

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9806

總計畫名稱：高多酚類含量之原生種蔬菜的生物活性評估

子計畫三計畫名稱：高多酚類蔬菜抗EB病毒及抗腫瘤效應

執行期間：98年1月1日至98年12月31日

<input checked="" type="checkbox"/> 整合型計畫	<input type="checkbox"/> 個別型計畫
計畫總主持人：蕭慧美	計畫主持人：
子計畫主持人：一、陳淑芬 二、蕭慧美 三、林翠品	

中華民國 99 年 2 月 28 日

## 子計畫三：高多酚類蔬菜抗 EB 病毒及抗腫瘤效應

子計畫三主持人：保營系 林翠品

共同主持人：保營系 陳姿秀

### 一、摘要

EB 病毒從潛伏時期進入溶裂循環(lytic cycle)進行增殖作用會導致病毒顆粒的產生，再感染其他細胞，此作用與 EB 病毒所導致的疾病有重要的相關性。在這個研究我們探討高多酚類蔬菜，獼猴木(*Adansonia digitata* L.)嫩葉、香蓼(*Polygonum odoratum* Lour.)幼芽及海巴戟天(*Morinda citrifolia*)葉抗 EB 病毒及抗腫瘤效應。結果顯示獼猴木嫩葉甲醇粗萃物在 25 µg/ml 時，明顯抑制 Rta、Zta 及 EA-D 蛋白質的表現量，抑制率分別 31%，45%及 46%。香蓼幼芽甲醇粗萃物在 25 µg/ml 時只對 Zta 蛋白質表現有明顯抑制作用，抑制率約 33%。而且也發現具有抑制 EB 病毒溶裂蛋白質表現的濃度對細胞不會造成毒性；所以，本研究確認獼猴木嫩葉甲醇粗萃物具有抑制病毒進入溶裂循環，阻擋病毒的再活化的效果。此外，也發現海巴戟天葉酒精萃取液 (LES)中含有抗氧化及基因毒性的成分。

### 二、緣由與目的

EB 病毒是人類的皰疹病毒(herpesvirus)，會感染淋巴球細胞及上皮細胞<sup>(1)</sup>，導致傳染性單核球增多症(infectious mononucleosis)<sup>(2)</sup>及多種惡質病(malignant disease)包括巴克氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)<sup>(3)</sup>、T 細胞淋巴瘤<sup>(4)</sup>、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)<sup>(5)</sup>、胃癌(gastric cancer)<sup>(6)</sup>及鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma)<sup>(7)</sup>。病毒感染 B 淋巴球細胞後會進入潛伏時期(latent)<sup>(8)</sup>，但是當受到外在因子包括紫外線<sup>(9)</sup>、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)<sup>(10)</sup>，sodium butyrate(SB)<sup>(11)</sup>就會由潛伏時期進入溶裂循環(lytic cycle)進行增殖作用再感染其他細胞，此作用與 EB 病毒所導致的疾病有重要的相關性。在溶裂循環時期病毒會表現兩個較早期基因(immediate-early genes)，BRLF1 及 BZLF1 它們分別可以表現轉錄因子 Rta 及 Zta<sup>(12)</sup>，這兩個轉錄因子可以互相作用或單獨活化其他與溶裂循環時期有關的基因表現，包括 BMRF1 及 BALF5 分別表現 diffused early antigen (EA-D)及 DNA 聚合酶(polymerase)<sup>(13)</sup>。換言之，如果沒有這些溶裂蛋白質的表現就無法完成溶裂循環，就可以降低發生 EB 病毒相關疾病的危險性。目前一般對皰疹病毒的治療是以 acyclovir 和 ganciclovir，這兩種是核苷酸的類似物主要抑制 DNA 聚合酶(polymerase)使病毒無法進行溶裂循環，也就無法再感染其他的細胞<sup>(14)</sup>。但是此種治療伴隨毒性太高，缺乏口服生物利用度及衍生抗藥性等缺點，所以本研究希望從食品或藥草中找出具有抗病毒的物質和抑癌物質，使身體內抗病毒物質或抑癌因素佔上風，以達到身體保健與疾病預防的目的。此外，人類癌症的發生與 DNA 受傷害有關。因此，檢測 DNA 受傷害程度可以間接預測癌症發生的危險機率。在過去的文獻中發現含有高量多酚化合物在抗病毒、抗腫瘤及保護 DNA 免於受傷害的效果呈現正反應。所以在我們的研究以含有高量多酚化合物的蔬菜—海巴戟天(*Morinda citrifolia*)葉、香蓼(*Polygonum odoratum* Lour.)幼芽及獼猴木(*Adansonia digitata* L.)嫩葉作為材料，經水，乙醇或甲醇萃取，所得萃取物進行抗 EB 病毒、抗腫瘤活性及保護 DNA 免於受傷害的評估。此研究成果將有助於開發預防鼻咽癌及胃癌的天然物，也提高海巴戟天、香蓼及獼猴木的經濟效益及利用率。

