

# 美和學校財團法人美和科技大學

## 102 年度教師產學合作計畫 結案報告書

計畫名稱：川陳皮素與橘紅素抑制七種腫瘤細胞  
及抗人類 B 型肝炎病毒活性之探討

**A Study of Anti-Tumor Effects on Seven Kinds  
of Tumor Cells and Anti-Hepatitis B Virus  
Activities of Nobiletin and Tangeretin**

計畫編號：102-102-FI-DBT-IAC-R-003

計畫期間：102 年 08 月 01 日至 103 年 07 月 31 日止

計畫主持人：黃瑞齡

共同主持人：溫雅蘭老師、施慧娟老師

經費總額：壹拾陸萬元整

經費來源：華珍生物科技有限公司

華欣食品有限公司

華珍食品有限公司

華珍食品行

呷百二自然洋菓子有限公司

## 致謝

感謝 華珍生物科技有限公司、華欣食品有限公司、華珍食品有限公司、華珍食品行、呷百二自然洋菓子有限公司 提供產學合作經費

使本計畫得以順利完成

由衷感謝

## 中文摘要

川陳皮素(nobiletin)與橘紅素(tangeretin)為多甲氧基黃酮類(Polymethoxylated Flavones; PMF)化合物，具有抗發炎、抗氧化及降膽固醇功能。本報告以體外細胞培養模式，探討二者抑制肝癌、乳癌、肺癌、胃癌、大腸癌、腦癌及血癌等七種人類腫瘤細胞之作用，MTT assay 測試結果顯示，對胃癌細胞(AGS)、腦癌細胞(U87)及肺癌細胞(H2981)無抑制作用；乳癌細胞(MCF-7)及肝癌細胞(HepG2)具有輕度抑制作用；大腸癌細胞(COLO201)具有中度抑制作用；血癌細胞(U937)具有強度抑制作用，川陳皮素處理 24 小時  $IC_{50}$  為  $8.6 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ 、處理 48 小時  $IC_{50}$  為  $7.2 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$ ；橘紅素處理 24 小時  $IC_{50}$  為  $26.7 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ 、處理 48 小時  $IC_{50}$  為  $14.3 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ ，二者均具有時間與濃度依賴性。細胞凋亡藉由 ELISA kit 測定，顯示二者均具有誘導肝癌、乳癌、大腸癌及血癌細胞凋亡之活性。更進一步利用 HepG2215 作為野生型 HBV 產生之病毒株，M33 作為肝安能抗藥性突變株，進行抗人類 B 型肝炎病毒活性之探討，結果顯示，川陳皮素與橘紅素對 B 型肝炎野生型病毒株 (HepG2215)，無細胞毒性下，對表面抗原具有顯著抑制作用；對 e 抗原無抑制作用；對肝安能抗藥性突變株(M33)，無顯著細胞毒性下，對表面抗原具有顯著抑制作用；對 e 抗原無抑制作用。

**關鍵字：**川陳皮素、橘紅素、細胞凋亡、人類 B 型肝炎病毒、野生型、肝安能突變株、表面抗原、e 抗原。

## 英文摘要

Nobiletin and tangeretin are two pure compounds belonging to Polymethoxylated Flavones, PMF, and have anti-inflammatory, radical scavenging activity and hypocholesterol functions. The goal of this study is to explore their anti-tumor effects on 7 kinds of tumor cells (*i.e.*, hepatoma, breast cancer, lung cancer, gastric cancer, colon cancer, brain cancer and leukemia). MTT assay data showed that nobiletin and tangeretin have no effects on gastric cancer cells (AGS), brain cancer cells (U87) or lung cancer cells (H2981); slight inhibition on breast cancer cells (MCF-7) and hepatoma cancer cells (HepG2), intermediate effect on colon cancer cells (COLO201); but showed strong inhibition on leukemia cell line (U937) (*i.e.*,  $IC_{50} = 8.6 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$  at 24 hours and  $IC_{50} = 7.2 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$  at 48 hours for nobiletin;  $IC_{50} = 26.7 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$  at 24 hours and  $IC_{50} = 14.3 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$  at 48 hours for tangeretin) in a time and concentration-dependent manner. Moreover, by analyzing the DNA apoptosis with ELISA method, we found clearly that both nobiletin and tangeretin indeed induced apoptosis on HepG2, MCF-7, COLO201 and U937 cells. Finally, by using wild-type hepatitis B virus producing cell line (HepG2215) and lamivudine-resistant mutant virus producing cell line (M33) to evaluate the anti-HBV effects of nobiletin and tangeretin under doses with non-cytotoxicity to both cell lines, both nobiletin and tangeretin have significantly reduced the HBsAg secretion, albeit no effects to e antigen secretion.

**Key words :** nobiletin 、 tangeretin 、 apoptosis 、 human hepatitis B virus 、 wild-type 、 lamivudine-resistant mutant 、 HBsAg 、 e antigen ◦

## 前言

影響人類最大的疾病是癌症，只要活得夠老，任何人得各種類型癌症的機率是很高的。利用藥物來治療癌症，此概念源自於 Michael Sporn 等學者於 1976 年首度提出了癌症化學預防(cancer chemoprevention) (Sporn et al., 1976)，也就是使用單一或多種藥物合併使用，達到預防、阻斷、抑制或逆轉癌化作用或過程，藉此降低癌症形成的危險因子或減少癌症復發的機會(Tsao et al., 2004)。天然物中有許多化合物，特別是黃酮類化合物其種類的豐富性與多樣化具有不同的生物活性，也因此提供治療癌症的新契機(Auyeung & Ko, 2009; Park et al., 2012)。多甲氧基黃酮(Polymethoxylated flavone, PMF)是一類含有多個甲氧基、低極性、具有平面結構且生物活性顯著的黃酮類化合物，它主要來源於芸香科柑橘屬植物，存在於陳皮、青皮、橘紅、佛手、枳實等中藥材中(中藥化學 王立軍主編)。川陳皮素(nobiletin)與橘紅素(tangeretin)為多甲氧基黃酮類(Polymethoxylated Flavones; PMF)化合物，具有抗發炎、抗氧化及降膽固醇功能(Manthey & Bendele, 2008; Zhang et al., 2011)。

此外病毒引起的肝病變是國人常見的肝障礙疾病，其中又以 B 型肝炎病毒〔Hepatitis B virus，簡稱 HBV〕引起的最為普遍。人類 B 型肝炎病毒(Hepatitis B virus，簡稱 HBV)屬於肝去氧核糖核酸病毒科(Hepadnaviridae)，是目前已知最小的 DNA 病毒(Robinson et al., 1974; Robinson, 1977; Delius et al., 1983)。感染 B 型肝炎病毒，除了會引起急性肝炎(acute hepatitis)外，有些感染者會變成慢性肝炎(chronic hepatitis)，嚴重的發展成肝硬化(cirrhosis)，更有甚者，此病毒與原發性肝癌(hepatocellular carcinoma; HCC)的形成有密切的關係(Szmunn 1978; Beasley et al., 1981; Beasley et al., 1984)。臺灣的 B 型肝炎之感染率大約為 85%，而其中有 15%左右的人會轉變成為帶原者(HBV carrier) (Tong et al., 1971)。據 Szmunn 於 1978 年發表的流行病報告中(Szmunn 1978)，指出全世界有二億人口為 B 型肝炎病毒帶原者，其中大部分集中在亞洲和非洲流行地區，而這些高 B 型肝炎病毒帶原地區，亦為世界上肝癌發生比例最高的地區。且依據臺大

醫師宋瑞樓多年研究 B 型肝炎病毒在臺灣之感染情形與其後果，由統計上發現：肝癌患者中有 B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)者高達 91.2%，顯示 B 型肝炎病毒帶原者，極大多數發展成肝癌(Sung et al., 1971)。1981 年畢斯里氏在臺灣公保門診中心，對公務員 B 型肝炎病毒表面抗原陽性及陰性患者追蹤了 22,707 例，發現表面抗原陽性者獲得肝癌比表面抗原陰性者高 223 倍(Beasley et al., 1981)，由於以上流行病學研究及臨床觀察，加上現在分子生物學方法，測定肝癌細胞內帶有 B 型肝炎病毒的去氧核糖核酸，更證實 B 型肝炎病毒與肝癌之形成息息相關。B 型肝炎目前雖然有疫苗，但是國內仍有約 300 萬病毒帶原者需要治療。目前臨床上使用之治療藥物，以肝安能(lamivudine；即 3TC)，有非常肯定的療效(Dienstag et al., 1995；Honkoop et al., 1997)，可惜仍然有抗藥性的問題(Allen et al., 1998；Lai et al., 1998)。肝安能抗藥性突變株，為 B 型肝炎病毒聚合酶基因的 YMDD 位置產生單一點突變成為 YIDD 或 YVDD 後，對肝安能產生抗藥性，導致肝安能失去作用，病人血清內病毒量反彈上升。美和科技大學生物科技系黃瑞齡老師實驗室，執行國科會計畫案，建立抗肝安能 lamivudine 突變株(mutant type)之穩定轉殖細胞株，提供篩選抗 B 型肝炎病毒突變株之中草藥。

芸香科植物四季橘(*Citrus madurensis* Lour.)果實(含果皮與果肉)，其乙酸乙酯粗萃物具有顯著抑制人類 B 型肝炎病毒表面抗原活性，經由管柱分析其有效成分為黃酮類化合物(Shie et al., 2013)。川陳皮素(Nobiletin)、橘紅素(Tangeretin)等多甲氧基黃酮(Polymethoxylated Flavones；PMF)，是否具有抑制肝癌、乳癌、肺癌、胃癌、大腸癌、腦癌及血癌等七種腫瘤細胞及抗人類 B 型肝炎病毒野生型及肝安能抗藥性突變株活性，值得探討。本報告以體外細胞培養模式，利用酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)測定川陳皮素及橘紅素抑制七種腫瘤細胞及抗人類 B 型肝炎病毒活性探討。期望有助於中醫臨床抗癌、抗病毒藥物之開發。

## 研究材料及方法

第一部分川陳皮素、橘紅素與 30%PMF 抑制肝癌細胞 HepG2、血癌細胞 U937、大腸癌細胞 COLO201、肺癌細胞 H2981、胃癌細胞 AGS、乳癌細胞 MCF-7 及腦癌細胞 U87 之抗腫瘤活性測試

