

編號：CCMP94-RD-030

從基因體層面探討台灣赤楊 diarylheptanoid 成分之抗發炎作用

何豐名

行政院衛生署桃園醫院

摘 要

在此計畫中將進一步證實這類化合物是否可能透過影響血球細胞的附著及趨化作用而達到抗發炎的目的。希望由這些天然來源豐富，不同結構 diarylheptanoid 化合物藥物作用機轉與活性的比較及研究，有助於釐清療效的根源及將來更廣泛臨床運用及新藥的開發。

RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞經過濃度越高的 Oregonin 前處理之後，其 NO 產量就低（圖一、a）。RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞經過濃度越高的 Oregonin 前處理之後，其 iNOS 表現量就越低（圖一、b），並以 actin 作為對照。當 Oregonin 濃度越高時，HO-1 表現量就越高，反之，iNOS 的表現量就越少（圖二、a）。HO-1 在處理後的 0-24 小時中，從處理後 2 小時開始表現，以處理後 4 小時的表現量達到最大（圖二、b）。由圖可看出，當 Oregonin 濃度越高時，HO-1 表現量就越高（圖二、c），由此可推測，HO-1 基因會隨著 Oregonin 的濃度而影響其表現量。

在此研究中，我們探索 Oregonin 在 RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞中，iNOS 基因表現的調控機制。我們證實 Oregonin 確實在 RAW274.7 巨噬細胞中扮演了 NO 的抑制者角色，也證實了 Oregonin 確實有對抗 LPS 所引發的發炎反應，但是 Oregonin 調控 iNOS 的機制仍是未知。總之，在這項研究過程中，我們證實天然產物 Oregonin 具有能抑制 LPS 所引發的 iNOS 基因的轉錄及增加 HO-1 的表現。

關鍵詞：Oregonin、脂多醣、可誘導型一氧化氮合成酶、血基質氧化酶、吞噬細胞、微神經膠細胞

Number: CCMP94-RD-030

Oregonin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced iNOS Gene and NO Expression in Macrophages and Microglia

Feng-Ming Ho

Tao-Yuan General Hospital

ABSTRACT

Oregonin isolated from *Alnus formosana* is a diarylheptanoid derivative, which appears to have antioxidative and anti-inflammatory activities. In this study, our data demonstrated inhibitory actions of oregonin on the LPS-induced iNOS protein in RAW264.7 macrophages and BV-2 microglial cells. We also suggested that HO-1 induction by oregonin might contribute to this action.

In this study, we examined the effects of oregonin on LPS stimulated iNOS gene expression in murine RAW264.7 macrophages and BV-2 microglia.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose, FBS, penicillin, and streptomycin were obtained from Life Technologies. Rabbit polyclonal antibodies for β -actin, iNOS and HO-1, and protein A/G agarose beads were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.).

The methaolic extract of the dry powder of leaves of *A. formosana* Burk (Betulaceae) (4.1 kg) was divided into fractions soluble in hexane, chloroform, n-butanol (293 g) and water by liquid-liquid partitioning.

Murine RAW264.7 macrophages and BV-2 microglia were grown at 37°C in 5% CO₂ using DMEM as the culture medium. DMEM was supplemented with 10% FBS, 100U/ml penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. In most conditions for NO measurement and iNOS protein assay, cells were 30 min pretreated with 10–100

μM oregonin, followed by 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (in BV-2) or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (in RAW264.7) LPS for 24 h, unless otherwise indicated.

Nitrite production, as an assay of NO release, was measured. Accumulation of nitrite in the medium was determined by a colorimetric assay with Griess reagent. Nitrite concentrations were determined by comparison with the OD550 using standard solutions of sodium nitrite prepared in cell culture medium. Each experiment was performed in duplicate and repeated at least three times.

After incubation with agents, cells were washed twice in icecold PBS and then solubilized in buffer. Samples of equal amounts of protein (80 mg) were separated through 8-12% SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose paper by semidry electrophoretic transfer. Membranes were blocked in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST) and 5% nonfat milk for 1 h. Proteins were visualized by specific primary antibodies, followed by peroxidase-labeled secondary antibodies.