### 三、材料與方法

#### (一)、獼猴木嫩葉及香蓼幼芽水及甲醇粗萃物的製備

1 克獼猴木嫩葉及香蓼幼芽粉末溶在水或 95% 甲醇在 80°C 水浴震盪 (100 rpm) 24 小時，經由紗布初步過濾後，再經由 6500 xg 離心 10 分鐘去除雜質，接著取上清液，水萃取物經冷凍乾燥。乙醇萃取物上清液進行真空減壓濃縮 (EYELA rotary evaporator N-100) 去除有機溶劑再冷凍乾燥，得到獼猴木嫩葉及香蓼幼芽水(AdW 及 PoW)及乙醇粗萃物(AdM 及 PoM)定量備用，萃取率分別為 40.24%, 14.5%, 5.34% 及 37.5%。

#### (二)、海巴戟天葉乙醇萃取物上清液 (LES) 粉末製備

採集新鮮的海巴戟天葉經由自來水清洗表面的灰塵，再以純水沖洗乾淨，將葉子整片放置烘箱以 37°C 乾燥 5 天，之後使用粉碎機打成粉末過篩放入 -80°C 冰箱保存備用。將海巴戟天葉粉末與 95% 乙醇分別以 1:10 (w/v) 的比例相混合，置於 80°C 水浴機迴流 2 小時，冷卻後以紗布過濾得到海巴戟天葉粗萃取液，之後進行減壓濃縮，此步驟中會加入二次水來置換出乙醇，所得的萃取液為濃縮後的海巴戟天葉乙醇萃取液 (LE)，在後續的步驟中將 LE 加熱 80°C、2 小時經過離心 (9000 xg, 4°C, 20 分鐘) 後取上清液 (LES)，再經過冷凍乾燥處理得到粉末樣品。

#### (三)、細胞毒性分析

將  $1 \times 10^5$  cell/ml 的 P3HR1 細胞以含有 10% 胎牛血清及 1% 抗生素 (penicillin-G & streptomycin) 的 HyQ RPMI 1640 培養基，在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培養 24 小時後，分別添加不同濃度的獼猴木嫩葉及香蓼幼芽水(AdW 及 PoW)及乙醇粗萃物(AdM 及 PoM)，又經過 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培養 24 小時後，加入 1/10 的 alamar blue 試劑，置於 5% CO<sub>2</sub>、37°C 反應作用 20 小時，測定螢光。

細胞生長存活率(%)

$$= \text{Sample 螢光強度} / \text{Control 螢光強度} \times 100\%$$

#### (四)、抗病毒生物活性分析

抗病毒活性分析，將 P3HR1 細胞 ( $6 \times 10^5$  cell/ml) 放置在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培養 24 小時後，再加入 SB (Sodium butyrate) 誘導細胞進入溶裂循環前一小時加入獼猴木嫩葉及香蓼幼芽水(AdW 及 PoW)及乙醇粗萃物(AdM 及 PoM)培養 24 小時後收集細胞，再以 lysis buffer 溶解細胞，經過離心取得上清液蛋白質，進一步我們利用西方墨點法來分析 EB 病毒溶裂蛋白質 Rta, Zta 及 EA-D 的表現。並且以影像分析軟體 (VisionWorksLS) 掃描影像強度進行數據分析，以  $\beta$ -actin 相對比較換算 Rta, Zta 及 EA-D 相對表現量。

#### (五)、人體血球研究模式

- (1) 淋巴球細胞分離：取全血 5 mL (添加 heparin)，加入等量的 PBS (5 mL)，溫和的上下倒置幾次，再將稀釋的 10mL 全血沿管壁緩緩加入 Ficoll-paque 中 (稀釋的全血：Ficoll-paque = 2:1)，離心 (2,500 rpm, 20°C, 30min)，取出 Lymphocyte。
- (2) Comet assay：彗星分析法可以用來判別受試樣品對於人體 DNA 修補的影響程度，取