## 1、細胞株(Cell lines)及細胞培養(Cell culture)

本報告使用人類肝癌細胞 HepG2、血癌細胞 U937、大腸癌細胞 COLO201、肺癌細胞 H2981 及腦癌細胞 U87，感謝榮總細胞庫所贈予；其中胃癌細胞 AGS 及乳癌細胞 MCF-7 係購自食品工業發展研究所生資中心，分別編號為 BCRC 60436 和 BCRC 60436，進行川陳皮素及橘紅素抗腫瘤活性測試，並以購自美國公司之 30% PMF(購自 JC Nutraceuticals Inc.，LOT#PMF-67606-30-NT、PRODUCT#2307，其中包含  $\geq 16\%$  之川陳皮素及  $\geq 14\%$  之橘紅素)，此為健康食品添加劑，經屏東科技大學檢驗含川陳皮素及橘紅素，作為參考。MCF-7 細胞培養於含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 Minimum Essential Medium (MEM)培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中，並需添加 sodium bicarbonate；AGS 細胞培養於含 10% 胎牛血清的 Ham's F-12K 培養基(Sigma 公司)中；HepG2 細胞、A549 細胞、COLO201、腦癌細胞 U87 及血癌細胞 U937 培養於含 10% 胎牛血清的 DMEM 培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中。每毫升的培養基內添加 100 I.U. 青黴素(penicillin)、100  $\mu\text{g}$  鏈黴素(streptomycin)、2.5  $\mu\text{g}$  防治黴(amphotericin B)(惟有血癌細胞 U937 無添加)、2 mM 麩氨酸(L-glutamine)及 100  $\mu\text{M}$  之非必需性氨基酸(non-essential amino acid，包括 14.7  $\mu\text{g}$  glutamic acid, 7.5  $\mu\text{g}$  glycine, 8.9  $\mu\text{g}$  alanine, 13.3  $\mu\text{g}$  aspartic acid, 11.5  $\mu\text{g}$  proline, 15  $\mu\text{g}$  asparagine 及 10.5  $\mu\text{g}$  serine)，以上稱完全培養基，置於含 5% 二氧化碳的 37°C 培養箱中，2 到 3 天繼代培養一次。

## 2、MTT assay 進行七種腫瘤細胞毒殺測試

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide)是一種黃色的染劑，會被活細胞所吸收並經由粒線體中的琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase)還原成藍紫色的 formazan，可用來檢測細胞存活與生長變化。在 96 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入  $2 \times 10^4$  細胞，培養於 5 %  $\text{CO}_2$ ，37°C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予川陳皮素或橘紅素或 30% PMF，各五種劑量(50、25、12.5、6.25、3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，每種劑量三重複。給藥處理 24 或 48 小時後，盤中留下 100  $\mu\text{L}$  培養液，加入 25  $\mu\text{L}$  含有 5  $\text{mg}/\text{mL}$  MTT 溶液，MTT 最終濃度為 1  $\text{mg}/\text{mL}$ ，放回 5 %  $\text{CO}_2$ ，37°C incubator 4 小時，再移

除培養液加入 100  $\mu$ L 的 100% DMSO 於室溫下震盪 5 分鐘，待紫色結晶完全溶解後，在 540 nm 測定吸光值，將不同處理後之吸光值扣除空白組吸光值後，帶入下列公式以求得細胞存活率 Cell viability (%)。

$$\text{Cell viability (\%)} = [\text{OD}_{540}(\text{sample}) / \text{OD}_{540}(\text{control})] \times 100 \%$$

### 3、ELISA assay 進行肝癌、乳癌、大腸癌及血癌細胞凋亡測試

在 96 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入  $2 \times 10^4$  細胞，培養於 5 % CO<sub>2</sub>，37°C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予川陳皮素或橘紅素或 30% PMF，各三種劑量(50、25 及 12.5  $\mu$ g/mL)，每種劑量三重複。給藥處理 24 小時後，移除培養液，加入 lysis buffer 200  $\mu$ L，在室溫下反應 30 分鐘，隨後離心(200  $\times$  g, 5 分鐘)，取上清液 20  $\mu$ L 放置有 streptavidin coated 的 micro-titer plate，加入 80  $\mu$ L 的 immuno-reagent(在 20 mL 的 immuno-reagent 中含有 1 mL 的 Anti-DNA-POD 和 1 mL 的 Anti-histone-biotin 及 18 mL 的 incubation buffer)並以 200 rpm 的轉速震搖 2 小時，移除上清液並以 incubation buffer 清洗三次，加入 ABTS solution 100  $\mu$ L 以 250 rpm 的轉速避光震搖 10 分鐘，再以 405 nm 測定吸光值(以上 lysis buffer, immune-reagent, incubation buffer 及 ABTS solution 均為 Cell Death Cell Detection ELISA<sup>PLUS</sup>kit [Roche, German]所附)。

### 4、統計分析

使用 SIGMA 軟體，實驗數據皆以平均值  $\pm$  標準誤差來表示，數據分析以 Student's *t*-test 來比較組別間的差異，當統計結果  $p < 0.05$  時，則認為有統計意義。

## 第二部分川陳皮素、橘紅素與 30% PMF 抗人類 B 型肝炎病毒活性測試

### 一、細胞株(Cell lines)及細胞培養(Cell culture)

本報告使用兩種產人類 B 型肝炎病毒(Human Hepatitis B Virus)之人類肝癌細胞株，一為 HepG2.215，此係 Harvard School of Public Health Dr. Essex 之實驗室所建立(Sureau et al., 1986)，乃利用肝癌細胞株 HepG2 經轉染(transfection)帶有完整



HBV DNA (ayw)及neomycin resistance 基因的質體後，以G418 篩選，再經由系列稀釋(limiting dilution)得到的細胞株，命名為HepG2.215。由於此細胞株有完整的HBV DNA 的嵌入 (integrated)，且已形成一個穩定的細胞株，故可持續高量的分泌B型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、e 抗原(HBeAg)及病毒顆粒體(42 nm Dane particles and 22 nm subviral particles)。另一為本實驗室執行國科會計畫，所建立的lamivudine(又稱3TC)抗藥性突變株之穩定轉殖細胞株，亦是利用肝癌細胞株HepG2 經轉染(transfection)帶有YMDD突變之HBV DNA (ayw)及hygromycin resistance 基因的質體後，以hygromycin篩選，再經由系列稀釋(limiting dilution)得到的細胞株，命名為M33。本報告將以HepG2.215細胞作為B型肝炎病毒野生型模式，以M33細胞作為B型肝炎病毒肝安能(又稱拉美夫錠lamivudine，亦即3TC)抗藥性突變株模式，進行川陳皮素及橘紅素抗B型肝炎病毒野生型活性測試，並以購自美國公司之30% PMF，此為健康食品添加劑，經屏東科技大學檢驗含川陳皮素及橘紅素，作為參考。

HepG2.215 細胞與 M33 細胞分別培養於含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 完全培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中，置於含 5%二氧化碳的 37°C 培養箱中，2 到 3 天繼代培養一次。

## 2. 抗病毒藥物之處理(Huang et al., 1996)

在 24 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 HepG2.215 細胞  $2 \times 10^5$ ，或 M33 細胞  $1.5 \times 10^5$ ，待隔夜後細胞充分附著，更新培養基，同時給予川陳皮素或橘紅素或 30% PMF，各五種劑量(25、12.5、6.25、3.125、1.5625  $\mu\text{g/ml}$ )，每種劑量三重複。給藥處理 48 小時後，收集上層培養液，進行抗病毒活性測定。

## 3. B 型肝炎病毒表面抗原及e 抗原之酵素免疫測定(Huang et al., 1996)

利用酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)，使用抗人類 B 型肝炎病毒表面抗原之單株抗體及抗人類 B 型肝炎病毒 core/e 抗原之多源抗體的酵素免疫檢驗試劑[普生股份有限公司，新竹縣，台灣]，利用抗體-抗原-抗體酵素接合體之三明治複合體，以 TMB 呈色

劑呈色之，再以分光比色計 BioTek ELX800 型 ELISA reader 在 450 nm 測定之，所得的吸光值 (O.D. value) 反應出抗原的多寡。並以對照組的吸光值當 100，依以下公式計算其抑制百分比 (Inhibition %)：

$$\frac{\text{對照組吸光值}-\text{給藥組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100\% = \text{抑制百分比(Inhibition \%)}$$

對照組吸光值

抑制百分比在 20—35 為輕度抑制(+)，抑制百分比在 35—50 為中度抑制(++)，抑制百分比在 50—65 為強度抑制(+++)，抑制百分比在 65 以上為非常強度抑制(+++++)。

#### 4. 統計方法

實驗所得之數據以平均值±標準誤差 (mean ± standard error of mean) 來表示。實驗組與對照組之間是否有差異以 Student's t-test 測定，當 p < 0.05 時視為有統計意義。

## 研究結果

第一部分川陳皮素、橘紅素與 30% PMF 抑制肝癌細胞 HepG2、血癌細胞 U937、大腸癌細胞 COLO201、肺癌細胞 H2981、胃癌細胞 AGS、乳癌細胞 MCF-7 及腦癌細胞 U87 之抗腫瘤活性測試

### 1、川陳皮素、橘紅素與 30%PMF 對七種人類癌細胞之毒殺作用

為了探討川陳皮素與橘紅素抑制肝癌細胞 HepG2、血癌細胞 U937、大腸癌細胞 COLO201、肺癌細胞 H2981、胃癌細胞 AGS、乳癌細胞 MCF-7 及腦癌細胞 U87 之抗腫瘤活性，首先進行細胞毒殺測試。藥物作用濃度為 50、25、12.5、6.25 及 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分別測定 24 及 48 小時細胞毒性試驗(MTT assay)，添加於 medium 之 DMSO 最終濃度為 0.25 %，作為有機溶劑對照組 (solvent control)。結果詳表 1，對胃癌細胞(AGS)、腦癌細胞(U87)及肺癌細胞(H2981)無抑制作用；圖 1 ~ 圖 4 乳癌細胞(MCF-7)及肝癌細胞(HepG2)具有輕度抑制作用；大腸癌細胞(COLO201)具有中度抑制作用；血癌細胞(U937)具有強度抑制作用，川陳皮素處理 24 小時  $\text{IC}_{50}$  為  $8.6 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、處理 48 小時  $\text{IC}_{50}$  為  $7.2 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；橘紅素處理 24 小時  $\text{IC}_{50}$  為  $26.7 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、處理 48 小時  $\text{IC}_{50}$  為  $14.3 \pm 1.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，二者均具有時間與濃度依賴性。