In RAW264.7 macrophages and BV-2 microglia, cotreatment with oregonin (10-100 μM) led to a concentration-dependent inhibition of both NO production and iNOS protein level stimulated by LPS. Results revealed that oregonin was able to decrease LPS-induced iNOS reporter activity in both cell types. As HO-1 induction participates in the negative regulation of iNOS expression, we attempted to determine whether oregonin has such action. oregonin (10-100 μM)-treated RAW264.7 and BV-2 cells, HO-1 protein was dose-dependently induced. LPS also induced a moderate increase of HO-1 protein level and this response was additive to oregonin. Time course analysis in RAW264.7 cells revealed that the onset for HO-1 induction by 30 mM oregonin was around 2 h and this response achieved maximum at 4 h.

Oregonin, a natural diarylheptanoid compound isolated from *A. formosana*, acts as an inhibitor of NO production in RAW264.7 macrophages, the mechanism by which oregonin regulates iNOS expression is still unknown. In this study, we explored the effect of oregonin in the regulation of iNOS gene expression in RAW264.7 macrophages and BV-2 microglia.

Keywords : Oregonin, *Alnus formosana*, lipopolysaccharide (LPS), iNOS, Ho-1, macrophage, microglia

壹、前言

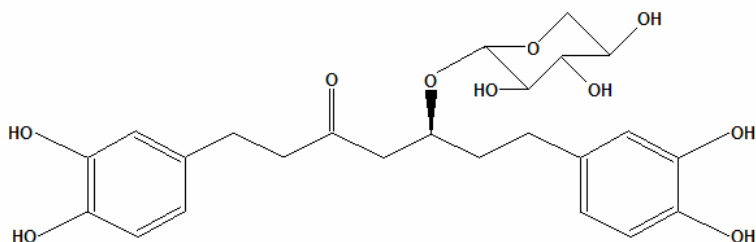
赤楊屬植物富含多種 diarylheptanoid 類成分，而台灣赤楊 (*Alnus formosana*) 也不例外，已證實含有 oregonin、alusonol、alnustone 及許多新成分，均屬於 diarylheptanoid 類結構。

diarylheptanoid 類成分是廣泛存在自然界多種植物中的一類化合物，其生物活性近年來漸漸引起重視。就目前文獻報告得知 diarylheptanoid 類結構成分一般具有抗發炎的功效。在抗炎方面的潛力是基於發現 myricanol, myricanone, oregonin 及其他 diarylheptanoid 類成分可抑制一些發炎媒介物質的表現，例如 NO、PGE₂、leukotriene。近年之研究更證實這些作用主要是因抑制 inducible NO synthase (iNOS) 及 cyclooxygenase-2 (COX-2) 蛋白基因表現而來，但真正是如何影響這些基因表現仍不明白。diarylheptanoid 類結構有各種不同的差異，有些具有 glycosides (例如 myricanol myricanone, oregonin)，有些類似於 curcumin (結構如下)，有些則是 cyclicform (如 myricanone, acerosides, aceroketoside)。就目前文獻的報告 diarylheptanoid 類結構成分一般具有抗癌，抗炎及治療寄生蟲疾病的功效。在體外細胞培養實驗已有許多報導發現不同的 diarylheptanoid 類物質可抑制癌細胞，例如 oregonin 及 *Alnus hirsuta* 中的 diarylheptanoid 可抑制黑色素瘤細胞 (Cho *et al.*, 2002)，*Alpinia oxyphylla* 中的 yakuchinone 可抑制血癌細胞 (Chun *et al.*, 2002)，而其他種植物的 diarylheptanoid 類成分也分別可抑制肺癌，直腸癌，乳癌及口腔癌細胞 (Martin-Cordero *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002b; Yokosuka *et al.*, 2002)。活體實驗也證實 myricanone, yakuchinone 對老鼠皮膚癌，oregonin 對老鼠黑色素癌有很好的治療效果，具有開發為化療藥物的潛力 (Chun *et al.*, 2002; Ishida *et al.*, 2002; Joo *et al.*, 2002)。由於已有許多文獻報告 cyclooxygenase-2 (COX-2) 表現量與癌細胞生長及癌症發生率有密切相關性，因此推測 diarylheptanoid 類成分抑制 COX-2 表現的作用可能與其抑制癌細胞生長有關 (Lee *et al.*, 2000b)。在抗發炎方面的潛力主要是基於發現 myricanol, myricanone, oregonin 及其他一些 diarylheptanoid 類成分可抑制發炎媒介物質的表現，例如 NO (Prasain *et al.*, 1998)、PGE₂、leukotriene (Kiuchi *et al.*, 1992)。近年研究證實這些作用主要是因抑制 inducible NO synthase (iNOS) (Lee *et al.* 2000a; Tao *et al.*, 2002; Morikawa *et al.*, 2003)，COX-2 (Lee *et al.*, 2000b; Chun *et al.*, 2002) 而來。活體實驗也證實對皮膚炎的老鼠有明顯療效 (Yamazaki *et al.*, 1998)。在寄生蟲疾病方面對萊