出人體淋巴球細胞，經細胞生存率鑑定後調整細胞濃度，加入測試樣品（抗氧化物質）與淋巴球細胞作用，經過 37°C 孵育 20 分鐘，隨後加入誘發氧化性傷害物質（氧化物），並於 37°C 孵育 20 分鐘後，進行單細胞膠體電泳（Single cell gel electrophoresis）後，如果受試樣無法保護淋巴球細胞，那麼淋巴球細胞的 DNA 會受到氧化物的傷害而遭致破壞，而被損壞的 DNA 將開始遊離細胞核，形成彗星形狀，可以螢光顯微鏡觀察與照相，DNA 損壞愈大，DNA 碎段就愈多，愈小的 DNA 碎段遊離的速度就愈快，也遊離愈遠，因而形成了彗星的尾部，而較大的一些碎段位置則靠近細胞核，因而形成彗星的頭部；因此彗星尾端的長度可作為計算造成 DNA 氧化性傷害的程度。

(六)、將所得的數據以 Statistical Analysis System (SAS) 進行統計分析，以 ANOVA 程式做變異數分析，並以 Duncan's Multiple Range Tests 做顯著差異性比較，作為樣品於人體血球研究模式中抗氧化機能之檢定。

#### 四、結果

(一)、獼猴木嫩葉及香蓼幼芽水及甲醇粗萃物對 EB 病毒溶裂蛋白質的影響

EB 病毒感染 B 細胞後即進入潛伏時期，當受到紫外光或是 TPA、SB 等誘導，便會促使 Rta 及 Zta 轉錄因子的表現，進而使 EB 病毒走向溶裂循環。這兩個轉錄因子會活化 BMRF1 基因產生 EA-D 蛋白質，而增加病毒聚合酶效能，使病毒大量的複製。所以如果獼猴木嫩葉及香蓼幼芽水及甲醇粗萃物能夠抑制這些蛋白質的表現，就可以抑制 EB 病毒走向溶裂循環。首先培養 P3HR1 細胞 ( $6 \times 10^5$ /ml)，加入不同濃度的獼猴木嫩葉及香蓼幼芽水及甲醇粗萃物，接著加入 SB，經過 24 小時培養，將細胞收集並打破，利用西方墨點法偵測細胞中 Rta、Zta 及 EA-D 蛋白質的表現。結果顯示獼猴木嫩葉及香蓼幼芽水粗萃物在濃度 25  $\mu$ g/ml 對 EB 病毒溶裂循環蛋白質，Rta、Zta 及 EA-D 沒有明顯抑制。但是獼猴木嫩葉甲醇粗萃物在 25  $\mu$ g/ml 時，明顯抑制 Rta、Zta 及 EA-D 蛋白質的表現量，抑制率分別 31%、45% 及 46% ((圖一-A)。香蓼幼芽甲醇粗萃物在 25  $\mu$ g/ml 時只對 Zta 蛋白質表現有明顯抑制作用，抑制率約 33%(圖一-B)。

(二)、香蓼幼芽及獼猴木嫩葉水及甲醇粗萃物對 P3HR1 細胞的毒性

將不同濃度的香蓼幼芽及獼猴木嫩葉水及甲醇粗萃物加入含有  $1 \times 10^5$ /ml P3HR1 細胞的培養液中，培養 24 小時後，利用 alamar blue 方法來測定這些樣品對於 P3HR1 細胞是否有毒性。結果顯示，香蓼幼芽及獼猴木嫩葉水粗萃物及甲醇粗萃物 (3.13-100  $\mu$ g/ml) 對 P3HR1 細胞存活率沒有明顯影響 (圖二)。