### 2、川陳皮素、橘紅素與 30%PMF 對肝癌、乳癌、大腸癌及血癌等四種人類癌細胞之誘導細胞凋亡之作用

細胞凋亡時，內切酶被激活，染色質 DNA 在核小體單位之間的連接處斷裂，使組蛋白、DNA 暴露，形成 180 ~ 200 bp 或整數倍的片段，而細胞凋亡免疫酵素分析法則是利用細胞凋亡時，使組蛋白、DNA 暴露的特徵，來測定細胞凋亡，此為確定供測藥物是否具有誘導腫瘤細胞凋亡作用，非常靈敏的實驗方法。結果詳圖 5，細胞凋亡藉由 ELISA kit 測定 apoptotic cell，顯示二者均具有誘導肝癌、乳癌、大腸癌及血癌細胞凋亡之活性。另外細胞處理不含藥物之 0.25% DMSO 其 O.D 值為  $0.34 \pm 0.02$  與控制組相比並無顯著差異，也因此證明 0.25% DMSO

未能引起細胞凋亡現象。

## 第二部分川陳皮素、橘紅素與 30% PMF 抗人類 B 型肝炎病毒活性測試

本試驗原則上採五種測定濃度，三重覆處理。24 孔培養皿 ( $2 \times 10^5$  cells/1 mL medium)，川陳皮素、橘紅素與 30% PMF，以 DMSO 溶解，故 DMSO 2.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  為 solvent control。結果如下：

### 1. 川陳皮素

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 2 及圖 6]：

五個測試濃度(25、12.5、6.25、3.125 及 1.5625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )均無顯著細胞毒性；12.5 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  對表面抗原具中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為  $36.1 \pm 2.4$  及  $44.6 \pm 1.3$ ；對 e 抗原無抑制作用。

(B). 肝安能抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 及圖 7]：

五個測試濃度(25、12.5、6.25、3.125 及 1.5625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )均無顯著細胞毒性；6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  對表面抗原具輕度(+)抑制作用，其抑制百分比為  $28.0 \pm 1.1$ ，12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  對表面抗原具中度(++)抑制作用，其抑制百分比為  $41.5 \pm 1.8$ ，25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  對表面抗原具非常強度(+++++)抑制作用，其抑制百分比為  $65.2 \pm 1.0$ ，川陳皮素對表面抗原抑制作用，隨著濃度增加而增強；對 e 抗原無抑制作用。

### 2. 橘紅素

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 2 及圖 8]：

五個測試濃度(25、12.5、6.25、3.125 及 1.5625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )均無顯著細胞毒性；12.5 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  對表面抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為  $28.9 \pm 2.0$  及  $46.9 \pm 2.3$ ；對 e 抗原無抑制作用。

(B). 肝安能抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 及圖 9]：

五個測試濃度(25、12.5、6.25、3.125 及 1.5625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )均無顯著細胞毒性；12.5 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  對表面抗原具中度(++)至強度(+++)抑制作用，其

抑制百分比分別為  $39.3 \pm 1.0$  及  $58.5 \pm 0.4$ ；對 e 抗原無抑制作用。

### 3. 30%PMF

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 2 及圖 10]：

五個測試濃度(25、12.5、6.25、3.125 及 1.5625  $\mu\text{g/mL}$ )均無顯著細胞毒性；25  $\mu\text{g/mL}$  對表面抗原具輕度(+)抑制作用，其抑制百分比為  $29.0 \pm 3.2$ ；對 e 抗原無抑制作用。

(B). 肝安能抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 及圖 11]：

五個測試濃度(25、12.5、6.25、3.125 及 1.5625  $\mu\text{g/mL}$ )均無顯著細胞毒性；25  $\mu\text{g/mL}$  對表面抗原具輕度(+)抑制作用，其抑制百分比為  $27.1 \pm 1.8$ ；對 e 抗原無抑制作用。

4. 分離自獨活的 Osthole 為正對照組(Huang et al., 1996)，Osthole 給藥濃度 80  $\mu\text{M}$ ，無顯著細胞毒性，對 HBV 野生型之表面抗原具中度抑制(++)其抑制百分比為  $49.7 \pm 0.8$ ，對肝安能抗藥性突變株之表面抗原具強度抑制(+++)其抑制百分比為  $56.4 \pm 1.9$ ；對 e 抗原無抑制作用[詳 Table 2 及 Table 3]。
5. DMSO 組為 solvent control，給藥濃度 2.5  $\mu\text{l/mL}$ ，無顯著細胞毒性，對 HBV 野生型細胞株及肝安能抗藥性突變株之表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [詳 Table 2 及 Table 3]。

## 肆、結論

本報告選擇七種人類腫瘤細胞進行川陳皮素(nobiletin)與橘紅素(tangeretin)之抗腫瘤活性測試，首先以 MTT 細胞毒殺作用，結果顯示對胃癌細胞(AGS)、腦癌細胞(U87)及肺癌細胞(H2981)無抑制作用；乳癌細胞(MCF-7)及肝癌細胞(HepG2)具有輕度抑制作用；大腸癌細胞(COLO201)具有中度抑制作用；血癌細

胞(U937)具有強度抑制作用。為了快速進一步確定川陳皮素(nobiletin)與橘紅素(tangeretin)的細胞毒殺作用，是因為誘導細胞凋亡(apoptosis)所致，由於細胞凋亡時，會因核酸內切酶作用下，細胞 DNA 會以核小體(nucleosome)為單位斷裂(DNA fragmentation)，此 DNA 包覆的完整核小體。經由 ELISA kit 測定證實，由圖五結果，推論川陳皮素(nobiletin)與橘紅素(tangeretin)具有時間與濃度依賴性，有效誘導人類肝癌細胞 HepG2、人類乳癌細胞 MCF-7、人類大腸癌細胞 COLO201 及人類血癌細胞 U937 產生細胞凋亡現象。

B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)，代表的意義是病毒的外套(virus envelope)，其由感染的肝細胞泌出，是經由內質網膜系統，由粗糙內質網送往高基氏體，並需經過轉譯後修飾(post translational modification)；e 抗原代表的意義是病毒的製造產物，與病毒 DNA 的複製有關，其由感染的肝細胞泌出，是經由內質網內腔(lumen)，以分泌小泡(secretory vesicle) 方式(Delius et al., 1983；Huang et al., 1996)。川陳皮素(nobiletin)與橘紅素(tangeretin)為多甲氧基黃酮類(Polymethoxylated Flavones；PMF)化合物以及購自美國公司之 30% PMF，對 B 型肝炎病毒野生型細胞株及肝安能抗藥性突變株，均具有非常顯著抗 B 型肝炎病毒表面抗原之作用；但是對 e 抗原無抑制作用，其進一步機轉值得探討。

## 參考文獻

- Allen, M. I., Deslauriers, M., Andrews, C. W., Tipples, G. A., Walters, K-A., Tyrrell, D. L. J., Brown, N., & Condeay, L. D. (1998) Identification and characterization of mutation in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology*, 27:1670-1677.
- Auyeung, K. K., & Ko, J. K. (2009). Novel herbal flavonoids promote apoptosis but differentially induce cell cycle arrest in human colon cancer cell. *Invest New Drugs*, 28, 1-13.
- Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C. & Chien, C.S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet*, 2: 1129-1133.
- Beasley, R. P., & Hwang, L. Y. (1984). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In Vyas, G. N. (ed): *Viral Hepatitis and Liver Disease*. 209-224, Grune & Stratton, New York, 1984.
- Delius, H., Gough, N. M., Cameron, C. H., & Murray, K. (1983). Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.*47: 337-343.
- Dienstag, J. L., Perrillo, R. P., Schiff, E. R., Bartholomew, M., Vicary, C., & Rubin, M. (1995). A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 333:1657-1661.
- Honkoop, P., Niesters, H. G., deMan, R. A., Osterhaus, A. D., & Schalm, S. W. (1997). Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol*, 26:1393-1395.
- Huang, R-L., Chen, C-C., Huang, Y-L., Hsieh, D-J., Hu, C-P., Chen, C-F., & Chang, C. (1996). Osthole increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus *In Vitro*. *Hepatology*, 24(3), 508-515.
- Lai, C. L., Chien, R-N., Leung, N. W. Y., Chang, T.T., Guan, R., Tai, D. I., Ng, K. Y., Wu, P. C., Dent, J. C., Barber, J., Stephenson, S. L., & Gray, D. F. (1998). A

one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 339:61-68.

Manthey J. A., & Bendele, P. (2008). Anti-inflammatory activity of an orange peel polymethoxylated flavone, 3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone, in the rat carrageenan/paw edema and mouse lipopolysaccharide-challenge assays *J. Agric. Food Chem.*, 56 (20), 9399–9403.

Park, K. Il., Park, H. S., Nagappan, A., Hong, G. E., Lee, D. H., Kang, S. R., Kim, J. A., Zhang, J., Kim, E. H., Lee, W. S., Shin, S. C., Hah, Y. S., & Kim, G. S. (2012). Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean *Citrus aurantium* L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chemistry*, 135, 2728–2735

Robinson, W.S. (1977). The genome of hepatitis B virus. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 357-377.

Shie, P. H., Huang, R. L., & Lay, H. L. (2013). The flavonoids in *Citrus madurensis* Lour and their anti-hepatitis B virus activity. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 4(5), 239-243.

Sporn, M. B. (1976). Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res*, 36, 2699-2702.

Sung, J. L., Shih, P. L., Liaw, Y. F., Lin, W. S. J., Tai, T. Y., Hsieh, S. C., Wang, C. Y., Chang, C. K., Wang, T. H., Yu, J. Y., & Chen, J. S. (1979). A survey and follow-up study of anicteric hepatitis, other asymptomatic liver diseases and hepatitis B surface antigen carriers. *J. Formosan Med. Assoc*, 78: 452-459.

Sureau, C., Romet-Lemonne, J-L., Mullins, J. I., & Essex, M.. (1986). Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell*, 47(1), 37-47



Szmunes, W. (1978). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.* 24: 40-69.

Tong, M. J., Sun, S. C., Schaeffer, B. T., Chang, N. K., Lo, K. J., & Peters, R. L. (1971). Hepatitis-associated antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Ann. Intern. Med.* 75: 687-691.

Tsao, A., Kim, E., & Hong, W. (2004). Chemoprevention of cancer. *CA: A Cancer J for Clinicians*, 54, 150-180.

Zhang, J. Y., Li, N., Che, Y. Y., Zhang, Y., Liang, S. X., Zhao, M. B., Jiang, Y., & Tu, P. F. (2011). Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of *Murraya paniculata* by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry *J. of Pharmaceu. & Biomed. Analysis*, 56(5), 950 – 961

## 附表及附圖

Table 1. Inhibition Concentration Fifty (IC<sub>50</sub>) of Nobiletin, Tangeretin and 30%PMF in Seven kinds of Tumor Cell Lines.

