

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☒ 成果報告
☐ 期中報告

橙皮對肝氧化破壞之抑制性及抗腫瘤活性之研究

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2313-B-041-002-MY3

執行期間：2010 年 8 月 1 日至 2013 年 7 月 31 日

執行機構及系所：嘉南藥理大學食品科技系

計畫主持人：杜平惠

共同主持人：褚錦承

計畫參與人員：陳師瑩

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☐ 精簡報告 ☒ 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

☐ 赴國外出差或研習心得報告

☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告

☒ 出席國際學術會議心得報告

☐ 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☒ 一年 ☐ 二年後可公開查詢

中 華 民 國 103 年 5 月 23 日

目錄

壹、中文摘要	1
貳、英文摘要	1
參、前言	2
肆、研究方法	3
伍、結果與討論	8
陸、引用文獻	13
柒、附錄:已發表研發成果	44

壹、中文摘要

本計畫探討橙皮護肝效應與抗腫瘤活性之研究。橙皮水萃取物(WESP)不僅含多酚類(53.01mg/g)及類黃酮(10.91 mg/g)，且經分離純化得出 hesperidin (HD), hesperetin (HT), nobiletin (NT) 及 tangeretin(TT)。WESP 有效抑制 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞毒性，其作用機轉與其有效抑制 *t*-BHP 所誘發 caspase-3 活性、膜電位之下降、提昇 Bcl-2/Bax 比率、降低 ROS 及脂質氧化物之生成及提昇 GSH 含量有相當密切關係。另外，所含活性成分 HD, HT 及 NT 在胞內各項表現也有關連性。在動物試驗模式上之護肝效應，大鼠預先餵食橙皮水萃取物(WESP)及 HD 連續 28 天，並於第 28 天腹腔注射 CCl₄ (50% CCl₄ +50% olive oil 2mL/kg bw)，隔天犧牲，並進行血清與肝臟生化值之測定與病理切片檢驗。結果顯示，未經 CCl₄ 處理的大鼠，餵食高劑量 WESP (100 mg/kg bw) 28 天，並無顯著肝毒性，而大鼠餵食 10, 100 mg/kg bw WESP 能顯著降低 AST 值，且能減緩因注射 CCl₄ 而 GSH 含量之下降，亦可減緩 SOD 與 GPx 活性之下降，此外，WESP 顯著性地誘發 CYP2E1 活性。此動物模式顯示 WESP 因具有抑制氧化作用，進而產生護肝效應。抗腹腫瘤模式試驗，顯示橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)對人類肝癌細胞 HepG2 具有毒性。由於 EESP 會誘發肝癌細胞之膜電位下降、促進 caspase-3 活性、提昇 Bax/Bcl-2 比率，使得肝癌細胞走向凋亡之趨勢。另由 Annexin V 分析得知，上述凋亡以晚期凋亡為主。再者，EESP 具有誘發 ROS 之生成，此可解釋 EESP 誘發肝癌細胞趨於死亡之可能原因。此外，25 mg/kg bw EESP 可抑制裸鼠腫瘤之體面積，顯示 EESP 具有抑制肝癌

細胞之功能。

綜合上述三年之研究結果，證實橙皮不僅有護肝效應也具有抗腫瘤功效。

關鍵字：橙皮，護肝效應， 抗腫瘤

貳、英文摘要

Study of inhibitory effect of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel on oxidative damage of liver and their antihepatoma activity was investigated. According to HPLC/DAD and HPLC/MS/MS analysis, hesperidin (HD), hesperetin (HT), nobiletin (NT), and tangeretin (TT) were present in water extracts of sweet orange peel (WESP). The cytotoxic effect in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells was inhibited by WESP and their bioactive compounds. These proreductive effects may be associated with positive regulation of GSH levels, antioxidant enzymes, decreased in ROS formation and TBARS generation, increased in the mitochondria membrane potential and Bcl-2/Bax ratio, as well as decreased in caspase-3 activation. Oral administration of WESP to rats at 10 and 100 mg/kg bw for 28 consecutive days before a single dose of CCl₄ (0.5 ml/kg bw) demonstrated a significant protective effect by lowering the levels of AST and ALT, and by improving the histological architecture of the rat liver. WESP attenuated oxidative stress by increasing the content of hepatic glutathione (GSH), which results in a reduction in the levels of TBARS, and by a dramatic increase in the activities of SOD and GPx. WESP induced CYP2E1 activity, which

suggests that WESP may be a substrate of CYP2E1. Ethy acetate extracts of sweet orange peel (EESP) demonstrated marked antiproliferation and cytotoxic activities toward HepG2 cells. The apoptosis induced by EESP was associated with the attenuation of mitochondria membrane potential, induction of caspase-3 activation, and increased in Bax/Bcl-2 ratio. In addition, EESP treatment induced an apoptotic response in HepG2 cells. Moreover, EESP induced ROS generation, which may in part account for apoptosis of HepG2 cells. EESP (25 mg/kg bw) inhibited tumor growth in vivo. Taken together, the results of the project showed sweet orange peel demonstrated not only hepatoprotection but also inhibition of liver cancer growth in vitro and in vivo.

Keywords: sweet orange (*Citrus sinensis*) peel, hepatoprotection, antihepatoma activity

參、前言

依據衛生署所公佈 2012 年台灣地區十大死因排行中，惡性腫瘤仍居首位，而肝癌佔癌症之第二位。換言之，肝病是台灣地區最常見之本土病，也是所謂的「國病」。長久以來，產官學研多方努力，積極尋求有效方法以降低國人肝病之罹患率，其中藉食物或天然物之活性成分以調控生物體之氧化壓力或控制癌細胞之生長與轉移，是近年來研究之重點之一。

橙又名柳橙、甜橙、黃果、金環，在台灣亦稱為柳丁，其學名為 *Citrus sinensis*，是為芸香科。柳橙為柑橘屬最常見的水果之一。對柳橙的利用，主要集中

在果實上，全球每年平均柳橙總產量約為七千三百萬噸，大約有 34% 用於橙汁之製作，其中 44% 的橙皮為其副產物。彼等大部份被當作廢棄物丟棄，惟少部份橙皮被用來榨取精油或作為烘焙產品之裝飾，另也有被應用為中藥材使用。再者，根據前人研究指出，橙皮含豐富不可溶性纖維，其可吸收血糖、阻礙血糖滲透性，達到降低血糖作用 (Chau et al., 2003)，其亦含 limonene 與 linalool 之 terpenoids 及揮發性精油、多量多酚酸 (phenolic acids) 及多酚類 (Tripoli et al., 2007)。換言之，橙皮含有生物活性。再者，由本計畫之預備試驗得知橙皮水粗萃取物回收率高達 39.2%，抗氧化性以乙酸乙酯分劃區分物表現最優；在細胞模系試驗平台，以橙皮水粗萃取物對 HepG2 生存不具影響性，而乙酸乙酯分劃區分物與正己烷分劃區分物最具有毒性，故在對細胞無毒性之前提下，發現橙皮水粗萃取物對 0.1 mM t-BHP 誘發 HepG2 之氧化破壞具有極顯著之保護效應。由上述預備試驗得悉橙皮不僅具氧化壓力防禦功能，且含有抑制肝癌細胞生長之活性成分。基於此，若能以完整之 in vitro 與 in vivo 試驗模系廣續探討橙皮之生物活性，藉此將可彰顯其重要性，且本計畫研究結果亦可提供醫藥界之應用與參考。爰此，本計畫分三年進行。第一年計畫擬以細胞模系為平台，探討橙皮對肝細胞遭受氧化傷害及凋亡之保護效應；第二年計畫乃以第一年研究成果為基礎，並以動物試驗模系廣續探討橙皮對氧化誘導劑誘發鼠肝損傷之保護性；第三年計畫則以細胞與動物試驗模系為平台，探討橙皮之抗肝腫瘤活性。

肆、研究方法

第一年

一、萃取物之製備

1. 橙皮取自麻豆農會，經 50°C 熱風乾燥後，以磨碎機研磨成粉末，以 1:10 加水煮沸 40 分鐘，過濾後，濾液再以 1:10 水煮沸 40 分鐘，二次之濾液進行減壓濃縮乾燥，加水後為橙皮水粗萃取物(WESP)。

2. 橙皮分劃區分物之製備

取 500 ml WESP 於分液漏斗，分別以 500 ml 正己烷、乙酸乙酯、正丁醇分劃層析，最終留存為水分劃區分。將上述其他各分劃區分物命名為正己烷分劃區分物(HESP)、乙酸乙酯分劃區分物(EESP)、正丁醇分劃區分物(BESP)，各分劃區分物液進行減壓濃縮乾燥，稱重後儲存於 4°C 下以備用。

二、成份分析

橙皮成份分析參考 Chen 等(2012)方法。

三、細胞實驗

1. 細胞存活試驗

本實驗所用人類肝癌細胞株 HepG2 cells (BCRC60025)購自新竹食品工業發展研究所。細胞存活試驗以MTT法測試，將HepG2 cells 以 10×10^4 /ml 接種於24 孔盤，於培養箱中培養24小時後，移除舊的培養基，再加入0.5 ml含不同濃度樣品之培養基，置入培養箱37°C，5 % CO₂下預反應30分鐘後，待反應時間終了後，加入50 µl 0.1% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 於培養箱中反應30~40 分鐘，去除上清液，加入 120µl DMSO，以 ELISA reader (Molecular Devices, VMax) 測定550 nm 下之吸光值。

2. 胞內活性氧 (ROS) 分析

將HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於6 孔盤，於培養箱中培養24 小時後，移除舊的培養基，再加入1 ml 含不同濃度之樣品之培養基，置入培養箱37°C，5 % CO₂ 下預反應30分鐘後，再加入50µM 之

2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 反應15分鐘，再加入*t*-BHP 0.2 mM 反應3小時，待反應時間終了，移除培養基，以PBS 緩衝液清洗細胞2 次後，加入100 µl Trypsin-EDTA 作用2~3 分鐘，加入 400 µl PBS 緩衝液中中和 Trypsin-EDTA 反應，切除細胞，再將液體裝至離心管內以1000rpm，5 分鐘離心，去除上層液，加入100 µL PBS 緩衝液，將細胞打散後，移至96 孔黑盤中，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength: 485 nm, Em wavelength:530 nm)。

3. 粒腺體膜電位變化之分析

粒腺體膜電位是使用Cayman之JC-1 Mitochondrial Membrane Potential AssayKit進行分析。將HepG2 cells 以 10×10^4 /mL 接種於12孔盤，於培養箱中培養24小時後，移除舊的培養基，再加入1 ml 含不同濃度樣品之培養基，置入培養箱37°C，5 % CO₂ 下預反應30分鐘後，再加入*t*-BHP 0.2 mM 反應2 小時，待反應時間終了後，加入10 µl JC-1 kit 混合均勻後，置入培養箱37°C，5 % CO₂ 下反應30分鐘後，將培養基移除，以PBS 緩衝液清洗細胞2次後，加入100 µl Trypsin-EDTA 作用2~3 分鐘，加入400µl PBS緩衝液中中和 Trypsin-EDTA 反應，切除細胞，再將液體裝至離心管內以1000 rpm，5 分鐘離心，去除上層液接著加入100µl 之Assay buffer 將細胞打散後，移至 96 孔黑盤中，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進

行螢光強度分析 (Ex wavelength : 530 nm , Em wavelength : 590 nm) 。

4.細胞中脂質過氧化之分析

將HepG2 cells以 20×10^4 /ml接種於6孔盤，於培養箱中培養24小時後，移除舊的培養基，再加入1mL含不同濃度之樣品於培養皿，置入培養箱37℃，5% CO₂ 下預反應30分鐘後，再加入t-BHP 0.2 mM反應2小時，待反應時間終了後，移除培養基以PBS 清洗細胞除去未貼附之細胞，加入0.5 ml Homogene buffer (1.5% KCl, 1mM EDTA, 10 mM KH₂PO₄, pH7.4)，將細胞刮下後收集，此細胞懸浮液經超音波破碎機進行均質，再以10000 rpm 離心10分鐘，上清液即為細胞均質液。取200μl 細胞均質液加入200μl 10 % TCA，以3500 rpm 離心10分鐘，取上清液200 μl， 再加入200 μl 0.4 % TBA (溶於0.2 N HCl)，水浴50℃，加熱1小時，加入400 μl Isobutanol 混勻後，以3500 rpm 離心10分鐘，取200μl 上層反應物至96孔黑盤，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength : 485 nm , Em wavelength: 530 nm) 。

5. 西方墨點法

a. 蛋白質液之製備

樣品經不同濃度處理之 HepG2 cells 200×10^4 /ml (10 cm dish)，去除培養基後，以PBS 清洗2次，將細胞刮下，加1 ml LPBS 以5000 rpm，10分鐘離心，去除上層液後，加入100 μl lysis buffer (RIPA buffer) 混合均勻，於冰上反應30分鐘，再以4℃離心10000 rpm 10分鐘，取得細胞均質液並定量蛋白質濃度。接著將細胞均質液加入2倍loading buffer以95℃ 反應10分鐘後，

冰浴5分鐘，再以4℃離心10000 rpm 10分鐘，冰浴備用。

b. 電泳分析

利用 SDS-PAGE 將蛋白質依分子量的不同分離。配製discontinuous acrylamide gel，gel 分為上下兩層，下層為separating gel，其acrylamide 的百分比視所分析的蛋白質分子而定，上層則為stacking gel，含4 % acrylamide。將凝膠完成的膠片置於電泳槽中，加入電泳緩衝液(Running buffer : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS)。將標準分子量的marker 以及各樣品依序注入膠體的孔槽中，以電壓70 voltage，待樣品通過stacking gel 後將電壓調整為140 voltage，視需要調整電泳時間。

c. 西方轉漬法

將NC membrane浸泡於transfer buffer，接著將濾紙與membrane 浸泡在transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.00375 % SDS, 20 % methanol)。剪裁下所要轉漬的電泳膠片，同樣浸泡於transfer buffer。採用Bio-RAD MiniProtean 濕式轉漬設備，以400 mA 進行1.5小時後取出membrane 並浸泡於5 % skim milk (溶於PBST (PBS中含有0.1 % Tween-20) 中)，置於4℃下反應overnight，隔天以PBST 震盪清洗30分鐘(每10分鐘更換一次)，便可加入一級抗體(1% BSA/PBST 稀釋配置)，於室溫下震盪反應1小時，接著以PBST 震盪清洗30分鐘(每10分鐘更換一次)，接著加入二級抗體(溶於PBST中)，於室溫下震盪反應1小時後，再以PBST 震盪清洗30分鐘(每10分鐘更換一次)，接著在暗房中進行enhanced chemi-luminescence 顯影反應，再用Kodak X-OMAT Blue Autoradiography Film 顯影壓片。

6. Caspase 3 活性測定

將 HepG2 cells 以 10×10^4 /ml接種於24 孔盤，培養24小時後，移除舊的培養基，再加入0.5 mL 含不同濃度之樣品於培養基，置入培養箱 37 °C，5% CO₂ 下預反應30分鐘後，再加入t-BHP 0.2 mM 反應3小時，反應終了，移除300 µl之培養基後將細胞刮下，使細胞呈現懸浮狀態並加入25µL Caspase-Glo® 3/7kit，混合均勻後，置入培養箱 37 °C，5% CO₂ 下反應1小時後，取100 µl至96孔白盤，以螢光冷光儀（BioTekFLx-800）偵測定冷光強度，以換算Caspase 3 的活性。

7. 胞內GSH 測定

將HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於6 孔盤，於培養箱中培養24小時後，移除舊的培養基，再加入1 ml 含不同濃度之樣品之培養基，置入培養箱37°C，5% CO₂ 下預反應30分鐘後，再加入t-BHP 0.2mM反應2小時，待反應時間終了後，移除培養基，再加入CMF-DA 5 µM（溶於PBS 緩衝液），置入培養箱37°C，5 %CO₂ 下反應30分鐘後，將PBS 緩衝液移除，以PBS 緩衝液清洗細胞2 次後，加入100 µl Trypsin-EDTA作用2~3分鐘，加入400µl PBS緩衝液中和

Trypsin-EDTA 反應，切除細胞，再將液體裝至離心管內以1000 rpm，5分鐘離心，去除上層液，接著加入100 µl之PBS 緩衝液 將細胞打散後，移至96孔黑盤中，以螢光冷光儀（BioTek FLx-800）進行螢光強度分析Ex wavelength : 485 nm，Em wavelength : 530 nm）(Hu et al., 1988)。

第二年

動物試驗模式系統

一、萃取物之製備

萃取物之製備同前。

二、成份分析

橙皮成份分析參考 Chen 等(2013)方法。

三、飼養條件

雄性Wistar 品系大鼠體重為126-150g，購自樂斯科生物科技公司。飼養於本校之動物房，飼養環境條件設定為：溫度 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 、濕度 $65 \pm 5\%$ ，光照及黑暗循環時間為各12小時。實驗飼養期間飲食與水皆採自由進食。動物飼料為Lab Diet 5001 標準飼料。

四、實驗設計

將大鼠分為8組(10隻/組)，連續餵食樣品28天，於第28天在腹腔注射50% CCl₄ (2 ml/kg)，隨後禁食18小時，隔日以CO₂處理並犧牲、採血。由腹腔靜脈取得血液經離心(3000rpm,10分鐘)，取得上層液血清。再將取出的臟器（肝、腎），以鋁箔紙包裹，取一部分肝臟與腎臟浸泡在10% 福馬林溶液中，其餘部分置於乾冰中使其冷凍，再移入-20°C 冷凍庫中儲存。