(三)、海巴戟天葉酒精萃取液 (LES) 的抗氧化與基因毒性

LES 的基因毒性分析中，Standard (圖三 A) 與 Lysed-cell assay (圖五 B) 的結果皆顯示隨著 LES 劑量增加，基因毒性也顯著上升，並具有劑量依存關係 (dose-dependent)，濃度在 200-400  $\mu$ g/mL 呈現明顯的基因毒性，其線性迴歸分別為 ( $y=0.20(\pm 0.01)x - 1.97(\pm 2.27)$ ,  $R^2=0.91$  (圖一 A);  $y=0.01(\pm 0.00)x + 0.74(\pm 0.08)$ ,  $R^2=0.81$  (圖一 B);  $y=0.32(\pm 0.05)x + 5.13(\pm 7.92)$ ,  $R^2=0.68$  (圖五 A);  $y=0.01(\pm 0.00)x + 2.10(\pm 0.14)$ ,  $R^2=0.55$  (圖五 B))。由於在細胞膜存在 (圖三 A) 與不存在的模式 (圖五 B) 下，測試基因毒性的結果相當相似，顯示細胞膜的存在不

會造成基因毒性的改變，故推測 LES 中造成基因毒性的物質具有穿越細胞膜的特性，能直接對 DNA 造成氧化傷害，此傷害與細胞膜存在與否無關。

LES 的抗氧化活性分析中，Standard assay 的結果顯示 LES 在濃度 6-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  具有顯著保護人類淋巴球細胞免於遭受過氧化氫誘發 DNA 氧化傷害的效果（以下簡稱抗氧化活性），但隨著 LES 劑量增加，抗氧化活性的效果逐步顯著下降 ( $y=0.21(\pm 0.02)x - 6.67(\pm 2.65)$ ),  $R^2=0.90$  (圖四 A);  $y=0.01(\pm 0.00)x + 0.59(\pm 0.06)$ ),  $R^2=0.91$  (圖四 B)), LES 在濃度 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時甚至已經喪失抗氧化的特性，無法有效保護人類淋巴球細胞免於遭受過氧化氫誘發 DNA 的氧化傷害；Lysed-cell assay 的結果顯示低劑量 6-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  雖仍可維持微弱的抗氧化活性，但與高劑量 100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  無抗氧化活性的結果差異不大。

觀察低劑量（基因毒性很低）的表現，可以排除基因毒性的干擾，並直接反應抗氧化活性物質的特性，結果顯示 LES 在細胞膜存在（圖四 A,B）與不存在的模式（圖六 A,B）下的抗氧化活性表現顯著不同，顯示細胞膜是造成結果不同的重要影響因素，故推測的抗氧化活性物質需與細胞膜產生交互作用，間接引發細胞抗氧化防禦機制。LES 在高劑量的範圍，同時存在基因毒性與抗氧化特性，研究結果顯示此範圍的基因毒性顯著大於抗氧化特性，亦即 LES 造成 DNA 氧化傷害的原因可能來自於本身的基因毒性，並非 LES 無法保護人類淋巴球細胞免於遭受過氧化氫誘發 DNA 的氧化傷害。

## 五、討論

皰疹病毒感染所導致的臨床症狀有唇皰疹(cold sores)，生殖器疹(genital herpes)，水痘(chicken pox)及感染性單核球增多症(infectious mononucleosis)都和病毒的再活化有關。因此一般抗皰疹病毒的藥劑，如 acyclovir 和 ganciclovir 是核苷酸的類似物抑制皰疹的 DNA 聚合酶及病毒溶裂循環的複製。早期的研究證明 EB 病毒顆粒是由 B 淋巴球細胞產生傾向再去感染上皮細胞。因此在 B 淋巴球細胞中的 EB 病毒溶裂循環的再活化是導致上皮細胞癌，如鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma; NPC)重要癌化的步驟。因此篩選抑制溶裂循環的新物質是可以治療與 EB 病毒感染有關的疾病。