		Inhibition Concentration Fifty (IC <sub>50</sub> ) (μg/ml)						
	Tumor cells	肝癌細胞 HepG2	血癌細胞 U937	大腸癌細胞 COLO201	肺癌細胞 H2981	胃癌細胞 AGS	乳癌細胞 MCF-7	腦癌細胞 U87
	Treatments							
24 小時	川陳皮素	> 50	8.6±0.6	16.8±1.3	> 50	> 50	44.9±1.8	> 50
	橘紅素	> 50	26.7±0.9	47.8±2.5	> 50	> 50	> 50	> 50
	30%PMF	> 50	30.9±2.3	48.1±1.9	> 50	> 50	> 50	> 50
48 小時	川陳皮素	47.8±1.5	7.2±2.0	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
	橘紅素	> 50	14.3±1.6	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
	30%PMF	> 50	17.2±2.0	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

Table 2. HBsAg, HBeAg and MTT of Nobiletin, Tangeretin and 30%PMF in Wild-Type HBV Cell Line (HepG2215).

Treatments for 48 h	$\mu\text{g/ml}$	HBsAg (Inhibition %) Mean $\pm$ S. E.	HBeAg (Inhibition %) Mean $\pm$ S. E.	MTT assay (Inhibition %) Mean $\pm$ S. E.
Control	0	0	0	0
DMSO	2.5 $\mu\text{l/ml}$	2.2 $\pm$ 0.2	-3.3 $\pm$ 2.1	2.5 $\pm$ 0.8
川陳皮素	25 $\mu\text{g/ml}$ (25 ppm)	44.6 $\pm$ 1.3 <sup>++</sup>	0.7 $\pm$ 1.4	3.3 $\pm$ 2.2
	12.5 $\mu\text{g/ml}$ (12.5 ppm)	36.1 $\pm$ 2.4 <sup>++</sup>	3.0 $\pm$ 1.1	4.5 $\pm$ 0.4
	6.25 $\mu\text{g/ml}$ (6.25 ppm)	17.2 $\pm$ 2.3	0.2 $\pm$ 2.5	9.5 $\pm$ 2.5
	3.125 $\mu\text{g/ml}$ (3.125 ppm)	14.3 $\pm$ 1.8	-3.4 $\pm$ 2.2	7.0 $\pm$ 5.7
	1.5625 $\mu\text{g/ml}$ (1.5625 ppm)	4.8 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 3.2	-4.6 $\pm$ 2.3
橘紅素	25 $\mu\text{g/ml}$ (25 ppm)	46.9 $\pm$ 2.3 <sup>++</sup>	-2.2 $\pm$ 2.9	4.4 $\pm$ 2.7
	12.5 $\mu\text{g/ml}$ (12.5 ppm)	28.9 $\pm$ 2.0 <sup>+</sup>	1.3 $\pm$ 1.6	5.4 $\pm$ 3.0
	6.25 $\mu\text{g/ml}$ (6.25 ppm)	15.2 $\pm$ 2.0	2.1 $\pm$ 2.6	5.0 $\pm$ 2.9
	3.125 $\mu\text{g/ml}$ (3.125 ppm)	8.7 $\pm$ 0.3	-2.8 $\pm$ 2.3	3.0 $\pm$ 2.2
	1.5625 $\mu\text{g/ml}$ (1.5625 ppm)	4.7 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 4.0	-3.2 $\pm$ 1.5
30%PMF	25 $\mu\text{g/ml}$ (25 ppm)	29.0 $\pm$ 3.2 <sup>+</sup>	-5.8 $\pm$ 1.0	0.8 $\pm$ 2.2
	12.5 $\mu\text{g/ml}$ (12.5 ppm)	13.3 $\pm$ 2.6	0.2 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 3.5
	6.25 $\mu\text{g/ml}$ (6.25 ppm)	5.4 $\pm$ 1.3	-1.9 $\pm$ 1.0	5.3 $\pm$ 2.8
	3.125 $\mu\text{g/ml}$ (3.125 ppm)	0.7 $\pm$ 1.1	-4.0 $\pm$ 2.8	-3.1 $\pm$ 4.3
	1.5625 $\mu\text{g/ml}$ (1.5625 ppm)	-1.1 $\pm$ 1.0	-1.6 $\pm$ 1.0	-1.9 $\pm$ 2.4
Osthole (From 獨活)	80 $\mu\text{M}$	49.7 $\pm$ 0.8 <sup>++</sup>	-2.5 $\pm$ 1.1	4.0 $\pm$ 1.6

Values are based on one experiment performed in triplicate.

抑制百分比(Inhibition percentage) : 介於 20% - 35% 為輕度抑制(+)  
 介於 35% - 50% 為中度抑制(++)  
 介於 50% - 65% 為強度抑制(+++)  
 大於 65% 為非常強度抑制(++++)

Table 3. HBsAg, HBeAg and MTT of Nobiletin, Tangeretin and 30%PMF in Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).

Treatments for 48 h	$\mu\text{g/ml}$	HBsAg (Inhibition %) Mean $\pm$ S. E.	HBeAg (Inhibition %) Mean $\pm$ S. E.	MTT assay (Inhibition %) Mean $\pm$ S. E.
Control	0	0	0	0
DMSO	2.5 $\mu\text{l/ml}$	0.8 $\pm$ 4.5	1.7 $\pm$ 1.2	-2.3 $\pm$ 2.9
川陳皮素	25 $\mu\text{g/ml}$ (25 ppm)	65.2 $\pm$ 1.0 <sup>+++</sup>	-4.7 $\pm$ 0.3	19.9 $\pm$ 1.1
	12.5 $\mu\text{g/ml}$ (12.5 ppm)	41.5 $\pm$ 1.8 <sup>++</sup>	-3.5 $\pm$ 0.4	14.8 $\pm$ 1.0
	6.25 $\mu\text{g/ml}$ (6.25 ppm)	28.0 $\pm$ 1.1 <sup>+</sup>	-1.7 $\pm$ 0.4	8.8 $\pm$ 1.7
	3.125 $\mu\text{g/ml}$ (3.125 ppm)	6.2 $\pm$ 3.0	2.4 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 3.1
	1.5625 $\mu\text{g/ml}$ (1.5625 ppm)	5.4 $\pm$ 2.9	5.2 $\pm$ 2.3	0.9 $\pm$ 4.5
橘紅素	25 $\mu\text{g/ml}$ (25 ppm)	58.5 $\pm$ 0.4 <sup>+++</sup>	-5.0 $\pm$ 1.6	11.8 $\pm$ 1.2
	12.5 $\mu\text{g/ml}$ (12.5 ppm)	39.3 $\pm$ 1.0 <sup>++</sup>	-2.4 $\pm$ 0.8	14.1 $\pm$ 2.9
	6.25 $\mu\text{g/ml}$ (6.25 ppm)	19.9 $\pm$ 5.9	-0.4 $\pm$ 2.7	4.8 $\pm$ 4.1
	3.125 $\mu\text{g/ml}$ (3.125 ppm)	-3.6 $\pm$ 1.8	2.1 $\pm$ 1.0	-3.8 $\pm$ 4.3
	1.5625 $\mu\text{g/ml}$ (1.5625 ppm)	-2.0 $\pm$ 2.7	3.5 $\pm$ 0.9	-6.6 $\pm$ 2.3
30%PMF	25 $\mu\text{g/ml}$ (25 ppm)	27.1 $\pm$ 1.8 <sup>+</sup>	-1.9 $\pm$ 1.0	8.0 $\pm$ 2.3
	12.5 $\mu\text{g/ml}$ (12.5 ppm)	10.0 $\pm$ 2.9	2.2 $\pm$ 1.5	8.7 $\pm$ 3.2
	6.25 $\mu\text{g/ml}$ (6.25 ppm)	-1.1 $\pm$ 5.0	4.8 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 2.1
	3.125 $\mu\text{g/ml}$ (3.125 ppm)	-13.3 $\pm$ 3.0	0.2 $\pm$ 3.6	-0.1 $\pm$ 2.0
	1.5625 $\mu\text{g/ml}$ (1.5625 ppm)	-3.3 $\pm$ 2.3	2.8 $\pm$ 5.4	-2.1 $\pm$ 2.1
Osthole (From 獨活)	80 $\mu\text{M}$	56.4 $\pm$ 1.9 <sup>+++</sup>	0.5 $\pm$ 3.6	2.2 $\pm$ 2.3

Values are based on one experiment performed in triplicate.

抑制百分比(Inhibition percentage) : 介於 20% - 35%為輕度抑制(+)  
 介於 35% - 50%為中度抑制(++)  
 介於 50% - 65%為強度抑制(+++)  
 大於 65% 為非常強度抑制(++++)