分組方式：

1. 正常組：control + olive oil
2. 負對照組：50% CCl₄ (2 ml/ kg bw)
3. 正對照組：silymarin (0.2 g/ kg bw) + 50%CCl₄ (2 ml/ kgbw)
- 4.HD 0.1 mg/kg+50%CCl₄ (2 ml/ kg bw)
- 5.WESP低劑量：1 mg/kgbw + 50%CCl₄ (2ml/ kg bw)
- 6.WESP中劑量：10 mg/kgbw + 50%CCl₄ (2ml/ kg bw)
- 7.WESP高劑量：100 mg/kgbw + 50%CCl₄ (2 ml/ kg bw)

8.WESP高劑量：100 mg/kgbw + olive oil

五、血清與生化指標測定項目

血清GOT、GPT、BUN、CRE、及肝臟GSH、SOD、CAT、GPx委由坊間檢驗所測定。

六、肝臟中TBARS測定

1. WESP均質液之製備

取肝組織0.5 g加入5 ml Homogene buffer (1.5 % KCl, 1 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 , pH 7.4), 以均質機均質化, 再以10000 rpm離心10分鐘, 上清液即為肝臟均質液。

丙二醛(malondialdehyde, MDA)為脂質過氧化所產生的二級產物, 當胞內脂質成份受到氧化劑氧化時, 會造成脂質氧化生成MDA。此時測定MDA生成量可反映出胞內氧化程度。分別加入樣品先於37°C下反應30分鐘後, 加入BHA(最終濃度為1 mM), 取出上述反應液與TCA和TBA混合, 再將此混合液在沸水中反應10 min, 使用分光光度計檢測532 nm的吸光值。吸光值愈高表示氧化傷害愈嚴重。

七、病理切片觀察

委由屏科大獸醫系分析。簡述如下：將大鼠予以犧牲, 頸動脈採血後, 取肝臟, 在最大右葉的同一位置割取1公見方的肝組織, 放入10%的中性福馬林中, 做進一節的觀察染色, 其餘五葉肝臟則置於-80°C的冷凍櫃中冷凍, 以便檢測抗氧化酵素的活性。為了觀察慢性肝損傷時, 肝細胞的受損、脂肪變性、壞死、纖維化等變化, 因此除了將肝組織做Hematoxylin & Eosin stain之外, 還做網狀纖維及膠原纖維的特殊染色(Reticulin silver stain & Masson stain), 以便評估肝纖維化程度。

第三年

一、橙皮乙酸乙酯萃取物之製備

橙皮乾經熱風乾燥後, 其粉末以1:5之比例加入乙酸乙酯靜置24小時後, 經過濾, 再將濾液以1:5乙酸乙酯靜置24小時, 再取濾液以1:5乙酸乙酯靜置24小時, 取三次濾液進行減壓濃縮, 冷凍乾燥後所得之固形物秤重, 計算樣品之萃取率。所得萃取物即為橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP), 並置於冷凍庫備用。

二、成份分析

以HPLC-MS/MS分析EESP成份分析所用方法同前。

三、細胞實驗

1. 細胞存活試驗

所用方法同前。

2. 細胞滲漏率之測定 (LDH)

LDH細胞滲漏率為評估細胞毒性之指標, 為針對死亡細胞進行測定之方法, 細胞毒性(%)使用Promega之CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay來分析。將HepG2 cells以 10×10^4 /ml接種於24 well plate, 培養24小時後, 移除舊的培養基, 再加入0.5 ml含不同濃度之EESP (50, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及HD (10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之培養基, 置入培養箱37°C, 5% CO_2 下反應36小時, 待反應時間終了, 取出50 μl 胞外細胞培養液(extracellular fluid)至96 well plate加入50 μl 反應試劑於室溫下暗反應30分鐘後, 加入50 μl 終止試劑, 以ELISA reader讀取490 nm的吸光值。最後以Cytotoxicity(%)表示。計算公式如下：

$\text{Cytotoxicity}(\%) = \frac{\text{實驗組}}{\text{細胞全死LDH}}$

3. 胞內活性氧 (ROS) 分析

所用方法同前。

4. 粒腺體膜電位變化之分析

所用方法同前。

5. 西方墨點法

所用方法同前。

6. Caspase-3 活性測定

所用方法同前。

7. 細胞週期分析

將 HepG2 cells 以 50×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入 1 ml 含不同濃度之 EESP (50, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$) 及 HD (10, 100 $\mu\text{g/ml}$) 之培養基，置入培養箱 37°C ，5% CO_2 下預反應 36 小時，待反應時間終了後，移除培養基，以 PBS 清洗 2 次後，加入 100 μl Trypsin-EDTA 作用 2~3 分鐘，加入 400 μl PBS 緩衝液中和 Trypsin-EDTA 反應，切除細胞，再將液體裝至離心管內以 1000 rpm，5 分鐘離心，去除上層液，加入 300 μl PBS 後，並以 700 μl 4°C 下之 95 % 酒精，以一邊震盪一邊緩慢加入之方式，使細胞均勻混合並且產生孔隙，於 -20°C 中放置隔天，以利 PI 染劑進行染色。隔天，以 4°C ，1500 rpm 離心 5 分鐘去除酒精，加入 800 μl PBS 並於其中加入 100 μl 之 200 $\mu\text{g/ml}$ RNase A，混合均勻，在 37°C 下反應 2 小時後，加入 100 μl 之 1mg/ml propidium iodide (PI)，混勻，暗處反應 5~10 分鐘，最後以流式細胞儀分析。

8. Annexin V 分析

將 HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入 1 ml 含不同濃度之 EESP (50, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$) 及 HD (10, 100

$\mu\text{g/ml}$) 之培養基，置入培養箱 37°C ，5% CO_2 下預反應 36 小時，待反應時間終了後，移除培養基，以 PBS 清洗 2 次後，加入 100 μl Trypsin-EDTA 作用 2~3 分鐘，加入 400 μl PBS 緩衝液中和 Trypsin-EDTA 反應，切除細胞，再將液體裝至離心管內以 1000 rpm，5 分鐘離心，去除上層液，加入 500 μl Annexin-V binding buffer 震盪混合均勻，分別加入 5 μl Annexin-V-FITC 和 PI 的染劑，混勻，暗處反應 5~10 分鐘，最後以流式細胞儀進行分析。

9. DAPI 染色分析

將 HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入含不同濃度樣品之培養基，置入培養箱 37°C ，5% CO_2 下處理 24 小時，待反應時間終了後，去除培養液，細胞以 PBS 清洗兩次，之後加入 100 μl Trypsin-EDTA 作用 2~3 分鐘，加入 400 μl PBS 緩衝液中和 Trypsin-EDTA 反應，切除細胞，再將液體裝至離心管內以 1000 rpm，5 分鐘離心，除去上清液，接著以 500 μl PBS 將細胞打散。蓋玻片表面先以 100 μl poly-L-lysine 處理 1 分鐘，使蓋玻片帶有正電，取打散後的細胞 100 μl 平鋪於蓋玻片上，靜置 10 分鐘使細胞貼附於蓋玻片，緩緩加入 1 ml 4% paraformaldehyde，溶液固定細胞，靜置 30 分鐘後，吸出 paraformaldehyde 再以 PBS 重覆清洗 3 次，移除未附著的細胞。加入 1 ml 0.5% Triton X-100，靜置 10 分鐘使細胞膜破裂，以 PBS 重覆清洗 3 次，加入 1ml 1% BSA 靜置 30 分鐘。取 5 μl DAPI 染劑於載玻片上，再將含有細胞的蓋玻片掉蓋在含有 DAPI 染劑的載玻片上，螢光顯微鏡 400 倍觀察細胞的型態，將影像轉到電腦

上作為結果。

10.抑制腫瘤 in vivo 試驗

(1) 腫瘤細胞處理

將長滿瓶壁的 HepG2 肝癌細胞之瓶內培養基移除，以 PBS 緩衝液洗滌細胞 2 次，加入濃度為 0.1% Trypsin-EDTA 作用 2~3 分鐘，加入兩倍體積含 FBS 之 MEM medium 中和 Trypsin-EDTA 反應後，切除細胞，再將所有液體裝至離心管內進行離心，於 1,200 rpm 離心 5 min，棄上清液，加入 3 ml 不含胎牛血清的 MEM (minimal essential medium) 培養基，吸管吹打混勻 (取適量計數細胞)，再離心，棄上清液。準備好的 HepG2 肝癌細胞懸浮液經 Trypan blue 染色，確認活細胞數占 95% 以上，依據每隻裸鼠皮下接種 0.2 ml HepG2 肝癌細胞懸浮液，再加入 PBS 定量 (2.5×10^7 cells/ 0.2 ml PBS /mice)，並以 1:1 體積比混入預冷 Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA)，隨後注射於消毒後的裸鼠頸背後方皮下(s. c.)，每隔兩天觀察腫瘤移植成長狀況。

(2) 實驗動物分組

由國科會國家動物中心購進 3 週齡，體重 16~18 g 之雄性裸鼠 (BALB/c-nu/nu, male nude mice) 40 隻，飼養於永康奇美教學中心研究部動物房，經 1 週的適應飼養，隨機分成 5 組，每組 8 隻，除控制組 (管餵 0.1 ml 溶劑 甲基纖維素鈉 (sodium methylcellulose, MC)) 未進行腫瘤移植外 (C)，其餘各組皆進行腫瘤移植，隔天即進行管餵溶解於 MC 之橙皮乙酸乙酯萃取物，對照組 (N)、低劑量組 (L)、中劑量組 (M)、高劑量組 (H) 分別管餵 0, 25, 200, 500 mg /kg bw，各組均採隔天管餵一次至實驗結束。所有動物實驗均遵循動物實驗

管理規定操作，飼養條件為溫度 $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ，相對濕度 $55 \pm 5\%$ ，12 小時晝夜循環 (光照時間為 AM 8:00 ~ PM 20:00)，在實驗期間，裸鼠自由攝取水和飼料，每兩天添加飼料並記錄小鼠體重。

(3) 腫瘤體積計算方法

每二天用遊標尺測量皮下移植腫瘤大小，按通用公式 $[V(\text{mm}^3) = L(\text{長徑}) \times W(\text{短徑}) \times 0.5]$ 計算腫瘤體積 (V)。

(4) 以 SPSS 12.0 統計軟體進行 One-way ANOVA 變異數分析，並以 Dunnett's tests 做顯著性差異比較 ($P < 0.05$)。

伍、結果與討論

第一年

以細胞模系探討橙皮水粗萃取物之保護肝臟效應

一、成份分析

本計畫以四種溶劑作區分，分別以水作初步萃取，所得萃取物稱為水粗萃物 (water extracts of sweet orange peel, WESP)，其次依序以正己烷、乙酸乙酯及正丁醇等溶劑作萃取，所得萃取物區分，分別稱之為正己烷分劃區分物 (hexane extracts of sweet orange peel, HESP)、乙酸乙酯分劃區分物 (ethyl acetate extracts of sweet orange peel, EESP)、正丁醇分劃區分物 (butanol extracts of sweet orange peel, BESP)。其回收率分別為 39.2%、0.23%、0.45 及 3.2%，顯示 WESP 之回收率最高。再者，針對四種分劃區分物探討其對 HepG2 生存性之影響。圖一為各區分物對 HepG2 細胞之生存性之影響，顯示 WESP 在不同濃度對 HepG2 之生存性無作用性，而各區分物皆顯示具有毒性。基於

此，以下試驗乃以 WESP 為試驗對象，探討其對 *t*-BHP 誘發細胞氧化壓力之保護效應。

圖二為 WESP 經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析，由結果顯示共純化出 hesperidin (HD)、hesperetin (HT)、nobiletin (NT) 與 tangeretin (TT)，其含量分別為 30.89、0.97、0.44 與 0.32 mg/g。表一為 WESP 成份分析之光譜數據。由此可得知，HD 含量最高 NT 與 TT 近似，其次為 HT。爰此，本試驗以 HD、HT 與 NT 作為測試物質。

二、對細胞生長之影響

圖三為 WESP、HD、HT、NT 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 生長傷害之影響。結果顯示不同濃度之 WESP 及 10 µg/ml 各純化物質可有效抑制 *t*-BHP 對 HepG2 生長傷害性。

圖四為 WESP、HD、HT、NT 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 之毒性反應之影響，結果顯示不同濃度之 WESP 與 10 µg/ml 之 HD、HT 均能顯著性抑制 *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞之毒性反應，惟 NT 則無顯著性之表現。

三、對氧化壓力之影響

圖五為 WESP、HD、HT 與 NT 對 0.2mM *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞 ROS 產生之影響。結果顯示 0.2 mM *t*-BHP 單獨處理 4 小時可使細胞內 ROS 產生至少為控制組之 3.4 倍，若以 50、200 與 500 µg/ml WESP 處理，則其 ROS 為控制組 2.5、1.42、1.42 倍，而 10 µg/ml HD、HT 與 NT 為 1.89、1.68 與 2.32 倍，很明顯與單獨處理 *t*-BHP 之傷害組比較，皆具有清除胞內 ROS 之

能力。

圖六 WESP、HD、HT 與 NT 對 0.2mM *t*-BHP 作用 2 小時誘發胞內脂質過氧化物產生之影響。結果顯示單獨處理 0.2 mM *t*-BHP 會使 HepG2 之 TBARS 量急遽上升，惟不同濃度之 WESP 及 10 µg/ml HD、HT 與 NT 皆顯著性抑制 TBARS 之生成量，此結果顯示 WESP、HD、HT 與 NT 能降低 *t*-BHP 誘發細胞脂質之氧化作用。

圖七為 WESP、HD、HT 與 NT 對 0.2mM *t*-BHP 誘發胞內 GSH 含量之影響。0.2 mM *t*-BHP 單獨作用 2 小時，HepG2 胞內之 GSH 含量減少為 55.92%，若同時處理不同濃度之 WESP，則 GSH 含量將顯著性增加且呈濃度之關係，而 HT 也顯著性增加 GSH 含量，惟 HD 與 NT 則不具增加 GSH 含量之現象。

四、對細胞凋亡之影響

圖八以西方墨點法分析細胞內 Bcl-2 與 Bax 之表現情形，並以 Bcl-2/Bax 之比率作為指標。由結果顯示 0.2 mM *t*-BHP 單獨作用 2 小時，其 Bcl-2/Bax 之比率由控制之 1.0 降為 0.68，而不同濃度之 WESP 及 HD 與 HT 明顯皆顯著性的升高，顯示待測物能減緩 *t*-BHP 所誘發的細胞凋亡現象。

圖九顯示不同劑量 WESP 及 HD、HT 與 NT 對 *t*-BHP 誘發胞內膜電位之影響。由結果顯示單獨處理 0.2 mM *t*-BHP 2 小時，HepG2 之膜電位劇降 52.07%，而上述待測物均能顯著性增加膜電位。此結果顯示 WESP 及所含之 HD、HT 與 NT 能有效防止 *t*-BHP 誘發細胞膜電位之下降現象。

圖十為 WESP、HD、HT 及 NT 對 *t*-BHP 誘發 HepG2 胞內 caspase-3 活性之影響。0.2 mM *t*-BHP 可使胞內之 caspase-3 活性增為控制組之 2.35 倍。若同時個別處理 50、200、500 µg/ml 之 WESP 及 10 µg/ml HD、HT，則 caspase-3 活性將減少至控制組之 1.05、0.8、1.05、1.53 及 1.55 倍，顯示上述待測物對 *t*-BHP 誘發 caspase-3 活性有減緩作用，惟 NT 則不具減緩性。

第二年

動物試驗模系探討橙皮水粗萃取物之護肝效應

一、成份分析

雖然第一年研究已分析其成分，惟不同時期之待測物可能因貯存及其他因素而影響其活性成分之質與量，因此於第二年 *in vivo* 試驗前，有必要再以 HPLC 與 LC/MS 分析其成分。圖十一顯示第二年之 WESP 之成分分析。表二與表三分別為 WESP 之光譜數據與成份鑑定。由於 HD 之含量最高，再者 silymarin 為公認的治療肝臟的藥物，因此以下之試驗以 HD 與 silymarin 正對照組。

二、WESP 對 CCl₄ 誘發大鼠 DNA strand breakage 的影響

圖十二為 WESP 對 CCl₄ 誘發大鼠 DNA strand breakage 的影響，結果顯示 100 mg/kg bw WESP 與對空白組無顯著差異，表示高劑量 WESP 對淋巴球 DNA 不具 strand breakage，而 50% CCl₄ 具有顯著性影響，惟不同濃度 WESP 具有保護性，而 HD 不具保護作用。

二、WESP 對 CCl₄ 誘發大鼠體重與肝、腎臟器重量之影響

表四為預先餵食 WESP (1、10、100 mg/kg bw) 與 hesperidin (HP, 0.1 mg/kg bw) 大鼠連續 28 天，並於第 28 天腹腔注射 CCl₄ (50% CCl₄ +50% olive oil, 2mL/kg bw)，其誘發大鼠體重與肝、腎器官重量之影響。由結果顯示各組樣品餵食 28 天後，其大鼠體重皆無顯著性差異 ($p>0.05$)。另在肝、腎相對重量比較，腹腔注射 CCl₄ 的大鼠其肝相對重量則比空白組、Silymarin (200 mg/kg bw) 組、HP 組、WESP (10 mg/kg bw) 與不加 CCl₄ 的 100 mg/kg bw WESP 組要高 ($p<0.05$)；對腎相對重量而言，則顯示單獨腹腔注射 CCl₄ 的大鼠，其腎相對重量比其他組要高 ($p<0.05$)。