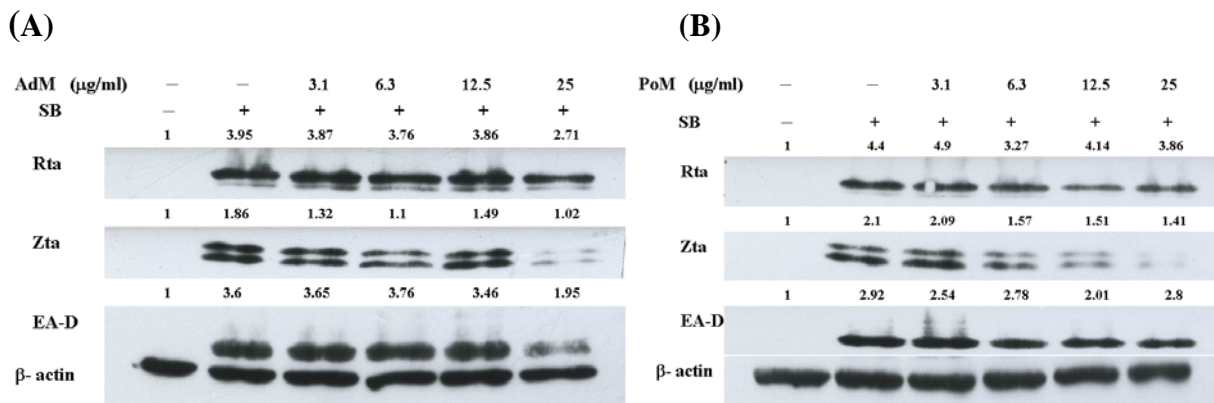
本研究發現獼猴木嫩葉甲醇粗萃物在 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時，明顯抑制 Rta、Zta 及 EA-D 蛋白質的表現量，抑制率分別 31%，45%及 46%。香蓼幼芽甲醇粗萃物在 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時只對 Zta 蛋白質表現有明顯抑制作用，抑制率約 33%。而且也發現具有抑制 EB 病毒溶裂蛋白質表現的濃度對細胞不會造成毒性。所以，本研究確認獼猴木嫩葉甲醇粗萃物具有抑制病毒進入溶裂循環，阻擋病毒的再活化的效果。此外，本試驗結果也可以確認海巴戟天葉酒精萃取液 (LES) 中具有基因毒性成分可能具有穿越細胞膜的能力，並能直接對 DNA 造成氧化傷害，而抗氧化物質可能不需要穿越細胞膜，即能與細胞膜產生交互作用，間接引發細胞抗氧化防禦機制。由於 LES 屬於混合物，其抗氧化與基因毒性作用機制又不相似，故抗氧化與基因毒性成分應分屬不同物質，故有分劃之必要，才能進一步探討其生物活性與作用機轉。

本研究的成果與原計畫之設定相符，且達預期目標的百分之八十以上。這個研究確認獼猴木嫩葉甲醇粗萃物抗 EB 病毒的能力及海巴戟天葉酒精萃取液 (LES) 的抗氧化與基因毒性，如此將有利於抗病毒及抗氧化試劑的開發。這個研究也達成二位保營系碩士生在藥草純化、抗病毒研究、淋巴球細胞分離及彗星分析法等技術的訓練目標。