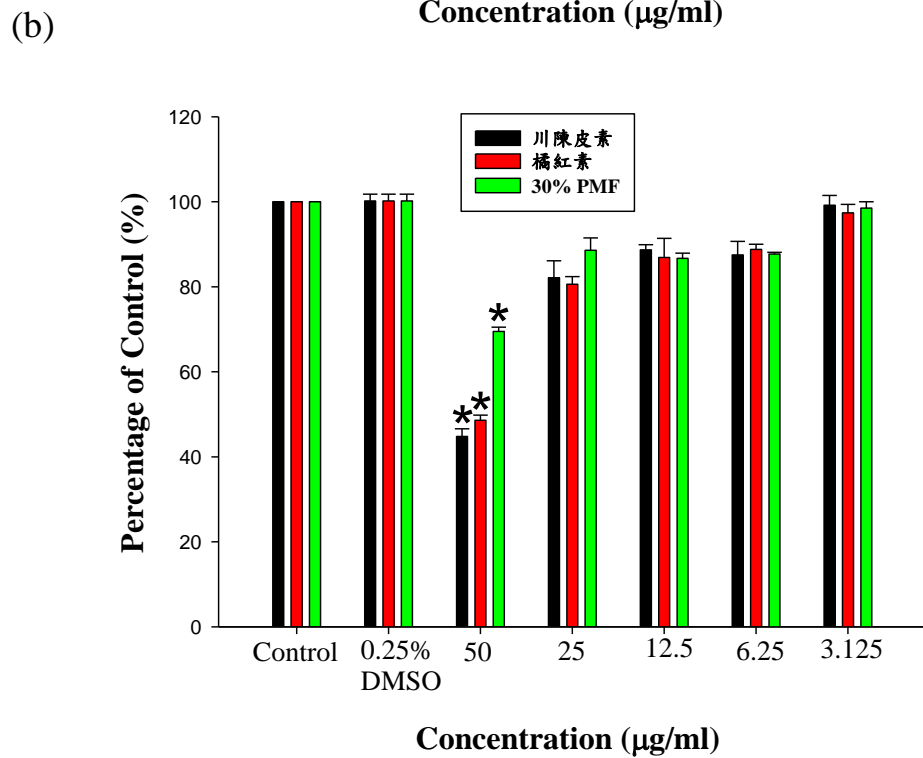
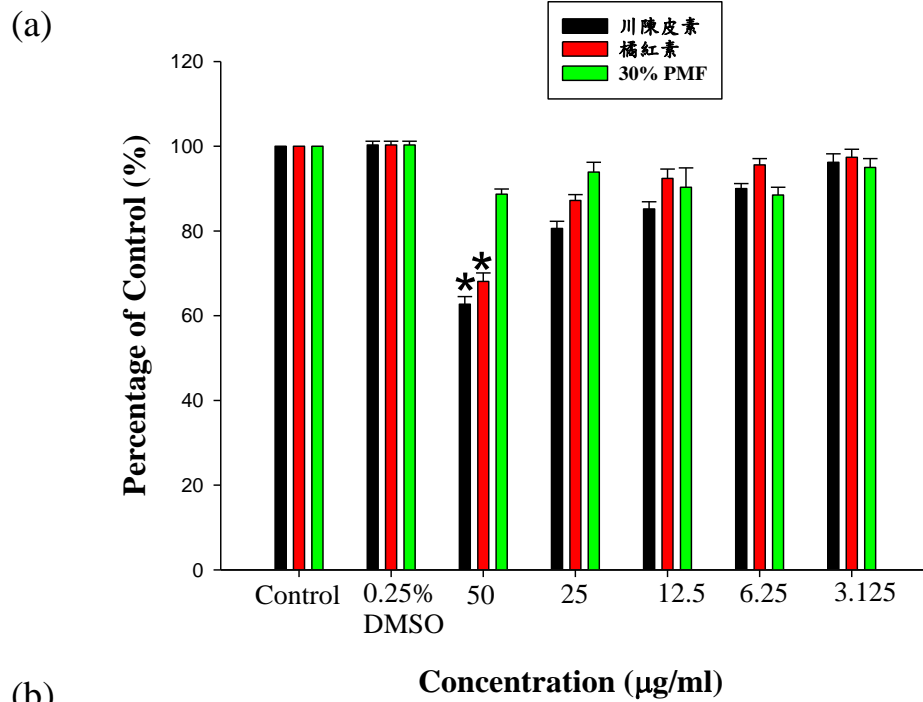
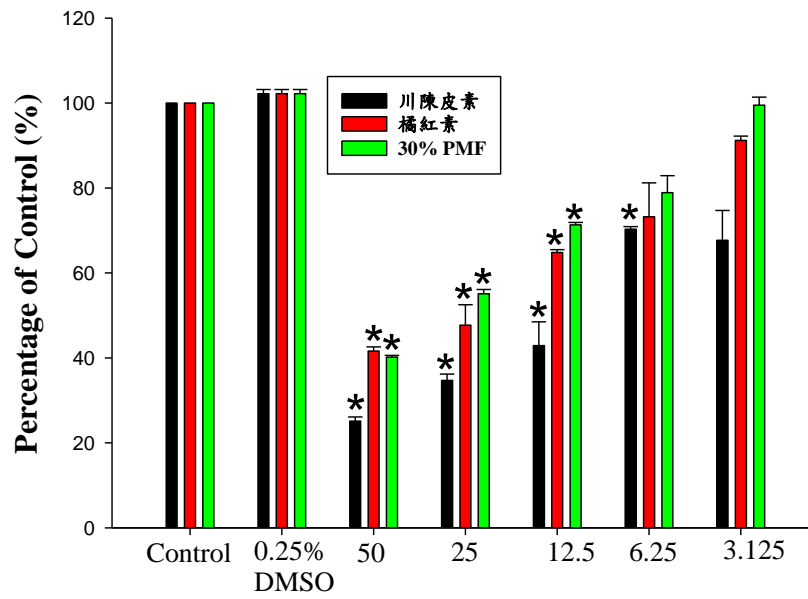


圖 1、HepG2 肝癌細胞毒殺測試。川陳皮素、橘紅素和 30% PMF 各 5 種濃度，3 重覆，分別處理 24 及 48 小時，MTT 測試結果。1a 為藥物處理 24 小時；1b 為藥物處理 48 小時。實驗數據皆以平均值±標準誤差來表示。\* $p < 0.05$

(a)



(b)

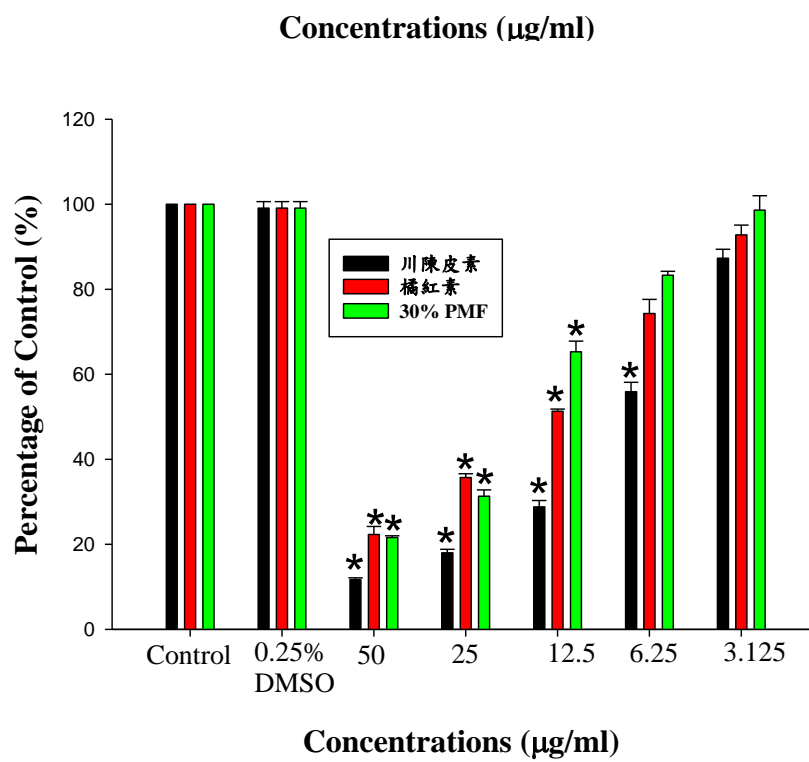
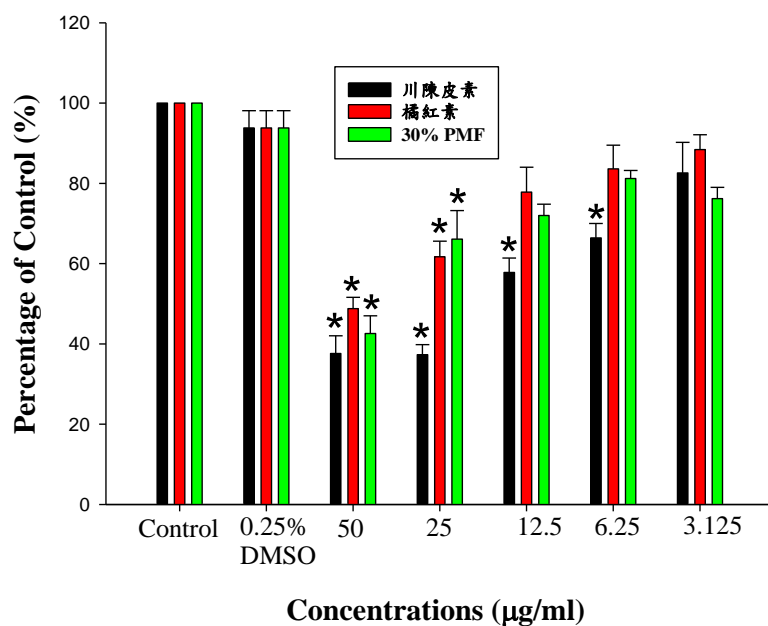


圖 2、U937 血癌細胞毒殺測試。川陳皮素、橘紅素和 30% PMF 各 5 種濃度，3 重覆，分別處理 24 及 48 小時，MTT 測試結果。2a 為藥物處理 24 小時；2b 為藥物處理 48 小時。實驗數據皆以平均值±標準誤差來表示。\* $p < 0.05$

(a)



(b)

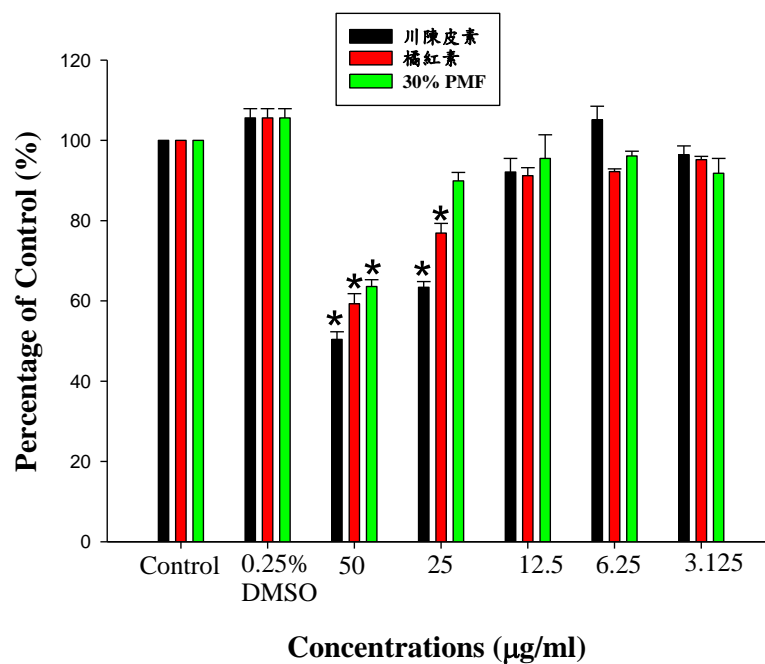
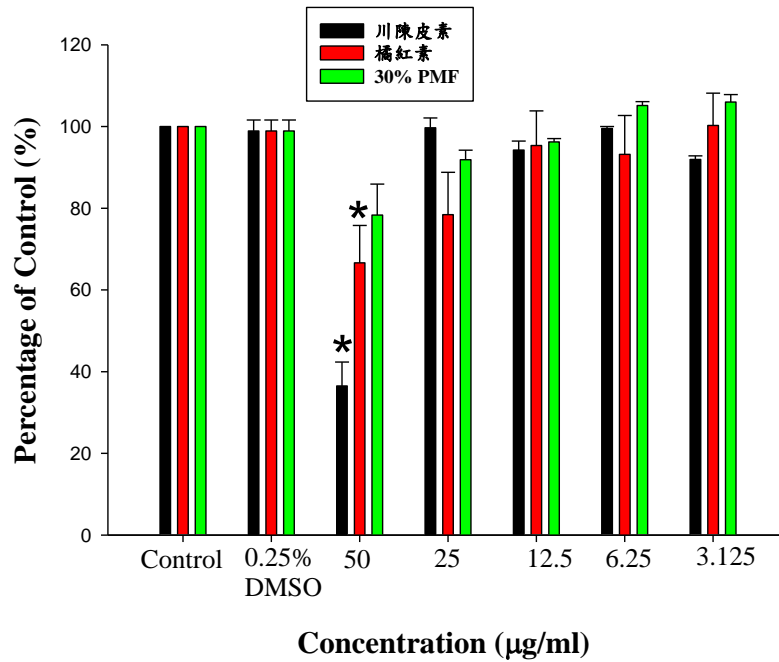


