998).
- 18) Chuang, H. N., Wang, J. Y., Chiu, J. H., Tsai, T. H., Yeh, S. F., Fu, S. L., Lui, W. Y. and Wu, C. W. : Enhancing effects of *Scutellaria baicalensis* and some of its constituents on TGF-beta1 gene expression in RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Planta Med.* **71**(5), 440 (2005).
- 19) Martin, D., Song, J., Mark, C. and Eyster, K. : Understanding the cardiovascular actions of soy isoflavones: potential novel targets for antihypertensive drug development. *Cardiovas. Hematol. Disord. Drug Targets.* **8**(4), 297 (2008).
- 20) Scambia, G., Ranelletti, F. O., Benedetti, Panici P., Piantelli, M., Rumi, C., Battaglia, F., Larocca, L. M., Capelli, A. and Mancuso, S. : Type-II estrogen binding sites in a lymphoblastoid cell line and growth-inhibitory effect of estrogen, anti-estrogen and bioflavonoids. *Int. J. Cancer.* **46**(6), 1112 (1990).
- 21) Miocinovic, R., McCabe, N. P., Keck, R. W., Jankun, J., Hampton, J. A. and Selman, S. H. : *In vivo* and *in vitro* effect of baicalein on human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **26**(1), 241 (2005).
- 22) Kassi, E., Papoutsis, Z., Pratsinis, H., Aligiannis, N., Manoussakis, M. and Moutsatsou, P. : Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **133**(7), 493 (2007).