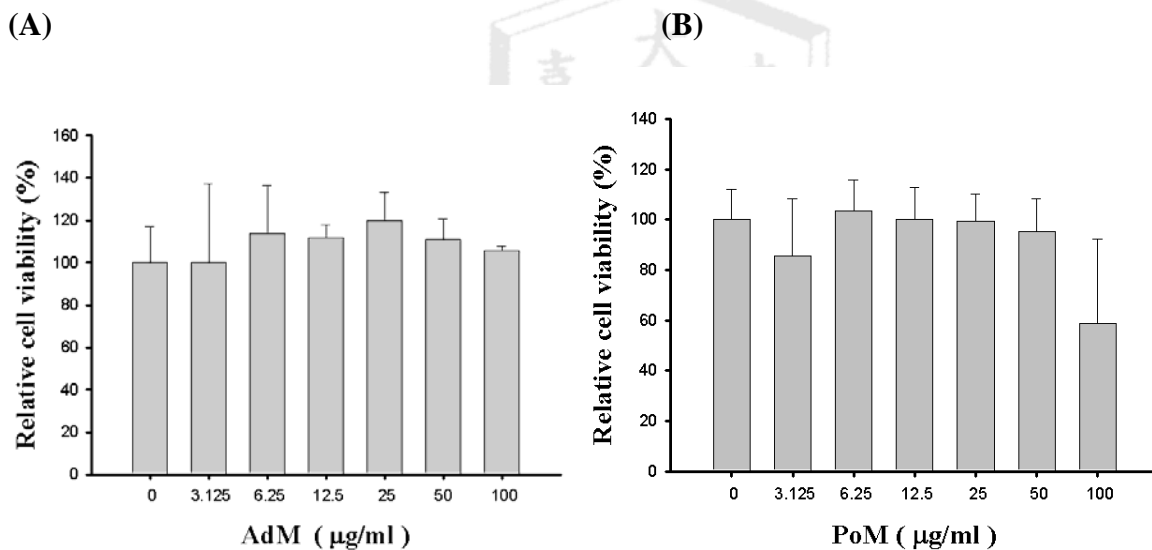
## 六、参考文献

1. Roizman, B.; Carmichael, L. E.; Deinhardt, F.; de-The, G.; Nahmias, A. J.; Plowright, W.; Rapp, F.; Sheldrick, P.; Takahashi, M.; Wolf, K., Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 1981;16:201-17.
2. Niedobitek, G.; Hamilton-Dutoit, S.; Herbst, H.; Finn, T.; Vetner, M.; Pallesen, G.; Stein, H., Identification of Epstein-Barr virus-infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by in situ hybridization. *Hum Pathol* 1989;20:796-9.
3. Magrath, I.; Jain, V.; Bhatia, K., Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. *Semin Cancer Biol* 1992;3:285-95.
4. Jones, J. F.; Shurin, S.; Abramowsky, C.; Tubbs, R. R.; Sciotto, C. G.; Wahl, R.; Sands, J.; Gottman, D.; Katz, B. Z.; Sklar, J., T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988;318:733-41.
5. Weiss, L. M.; Movahed, L. A.; Warnke, R. A.; Sklar, J., Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989;320:502-6.
6. Shibata, D.; Weiss, L. M., Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992;140:769-74.
7. zur Hausen, H.; Schulte-Holthausen, H.; Klein, G.; Henle, W.; Henle, G.; Clifford, P.; Santesson, L., EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970;228:1056-8.
8. Lindahl, T.; Adams, A.; Bjursell, G.; Bornkamm, G. W.; Kaschka-Dierich, C.; Jehn, U., Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* 1976;102:511-30.
9. Miller, G., The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 1990;161:833-44.
10. zur Hausen, H.; O'Neill, F. J.; Freese, U. K.; Hecker, E., Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature* 1978;272:373-5.
11. Luka, J.; Kallin, B.; Klein, G., Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology* 1979;94:228-31.
12. Giot, J. F.; Mikaelian, I.; Buisson, M.; Manet, E.; Joab, I.; Nicolas, J. C.; Sergeant, A., Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. *Nucleic Acids Res* 1991;19:1251-8.
13. Fixman, E. D.; Hayward, G. S.; Hayward, S. D., trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol* 1992;66:5030-9.
14. Feederle, R.; Kost, M.; Baumann, M.; Janz, A.; Drouet, E.; Hammerschmidt, W.; Delecluse, H. J., The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *Embo J* 2000;19:3080-9.