圖 3、COLO201 大腸癌細胞毒殺測試。川陳皮素、橘紅素和 30% PMF 各 5 種濃度，3 重覆，分別處理 24 及 48 小時，MTT 測試結果。3a 為藥物處理 24 小時；3b 為藥物處理 48 小時。實驗數據皆以平均值±標準誤差來表示。\* $p < 0.05$

(a)



(b)

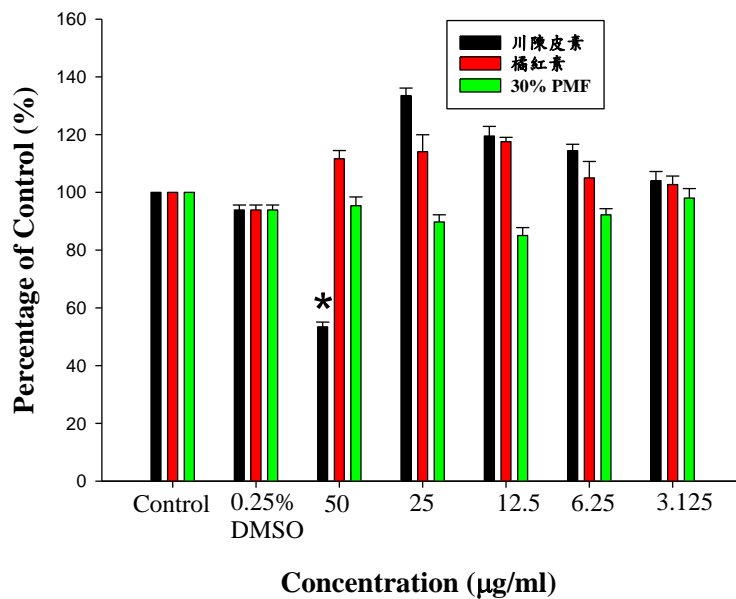
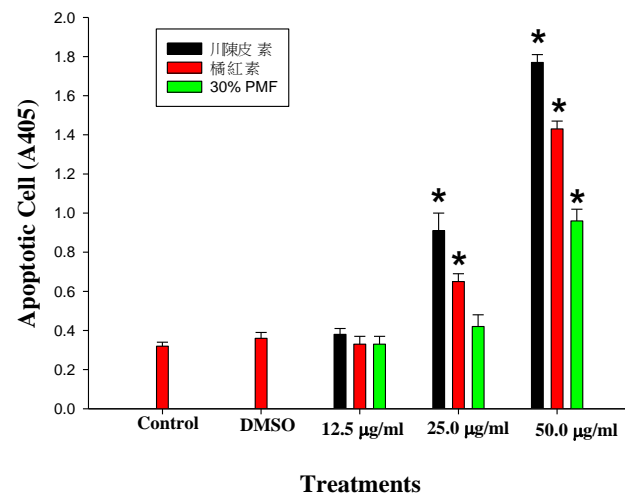


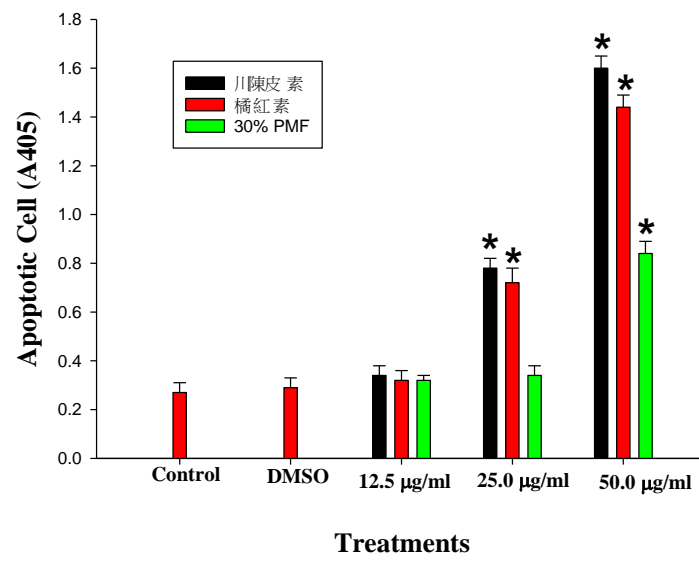
圖 4、MCF-7 乳癌細胞毒殺測試。川陳皮素、橘紅素和 30% PMF 各 5 種濃度，3 重覆，分別處理 24 及 48 小時，MTT 測試結果。4a 為藥物處理 24 小時；4b 為藥物處理 48 小時。實驗數據皆以平均值±標準誤差來表示。\* $p < 0.05$



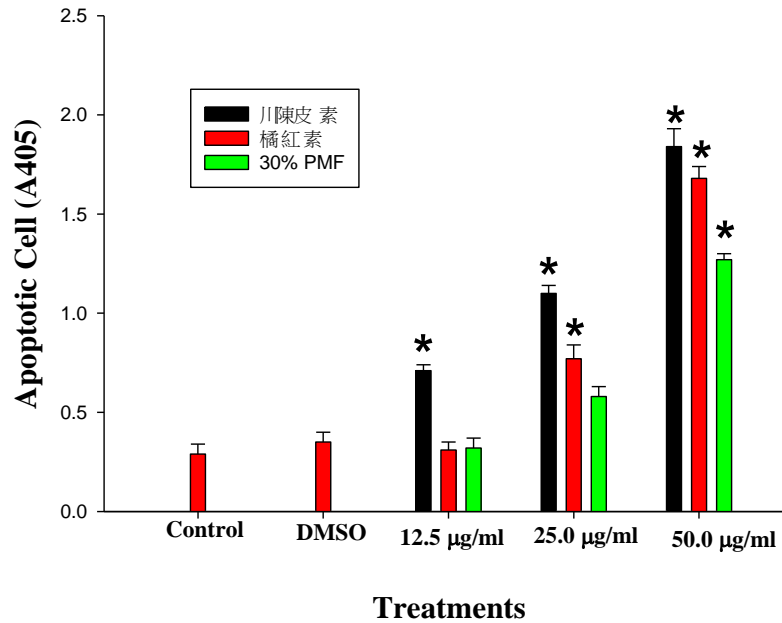
5(a)



5(b)



5(c)



5(d)

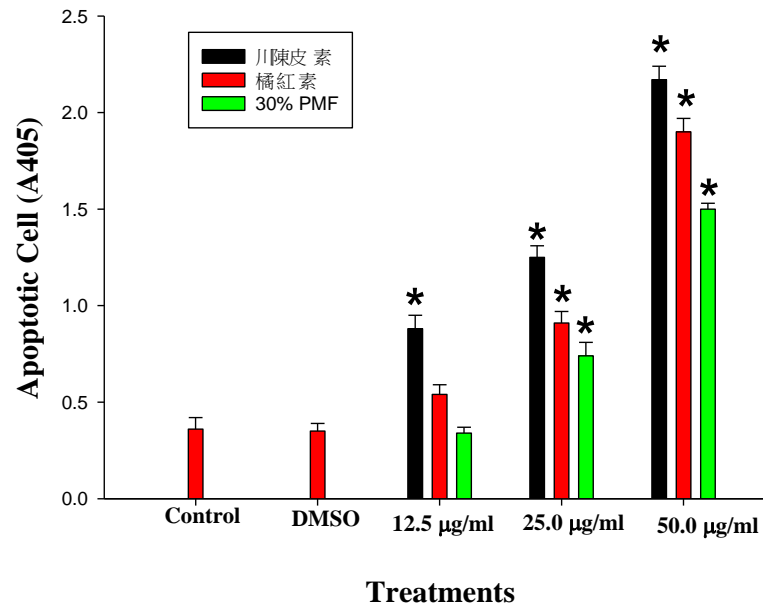
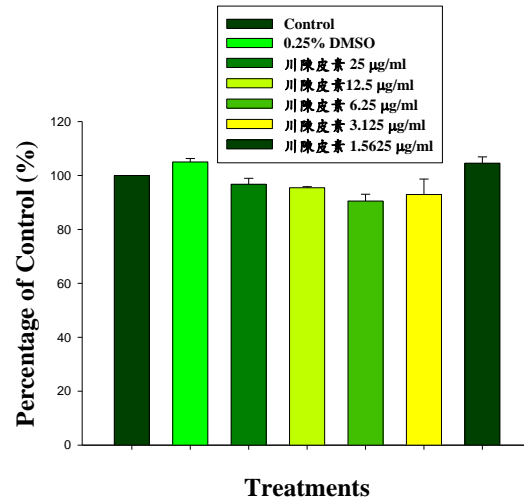
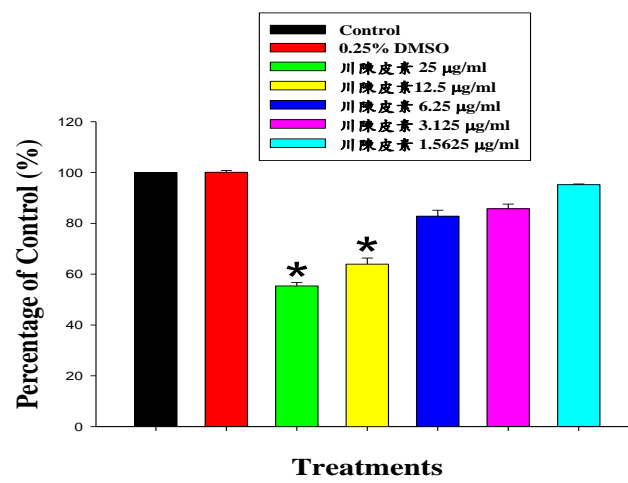


圖 5、以 ELISA kit 測定川陳皮素、橘紅素和 30% PMF 各 3 種濃度，3 重覆，處理 24 小時誘導(a)人類肝癌細胞 HepG2 細胞凋亡之作用；(b)人類乳癌細胞 MCF-7 細胞凋亡之作用；(c)人類大腸癌細胞 CoLo201 細胞凋亡之作用；(d) 人類血癌細胞 U937 細胞凋亡之作用。 Each value is mean  $\pm$  S.E. of three replicate analyses. \* represents significant difference as compared with control ( $P < 0.05$ ).

