pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 3, pp. 303~308 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.3.303

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

L-carnitine에 의한 인간대장암세포주 증식억제 및 산화적손상 기전 규명

이주연[1†] · 박정란[2†] · 장애라[3*] · 양세란[1*]
[1]강원대학교 의학과, [2]바이오셀트란, [3]강원대학교 동물생명과학과

The Anti-Proliferation and Oxidative Damage-Related Mechanism of L-Carnitine in Human Colorectal Cancer Cells

Jooyeon Lee[1†], Jeong-Ran Park[2†], Aera Jang[3*], Se-Ran Yang[1*]
[1]*Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*Bioceltran Co., Ltd., Chuncheon, Korea*
[3]*Department of Animal Products and Food Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
(Received January 14, 2019/Revised Fabruary 21, 2019/Accepted May 14, 2019)

ABSTRACT - L-carnitine is found in high levels in muscle tissues. It has been developed as a nutrient and dietary supplement, and also used as a therapeutic supplement in various diseases including type II diabetes, osteoporosis and metabolic neuropathies. However, it is not fully understood how it affects cellular mechanisms in colorectal cancer. Therefore, we attempted to determine the effect of L-carnitine in HCT116 human colorectal cancer cells. First, the HCT116 cells were exposed to L-carnitine for 24 hours at 0-40 mM, and then analyzed for cellular proliferation, oxidative stress and related mechanisms. In a MTT assay, L-carnitine inhibited cellular proliferation and induced reactive oxygen species (ROS) in HCT116 by DCF-DA analysis. To analyze the mechanism of L-carnitine in colorectal cancer cells, we performed a western blot analysis for pERK1/2 and pp38 MAP kinase. The western blot showed that L-carnitine significantly increased protein levels of pERK1/2 and pp38 compared with control. Taken together, we found that L-carnitine has anti-proliferative function via increased ROS and activation of ERK1/2 and p38 pathway in HCT116. These findings suggest that L-carnitine may have an anti-proliferative role on colorectal cancer.

Key words: L-carnitine, Colorectal cancer, Anti-proliferation, Reactive oxygen species, HCT116

대장암은 전 세계적으로 높은 발병률을 가지고 있고 주요 사망 원인 중 하나이다[1)]. 한국에서 대장암은 65세 이상일 경우 남성은 1위, 여성은 3위를 차지하는 높은 발병률을 나타내는 질병으로 보고되었다[2)]. 현대 의학에서 특정 지표를 표적 할지라도 다른 조직에서 내성을 획득하게 됨으로써 여전히 대장암에 의한 사망률은 높아지고 있기 때문에 이를 억제할 수 있는 효과적인 치료법의 개발이 요구 되고 있다. 암세포의 특징 중 하나는 무한 증식할 수 있다는 것인데, 제한적이지 않은 세포 증식은 일반적인 조직 세포들의 순수한 기능을 방해할 뿐만 아니라 다른 조직에 전이되어 증식할 수 있다[3)]. 암 환자에서, 특정 암세포의 전이는 치료가 어려울 뿐 아니라 예후가 좋지 못하기 때문에 암세포의 증식 억제가 항암 기전 연구에 있어서 가장 중요한 과제가 될 수 있다. 암세포에서 세포사멸(apoptosis)이 억제되거나 세포주기에 결함이 생기면 세포는 제거되지 못하고 증식하게 된다. 따라서, 암세포에서 세포사멸이나 죽음을 유도하는 생물학적 기전 혹은 약물들을 개발하는 것이 중요하다.

본 논문의 저자들은 이미 이전 연구에서 동물의 근육 조직에서 많이 발견되는 생리활성물질들을 조사하여 그 중 L-carnosine이 NF-κB/STAT1 신호전달체계를 억제함으로써 대장암세포주의 세포주기억제 및 세포사멸을 유도한다는 것을 밝혔고[3], 또 다른 생리활성물질인 coenzyme-Q10이 대장

†These authors equally contributed to this work.
Correspondence to : Aera Jang, Department of Animal Products and Food Science Address: 410dong , School of Animal Life Sciences, Kangwon National University, 1, Gangwondaehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do, 24341, Korea
Tel: 82-33-250-8643, FAX: 82-33-259-5574
E-mail: ajang@kangwon.ac.kr
Correspondence to : Se-Ran Yang, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery Address: 413dong, School of Medicine, Kangwon National University, 1, Gangwondaehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do, 24341, Korea
Tel: 82-33-250-7833, FAX: 82-33-255-8809
E-mail: seran@kanwon.ac.kr