什曼原蟲 (*Leishmania amazonensis*) 及非洲錐蟲 (African trypanosome) 感染也具有治療效果 (Araujo *et al.*, 1999; Gomes Dde *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003; Kamnaing *et al.*, 2003)。

在此計畫中將進一步證實這類化合物是否可能透過影響血球細胞的附著及趨化作用而達到抗發炎的目的。希望由這些天然來源豐富，不同結構 diarylheptanoid 化合物藥物作用機轉與活性的比較及研究，有助於釐清療效的根源及將來更廣泛臨床運用及新藥的開發。

Oregonin



貳、材料與方法

一、赤楊成分之抽提與分離

本實驗之材料是由台大醫學院藥學系李水盛教授實驗室所提供。各種 diarylheptanoid 成分之分離是將赤楊葉子，依所含成分極性差異性，連續利用溶媒（甲醇、正己烷、氯仿、正丁醇）抽提分割所得到。

二、細胞培養

以含有 10%胎牛血清及抗生素（100U/mL penicillin 及 100 μ g/mL streptomycin）DMEM 培養老鼠 RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞。細胞置於 5% CO₂，37°C 培養箱中培養。方法參考 Yang *et al.* (2004)。

三、Nitrite 產量之測定

Nitrite 的產量可做為 iNOS 活性的指標。將細胞培養在 24-well plates 中，直到細胞長滿後，換成 500 μ L 新鮮培養液，加入 IFN- γ 、LPS 和不同濃度 diarylheptanoid 成分，24 小時後收集細胞培養液然後測量 nitrite 含量。Nitrite 測定是取 100 μ L 培養液加入 100 μ L 的 Griess reagent（1% sulfanilamide 及 0.1% naphthylethylenediamide 溶於 5% phosphoric acid），用 microplate reader 測定 nitrite 含量，其吸收波長為 550nm。而 nitrite 之標準濃度曲線圖則用不同濃度 sodium nitrite 泡在培養液中當做標準液。

四、細胞抽取物之製備

將加藥反應後之細胞以冰冷的 PBS 清洗兩次然後置於冰上終止反應，加入適量的 lysis buffer（20mM Tris-HCl, pH7.5; 125mM NaCl; 1% Triton X-100; 1mM MgCl₂; 1mM PMSF; 25mM β -glycerophosphate; 50mM NaF; 100 μ M sodium orthovanadate; 10 μ g/mL leupeptin; 10 μ g/mL aprotinin），將細胞完全收集至離心管，靜置 30 分鐘，以 14,000 rpm，4°C 離心 30 分鐘，取上清液即為細胞抽取物。

五、SDS-PAGE 及西方點墨法

取一定量的蛋白質，加入 5X Laemmli buffer 在 100°C 下煮 5 分鐘。利用 SDS-PAGE 電泳分離蛋白質。電泳完畢後，利用半乾式石墨電極板進行轉印。