(a)



(b)



(c)

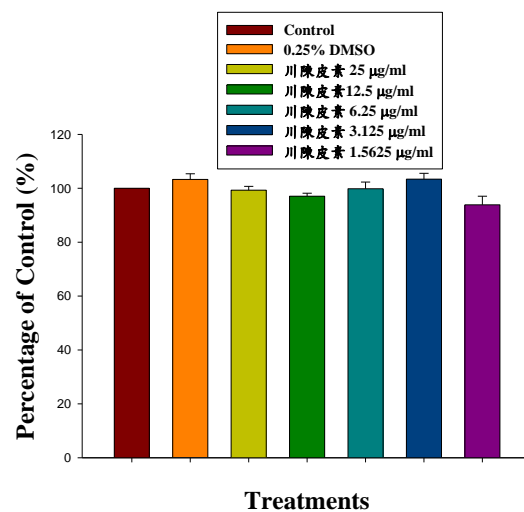
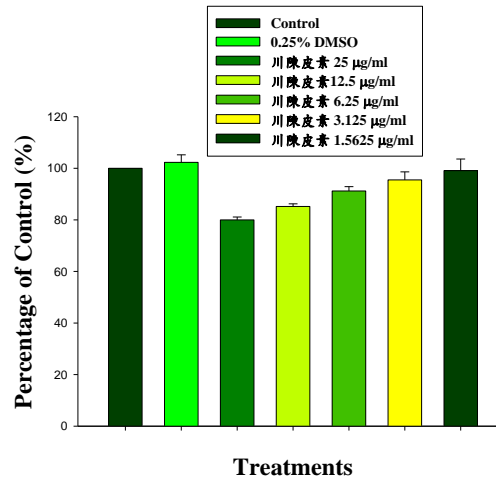
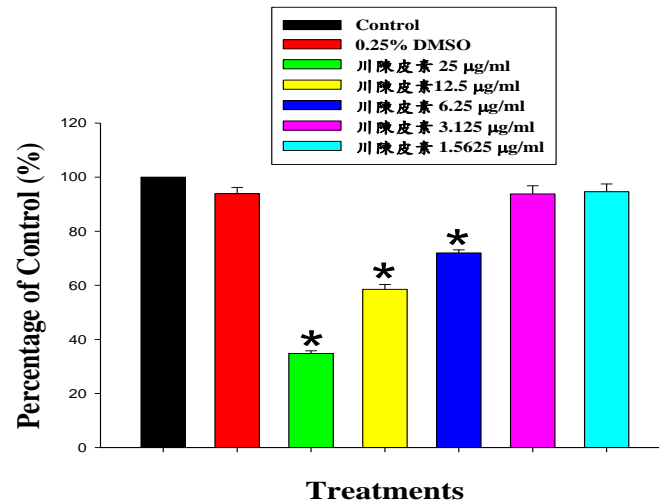


圖 6、MTT assay 及 ELISA 測定川陳皮素 5 種濃度，3 重覆，處理 48 小時，對 HepG2215 之作用。(a)為 MTT 測定結果；(b)為表面抗原活性抑制作用；(c)為 e 抗原活性抑制。Each value is mean  $\pm$  S.E. of three replicate analyses. \* represents significant difference as compared with control ( $P < 0.05$ ).

(a)



(b)



(c)

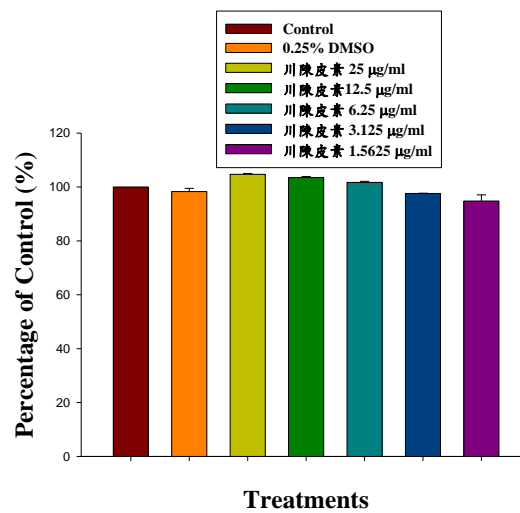
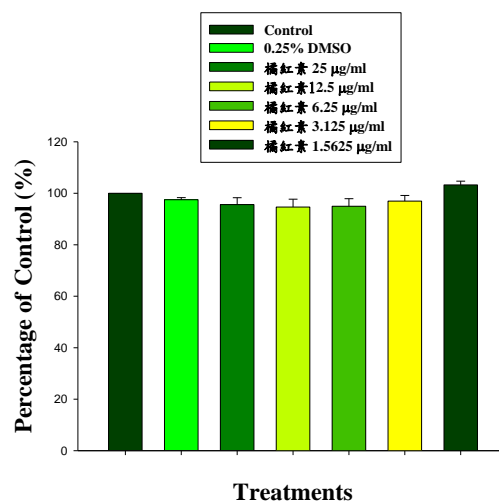
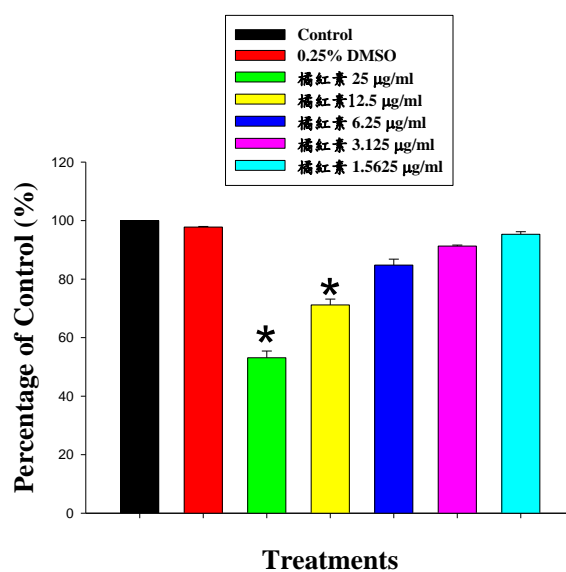


圖 7、MTT assay 及 ELISA 測定川陳皮素 5 種濃度，3 重覆，處理 48 小時，對 M33 之作用。(a)為 MTT 測定結果；(b)為表面抗原活性抑制作用；(c)為 e 抗原活性抑制。Each value is mean  $\pm$  S.E. of three replicate analyses. \* represents significant difference as compared with control ( $P < 0.05$ ).

(a)



(b)



(c)

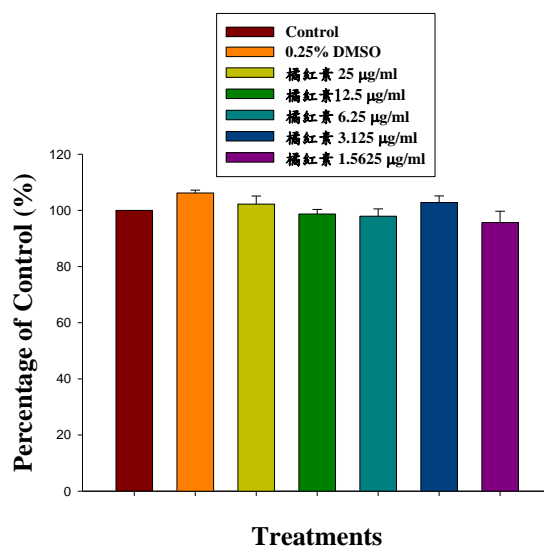


圖 8、MTT assay 及 ELISA 測定橘紅素 5 種濃度，3 重覆，處理 48 小時，對 HepG2215 之作用。(a)為 MTT 測定結果；(b)為表面抗原活性抑制作用；(c)為 e 抗原活性抑制。Each value is mean  $\pm$  S.E. of three replicate analyses. \* represents significant difference as compared with control ( $P < 0.05$ ).