암세포주에서 nitric oxide (NO)의 발생을 증가시킴으로써 세포사멸을 유도하는 단백질 BAX를 증가시키고 세포사멸을 억제하는 단백질 Bcl-2를 억제하여 세포의 생존률을 감소시킨다는 것을 밝힌 바 있다[4]. 따라서, 본 논문의 저자들은 동물의 근육 조직에 많이 존재하는 생리활성물질들의 항암 효능 대하여 주목하게 되었고, 그 중 비타민 B 복합체로 많이 알려져 있는 L-carnitine에 대하여 관심을 갖게 되었다.

L-carnitine은 라이신과 메티오닌에 의하여 생성되는 효소로 동물의 골격근 또는 심근을 포함하는 다양한 조직에 존재한다[5]. 이는 지방 분해 과정에 있어 지방산을 미토콘드리아로 옮기고 지방산을 분해함으로써 에너지를 생성해내는 물질로 근육 조직을 강화하는데 효과적이다[6]. L-carnitine이 가장 많이 들어있는 식품은 양고기로 100 g 당 209 mg 이상 함유되어 있다고 알려져 있으며 소고기가 대략 60 mg/100 g정도로 그 뒤를 잇는다[7]. 이러한 까닭에, 많은 사람들이 영양보조제로 L-carnitine을 복용하고 있는 실정이며 그 효과에 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다[8-10]. 더불어, L-carnitine은 골다공증에서 칼슘과 같은 역할을 하여 뼈를 강화하는 기능이 있다고 밝혀진 바 있고[11], 제 2형 당뇨 질환 환자에서 포도당을 처리 기능을 높임으로써 치료적 효능을 가지고 있다는 연구 보고가 있다[12]. 이미 L-carnitine은 암 환자의 영양 불균형을 줄이고 몸무게를 회복하는 효과가 있음이 밝혀졌으며, 특히 최근 다양한 암 질병 연구에서 L-carnitine이 암 억제적 효능을 가지고 있다는 것에 주목해왔다[13]. 그러나, 대장암에서는 L-carnitine에 대한 연구가 충분하지 않으며 관련 기전에 대하여 밝혀진 바가 없기 때문에 본 연구에서는 대장암에서 L-carnitine의 효과 및 기전을 규명하고자 흔히 대장암 *in vitro* 연구에서 사용되는 대표적인 대장암세포주, HCT116을 이용하여 연구를 진행하였다[3].

Materials and Methods

시약

L-carnitine은 시그마(#C0283)에서 구입하였다. 항 pERK1/2 (#4370), 항 pp38 (#4511), 항 ERK1/2 (#4695), 항 p38 (#9212), 항 β-actin (#3700)항체는 cell signaling에서 구입하였다.

세포배양

In vitro 연구에서 사용한 인간대장암세포주 HCT116 (No. 10247)은 한국세포주은행(KCLB)에서 구입하였다. 모든 세포주는 세포배양기에서 5% CO_2, 그리고 37°C의 온도를 유지하며 배양하였고 배양액은 1% penicillin streptomycin과 10% 우태아혈청(FBS)을 함유한 RPMI-1640 배지를 사용하였다. HCT116 세포주는 계대 배양 후 18 시간 동안 부착 하였고, 이후 L-carnitine은 0부터 40 mM의 농도로 24 시간, 48 시간 처치 하였다.

세포 생존률 분석

세포의 생존률을 조사하기 위하여 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay를 수행하였다. HCT116 세포주는 24 well plate에 1×10^5개의 개수로 넣어 부착하였고 이후 부착된 세포의 배양액을 제거하고 1X PBS로 2번 세척한 뒤 L-carnitine을 각각 다른 농도로 배양액에 희석하였다 (0, 10, 20, 30, 40 mM). 500 μL씩 넣어주고 24시간 동안 배양하였다. MTT 시약을 (5 mg/mL, sigma) 배양액에 2 μL/mL 농도로 혼합하여 넣고 4시간 보관한 다음 배양액을 제거 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 50 μL씩 넣어 결정체를 녹여주었다. 다음으로 96 well plate에 옮긴 후 스펙트럼 분석기를 사용하여 540 nm 흡광도로 측정하였다.