六、免疫染色法

將轉印上蛋白質之 nitrocellular paper 浸泡於 blocking 溶液（含有 5% 脫脂奶粉）中，室溫下輕輕搖晃 1 小時，以含有 0.5% Tween 20 之 Tris-base saline (TBS) 洗去 blocking 溶液（5 分鐘），泡入以適量之特定抗體，室溫下作用 90 分鐘，使抗體和特定蛋白質結合。接著以 TBST 清洗 3 次（每次 10 分鐘），再泡入含有結合酵素之第二抗體，使之與第一抗體結合，同樣作用 90 分鐘，以 TBST 清洗 3 次後，加入 ECLTM 溶液以 X 光片偵測特定蛋白質的表現。

參、結果

RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞，都皆以不同濃度的 Oregonin (0, 10, 30, 100 μ M) 前處理 30 分鐘後，再分別以 LPS (1 μ g/mL) 及 LPS (0.1 μ g/mL) 處理 24 小時後，測其 NO 的量。由圖可看出 RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞經過濃度越高的 Oregonin 前處理之後，其 NO 產量就低 (圖 1a)。

萃取經過不同濃度的 Oregonin (0, 10, 30, 100 μ M) 前處理 30 分鐘後，再分別以 LPS (1 μ g/mL) 及 LPS (0.1 μ g/mL) 處理 24 小時後，RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞的蛋白質，測定其 iNOS 的表現量。由圖可看出 RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞經過濃度越高的 Oregonin 前處理之後，其 iNOS 表現量就越低 (圖 1b)，並以 actin 作為對照，圖中括弧中的數字越低，代表 iNOS 表現量越低。

以不同濃度的 Oregonin (0, 10, 30, 100 μ M) 前處理 RAW274.7 巨噬細胞 30 分鐘後，再比較有 LPS (1 μ g/mL) 處理及沒有 LPS 處理 24 小時後，觀察其 HO-1 及 iNOS 之間表現之差異。由圖可看出，當 Oregonin 濃度越高時，HO-1 表現量就越高，反之，iNOS 的表現量就越少 (圖 2a)，由此可推測，HO-1 基因的確有調控 iNOS 表現的功能。

以相同濃度 (30 μ M) 的 Oregonin 處理 RAW274.7 巨噬細胞，再以不同時間點去分析 HO-1 的表現量。由圖可看出，HO-1 在處理後的 0-24 小時中，從處理後 2 小時開始表現，以處理後 4 小時的表現量達到最大 (圖 2b)。

以不同濃度的 Oregonin (0, 10, 30, 100 μ M) 前處理 BV-2 微神經膠細胞，再以 LPS (0.1 μ g/mL) 處理 24 小時後，觀察其 HO-1 表現量。由圖可看出，當 Oregonin 濃度越高時，HO-1 表現量就越高 (圖 2c)，由此可推測，HO-1 基因會隨著 Oregonin 的濃度而影響其表現量。

肆、討論

台灣赤楊 (*Alnus formosana*) 係樺木科 (*Betulaceae*) 赤楊屬之植物，植物形態為落葉常綠喬木，廣泛分佈於琉球與台灣。赤楊屬植物在全球約有 30 種，而目前在台灣地區只有一種。台灣赤楊的分布極廣，生長地形可由海拔 400 公尺一直上升到 3,000 公尺的山區。台灣赤楊除對台灣土壤保持扮演著重要的角色外，其藥用價值也有待開發。文獻中已報導同屬植物有許多為亞洲居民之傳統民間用藥，通常用於治療發燒、出血、腹瀉及宿醉等 (Lee, 1966)。此外，這類植物之葉糊藥可用於減輕頭痛和腫脹。

在此研究中，我們探索 Oregonin 在 RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞中，iNOS 基因表現的調控機制。我們證實 Oregonin 確實在 RAW274.7 巨噬細胞中扮演了 NO 的抑制者角色，也證實了 Oregonin 確實有對抗 LPS 所引發的發炎反應，但是 Oregonin 調控 iNOS 的機制仍是未知。總之，在這項研究過程中，我們證實天然產物 Oregonin 具有能抑制 LPS 所引發的 iNOS 基因的轉錄及增加 HO-1 的表現。