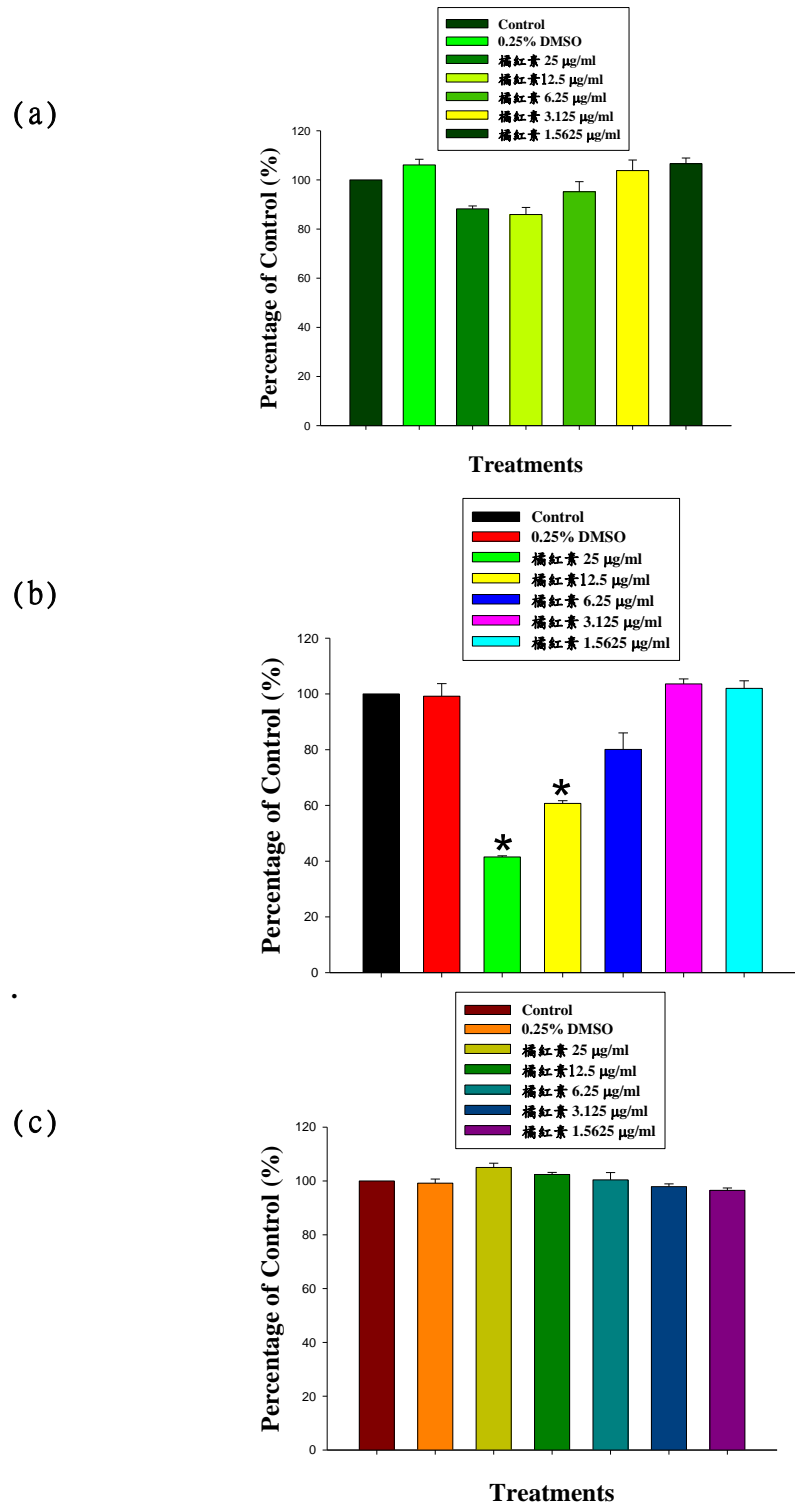


圖 9、MTT assay 及 ELISA 測定橘紅素 5 種濃度，3 重覆，處理 48 小時，對 M33 之作用。(a)為 MTT 測定結果；(b)為表面抗原活性抑制作用；(c)為 e 抗原活性抑制。Each value is mean  $\pm$  S.E. of three replicate analyses. \* represents significant difference as compared with control ( $P < 0.05$ ).

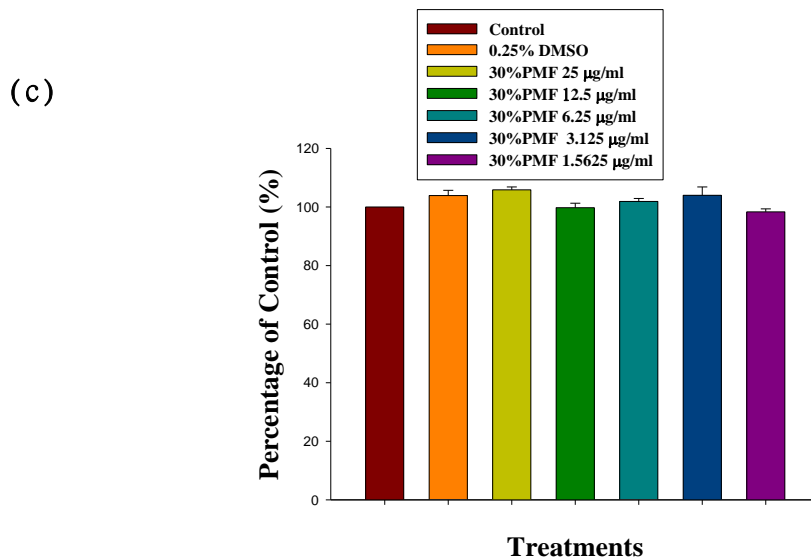
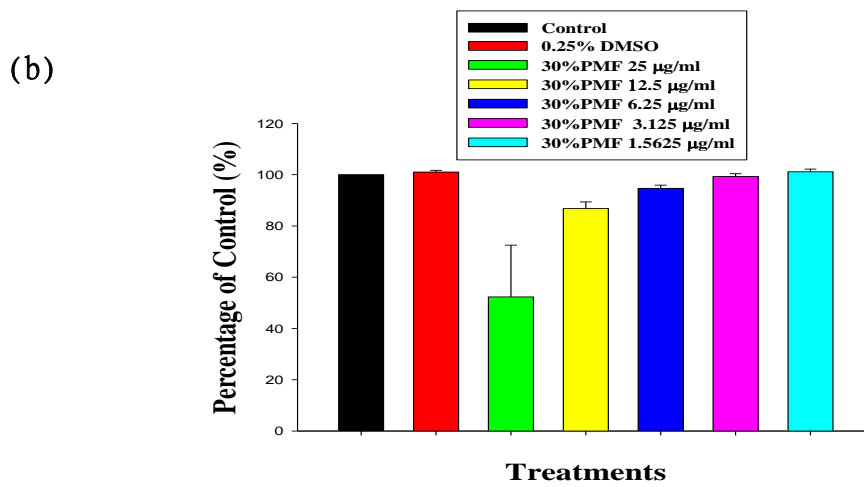
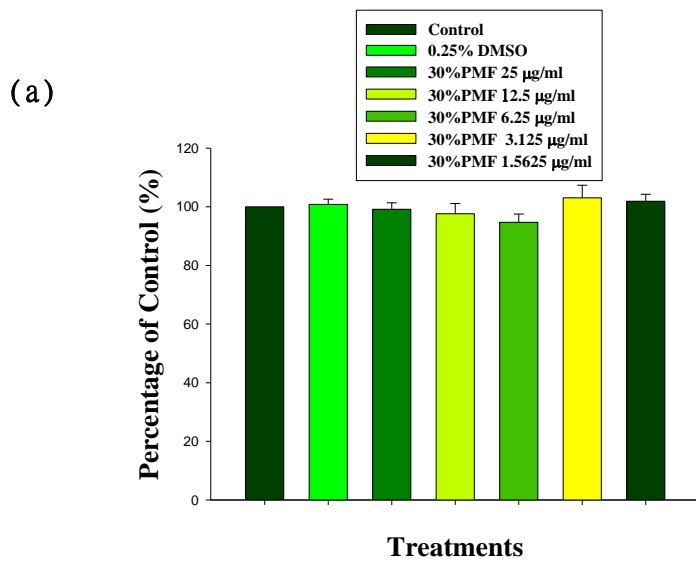
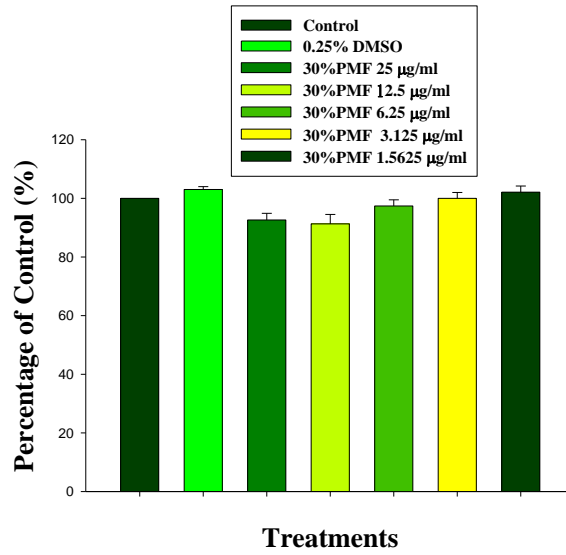
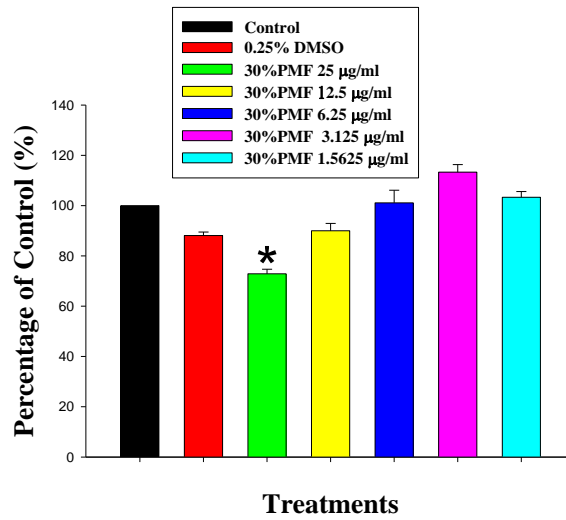


圖 10、MTT assay 及 ELISA 測定 30% PMF5 種濃度，3 重覆，處理 48 小時，對 HepG2215 之作用。(a)為 MTT 測定結果；(b)為表面抗原活性抑制作用；(c)為 e 抗原活性抑制。Each value is mean  $\pm$  S.E. of three replicate analyses. \* represents significant difference as compared with control ( $P < 0.05$ ).

(a)



(b)



(c)

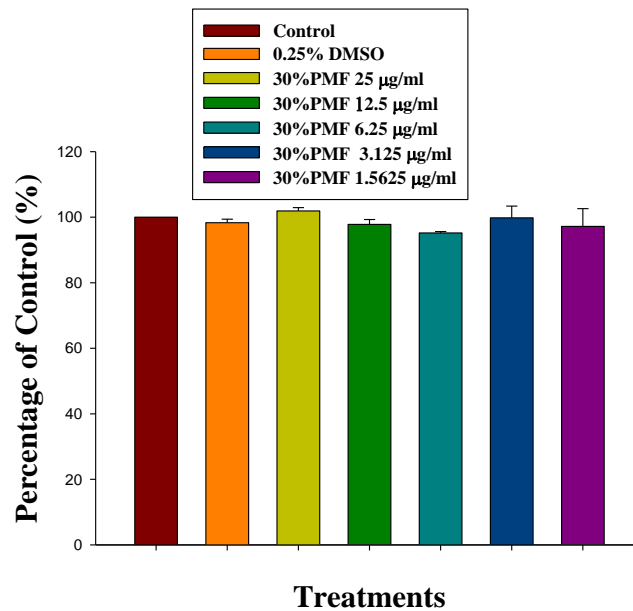


圖 11、MTT assay 及 ELISA 測定 30% PMF5 種濃度，3 重覆，處理 48 小時，對 M33 之作用。(a)為 MTT 測定結果；(b)為表面抗原活性抑制作用；(c)為 e 抗原活性抑制。Each value is mean  $\pm$  S.E. of three replicate analyses. \* represents significant difference as compared with control ( $P < 0.05$ ).