활성산소종(ROS) 측정

세포 내 활성산소종을 측정하기 위하여 2, 7′-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색법을 수행하였다. 세포는 6 well plate에 5×10^5개의 개수로 넣어 부착하였고 이후 부착된 세포의 배양액을 제거한 후 1X PBS로 세척한 뒤 10 μM의 DCF-DA를 30분 동안 처리하였다. 그 다음, L-carnitine을 0, 20, 30 mM의 농도로 24시간, 48시간 처치하였고 트립신을 이용하여 단일 세포로 분리하였다. 얻어진 세포는 유세포분석기(Flow cytometry)를 사용하여 FL-1 채널에서 측정하여 분석하였다.

Western blotting 분석

2×10^6개의 세포를 100 mm plate에 부착하였고 L-carnitine은 20, 30 mM의 농도로 24시간 동안 처치하였다. RIPA 버퍼를 이용하여 단백질을 분리하여 BCA 단백질 정량법으로 20 μg/15 μL로 정량하여 5X SDS-PAGE 샘플버퍼와 혼합하였다. 이후, 100°C에서 7분 동안 열처리 하였다. 10%의 SDS-acrylamide gel에 각 샘플을 걸어준 후 SDS-PAGE를 실시하였다. Nitrocellulose transfer membrane 0.45 μm에 단백질을 옮겨준 다음 5% skim milk를 이용하여 블로킹 시켰다. 1차 항체(1:2000)는 4시간 동안 노출 시켰고 10분간 3번 세척 후 2차 항체(1: 2000) 를 1시간 동안 처리하였다.

통계학적 분석

실험결과는 평균값과 표준편차를 나타내었다. 모든 실험결과의 유의성평가는 1-way-ANOVA 검정 Bonferroni's 다중검정법으로 실시하였으며, 대조군과 비교하여 $P<0.05$일 때 유의적이라고 판단하였다. 모든 그래프는 GraphPad prism 5 프로그램을 이용하여 나타내었다. 모든 실험결과는 3번 이상 수행한 결과이다.

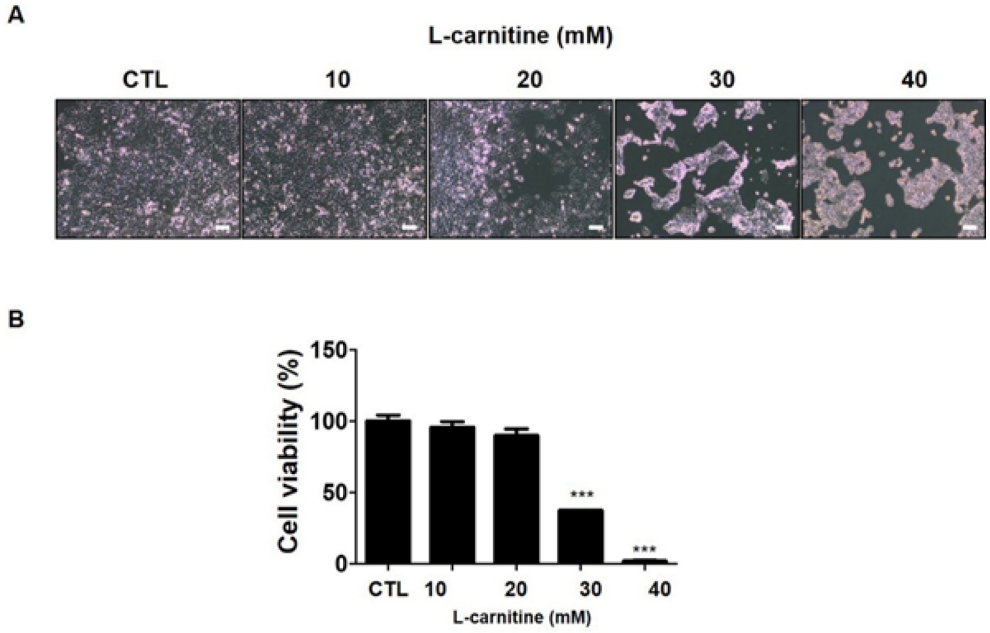

Fig. 1. Anti-proliferation effect of L-carnitine in HCT116 cells. Cells were treated L-carnitine at 0-40 mM for 24 hours. (A)The number of the cells were shown by microscope in phase contrast. (x100) (B) In MTT assay, cell viability (%) was determined. ***p<0.001 compared with control values. Scale bar 100 μm. CTL; control. scale bar. 100 μm.

Results and Discussion

L-carnitine의 대장암세포주 증식 억제 효과

무한 증식하는 암세포의 특성을 감안할 때 암세포의 증식을 억제하는 것은 항암에 있어 중요한 과제라고 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 L-carnitine에 의해 세포 증식의 변화를 측정하기 위해 MTT assay를 수행하여 생존률을 측정하였다. L-carnitine은 10~40 mM 농도로 각각 처치하였으며, 현미경 상에서 이루어진 세포의 형태학적 분석에서는 20 mM, 30 mM 그리고 40 mM에서 농도가 높아짐에 따라 세포의 밀도가 감소하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 1A). 실제로 세포의 생존률을 측정할 수 있는 MTT assay 에서는 30 mM, 40 mM 농도의 L-carnitine이 대장암세포주의 생존률을 각각 대략 70%, 90% 감소시키는 것으로 나타났다 (Fig. 1B). 본 연구결과는 L-carnitine이 대장암세포주의 증식을 억제할 수 있다는 것을 제시하였다.

대장암세포주에서 L-carnitine에 의한 산화적손상

정상세포와 비교하여 대부분의 암세포는 산화적손상의 지표인 활성산소종(ROS)을 높은 수준으로 발현하고 있다는 것이 알려져 있다[14]. 이때, 높아진 활성산소종은 암세포의 대사과정에 관여하여 증식 및 전이에 영향을 주기 때문에 암세포에서의 활성산소종을 타겟으로 많은 연구가 이루어지고 있다[15]. 흥미롭게도, 여러 연구논문에서는 높아진 활성산소종이 종양생성을 유도하지만, 더 많은 활성산소종이 발생할 경우, 암세포에서 apoptosis, necrosis(괴사)가 일어나게 되어 증식을 방해한다고 보고하였다[16,17]. 따라서, 다양한 암 연구에서는 활성산소종의 발생을 비특이적으로 증가시킴으로써 암세포 증식을 억제할 수 있는 기전을 규명하기 위해 노력해왔고, 실제로 많은 항암제는 활성산소종을 증가시켜 암세포를 억제한다는 특징이 있다[16,18]. 따라서 본 연구에서는, 대장암세포주에서 L-carnitine에 의하여 활성산소종의 발현에 대하여 분석하기 위하여 DCF-DA 염색법을 수행하여 발현도를 조사하였다. DCF-DA는 활성산소종을 검출 할 수 있는 염색 탐침으로, 활성산소종을 측정 할 수 있는 분석법이다[19]. 결과적으로, 30 mM 농도의 L-carnitine은 높은 수준으로 활성산소종을 증가시켰으며, 24시간뿐만 아니라 48시간 처치 시에도 그러하였다(Fig. 2A, 2B). 따라서, 본 연구결과는 L-carnitine은 높은 수준의 활성산소종을 발생시켜 세포의 증식을 억제할 수 있음을 시사한다.

L-carnitine에 의하여 조절되는 ERK1/2 와 p38 신호전달기전

ERK1/2와 p38 단백질은 mitogen activated protein kinase (MAPK) 신호전달체계에 속한 단백질로 활성화되면 인산화 되는 것으로 알려져 있다. 세포의 성장과 죽음, 그리고 세포주기에 관여하는 단백질로 여러 질병들에서 MAPK 신호전달체계에 대한 연구가 이루어지고 있으며 MAPK 신호전달체계는 활성산소종의 생성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 바 있다[20]. 최근, Li-Dong Zu 연구팀은 호르몬 펩타이드인 Gastrin의 ERK 신호전달 기전을 통한 위암세포의 억제적 효과를 규명하였다[21]. 추가로, Bangxing

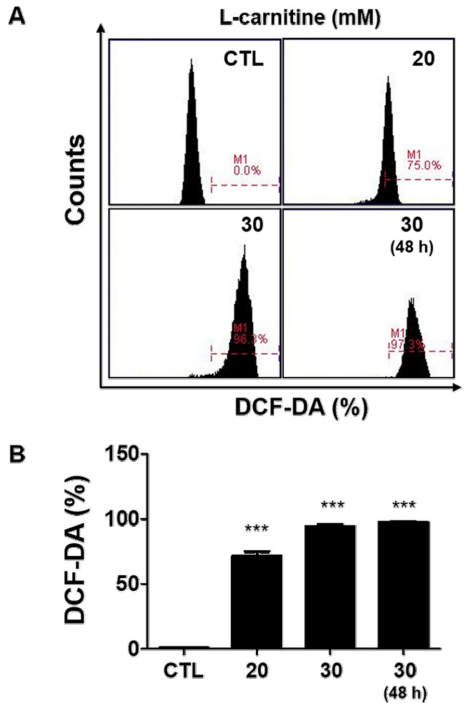

Fig. 2. Increase of reactive oxygen species (ROS) in HCT116. Cells were treated L-carnitine at 0, 20 and 30 mM for 24 and 48 hours. (A) DCF-DA (%) was detected by flow cytometry in FL-1 channel. (B) Data were presented in graph. ***p<0.001 compared with control values. CTL; control.

Hong연구팀은 유방암에서 p38이 치료 기전이 될 수 있다는 것을 밝혔고 이 과정에서 활성산소종이 관여한다고 보고했다[22]. 본 연구팀은 인간대장암세포주에서 L-carnitine이 어떤 신호전달기전을 통하여 세포사멸 및 활성산소종을 발생시키는지 궁금하였기에 L-carnitine 처치에 따른 ERK1/2 및 p38의 단백질 활성에 대하여 조사하였다. L-carnitine 처치에 의하여 인간대장암세포주에서 ERK1/2 와 p38의 인산화가 촉진되는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 최근 연구보고에 따르면 L-carnitine은 ERK1/2 신호전달기전을 경유해 골 형성 관련 유전자의 발현을 증가시킴으로 인간 골아유사 세포의 분화를 촉진하고, 추가로 제브라피시 배아에서는 L-carnitine이 케타민에 의해서 낮아진 ERK1/2 단백질의 활성을 증가시키며 이 신호전달기전에 의하여 낮아진 심박수가 정상으로 회복된다는 것을 ERK1/2 억제제를 통하여 규명하였다[23]. 본 연구에서도 마찬가지로 L-carnitine에 의해 높아진 ERK1/2 및 p38의 활성이 실제로 인간대장암세포주의 세포 사멸이나 활성산소종을 유도하는지 알아보기 위하여 ERK1/2 억제제(PD98059), p38 억제제(SB202190)를 사용하여 ERK1/2 및 p38이 억제되었을 때 L-carnitine이 활성산소종을 증가시키지 못하는지 조사하였다(Fig. 3B). ERK1/2 억제제를 처치하였을 때 L-carnitine에 의한 활성산소종의 발생이 감소하였지만(Fig. 3C), p38 억제제에 의해서는 변화하지 않았다 (결과는 명시하지 않

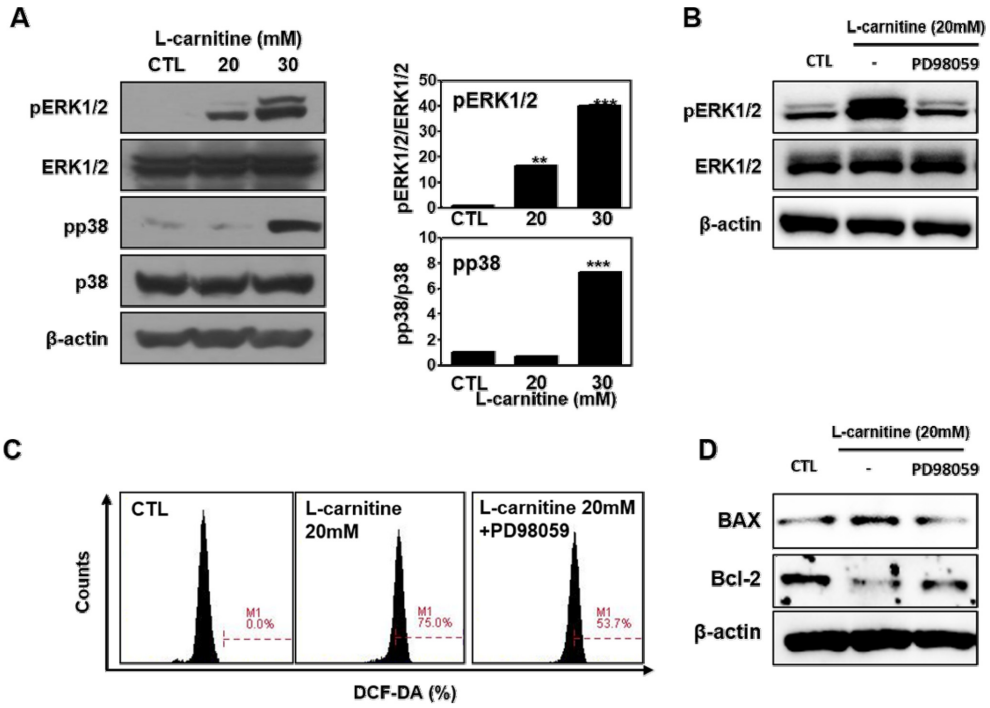

Fig. 3. The association with apoptosis/ROS and activation of ERK1/2 and p38 in L-carnitine-treated HCT116. Cells were treated L-carnitine at 0-30 mM for 24 hours. (A) Western blot analysis for pERK1/2, ERK1/2, pp38, p38 and β-actin (left), and densitometry ratio against total protein (right). (B) Western blot analysis for pERK1/2, ERK1/2 and β-actin in L-carnitine with 15 μM PD98059 (ERK1/2 inhibitor). (C) DCF-DA (%) was detected by FACS in FL-1 channel. (D) Western blot analysis for BAX, Bcl-2 and β-actin. **p<0.01, and ***p<0.001 compared with control values.

음). 더 나아가, 세포사멸과정에 관여하는지 알아보기 위하여 세포 사멸과 관련한 단백질인 bcl-2, BAX의 발현량을 분석하였다. Bcl-2 단백질은 세포 사멸을 억제하는데 관여하고 BAX 단백질은 세포사멸이 유도될 때 관여하는 단백질이다. 본 연구에서, L-carnitine에 의하여 증가된 BAX 단백질과 감소된 Bcl-2 단백질은 ERK1/2 억제제에 의하여 무력화 됨을 확인하였다(Fig. 3D). 종합해보면, 본 연구에서 L-carnitine은 ERK1/2와 p38 신호전달기전을 통하여 대장암세포주의 활성산소종을 높은 수준으로 증가시키고 세포사멸을 유도한다는 것을 말해준다. 따라서, L-carnitine의 대장암세포주의 세포사멸을 유도시키는 능력은 암세포의 특징인 무한 증식을 억제하는 데 기여하며 이는 항암 연구에 있어 중요한 치료적 물질이 될 수 있음을 시사한다.

이전에 Giuseppe Roscilli 연구팀이 발표한 연구논문에서 L-carnitine이 대장암세포의 성장을 늦춘다는 것이 보고되었고[24], 또한 경희대학교의 박소정 연구팀의 연구논문에서는 L-carnitine이 HCT116 세포의 apoptosis를 유도한다는 것을 보여주었으며 이 과정에서 BAX 단백질의 증가가 중요하다는 것이 규명되었다[25]. 하지만, 위 논문들에서는 L-carnitine에 의한 세포사멸 과정에 관여하는 생리적 변화 혹은 신호전달기전에 대해서는 규명하지 않았다. 본 연구 논문에서는 L-carnitine이 대장암세포주의 세포 증식을 효과적으로 억제하는 과정에서 활성산소종의 과도한 생성이 일어나고 이 때 ERK1/2 신호전달기전이 관련한다는 것을 증명함으로써 L-carnitine의 항암 기능에 대한 가능성을 제시하였다.

추후 연구에서 L-carnitine의 장기적인 노출에 대한 검증이 필요할 것으로 판단되고 암세포와 정상세포에서의 기전 및 역할 규명이 필요하고 더 나아가, p38 및 ERK1/2 활성화의 항암 기전에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다. 더불어, L-carnitine이 가진 항암보조제의 효과를 규명할 때, 이전에 보고된 L-carnitine을 과 복용 한 뒤 느끼는 메스꺼움 혹은 어지러움과 같은 부작용[26]에 대하여 충분히 고려되어야 할 것이고, 실험적으로 안정성이나 효율성에 대한 효능 검증을 생체 외 실험뿐만 아니라 생체 내 실험으로 명확히 규명해야 될 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2015 한우자조금에서 지원받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

L-carnitine은 라이신과 메티오닌으로 생합성되며 골격근과 심근을 포함한 다양한 동물조직에서 발견된다. L-carnitine이 포함된 식품으로는 양고기, 소고기, 돼지고기 등이 있고 근육발달에 도움을 주며 뼈를 강화하거나 대사작용을 도와주는 기능을 하여 영양 보조제로 많이 섭취하는 것으로 알려져 있다. 최근 L-carnitine은 제 2형 당뇨병, 골다공증, 대사성 신경증후군 등의 다양한 질병의 약물로도 연구 되고 있으며 암에서는 치료 보조제로 개발되어있다. 하지만 대장암에서의 L-carnitine에 대한 효과 및 기전에 대해서는 명확하지 않고 연구된 바가 없기 때문에 본 연구에서 저자들은 L-carnitine의 효능을 인간대장암세포주 HCT116에서 규명하고자 하였다. L-carnitine은 세포 내 활성산소종 (ROS)를 높은 수준으로 증가시켜 세포 증식을 억제하였다. 또한, 세포 증식과 죽음에 관련한 단백질 ERK1/2와 p38을 유의적으로 활성화 시킨다는 것을 입증하였다. 이때, ERK1/2 억제제(PD98059)를 처치하여 ERK1/2의 활성화가 활성산소종 발생 및 세포사멸에 중요하다는 것을 밝혔다. 따라서, 본 연구 결과는 L-carnitine이 대장암세포주의 증식을 억제 할 수 있고 이는 대장암의 치료에 있어 잠재적인 치료 물질이 될 수 있음을 시사하며 이 과정에 관여하는 신호전달기전을 조사하여 항암의 치료기전에서 활성산소종이나 ERK1/2, p38 단백질의 활성화의 중요성을 제시하였다.

References

1. Jung, K.W., Won, Y.J., Kong, H.J., Oh, C.M., Cho, H., Lee, D.H., Lee, K.H.: Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2012. *Cancer Res Treat*, **47**, 127-141 (2015).
2. Oh, C.M., Won, Y.J., Jung, K.W., Kong, H.J., Cho, H., Lee, J.K., Lee, D.H., Lee, K.H.: Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2013. *Cancer Res Treat*, **48,** 436-450 (2016).
3. Lee, J., Park, J.R., Lee, H., Jang, S., Ryu, S.M., Kim, H., Kim, D., Jang, A., Yang, S.R.: L-carnosine induces apoptosis/cell cycle arrest via suppression of NF-kappaB/STAT1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **54**, 505-512 (2018).
4. Jang, S., Lee, J., Ryu, S.M., Lee, H., Park, J.R., Kim, H.J., Kim, D.W., Jang, A, Yang, S.R.: Effect of coenzyme Q10 via nitric oxide production and growth arrest of human colon cancer HCT116 cells. *J. Prev. Vet. Med.*, **41**, 59-65 (2017).
5. Shimada, K., Sakuma, Y., Wakamatsu, J., Fukushima, M., Sckikawa, M., Kuchida, K., Mikami, M.: Species and muscle differences in L-carnitine levels in skeletal muscles based on a new simple assay. *Meat Sci*, **68**, 357-362 (2004).
6. Fielding, R., Riede, L., Lugo, J.P., Bellamine, A.: l-Carnitine Supplementation in Recovery after Exercise. *Nutrients*, **10**, 349 (2018).
7. Williams, P.G.: Nutritional composition of red meat. *Nutr Diet*, **64**, S113-S119 (2007).
8. Ferreira, G.C., McKenna, M.C.: L-Carnitine and Acetyl-L-

carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochem Res*, **42**, 1661-1675 (2017).
9. Hassan, A., Tsuda, Y., Asai, A., Yokohama, K., Nakamura, K., Sujishi, T., Ohama, H., Tsuchimoto, Y., Fukunishi, S., Abdelaal, U.M., Arafa, U.A., Hassan, A.T., Kassem, A.M., Higuchi, K.: Effects of Oral L-Carnitine on Liver Functions after Transarterial Chemoembolization in Intermediate-Stage HCC Patients. *Mediators Inflamm*, **2015**, 608216 (2015).
10. Zhang, J.J., Wu, Z.B., Cai, Y.J., Ke, B., Huang, Y.J., Qiu, C.P., Yang, Y.B., Shi, L.Y., Qin, J.: L-carnitine ameliorated fasting-induced fatigue, hunger, and metabolic abnormalities in patients with metabolic syndrome: a randomized controlled study. *Nutr J*, **13**, 110 (2014).
11. Murad, H.A.: L-Carnitine, but not coenzyme Q10, enhances the anti-osteoporotic effect of atorvastatin in ovariectomized rats. *J. Zhejiang Univ. Sci. B. B,* **17**, 43-53 (2016).
12. Mingrone, G., Greco, A.V., Capristo, E., Benedetti, G., Giancaterini, A., De Gaetano, A., Gasbarrini, G.: L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr*, **18**, 77-82 (1999).
13. Huang, H.; Liu, N.; Guo, H., Liao, S., Li, X., Yang, C., Liu, S., Song, W., Liu, C., Guan, L., Li, B., Xu, L.., Zhang, C., Wang, X., Dou, Q.P., Liu, J.: L-carnitine is an endogenous HDAC inhibitor selectively inhibiting cancer cell growth in vivo and in vitro. *PloS one*, **7**, e49062 (2012).
14. Liou, G.Y., Storz, P.: Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.*, **44**, 479-496 (2010).
15. de Sa Junior, P.L., Camara, D.A.D., Porcacchia, A.S., Fonseca, P.M.M., Jorge, S.D., Araldi, R.P., Ferreira, A.K.: The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*, **2017**, 2467940 (2017).
16. Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Thayyullathil, F.: Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med*, **104**, 144-164 (2017).
17. Yang, J., Zhao, X., Tang, M., Li, L., Lei, Y., Cheng, P., Guo, W., Zheng, Y., Wang, W., Luo, N., Peng, Y., Tong, A., Wei, Y., Nie, C., Yuan, Z.: The role of ROS and subsequent DNA-damage response in PUMA-induced apoptosis of ovarian cancer cells. *Oncotarget*, **8**, 23492-23506 (2017).
18. Wang, P., Zeng, Y., Liu, T., Zhang, C., Yu, P.W., Hao, Y.X., Luo, H.X., Liu, G.: Chloride intracellular channel 1 regulates colon cancer cell migration and invasion through ROS/ERK pathway. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 2071-2078 (2014).
19. Lee, H., Lee, J., Hong, S.H., Rahman, I., Yang, S.R.: Inhibition of RAGE Attenuates Cigarette Smoke-Induced Lung Epithelial Cell Damage via RAGE-Mediated Nrf2/DAMP Signaling. *Front Pharmacol,* **9**, 684 (2018).
20. Lee, J., Lee, H., Jang, S., Hong, S.H., Kim, W.J., Ryu, S.M., Park, S.M., Lee, K.H., Cho, S.J., Yang, S.R.: CMIT/MIT induce apoptosis and inflammation in alveolar epithelial cells through p38/JNK/ERK1/2 signaling pathway. *Mol Cell Toxicol*, **15**, 41-48 (2019).
21. Zu, L.D., Peng, X.C., Zeng, Z., Wang, J.L., Meng, L.L., Shen, W.W., Hu, C.T., Yang, Y., Fu, G.H.: Gastrin inhibits gastric cancer progression through activating the ERK-P65-miR23a/27a/24 axis. *J Exp Clin Cancer Res : CR*, **37**, 115 (2018).
22. Hong, B., Li, H., Zhang, M., Xu, J., Lu, Y., Zheng, Y., Qian, J., Chang, J.T., Yang, J., Yi, Q.: p38 MAPK inhibits breast cancer metastasis through regulation of stromal expansion. *Int. J. Cancer*, **136**, 34-43 (2015).
23. Kanungo, J., Cuevas, E., Ali, S.F., Paule, M.G.: L-Carnitine rescues ketamine-induced attenuated heart rate and MAPK (ERK) activity in zebrafish embryos. *Reprod Toxicol*, **33**, 205-212 (2012).
24. Roscilli, G., Marra, E., Mori, F., Di Napoli, A., Mancini, R., Serlupi-Crescenzi, O., Virmani, A., Aurisicchio, L., Ciliberto, G.: Carnitines slow down tumor development of colon cancer in the DMH-chemical carcinogenesis mouse model. *J Cell Biochem*, **114**, 1665-1673 (2013).
25. Park, S.J., Park, S.H., Kim, J.O., Kim, J.H., Park, S.J., Hwang, J. J., Jin, D.H., Jeong, S.Y., Lee, S.J., Kim, J.C., Kim, I., Cho, D.H.: Carnitine sensitizes TRAIL-resistant cancer cells to TRAIL-induced apoptotic cell death through the up-regulation of Bax. *Biochem Biophys Res Commun*, **428**, 185-190 (2012).
26. Hathcock, J.N., Shao, A.: Risk assessment for carnitine. *Regul Toxicol Pharmacol*, **46**, 23-28 (2006).