目前我們努力希望能闡述，Oregonin 是以如何的訊息路徑去調控 HO-1 蛋白質的表現，並且驗證細胞內的氧化及氮化的壓力是否會調節此訊息傳遞。之後的重點則在 RAW274.7 巨噬細胞中，是否會經由超氧離子及 NO 產生去增加調節 HO-1 的表現 (Srisook & Cha, 2004)。

伍、結論與建議

這項研究過程中，我們證實 Oregonin 確實在 RAW274.7 巨噬細胞中扮演了 NO 的抑制者角色，也證實了 Oregonin 確實有對抗 LPS 所引發的發炎反應；也證實天然產物 Oregonin 具有能抑制 LPS 所引發的 iNOS 基因的轉錄及增加 HO-1 的表現。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-030 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Alves LV, and Temporal RM. Cysne-Finkelstein L, Leon LL. Efficacy of a diarylheptanoid derivative against *Leishmania amazonensis*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 2003, 98: 553-555.
2. Araujo CA, Alegrio LV, Gomes DC, Lima ME, Gomes-Cardoso L, Leon LL. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1999, 94: 791-794.
3. Cho SM, Kwon YM, Lee JH, Yon KH, Lee MW. Melanogenesis inhibitory activities of diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* Turcz in B16 mouse melanoma cell. Arch. Pharmacol Res 2002, 25: 885-888.
4. Chun KS, Park KK, Lee J, Kang M, Surh YJ. Inhibition of mouse skin tumor promotion by anti-inflammatory diarylheptanoids derived from *Alpinia oxyphylla* Miquel (Zingiberaceae). Oncol. Res 2002, 13: 37-45.
5. Gomes Dde C, Alegrio LV, de Lima ME, Leon LL, Araujo CA. (2002) Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. Arzneimittel-Forschung. 52: 120-124.
6. Ho FM, Lai CC, Huang LJ, Kuo TC, Jhao CM, Lin WW. LCY-2-CHO.
7. Inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator expression through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. Br J Pharmacol 2004.
8. Ishida J, Kozuka M, Tokuda H, Nishino H, Nagumo S, Lee KH, Nagai M. Chemopreventive potential of cyclic diarylheptanoids. Bioorganic Med Chem 2002, 10: 3361-3365.
9. Joo SS, Kim MS, Oh WS, Lee DI. Enhancement of NK cytotoxicity, antimetastasis and elongation effect of survival time in B16-F10 melanoma cells by oregonin. Arch Pharmacol Res 2002, 25: 493-499.
10. Kamnaing P, Tsopmo A, Tanifum EA, Tchuendem MH, Tane P, Ayafor JF, Sterner O, Rattendi D, Iwu MM, Schuster B, Bacchi C. Trypanocidal diarylheptanoids from *Aframomum letestuiianum*. J Natural Products 2003, 66: 364-367.
11. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F., Sankawa U. Inhibition of

- prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem Pharmaceutical Bull* 1992, 40: 387-391.
12. Lee SJ. "Korea Folk Medicine" Seoul National University Publishing Center Press, Seoul 1996, 40.
 13. Lee JS, Kim HJ, Park H, Lee YS. New diarylheptanoids from the stems of *Carpinus cordata*. *J. Natural Products* 2002a, 65: 1367-1370.
 14. Lee MW, Kim JH, Jeong DW, Ahn KH, Toh SH, Surh YJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by diarylheptanoids from the bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*. *Biol. Pharmaceutical Bull* 2000b, 23: 517-518.
 15. Lee KS, Li G, Kim SH, Lee CS, Woo MH, Lee SH, Jhang YD, Son JK. Cytotoxic diarylheptanoids from the roots of *Juglans mandshurica*. *J Natural Products* 2002b, 65: 1707-1708.
 16. Lee MW, Kim NY, Park MS, Ahn KH, Toh SH, Hahn DR, Kim YC, Chung HT. Diarylheptanoids with in vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hirsuta*. *Planta Medica* 2000a, 66: 551-553.
 17. Martin-Cordero C, Lopez-Lazaro M, Agudo MA, Navarro E, Trujillo J, Ayuso MJ. A cytotoxic diarylheptanoid from *Viscum cruciatum*. *Phytochemistry* 2001, 58: 567-569.
 18. Morikawa T, Tao J, Toguchida I, Matsuda H, Yoshikawa M. Structures of new cyclic diarylheptanoids and inhibitors of nitric oxide production from Japanese folk medicine *Acer nikoense*. *J Natural Products* 2003, 66: 86-91.
 19. Prasain JK, Tezuka Y, Hase K, Basnet P, Dong H, Namba T, Kadota S. Inhibitory effect of diarylheptanoids on nitric oxide production in activated murine macrophages. *Biol Pharmaceutical Bull* 1992, 21: 371-374.
 20. Srisook K, Cha YN. Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol* 2004, 68: 1709-1720.
 21. Tao J, Morikawa T, Toguchida I, Ando S, Matsuda H, Yoshikawa M. Inhibitors of nitric oxide production from the bark of *Myrica rubra*: structures of new biphenyl type diarylheptanoid glycosides and taraxerane type triterpene. *Bioorg Med Chem* 2002, 10: 4005-4012.
 22. Yamazaki R, Aiyama R, Matsuzaki T, Hashimoto S, Yokokura T.

- Anti-inflammatory effect of YPE-01, a novel diarylheptanoid derivative, on dermal inflammation in mice. *Inflam Res* 1998, 47: 182-186.
23. Yang CR, Hsieh SL, Wang JH, Hsu JL, Lin WW. Decoy receptor 3 (DcR3) induces osteoclast formation from human monocytes and murine RAW 264.7 macrophages. *Cell Death Diff* 2004, 11: S97-S107.
 24. Yokosuka A, Mimaki Y, Sakagami H, Sashida Y. New diarylheptanoids and diarylheptanoid glucosides from the rhizomes of *Tacca chantrieri* and their cytotoxic activity. *J Natural Products* 2002, 65: 283-289.
 25. 衛生署桃園醫院：衛生署桃園醫院簡介，2000。
 26. 衛生署桃園醫院：衛生署桃園醫院人體試驗委員會規章及管理辦法，2000。
 27. 劉麗玲 (1996)：我國藥品臨床試驗之實施和管理概況。衛生報導，6 (7)，19-24。
 28. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣常用藥用植物圖鑑，2004。
 29. 行政院衛生署中醫藥委員會：中醫藥年報第 22 期。
 30. 行政院衛生署中醫藥委員會：92 年度中醫藥研究計畫成果報告中英文摘要彙編。

柒、圖

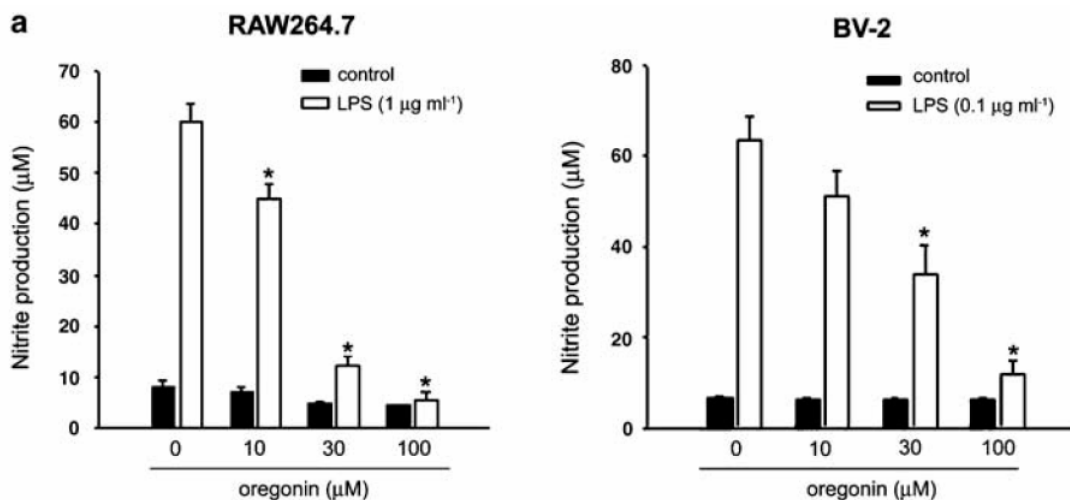


圖 1a RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞，都皆以不同濃度的 Oregonin (0, 10, 30, 100µM) 前處理 30 分鐘後，再分別以 LPS (1µg/mL) 及 LPS (0.1µg/mL) 處理 24 小時後，測其 NO 的量。