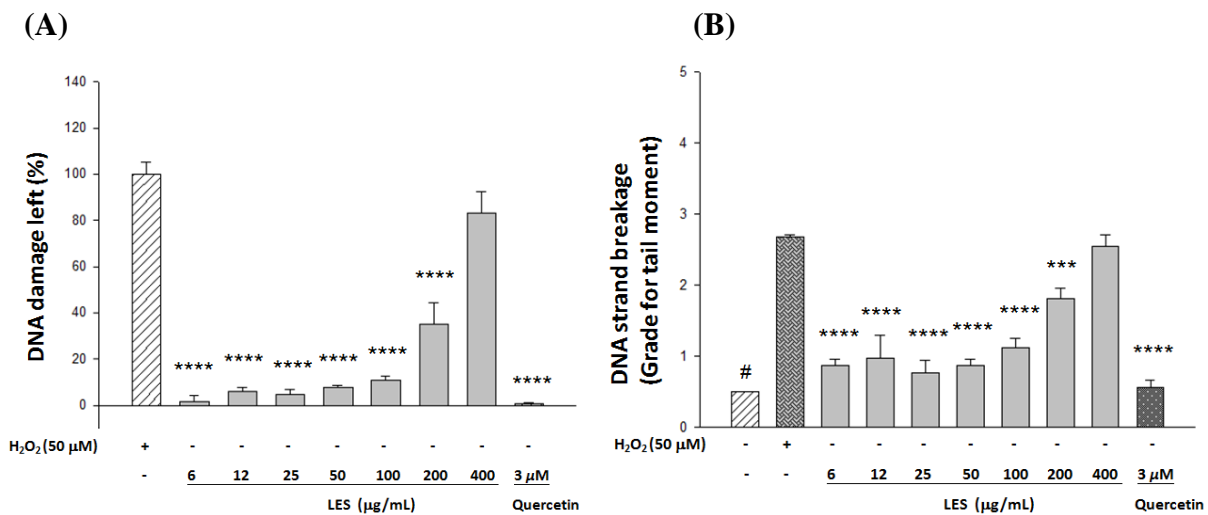
## 七、圖表



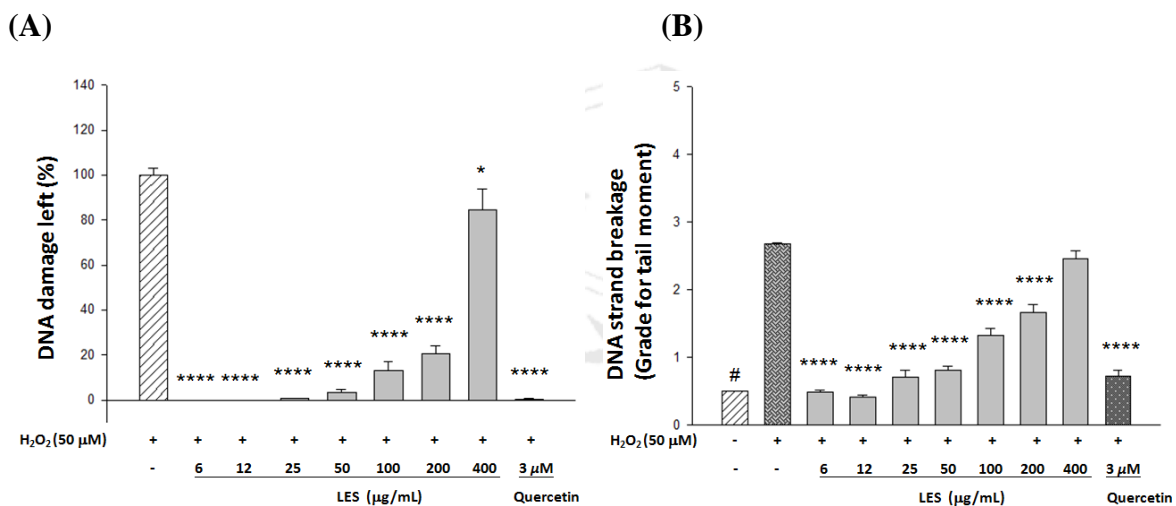
圖一、獼猴木嫩葉及香蓼幼芽甲醇粗萃物抑制 EB 病毒溶裂蛋白質的影響。培養含有 EB 病毒的 P3HR1 細胞 ( $6 \times 10^5$  cell/ml)，經過 24 小時後，添加不同濃度的獼猴木嫩葉(A)及香蓼幼芽甲醇粗萃物(B)，並加入誘導劑 (SB)，促使病毒走向溶裂循環，培養 24 小時後，收集細胞蛋白質。利用西方墨點法偵測 EB 病毒溶裂蛋白質 Rta、Zta、EA-D 的表現。



圖二、獼猴木嫩葉及香蓼幼芽甲醇粗萃物對於 P3HR1 細胞存活率的影響。培養含有 EB 病毒的 P3HR1 細胞 ( $1 \times 10^5$  cell/ml)，經過 24 小時後，添加不同濃度的獼猴木嫩葉及香蓼幼芽甲醇粗萃物培養 24 小時使用 Alamar blue 試驗法，測試不同濃度的樣品對於細胞存活率的影響。