四、WESP 對 CCl₄ 誘發大鼠肝損傷之血清生化值的影響

表五為 WESP 及 HD 對預先餵食大鼠 28 天後，於第 28 天腹腔注射 CCl₄ 誘發大鼠肝損傷之血清生化值及抗氧化酵素活性、GSH 與對 TBARS 的影響。大鼠在第 28 天注射 CCl₄ 會明顯增加血清中肝損傷指標的 AST 與 ALT ($p<0.05$)，而 Silymarin、10 與 100 mg/kg bw 的 WESP 可降低血清中之 AST ($p<0.05$)，而 HP 則與單獨注射 CCl₄ 無顯著性差異 ($p>0.05$)。另外，由表五中亦可看出未注射 CCl₄ 的 100 mg/kg bw WESP 其 AST 與 ALT 值很接近空白值，顯示，WESP 對肝臟無毒性損傷之影響，此結果與圖十二顯示未注射 CCl₄ 的 100 mg/kg bw WESP 對大鼠血液淋巴球細胞無基因毒性現象是一致。在 ALT 數值上，只有預先餵食 10 mg/kg bw WESP、空白組與單獨注射 CCl₄ 有顯著性差異 ($p<0.05$)，其餘各組皆不具顯著性差異 ($p>0.05$)。由表五亦可看出在 BUN 值，只有空白組與未注射 CCl₄ 的 100 mg/kg bw WESP 與單獨注射 CCl₄ 組有顯著差異

($p < 0.05$)，其餘皆無差異性($p > 0.005$)。

另外，WESP 及 HD 對 CCl_4 誘發大鼠抗氧化酵素活性、GSH 及對 TBARS 含量之影響。由表五結果顯示腹腔注射 CCl_4 會顯著性地降低 GSH 含量，惟 Silymarin 與 10、100 mg/kg bw 之 WESP 可減緩 GSH 含量之下降。再者，單獨注射 CCl_4 之大鼠，其 SOD 與 GPx 會明顯下降，而 Silymarin、10、100 mg/kg bw 之 WESP 能減緩彼等酵素活性之下降。另 HD 以外的各組與單獨注射 CCl_4 在 CAT 酵素活性無顯著差異 ($p > 0.05$)。對脂質氧化程度而言不同濃度 WESP 及 HD 皆可降低肝臟之脂質氧化。

五、對 CCl_4 誘發大鼠 CYP2E1 之影響

圖十三為 WESP 對 CCl_4 誘發大鼠 CYP2E1 之影響，由結果顯示 100 mg/kg bw 之 WESP 會誘發大鼠 CYP2E1，此可能原因為 WESP 可作為 CYP2E1 之基質並誘發 CYP2E1；而 WESP 對 CCl_4 誘發大鼠 CYP2E1 具有促進作用。由此顯示 WESP 在此模式有促氧化性，惟 WESP 在抗氧化酵素活性、GSH 及對 TBARS 之影響，推測 WESP 之抗氧化性大於誘發 CYP2E1 活性，以至於整體而言 WESP 對 CCl_4 誘發鼠肝具有保護作用。

六、WESP 對 CCl_4 誘發大鼠肝損傷之病理檢驗

圖十四為 WESP 對 CCl_4 誘發大鼠肝損傷之病理切片圖。很顯然，100 mg/kg bw 之 WESP 組之肝臟組織圖與空白組很近似 (圖十四 h)，而 CCl_4 處理的肝臟組織圖則有顯著的改變 (圖十四 b)；添加 10 與 100 mg/kg bw 之 WESP 則顯得改變較少 (圖十四 e 與 f)。此結果與生化值測試結果不謀而合。

第三年

以 in vitro 與 in vivo 模系探討橙皮抗肝腫瘤活性

一、成份分析

前二年之待測物是以水作為萃取溶劑，並分析其活性成分，而第三年之研究中乃測定橙皮之抗腫瘤活性之 in vitro 與 in vivo 試驗，故有必要預先偵測何種溶劑之萃取物對肝癌細胞具有毒殺性。由圖十五結果顯示橙皮乙酸乙酯萃取物 (EESP)、正丁醇萃取物 (BESP) 與正己烷萃取物 (HESP) 抑制 Hep G2 生存性效果最佳，惟前者之萃取回收率較高，因此以下試驗乃以 EESP 作為試驗樣品。圖十六以 HPLC 與 LC/MS 分析其成分，表六為 EESP 光譜數據，顯示 HD 之含量最高，故以下試驗以 HD 作為對待測物，藉此與 EESP 做比較。

二、對肝癌細胞生長與毒性之影響

圖十七為 EESP 與活性成分 HD 對 HepG2 細胞生存性之影響。結果顯示 50-500 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之 EESP 對 HepG2 生存性有抑制作用，而 10，100 $\mu\text{g/ml}$ 之 HD 亦具有抑制 HepG2 生存性。此結果顯示 EESP 對肝癌細胞 Hep G2 之生存性有顯著之抑制現象。

為了彰顯 EESP 是否對 Hep G2 細胞具有毒性，本研究以 LDH 模系測定其毒性作用。圖十八為不同濃度之 EESP 與 Hep G2 細胞作用 36 小時之毒性現象。結果顯示 50-500 $\mu\text{g/ml}$ 之 EESP 對 LDH 滲出胞外之比例顯著高於空白組，而 10 與 100 $\mu\text{g/ml}$ 之 HD 亦具有類似情況。顯示 EESP 及其活性成分 HD 具有毒殺肝癌細胞 HepG2 之能力。

三、與 ROS 生成之影響

為了探討 EESP 對 HepG2 之生存性與毒殺性是否與其誘發氧化壓力所致，本研究探討 EESP 及其活性成分與 HepG2 細胞培養 3 小時對其 ROS 之產生。由圖十九顯示不同濃度之 EESP 具有誘發 HepG2 細胞內氧化壓力之生成。另 HD 則具有抗氧化現象。雖然 50 與 200 $\mu\text{g/ml}$ EESP 之誘發 ROS 生成與對照組不具顯著差異($P>0.05$)，惟乃具有誘發之趨勢。很顯然，EESP 對 HepG2 生存性與毒殺性可能與其誘發 ROS 產生有很大關聯性。

四、對細胞凋亡之影響

圖二十顯示不同劑量 EESP 及 HD 與 HepG2 細胞作用 24 小時誘發凋亡現象。空白組顯示細胞為完整惟當細胞與 EESP 及 HD 作用後則顯得凝縮(condensed)與核碎片(fragmented nuclei)現象,顯示細胞遭受凋亡。

圖二十一橙皮乙酸乙酯萃取物作用

HepG2 細胞 36hr 後對細胞周期影響。顯示 500 $\mu\text{g/ml}$ EESP 對細胞生長顯著滯留於 G₀/G₁ 期，以致於影響其正常生長期。

表七為以雙染模式分析不同濃度 EESP 對 HepG2 之凋亡情形，由結果顯示 200 $\mu\text{g/ml}$ 與 500 $\mu\text{g/ml}$ EESP 對細胞凋亡以早期凋亡為主，另外 500 $\mu\text{g/ml}$ EESP 對壞死也有顯著影響。此結果亦証實 EESP 對 HepG2 生存性及毒殺性乃由於凋亡與所致，而高濃度 EESP 對 HepG2 之壞死也具影響性。

圖二十二顯示不同劑量 EESP 及 HD 誘發 HepG2 胞內膜電位之影響。不同濃度之 EESP 與 HD 具有誘發胞內膜電位下降。此結果顯示 EESP 能誘發 HepG2 胞內膜電

位下降，此可解釋彼等對細胞趨向於凋亡之現象。

圖二十三以西方點墨法偵測細胞內 Bax 與 Bcl-2 之表現，並以 Bax/Bcl-2 之比例做為促凋亡之指標。結果顯示不同濃度 EESP 其 Bax/Bcl-2 之比例有提昇之趨勢，顯示 EESP 能誘發細胞促凋亡現象，HD 雖有誘發促凋亡趨勢，惟不具顯著性。

圖二十四為不同濃度 EESP 及活性成分誘發 Hep G2 胞內 caspase-3 活性之影響。顯示不同濃度之 EESP 具有誘發胞內 caspase-3 活性現象，進而使其趨向凋之，而活性成分 100 $\mu\text{g/ml}$ HD 亦具有此現象，惟不具顯著性。

在 in vivo 試驗，以不同濃度 EESP 抑制 nude mice 腫瘤產生之試驗中，由表八中可看出於第 12 天時，負對照組長出腫瘤裸鼠有 37.5%，而不同濃度之 EESP 裸鼠仍未長出腫瘤，顯示長出腫瘤時間顯著較負對照組晚。以腫瘤體積而言，圖二十五可看出與負對照組比較，不同濃度之 EESP 長出腫瘤體積較小。第 16 天不同濃度之 EESP 對腫瘤雖有抑制趨勢，惟與負對照組比較則不具顯著差異($P>0.05$)。爰此，本研究未來仍將繼續探討對腫瘤有顯著抑制性之適當濃度。

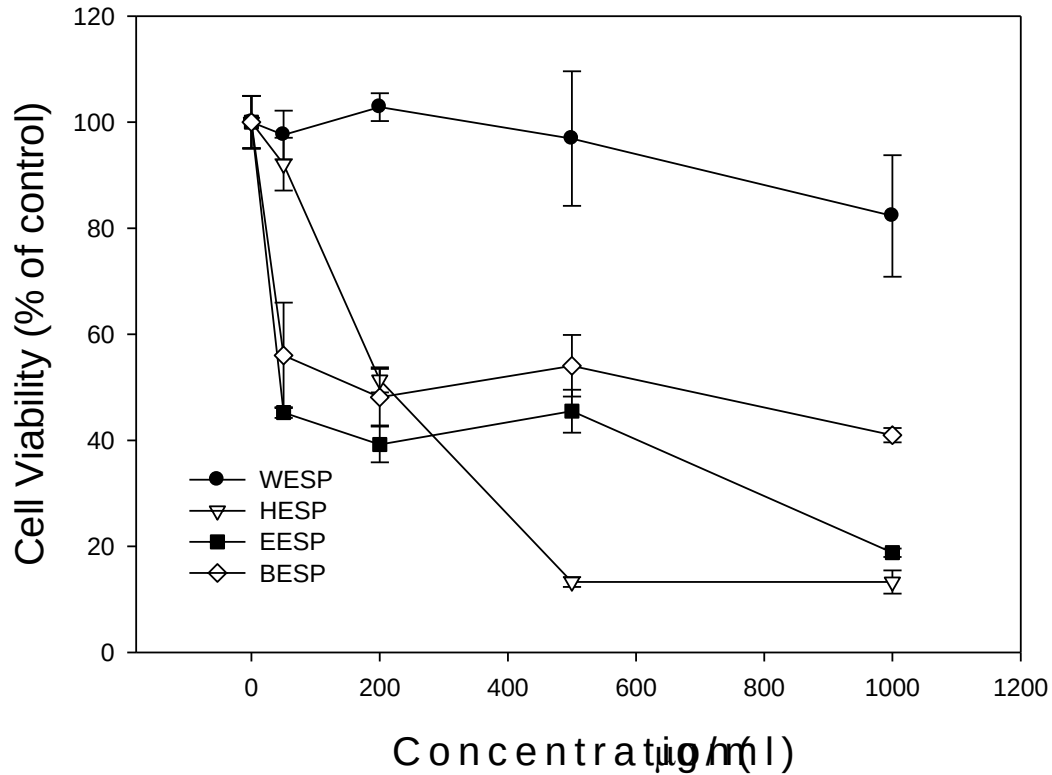
結論

綜合上述三年研究結果，橙皮含有生物活性成份，其在氧化 in vitro 與 in vivo 試扮演部份抗氧化角色，而 WESP 在上述兩種模式的試驗中表現出護肝效應。在抗肝腫瘤活性試驗，顯示 in vitro 試驗中，EESP 由於可誘發 ROS 之生成促使肝癌細胞 HepG2 走向凋亡，進而抑制或毒殺肝癌細

胞，惟其活性成分 HD 卻無法完成解釋相關機轉模式，顯示 EESP 具有抗癌細胞活性不完全由單獨活性成分 HD 所致。另外在 in vivo 試驗，EESP 能降低裸鼠腫瘤體積。顯示 EESP 具有抗腫瘤之特性。由本研究結果橙皮具有護肝與抗肝腫瘤活性。

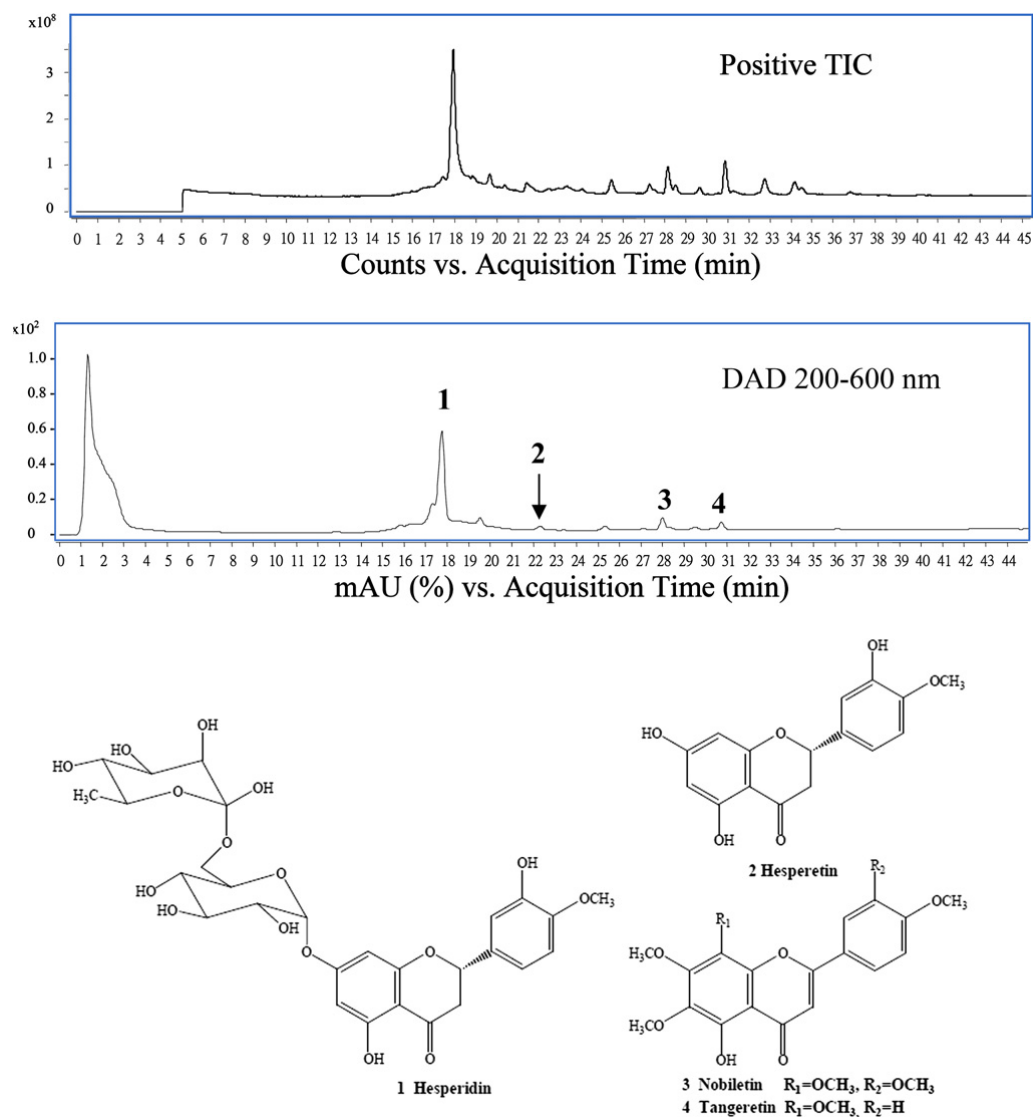
陸、參考文獻

- Tripoli, E.; Guardia, M.L.; Giammanco, S.; Maja, D.D.; Giammanco, M. *Citrus* flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* 2007, 104, 466-479.
- Chau, C. F.; Huang, Y.L.; Lee, M.H. In vitro hypoglycemic effects of different insoluble fiber-rich fractions prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6623-6626.
- Chen, ZT, Chu, HL, Chyan, CC, Chu, CC, Duh PD* Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. *Food Chemistry* 2012, 135, 2119-2127
- Chen, SY, Chyau, CC, Chuc, CC, Chen, YH, Duh, PD*. Hepatoprotection using sweet orange peel and its bioactive compound, hesperidin, for CCl₄-induced liver injury in vivo. *J. Functional Foods* 2013, 5, 1591-1600.



圖一 橙皮各區分物對 HepG2 細胞之生存性之影響

Figure 1. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hexane extracts of sweet orange peel (HESP), ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP), butanol extracts of sweet orange peel (BESP) on HepG2 cell viability. The cells were treated with WESP, HESP, EESP, and BESP, respectively, for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3).



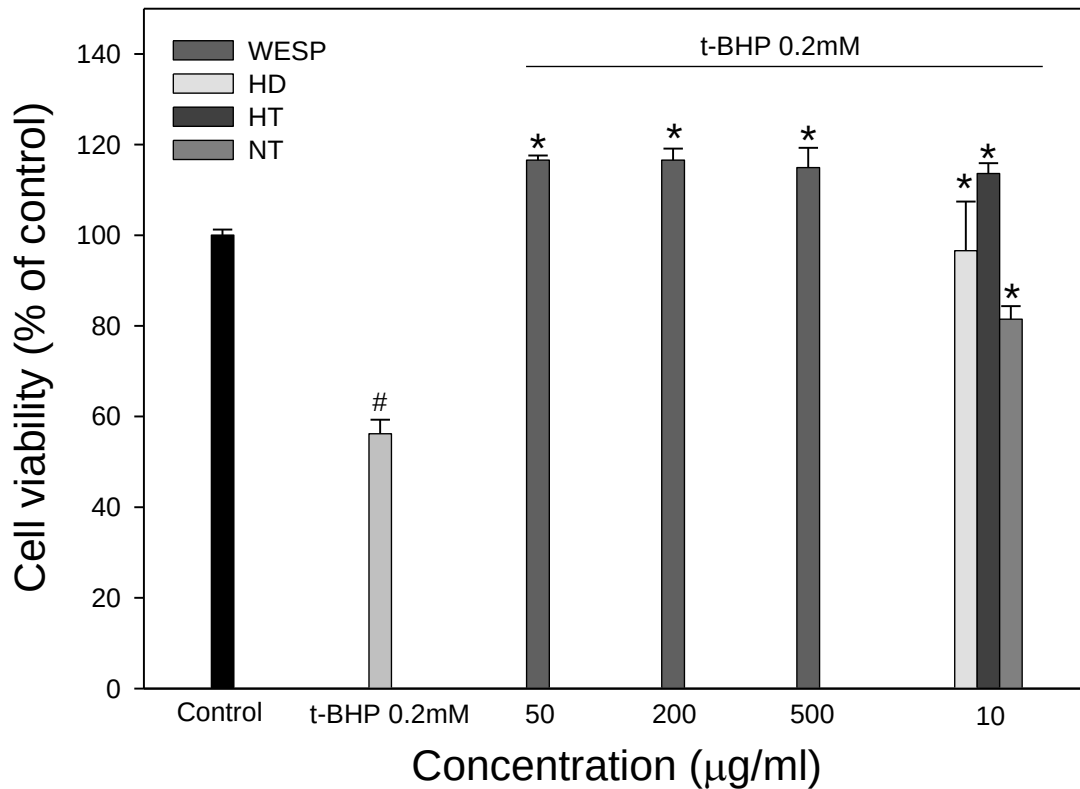
圖二 橙皮水萃取物 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析

Figure 2. Total ion chromatogram (top) , HPLC-DAD chromatogram (bottom) of WESP, and chemical structure of the identified compounds in WESP. Peak 1: hesperidin, peak 2: hesperetin, peak 3: nobiletin, and peak 4: tangeretin.

表一 橙皮水萃取物成份分析之光譜分析

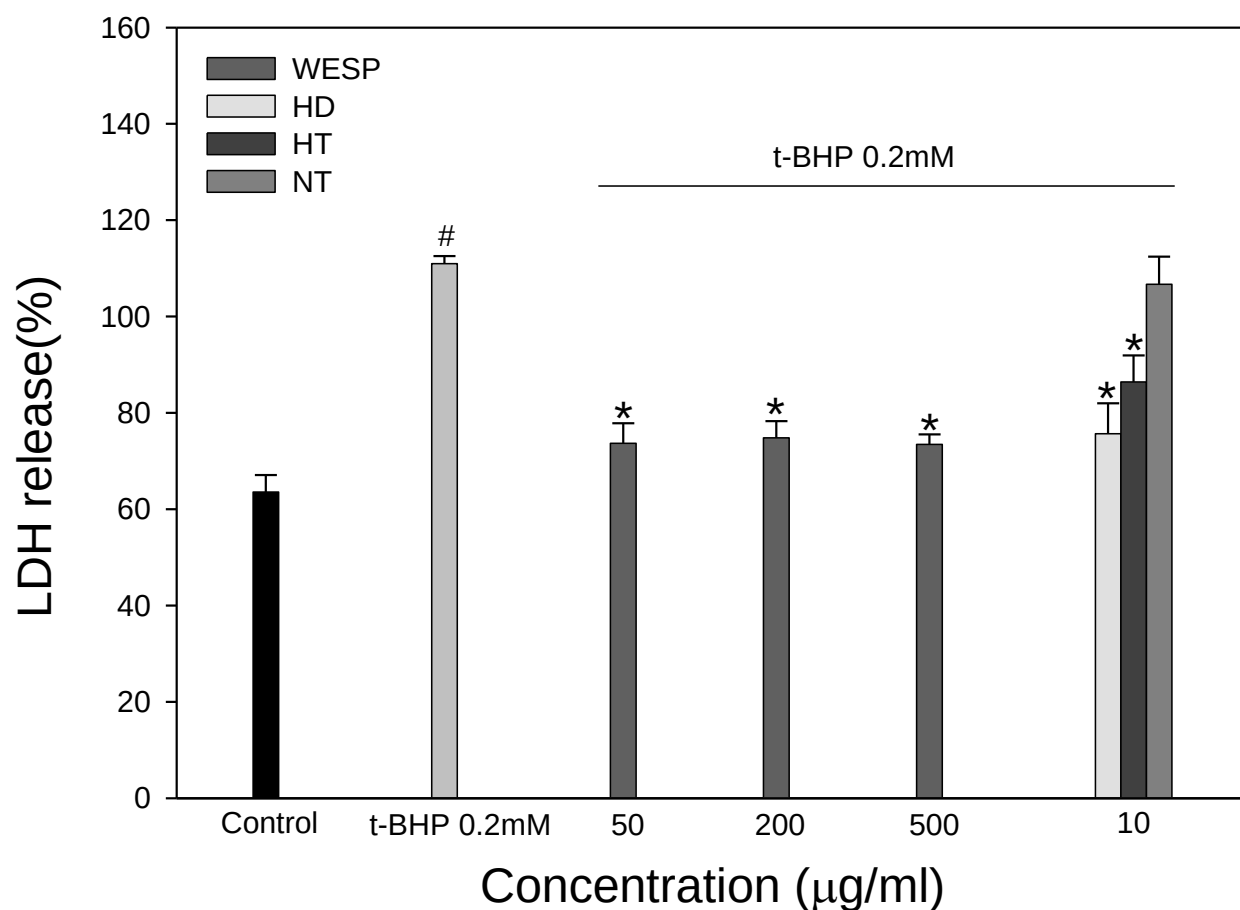
Table1 Chromatographic and spectral data of flavonoids in WESP

Peak	Compound	t _R (min)	UV-Vis λ _{max} (nm)	[M + H] ⁺	MS/MS (m/z)	[M - H] ⁻	MS/MS (m/z)
1	Hesperidin	17.94	284, 329			609	301, 285, 242, 215
2	Hesperetin	22.52	287, 329			301	285, 257, 242, 215, 199
3	Nobiletin	28.26	270, 334	403	388, 373, 357, 355, 327, 301		
4	Tangeretin	30.90	270, 325	373	358, 343, 328, 325, 300, 297		



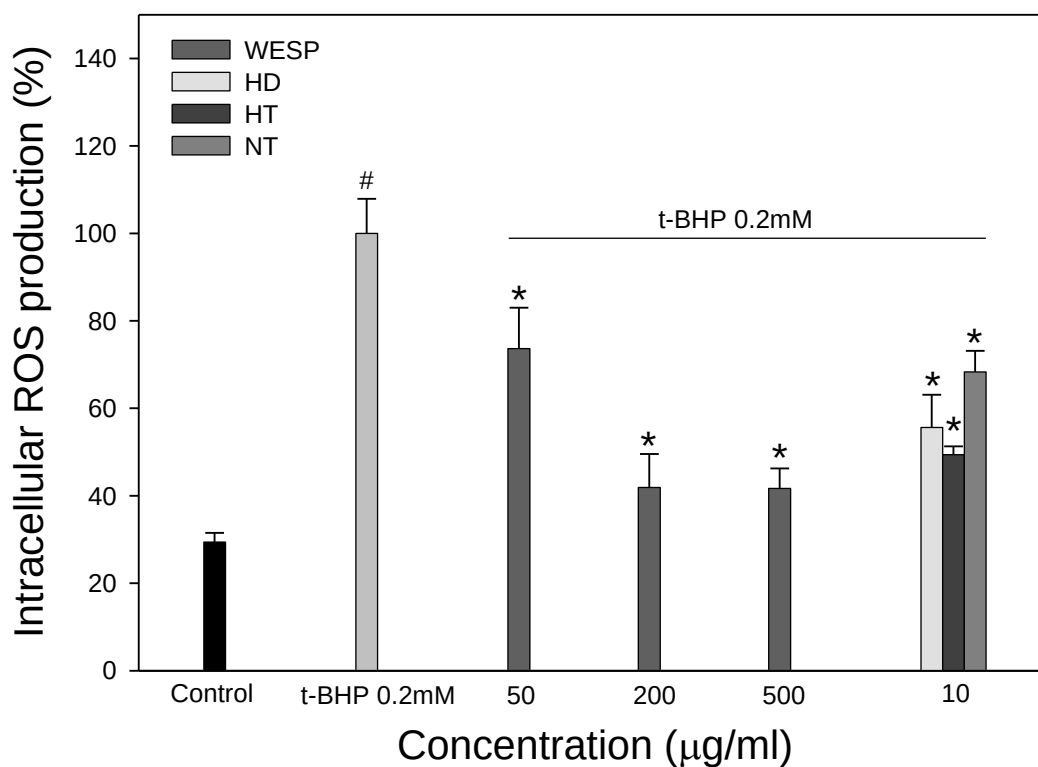
圖三 橙皮水萃取物(WESP)、hesperidin (HD), hesperetin (HT) 和 nobiletin (NT)對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 生長傷害之影響

Figure 3. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT) on HepG2 cell viability. The cells were treated with WESP, HD, HT, and NT, respectively, and exposure to 0.2 mM *t*-BHP for 6 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



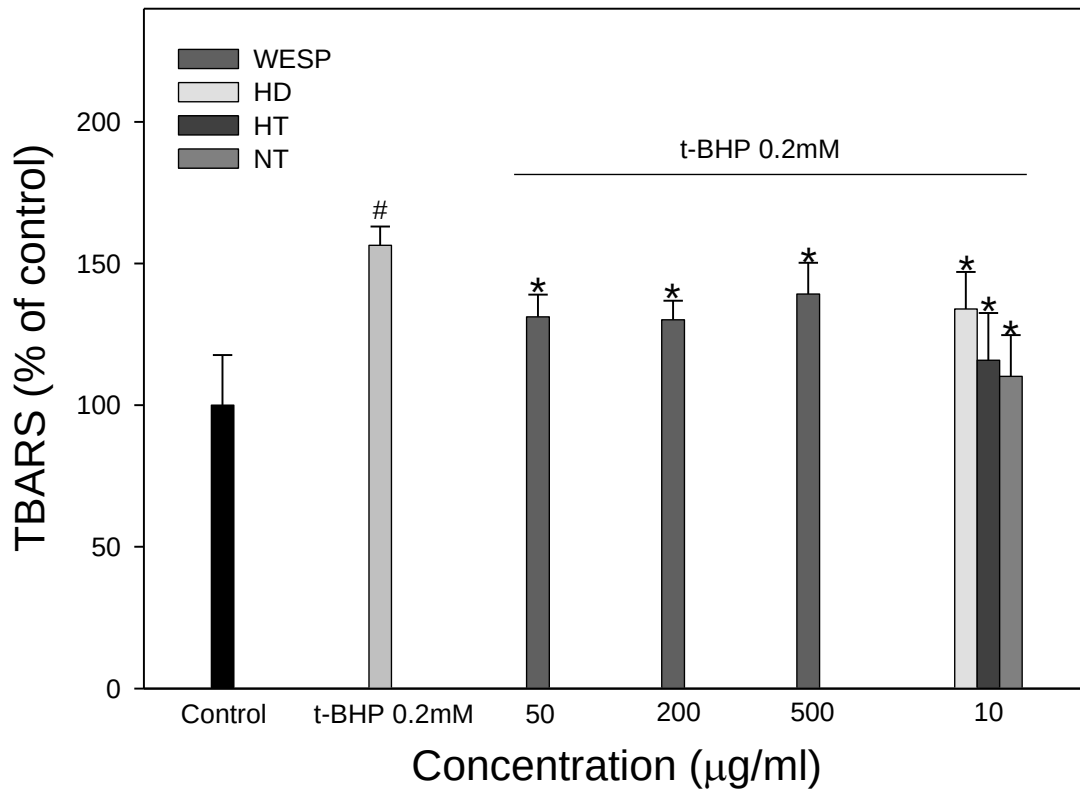
圖四 橙皮水萃取物(WESP)、hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT)對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 之毒性反應之影響

Figure 4. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT) on LDH leakage in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cell. The cells were treated with WESP, HD, HT, and NT, respectively, and exposure to 0.2 mM *t*-BHP for 6 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



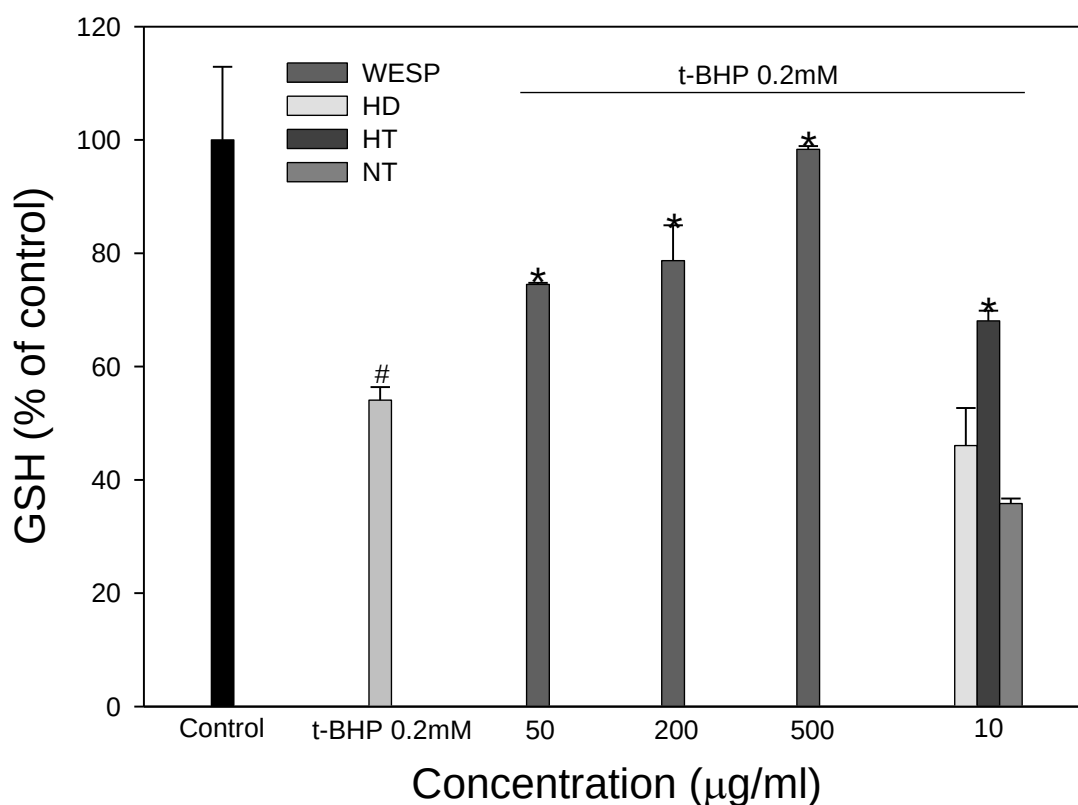
圖五 橙皮水萃取物(WESP)、hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT)對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 ROS 產生之影響

Figure 5. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT) on 0.2 mM *t*-BHP induced intercellular ROS production in HepG2 cells. The cells were treated with WESP, HD, HT, and NT respectively, and exposure to 0.2 mM *t*-BHP for 4 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



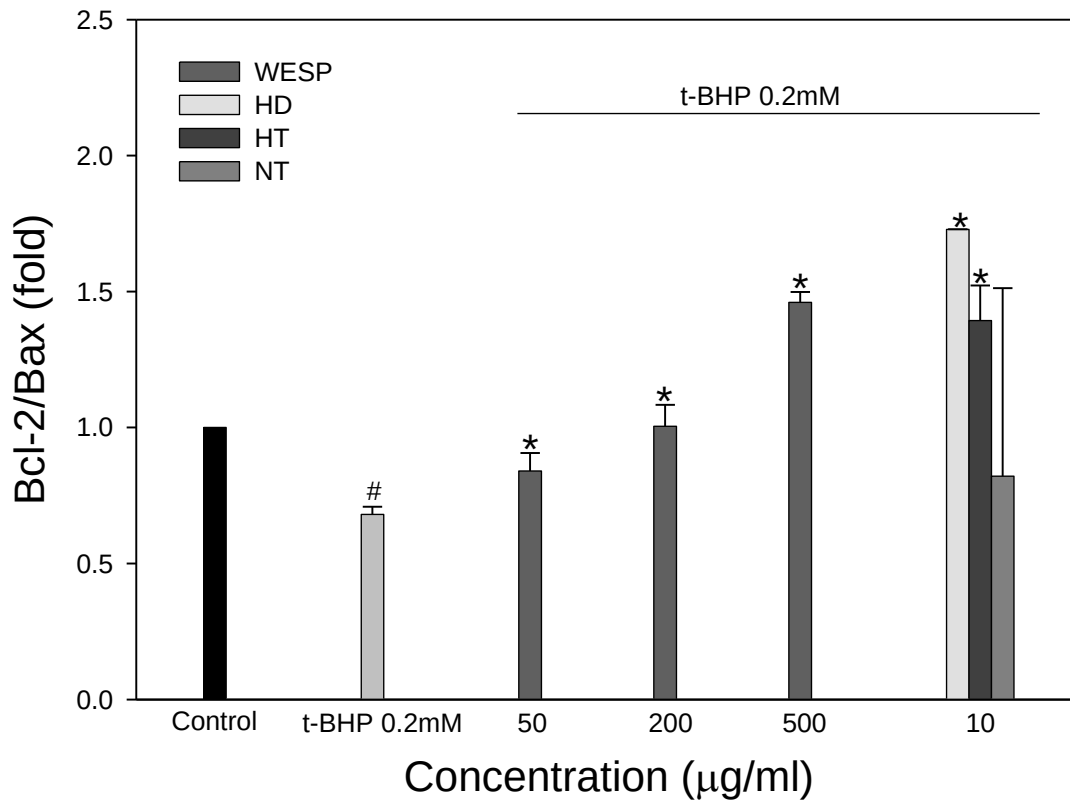
圖六 橙皮水萃取物(WESP)、hesperidin (HD), hesperetin (HT) 和 nobiletin (NT)對 0.2 mM *t*-BHP 作用 2 小時誘發胞內脂質過氧化物產生之影響

Figure 6. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT) on 0.2 mM *t*-BHP induced intercellular TBARS formation in HepG2 cells. The cells were treated with WESP, HD, HT, and NT respectively, and exposure to 0.2 mM *t*-BHP for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD ($n=3$). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



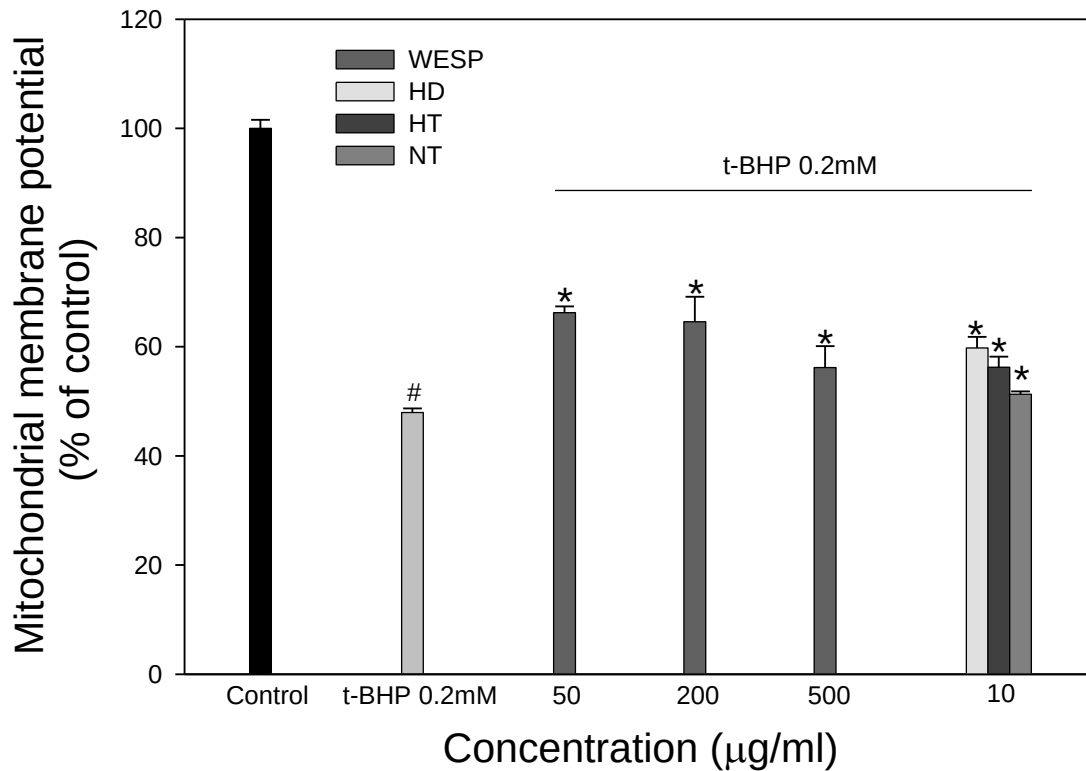
圖七 橙皮水萃取物(WESP)、hesperidin (HD), hesperetin (HT) 和 nobiletin (NT) 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發胞內 GSH 含量之影響

Figure 7. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT) on 0.2 mM *t*-BHP induced GSH in HepG2 cells. The cells were treated with WESP, HD, HT, and NT respectively, and exposure to 0.2 mM *t*-BHP for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



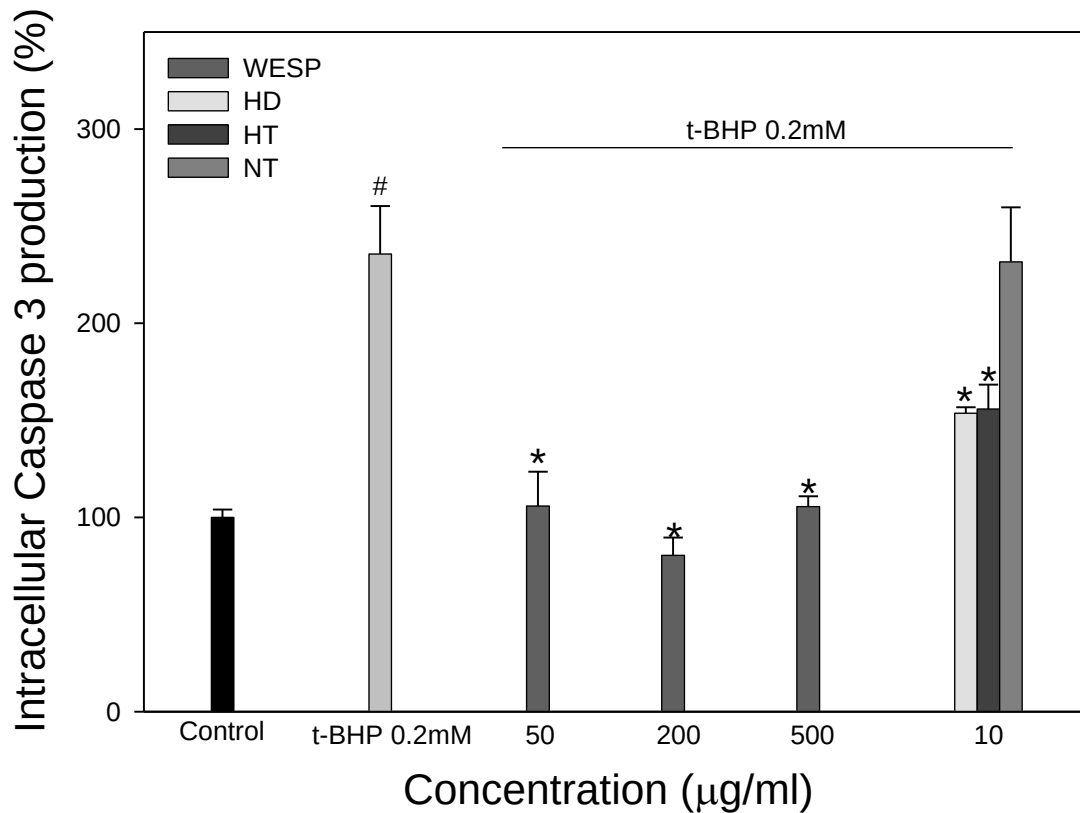
圖八 橙皮水萃取物(WESP)、hesperidin (HD), hesperetin (HT) 和 nobiletin (NT)對 0.2 mM *t*-BHP 作用 2 小時對 Bcl-2/Bax 比率之影響

Figure 8. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT) on the ratios of Bcl-2/ Bax in HepG2 cells induced by 0.2 mM *t*-BHP. The cells were treated with WESP, HD, HT, and NT respectively, and exposure to 0.2 mM *t*-BHP for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



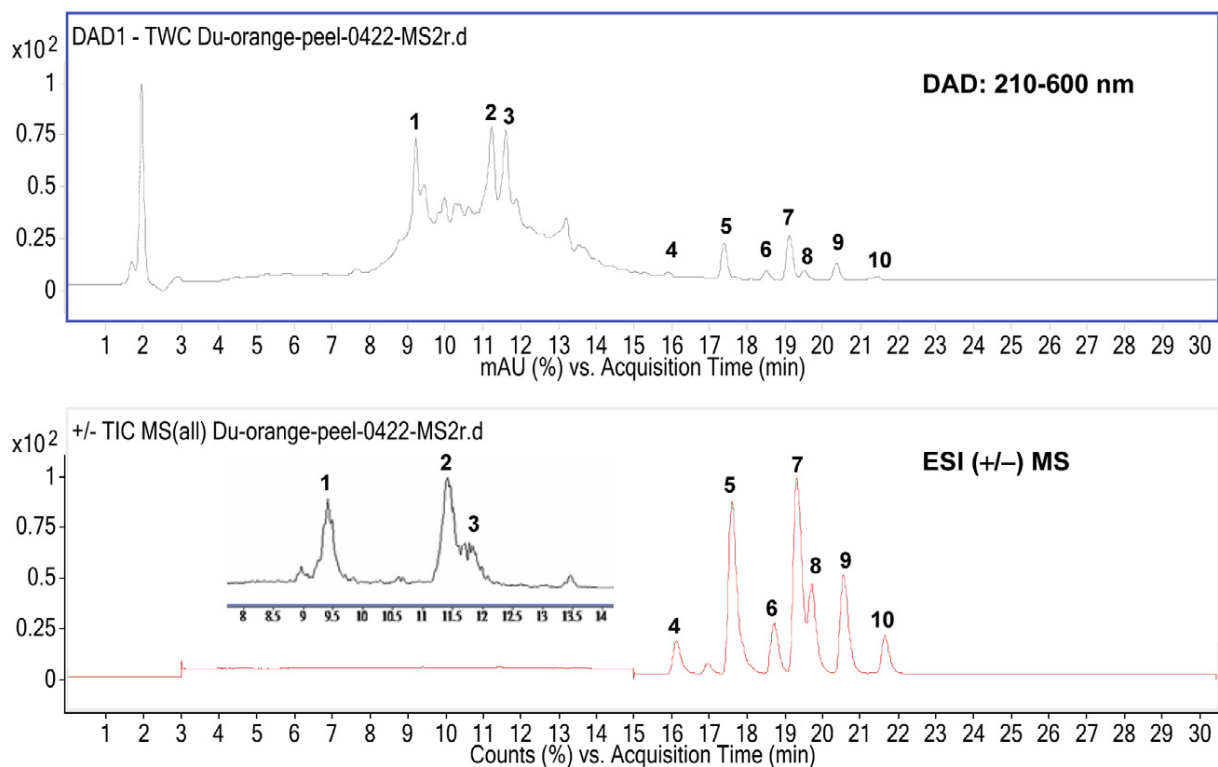
圖九 橙皮水萃取物(WESP)、hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT)對 0.2 mM t-BHP 誘發胞內膜電位之影響

Figure 9. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT) on mitochondrial membrane potential in HepG2 cell induced by 0.2 mM t-BHP. The cells were treated with WESP, HD, HT, and NT respectively, and exposure to 0.2 mM t-BHP for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 0.2 mM t-BHP-induced cells alone.



圖十 橙皮水萃取物(WESP)、hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT)對 0.2 mM t-BHP 誘發 HepG2 胞內 caspase-3 活性之影響

Figure 10. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP), hesperidin (HD), hesperetin (HT) and nobiletin (NT) on 0.2 mM t-BHP induced caspase 3 activity in HepG2 cells. The cells were treated with WESP, HD, HT, and NT respectively, and exposure to 0.2 mM t-BHP for 4 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 0.2 mM t-BHP-induced cells alone.



圖十一 橙皮水萃取物 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析
Figure 11. HPLC (upper panel) and electrospray ionization (ESI) MS (lower panel) chromatograms of water extracts of sweet orange peel (WESP). HPLC-MS/MS analyses were performed in negative (shown in lower panel with insert figure) and positive ionization modes (lower panel, peaks 4-10). The peak numbers are referred to Table2.

表二 橙皮水萃取物成份分析之光譜分析

Table 2. Retention time (t_R), UV-Vis and ESI Mass spectral characteristics of Compounds (1-10) of water extracts of sweet orange peel (WESP)

Peak ^a	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M + H]^+$	MS^2	$[M - H]^-$	MS^2
1	9.41	273, 337, 232			593	353(100), 383(51), 473(36), 297(6)
2	11.41	281, 236, 333			579	271(100), 151(11)
3	11.69	282, 236, 330			609	301(100), 286(5)
4	16.10	345, 272, 252,	373	343(100), 357(10), 315(8), 373(6)		
5	17.62	333, 243, 265 sh	373	343(100), 312(59), 329(45), 357(35), 339(19)		
6	18.71	338, 244	403	373(100), 387(46), 369(31), 355(22), 341(19),		
7	19.32	336, 251, 272	403	373(100), 327(10), 355(6)		
8	19.74	323, 268, 235	343	313(100), 282(65), 299(43), 327(30), 281(29)		
9	20.54	256, 234 sh, 344	433	403(100), 385(11), 417(7)		
10	21.63	328, 273, 234	373	343(100), 297(12), 325(7), 300(5)		

^a The identified results of each compound are referred to Table3.

表三 橙皮水萃取物成份鑑定

Table 3. Identified phenolic compounds in water extracts of sweet orange peel (WESP)

Peak	Compound	Reference	Quantification (mg/g extract) ^c
1	Apigenin-6,8-di-C-glucoside ^b	Gattuso, Hinds, Tong, & Srivastava, 2006	1.538 ± 0.135
2	Narirutin ^b	Gardana, Scaglianti, Pietta, & Simonetti, 2007	3.983 ± 0.601
3	Hesperidin ^a		6.439 ± 0.914
4	5,6,7,3',4'-Pentamethoxyflavone ^b	Han, Kim, Lee, Mok, & Lee, 2010	0.083 ± 0.022
5	Sinensetin ^b	Anagnostopoulou, Kefalas, Kokkalou, Assimopoulou, & Papageorgiou, 2005	0.347 ± 0.046
6	Nobiletin ^b	Mencherini, et al., 2013	0.084 ± 0.019
7	Hexamethoxyflavone ^b	Anagnostopoulou, et al., 2005	0.519 ± 0.088
8	5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone ^b	Li, et al., 2006	0.141 ± 0.026
9	3-Methoxynobiletin ^b	Li, et al., 2006	0.160 ± 0.027
10	Tangeretin ^a		0.118 ± 0.015

^aThe identification was confirmed further by authentic compound. ^bCompounds were tentatively identified according to mass spectra and the matched data from literatures. ^cThe results were expressed as equivalent of hesperidin in mg per g of extract, as mean ± SD of three independent analyses.

表四橙皮水萃物 (WESP) 對大鼠體重及相對臟器重量之影響

Table 4. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP) on body weight and relative organ weights in male Wistar rats

Values are means $\pm$ SD for eight rats per group. *Significantly different from the group

Groups	Initial weight (g)	Final weight (g)	Relative organ weight	
			Liver	Kidney
Control	211.34 $\pm$ 8.00	353.38 $\pm$ 36.10	4.81 $\pm$ 1.19*	1.18 $\pm$ 0.22*
50% CCl ₄ / Olive oil	204.66 $\pm$ 12.18	352.46 $\pm$ 29.38	5.74 $\pm$ 1.20	1.08 $\pm$ 0.21
Silymarin (200 mg/kg)+ CCl ₄	200.04 $\pm$ 12.26	340.74 $\pm$ 40.48	4.65 $\pm$ 0.36*	0.87 $\pm$ 0.06*
Hesperidin (0.1 mg/kg)+ CCl ₄	218.20 $\pm$ 5.07	379.19 $\pm$ 16.41	4.73 $\pm$ 0.38*	0.85 $\pm$ 0.06*
WESP (1 mg/kg)+ CCl ₄	216.74 $\pm$ 7.00	369.04 $\pm$ 27.64	4.89 $\pm$ 0.36	0.87 $\pm$ 0.05*
WESP (10 mg/kg)+ CCl ₄	209.28 $\pm$ 10.76	359.63 $\pm$ 28.16	4.64 $\pm$ 0.50*	0.91 $\pm$ 0.07*
WESP (100 mg/kg)+ CCl ₄	210.53 $\pm$ 14.39	355.68 $\pm$ 23.24	4.88 $\pm$ 0.47	0.91 $\pm$ 0.04*
WESP (100 mg/kg)	213.89 $\pm$ 8.75	362.90 $\pm$ 17.41	3.82 $\pm$ 0.45*	0.87 $\pm$ 0.07*

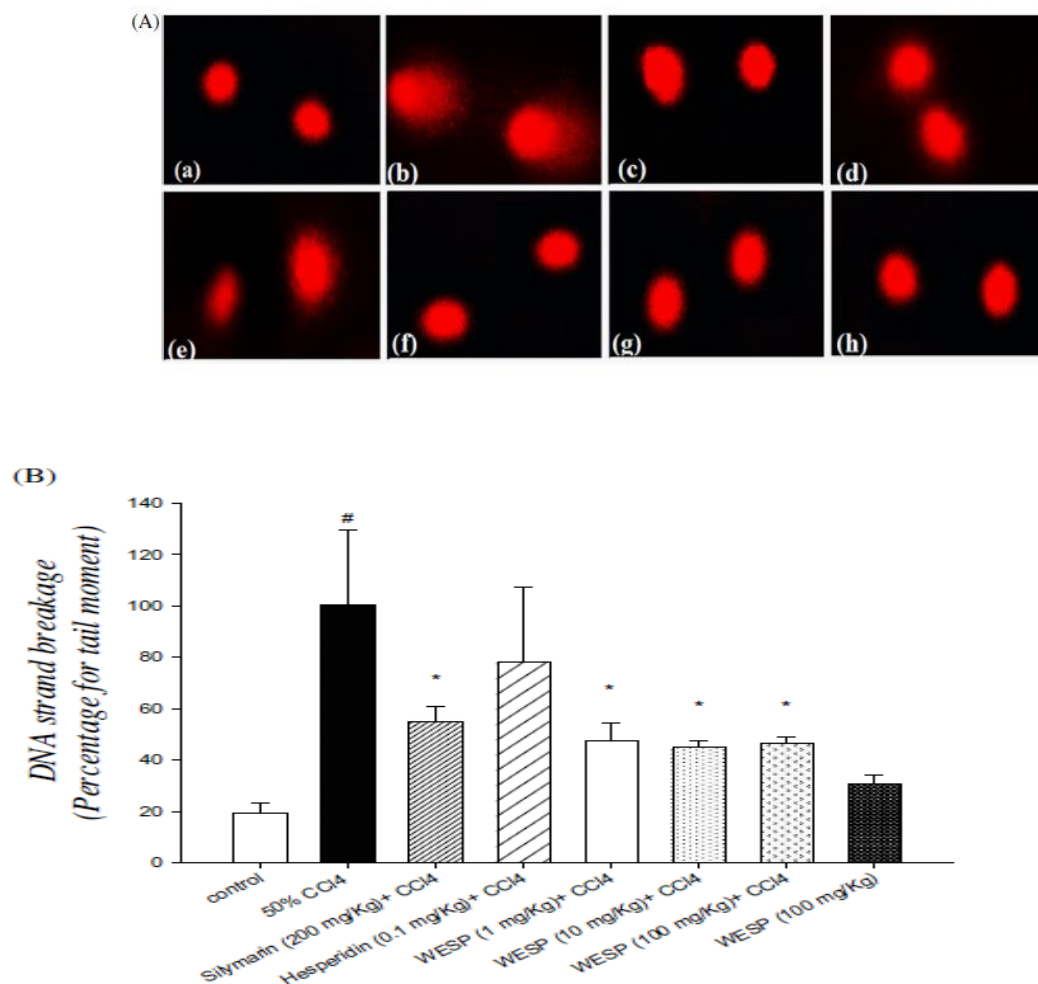
treated with 50% CCl₄ / Olive oil alone at p<0.05. Relative organ weight= organ weight (g) / final body weight (g) $\times$ 100%.

表五 橙皮水萃物對 CCl₄ 誘發大鼠肝損傷之血清生化值與 TBARS 及穀胱甘肽與抗氧化酵素之影響

Table 5. Effects of water extracts of sweet orange peel (WESP) on serum biochemical values, TBARS, glutathione content and antioxidant enzymes activities in male Wistar rats treated with CCl₄

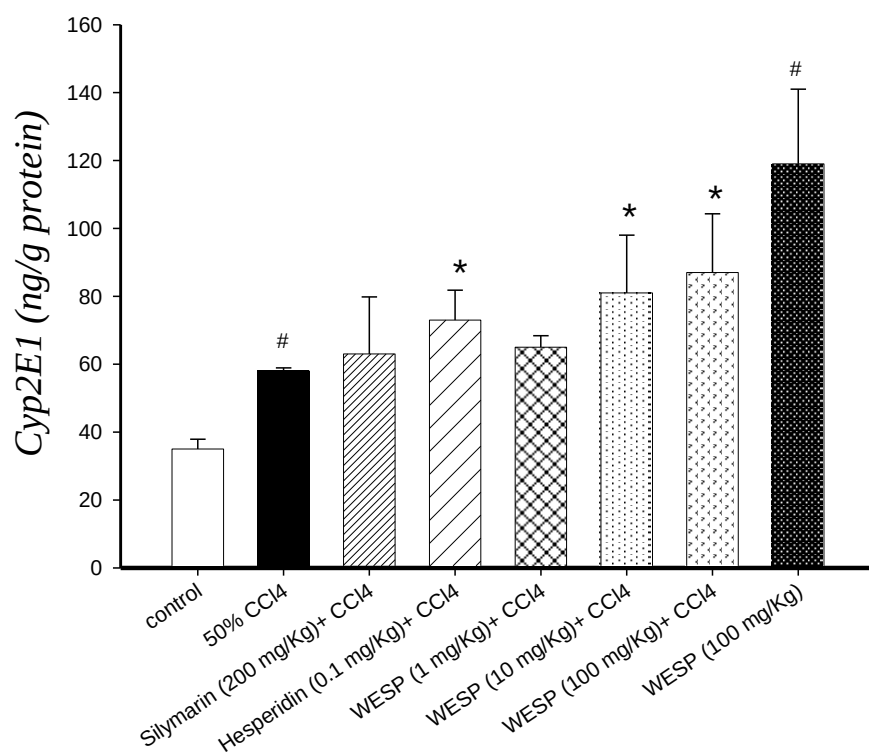
Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	TBARS (nmole / g tissue)	GSH (μg / g protein)	SOD (U / g protein)	CAT (U/ g protein)	GPx (U / g protein)
Control	123±10	46±1	17±1	0.85±0.03	0.50±0.46	797±206	13029±2608	18.29±2.1	1281±350
50% CCl ₄	2274±934 [#]	984±584 [#]	18±1	0.86±0.07	1.47±0.44 [#]	372±109 [#]	6794±1651 [#]	24.42±5.0	627±126 [#]
Silymarin (200 mg/Kg)+ CCl ₄	1188±732 [*]	494±354	19±1	0.92±0.03	0.69±0.38 [*]	600±186	11463±3172 [*]	22.45±5.7	962±161 [*]
Hesperidin (0.1 mg/Kg)+ CCl ₄	1928±726	967±631	17±2	0.90±0.09	0.91±0.66 [*]	264±48	6505±1131	18.67±3.9	1026±424
WESP (1 mg/Kg)+ CCl ₄	2368±548	1147±771	19±1	0.85±0.11	0.95±0.54 [*]	352±79	5200±2000	23.10±8.9	336±81 [*]
WESP (10 mg/Kg)+ CCl ₄	761±698 [*]	323±362 [*]	18±1	0.86±0.07	0.93±0.42 [*]	567±64 [*]	14241±1688 [*]	21.24±7.9	1630±134 [*]
WESP (100 mg/Kg)+ CCl ₄	1435±690 [*]	591±418	19±1	0.91±0.08	0.73±0.37 [*]	661±183 [*]	11687±4061 [*]	18.16±2.1	1283±253 [*]
WESP (100 mg/Kg)	109±12	32±5 [#]	16±1	0.85±0.01	0.56±0.24	869±141	11668±1149	18.18±2.16	1019±200

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine. TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; GSH, glutathione; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase. Values are means ± SD for eight rats per group. Results were all statistically analyzed with Student's *t*-test. [#]Significant difference from the control group (*p*<0.05). ^{*}Significant difference from the CCl₄ group (*p*<0.05).



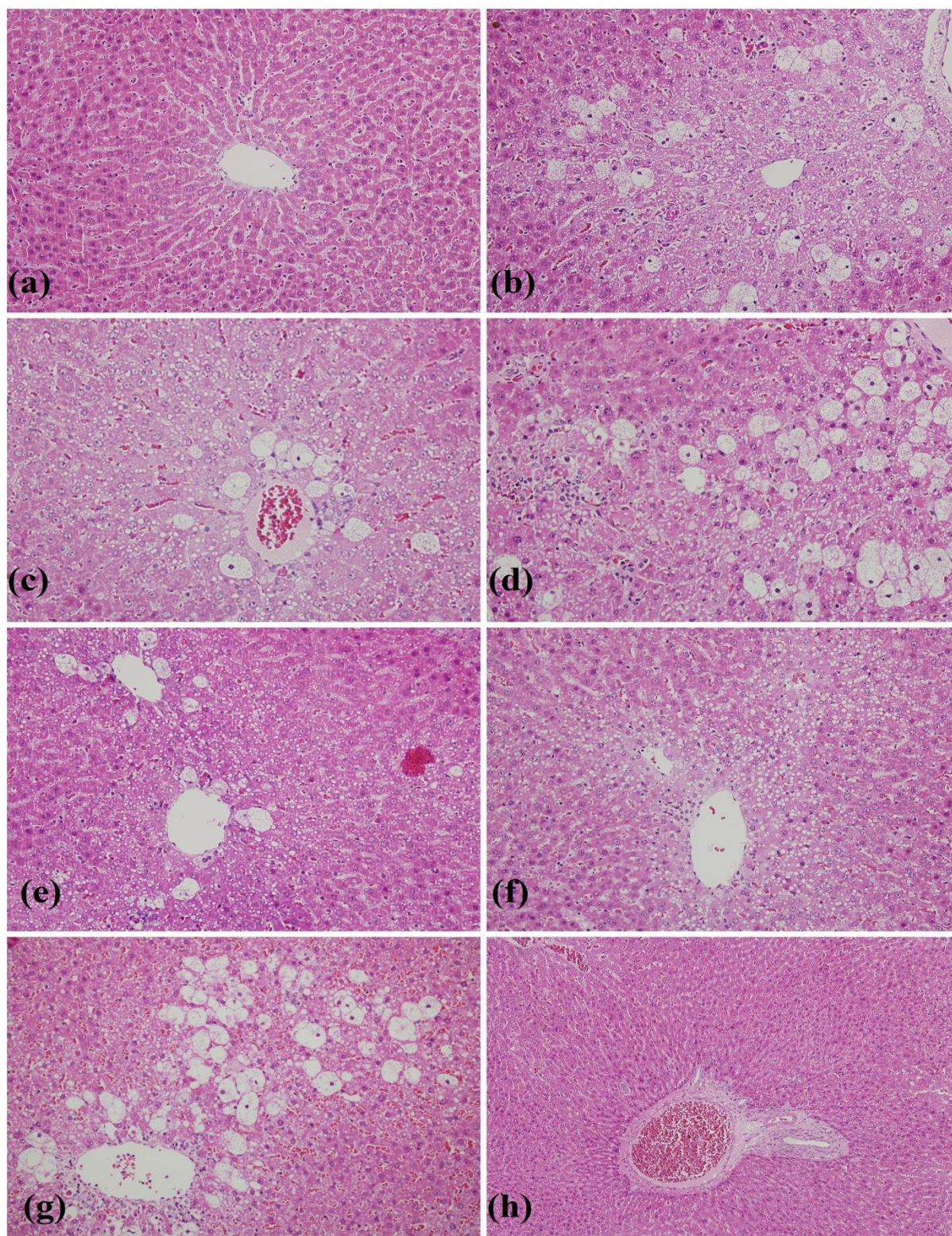
圖十二 橙皮水萃物對大鼠血液淋巴球細胞之基因毒性評估

Figure 12. Effect of water extracts of sweet orange peel (WESP) on DNA strand breakage. Photomicrographs of comets (A) in lymphocyte stained with propidium iodide in different groups: in different experimental groups. (a) Control group ; (b) 50% CCl₄ ; (c) silymarin (200 mg/kg bw)+ CCl₄ ; (d) Hesperidin (0.1 mg/kg bw)+ CCl₄ ; (e) WESP (1 mg/kg bw)+ CCl₄ ; (f) WESP (10 mg/kg bw)+ CCl₄ ; (g) WESP (100 mg/kg bw)+ CCl₄ ; (h) WESP (100 mg/kg bw) and genotoxicity of WESP on DNA strand breakage (B) in blood lymphocytes from rats treated with CCl₄. Tail moment= percent of DNA in the tail × tail length (μm). Data were presented as mean±SEM. [#]Significant difference from the control group (p<0.05). ^{*}Significant difference from the CCl₄ group (p<0.05).



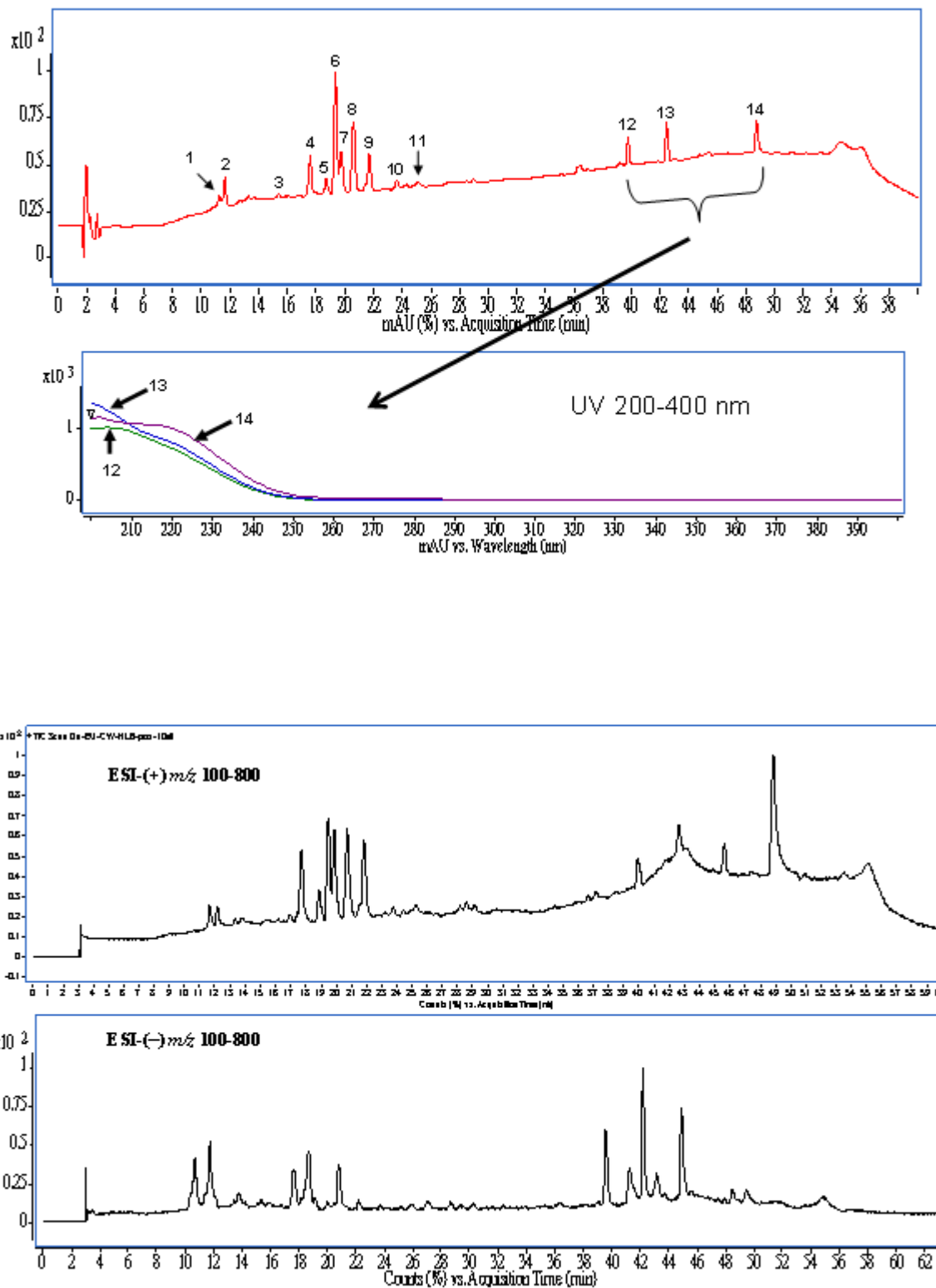
圖十三 橙皮水萃物對 CCl₄ 誘發大鼠肝臟微粒體 CYP2E1 活性之影響

Figure 13. Effect of water extracts of sweet orange peel (WESP) on CYP2E1 activity in the liver microsomes of rats treated with CCl₄. # Significant difference from the control group (p<0.05). * Significant difference from the CCl₄ group (p<0.05).



圖十四 橙皮水萃物對 CCl_4 誘發大鼠肝損傷之病理切片圖

Figure 14. Effect of water extracts of sweet orange peel (WESP) on rat liver treated with CCl_4 : (a) control group ; (b) 50% CCl_4 ; (c) silymarin (200 mg/kg bw)+ CCl_4 ; (d) Hesperidin (0.1 mg/ kg bw)+ CCl_4 ; (e) WESP (100 mg/ kg bw)+ CCl_4 ; (f) WESP (10 mg/ kg bw)+ CCl_4 ; (g) WESP (1 mg/ kg bw)+ CCl_4 ; (h) WESP (100 mg/ kg bw).



圖十五 以高效液相層析分析(A)，波峰 12-14 之紫外光光譜分析(B)，及正離子(C)與負離子(D)電灑離子化法分析橙皮乙酸乙酯萃取物之圖譜

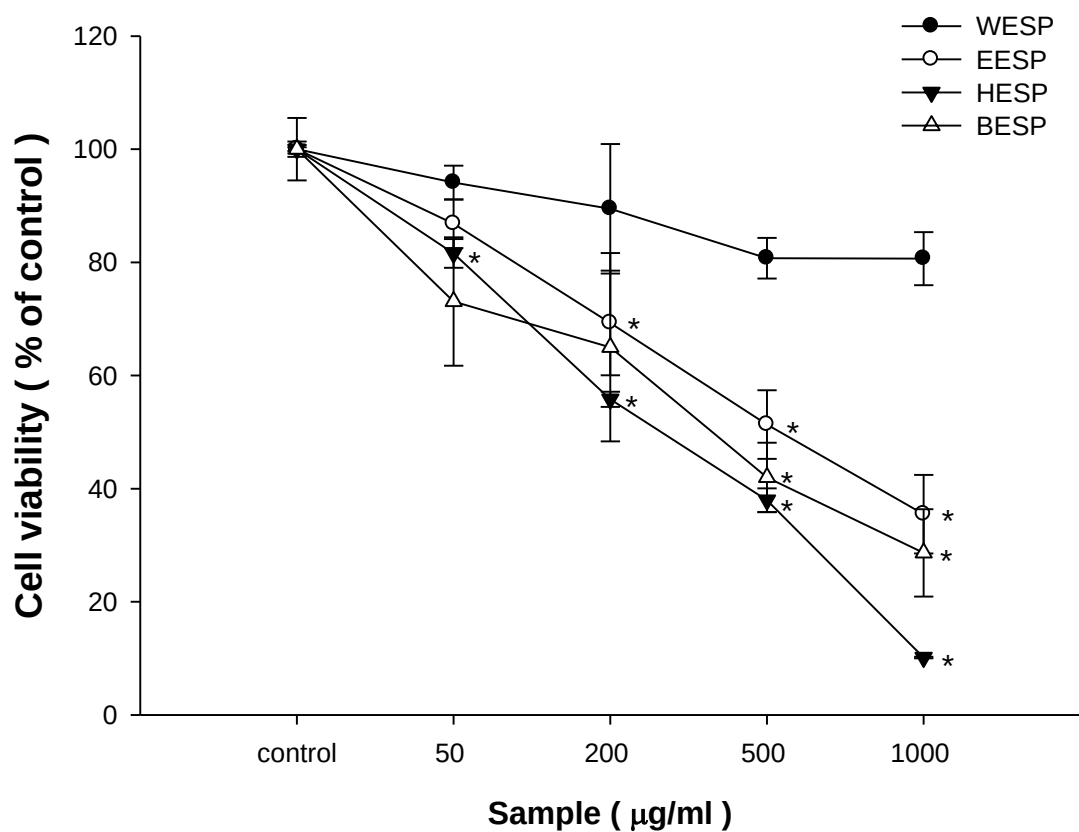
Figure 15. Chromatograms obtained from HPLC analysis (A), UV spectra of peak numbers 12-14 (B), and total ions of positive (C) and negative (D) electrospray ionization of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP)

表六 橙皮乙酸乙酯萃取物成份之光譜分析

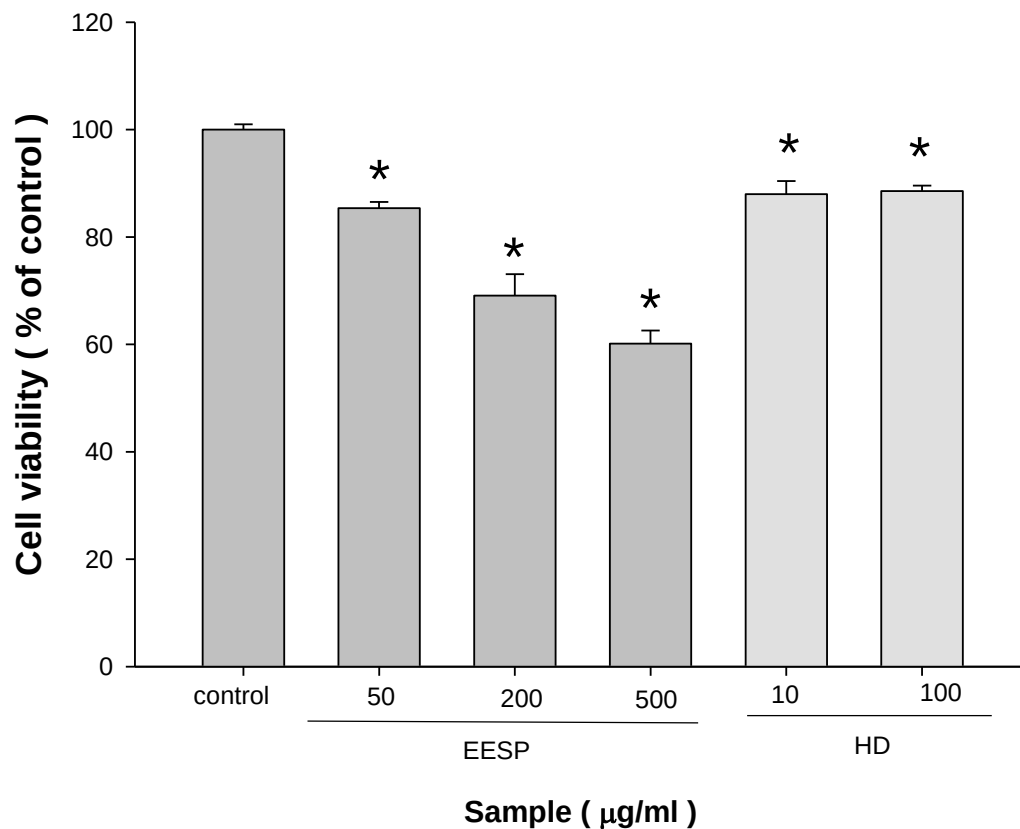
Table 6. Retention time (t_R), UV-Vis and ESI Mass spectral characteristics of Compounds (1-10) of orange peel extracts

Peak ^a	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M + H]^+$	MS^2	$[M - H]^-$	MS^2	Identification
1	11.41	281, 236, 333			579	271(100), 151(11)	Narirutin
2	11.69	282, 236, 330			609	301(100), 286(5)	Hesperidin
3	16.10	345, 272, 252,	373	343(100), 357(8), 315(4)		5,6,7,3',4'-Pentamethoxyflavone	
4	17.62	333, 243, 265 sh	373	343(100), 312(67), 329(42), 357(39), 339(20)			Sinensetin
5	18.71	338, 244	403	373(100), 387(40), 369(29), 355(21), 403(18),			Nobiletin
6	19.32	336, 251, 272	403	373(100), 327(5), 355(6)			Hexamethoxyflavone
7	19.74	323, 268, 235	343	313(100), 282(73), 299(45), 327(31), 309(23)		5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone	
8	20.54	256, 234 sh, 344	433	403(100), 385(10), 417(7)			3-Methoxynobiletin
9	21.63	328, 273, 234	373	343(100), 297(10), 325(7)			Tangeretin
10	23.82	347, 237	389	359(100), 341(39), 389(11), 328(6), 373(6)		5-Hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone ^a	
11	25.25	236, 279, 348	419	389(100), 371(24), 419(13), 361(8)		5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone ^a	
12	39.76	210			277		Linolenic acid
13	42.48	210			279		Linoleic acid
14	45.42	210			281		Oleic acid

^a Tentatively identified according to Weber et al. (2006) and Li et al. (2006). Weber, B., Hartmann, B., Stöckigt, D., Schreiber, K., Roloff, M., Bertram, H. J., Schmidt, C. O. Liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance as complementary analytical techniques for unambiguous identification of polymethoxylated flavones in residues from molecular distillation of orange peel oils (*Citrus sinensis*). J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 274-278. Li, S. M., Lo, C. Y., Ho, C. T. 2006. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 4176-4185



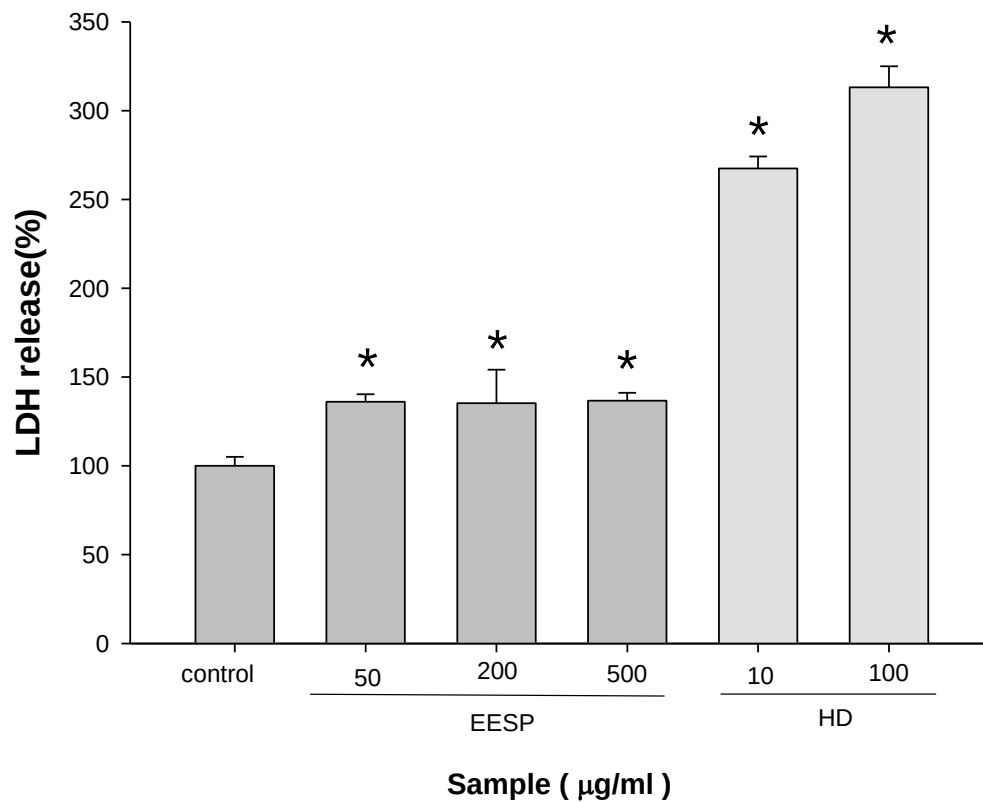
圖十六 橙皮不同萃取物不同濃度下對 Hep G2 細胞反應 24 小時之細胞生存性之影響
 Figure 16. Effects of different extracts of sweet orange peel on HepG2 cell viability. The cells were treated with WESP(water extracts of sweet orange peel),EESP (ethyl acetate extracts of sweet orange peel),HESP (hexane extracts of sweet orange peel) and BEBP (butanol extracts of sweet orange peel) for 24 h, respectively,. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control group.



圖十七 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)對 HepG2 細胞反應 36 小時之細胞生存性之影響

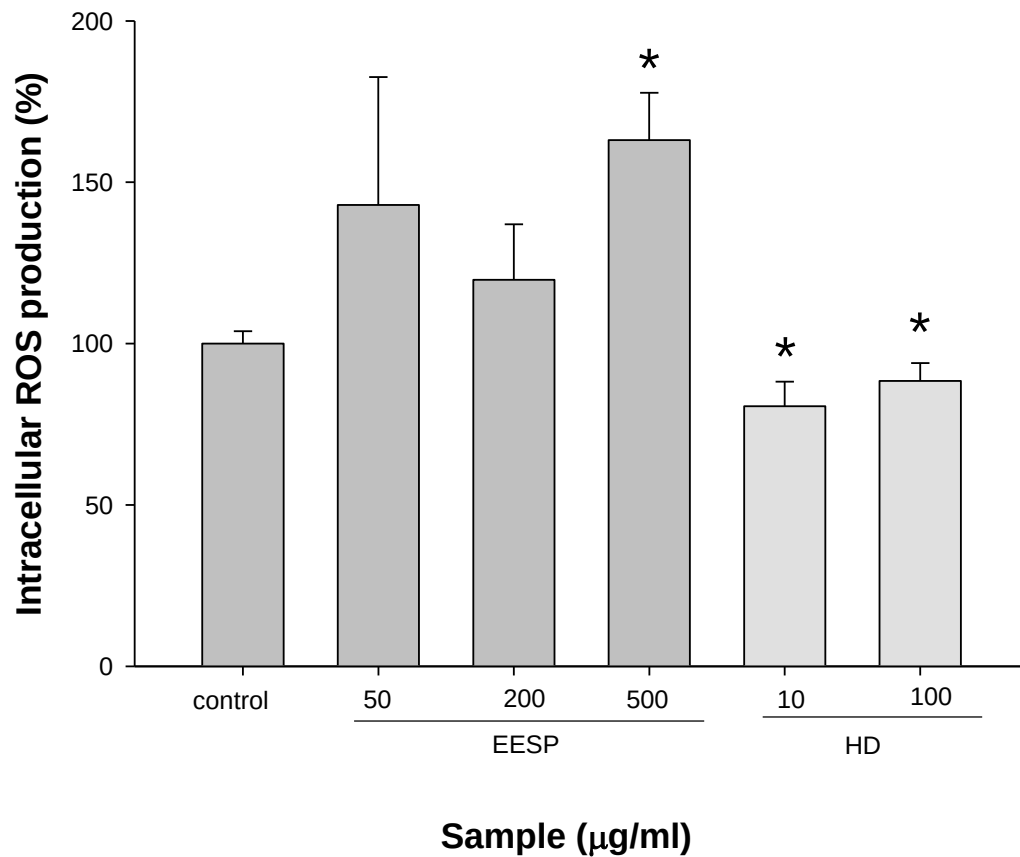
Figure 17. Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) and hesperidin (HD) on HepG2 cell viability. The cells were treated with EESP and HD, respectively, for 36 h.

Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control group.



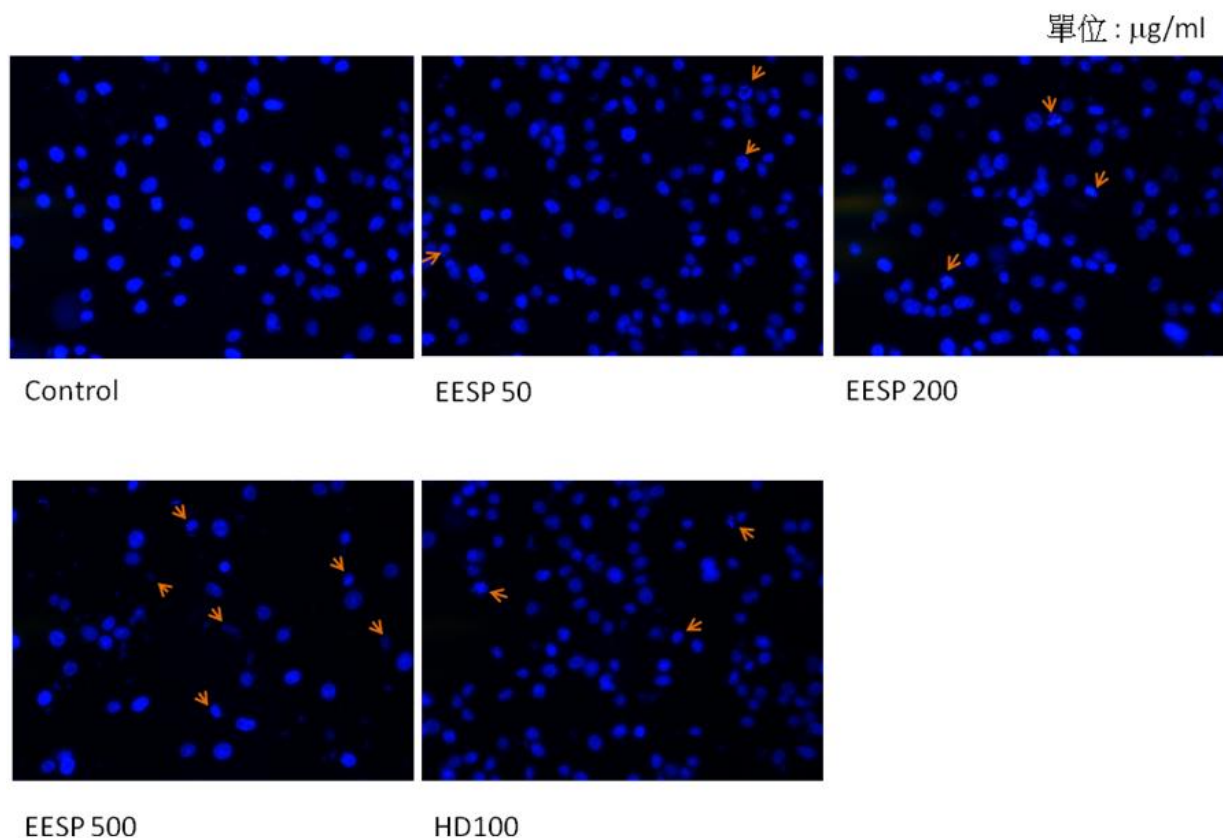
圖十八 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)對 Hep G2 細胞作用 36 小時對 LDH 釋放之影響

Figure 18. Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) and hesperidin (HD) on LDH for HepG2 cell. The cells were treated with EESP and HD respectively, for 36 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



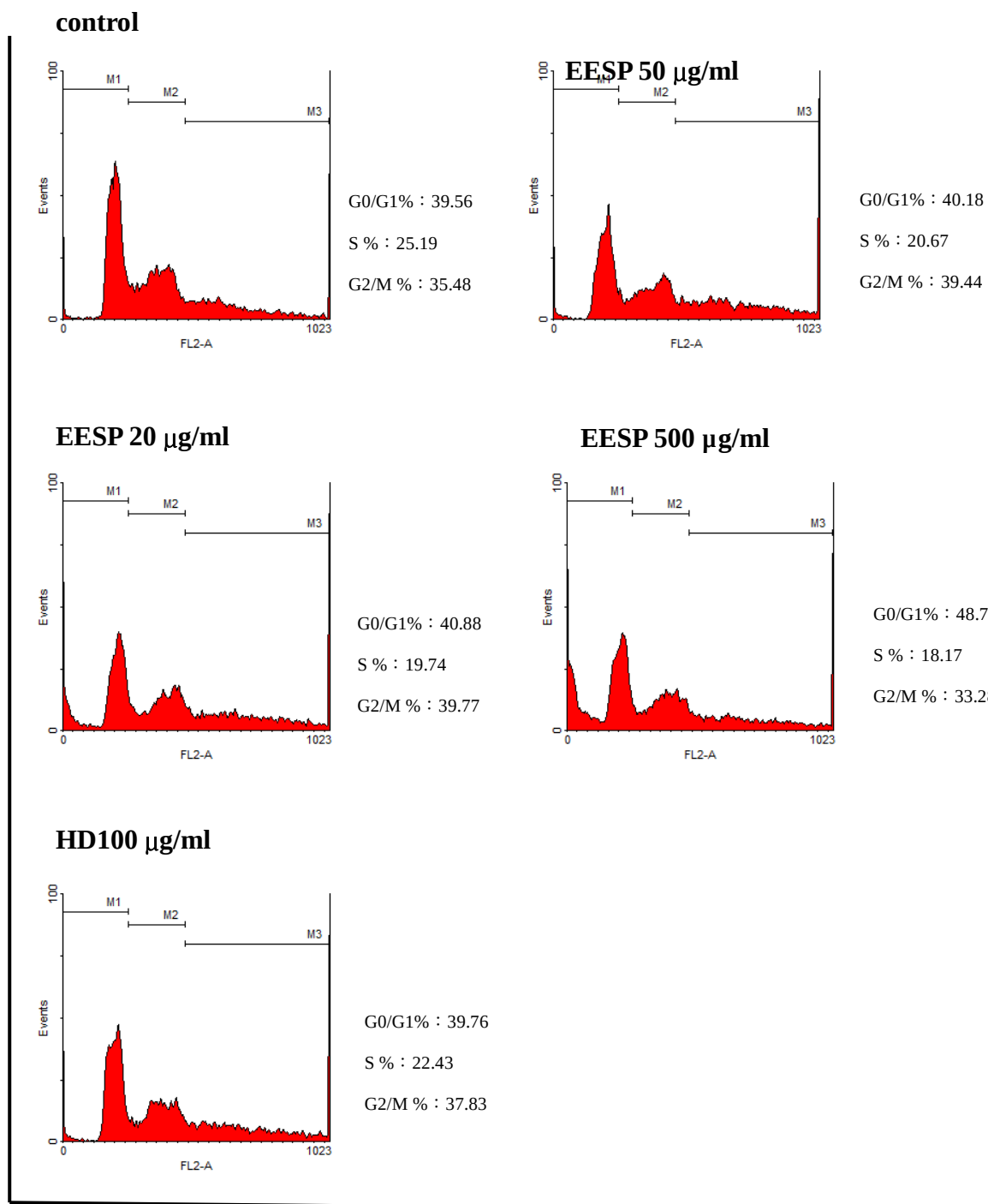
圖十九 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)作用 Hep G2 細胞 3 小時對 ROS 生成之影響

Figure 19. Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) and hesperidin (HD) on intercellular ROS production in HepG2 cells. The cells were treated with EESP and HD, respectively, for 3 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



圖二十 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)作用 Hep G2 細胞 24 小時氧化損害之影響

Figure 20. Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP), hesperidin (HD) on morphological changes in nuclear of HepG2 cells. The cells were exposed to EESP (50-500 $\mu\text{g/ml}$) and HD (100 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h, and oxidative damage was evaluated using DAPI staining. The DAPI-stained cells were evaluated using fluorescence microscopy (200x).



圖二十一 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)作用 Hep G2 細胞 36hr 後對細胞週期影響

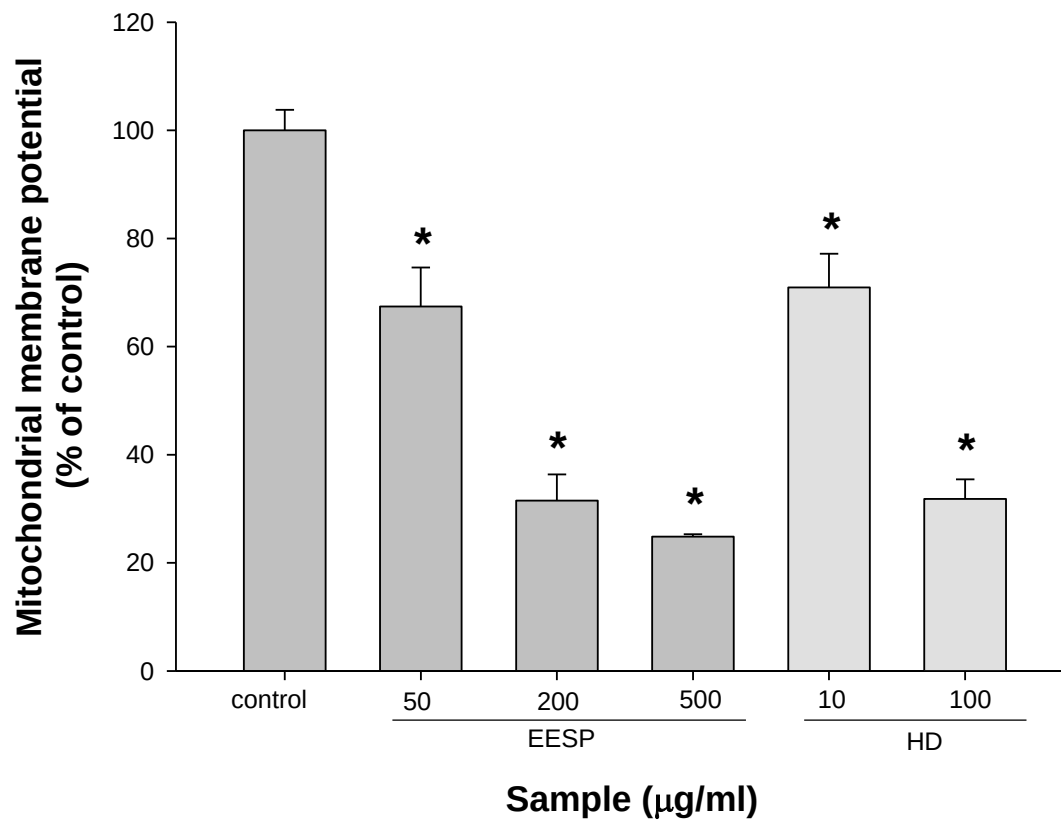
Figure 21 . Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) and hesperidin (HD) on the cell cycle of HepG2 cells. Cell were incubated with EESP (50-200 $\mu\text{g/ml}$) and hesperidin (HD) for 36h.

表七 .橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)作用 Hep G2 細胞 36hr 後對細胞凋亡與壞死之影響

Table 7. The effect of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) and hesperidin (HD) on apoptosis in HepG2 cells

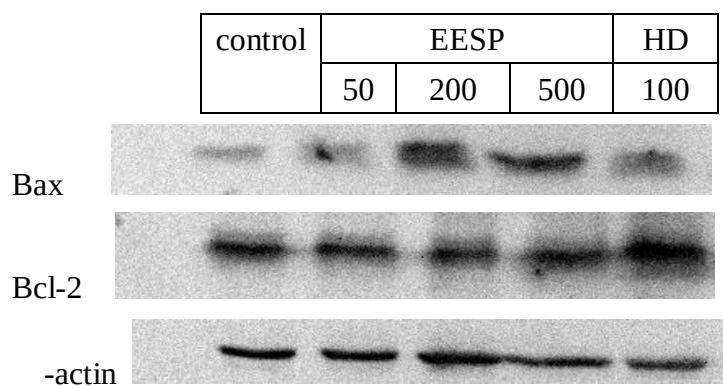
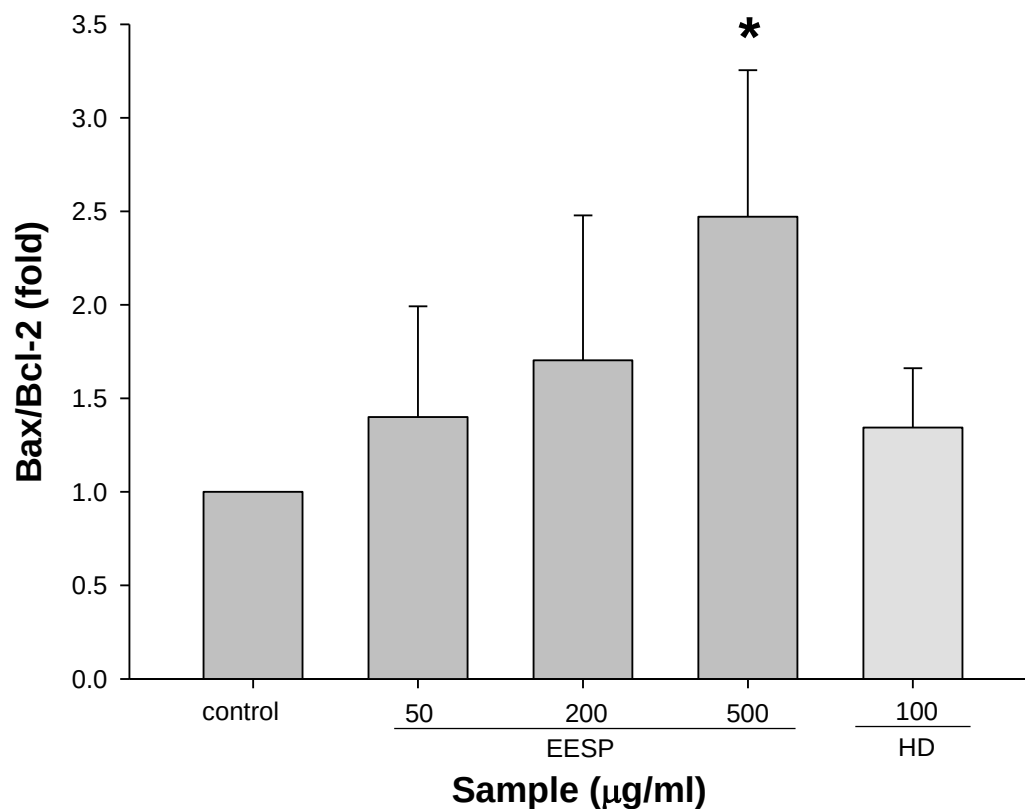
Sample ($\mu\text{g/ml}$)	Percentages of cells (%)			
	Normal	Apoptosis		Necrosis
		Early	Late	
Control	87.26 $\pm$ 0.08	1.61 $\pm$ 0.18	2.05 $\pm$ 0.53	9.09 $\pm$ 0.64
EESP(50)	90.62 $\pm$ 0.88	1.23 $\pm$ 1.12	1.78 $\pm$ 0.52	6.38 $\pm$ 0.75
EESP(200)	76.33 $\pm$ 0.01	6.92 $\pm$ 0.18 *	2.72 $\pm$ 0.51	13.86 $\pm$ 0.09
EESP(500)	58.91 $\pm$ 7.42 *	14.44 $\pm$ 3.12 *	6.22 $\pm$ 3.30	20.44 $\pm$ 1.00 *
HD(100)	82.39 $\pm$ 2.16	1.57 $\pm$ 0.62	2.63 $\pm$ 0.33	13.42 $\pm$ 1.20

The cells were exposed to EESP (50-500 $\mu\text{g/ml}$) and HD (100 $\mu\text{g/ml}$) respectively, for 36hr. The cells were harvested and stained with annexin V-FITC and propidium iodide (PI).



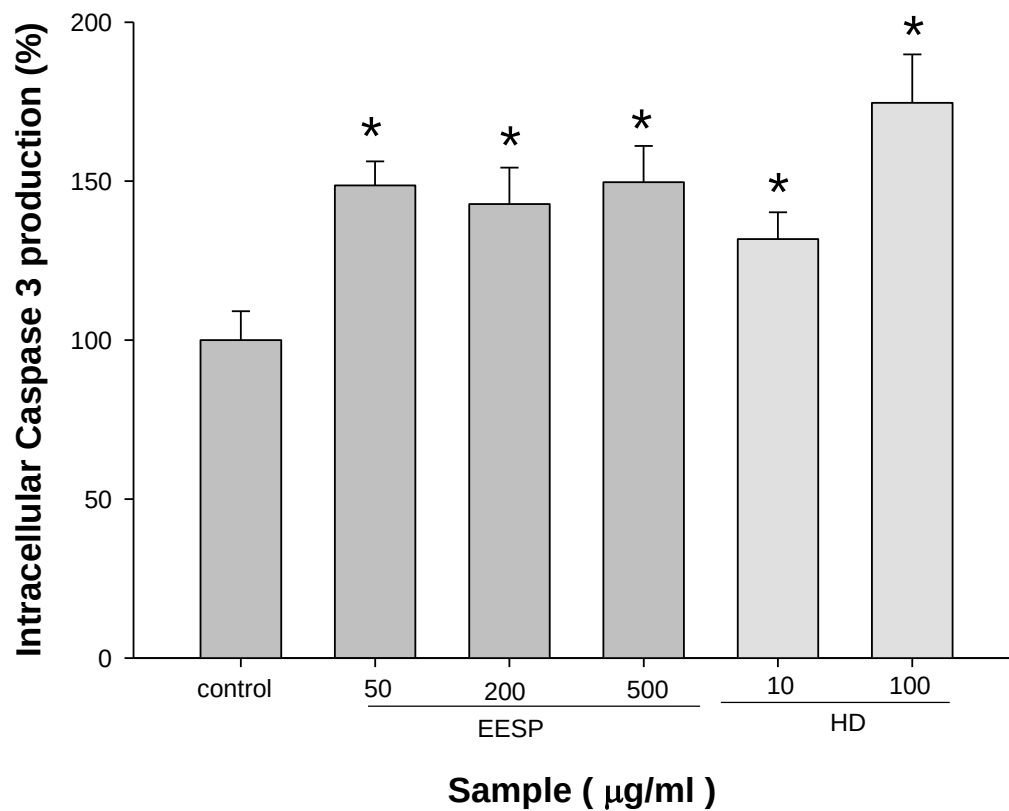
圖二十二 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)作用 HepG2 細胞作用 4 小時對粒線體膜電位影響

Figure 22. Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) and hesperidin (HD) on mitochondrial membrane potential in HepG2 cells. The cells were treated with EESP and HD, respectively, for 4 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



圖二十三 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)作用 Hep G2 細胞 3 小時對 Bax/Bcl-2 比率之影響

Figure 23. Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP), hesperidin (HD) and on the ratios of Bax/Bcl-2 in HepG2 cells. The cells were treated with EESP and HD , respectively, for 3 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



圖二十四 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)與 hesperidin (HD)作用 Hep G2 細胞
作用 16 小時
對 caspase-3 生成影響

Figure 24. Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) and hesperidin (HD) on caspase 3 activity in HepG2 cells. The cells were treated with EESP and HD ,respectively, for 16 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.

表八橙皮乙酸乙酯萃取物對裸鼠肝腫瘤生長之抑制性

Table 8 .Inhibitory effect of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) on the growth of xenografted HepG2 tumour tissue in nude mice

Groups	Tumor size ($L \times W^2 \times 0.5 \text{ mm}^3$)			
	Day 8	Day 12	Day 16	Day 18
C	0.0±0.0	0.0±0.0*	0.0±0.0	0.0±0.0
N	12.8±8.4 (25)	32.9±17.9 (37.5)	63.4±28.1 (50)	116.4±53.9 (50)
L	0.0±0.0	0.0±0.0*	0.0±0.0	19.6±10.9 (37.5)
M	0.0±0.0	0.0±0.0*	3.7±3.7 (12.5)	32.2±12.7 (50)
H	0.0±0.0	0.0±0.0*	56.2±30.1(37.5)	72.2±30.7 (62.5)

Treatment period were indicated the days after tumor inoculation. Values are means $\pm$ SE (% for tumor growth no. of mice) for eight mice per group. Control (C) and Control (N) indicate normal nude mice with normal feed and tumor injected nude mice without test sample treatment, respectively. The different doses of EESP (L,25 mg /kg bw; M, 150 mg /kg bw; H, 250 mg /kg bw) were administered orally for 18 consecutive days, starting the day after implantation of tumor cells. Visible tumor sizes on day 18 after injection of indicated HepG2 cells. Dunnett's test for multiple comparison, * $p < 0.05$ vs N.



圖二十五. 橙皮乙酸乙酯萃取物(EESP)抑制肝腫瘤作用

Figure 25. Effects of ethyl acetate extracts of sweet orange peel (EESP) on the growth of xenografted HepG2 tumour tissue in nude mice: Control (C) and Control (N) indicate normal nude mice with normal feed and tumor injected nude mice without test sample treatment, respectively. The different doses of EESP (L,25 mg /kg bw; M, 150 mg /kg bw; H,250 mg /kg bw) were administered orally for 18 consecutive days, starting the day after implantation of tumor cells.. Visible tumor sizes on day 18 after injection of indicated HepG2 cells.

柒、附錄:已發表研發成果

Chen, SY, Chyau, CC, Chuc, CC, Chen, YH, Duh, PD*. Hepatoprotection using sweet orange peel and its bioactive compound, hesperidin, for CCl₄-induced liver injury in vivo. J. Functional Foods 2013, 5, 1591-1600 (99-2313-B-041-002-MY3).

Chen, ZT, Chu, HL, Chyan, CC, Chu, CC, Duh PD* Protective effects of sweet orange (Citrus sinensis) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. Food Chemistry 2012, 135, 2119-2127 (NSC 99-2313-B-041-002-MY3).