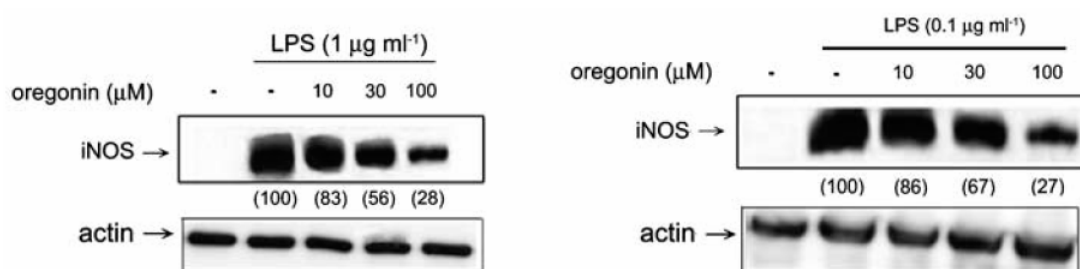


圖 1b 萃取經過不同濃度的 Oregonin (0, 10, 30, 100µM) 前處理 30 分鐘後，再分別以 LPS (1µg/mL) 及 LPS (0.1µg/mL) 處理 24 小時後，RAW274.7 巨噬細胞及 BV-2 微神經膠細胞的蛋白質，測定其 iNOS 的表現量。

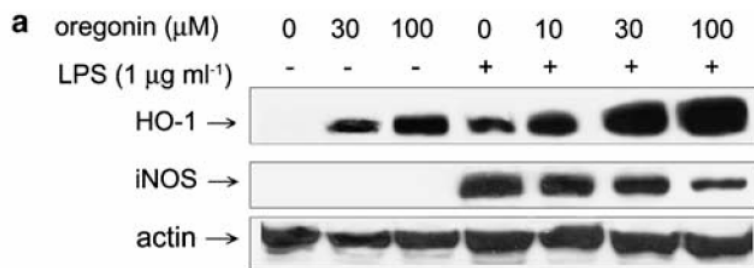


圖 2a 以不同濃度的 Oregonin (0, 10, 30, 100 μM) 前處理 RAW274.7 巨噬細胞 30 分鐘後，再比較有 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理及沒有 LPS 處理 24 小時後，觀察其 HO-1 及 iNOS 之間表現之差異。

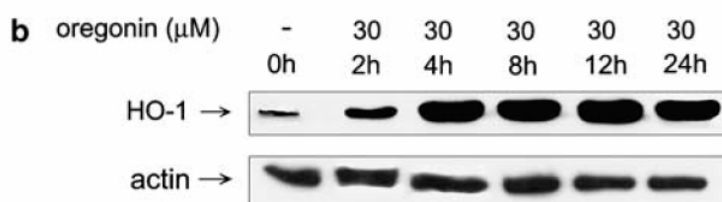


圖 2b 以相同濃度 (30 μM) 的 Oregonin 處理 RAW274.7 巨噬細胞，再以不同時間點去分析 HO-1 的表現量。

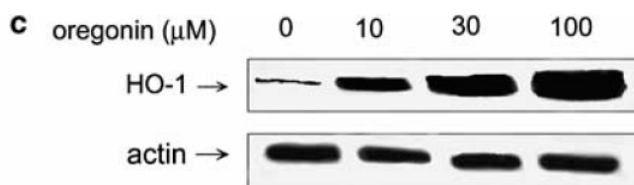


圖 2c 以不同濃度的 Oregonin (0, 10, 30, 100 μM) 前處理 BV-2 微神經膠細胞，再以 LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理 24 小時後，觀察其 HO-1 表現量。