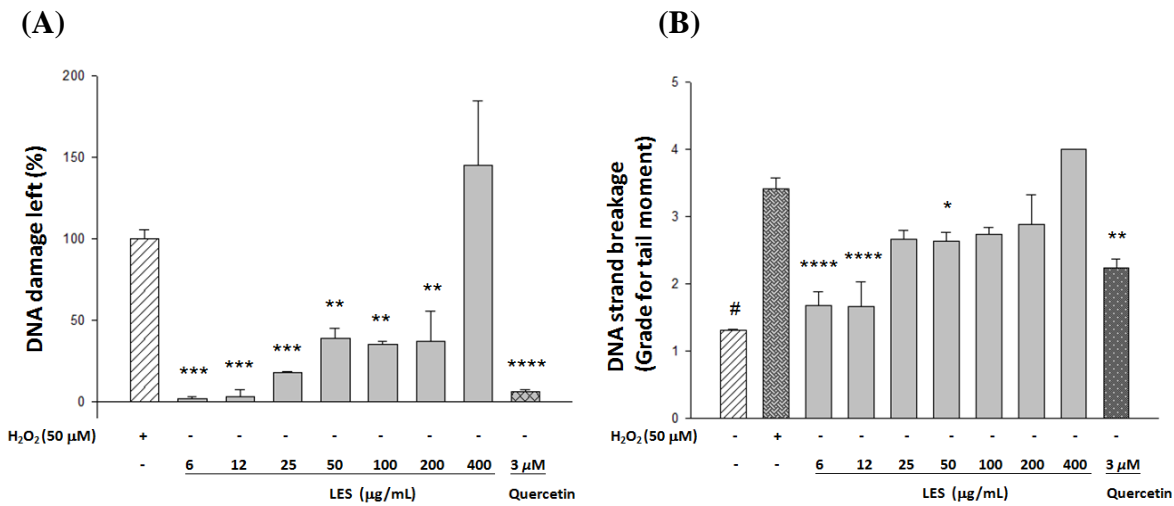


圖三：LES 對人類淋巴球細胞(HLC)之基因毒性 (Standard assay)。(A)：DNA damage left(%)，(B)：Grade for tail moment)。Data were presented as mean±SEM. Means with different letters were significantly different from one another, analyzed by Dunnett's test. #,  $P < 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

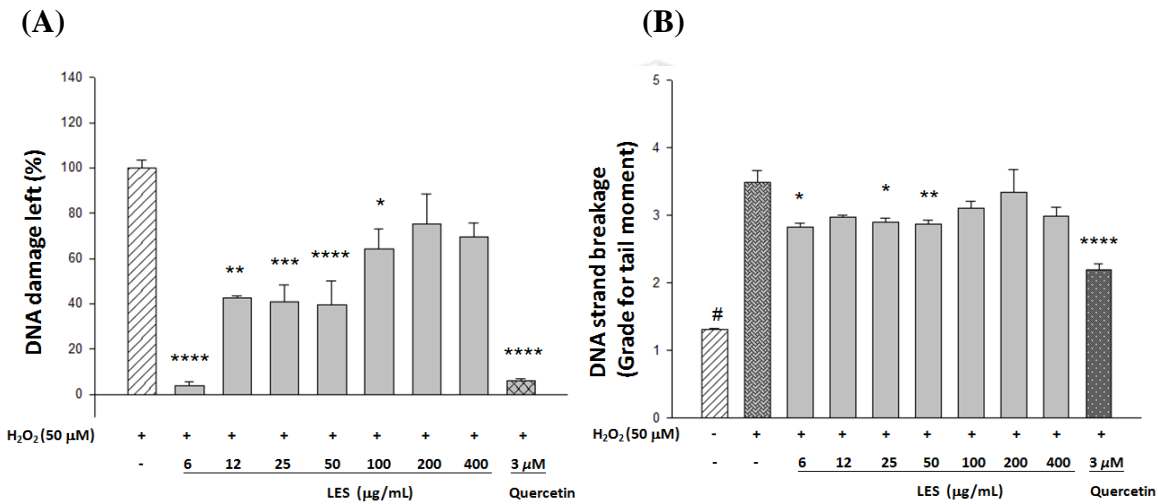


圖四：LES 對人類淋巴球細胞 DNA (HLC-DNA) 遭受氧化傷害之保護效應 (Standard assay) (A)：DNA damage left(%)，(B)：Grade for tail moment) Data were presented as mean±SEM. Means with different letters were significantly different from one another, analyzed by Dunnett's test. #,  $P < 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .





圖五：LES 對 HLC 之基因毒性 (Lysed-cell assay) (A)：DNA damage left(%)，(B)：Grade for tail moment) Data were presented as mean±SEM. Means with different letters were significantly different from one another, analyzed by Dunnett's test. #,  $P < 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ 。



圖六：LES 對 HLC-DNA 遭受氧化傷害之保護效應 (Lysed-cell assay) (A：DNA damage left(%)，B：Grade for tail moment) Data were presented as mean±SEM. Means with different letters were significantly different from one another, analyzed by Dunnett's test. #,  $P < 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .