

臺北醫學大學 醫學院 醫學科學研究所
碩士論文

Taipei Medical University
Graduate Institute of Medical Science
Master Thesis

Coumarin 衍生物的抗氧化作用之活性探討

Study on the antioxidant activity of coumarin



研究生：周 裕 翔 (Yu-Shiang Chou)

指導教授：周敦穗 博士 (Duen-Suey Chou, Ph. D)

許準榕 博士 (Joen-Rong Sheu, Ph. D)

中華民國九十九年六月

June, 2010

目錄

中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
縮寫表.....	5
壹、緒論.....	6
貳、材料與方法	
實驗材料.....	19
實驗方法.....	23
參、結果.....	27
肆、討論.....	30
伍、結論與展望.....	34
陸、附圖.....	35
柒、圖表.....	37
捌、參考文獻.....	47

中文摘要

在之前的研究中我們確定了 baicalein 會刺激 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞株產生 superoxide 及 hydroxyl radical，且認為此 reactive oxygen species (ROS)的生成過程與 arachidonic acid (AA)的代謝路徑有關，同時 baicalein 也造成了細胞存活率下降和細胞凋亡。本次研究我們用 electron spin resonance (ESR)直接分析不同的系統，來偵測 coumarin 衍生物的抗氧化活性。第一個系統是使用 DPPH，分析結果發現各種 coumarin 衍生物皆有抗氧化的活性；第二個系統是 xanthine oxidase / hypoxanthine 系統，直接偵測 superoxide 的強度，結果發現各種 coumarin 衍生物也都有抗氧化的活性；第三個系統是直接分析 B16F10 老鼠黑色素瘤腫瘤細胞受到 baicalein 刺激後所釋放之 hydroxyl radical，結果發現在 coumarin 衍生物中的 Mei-174、Mei-215、Mei-228、Mei-234 也有抗氧化的活性。我們也使用 MTT assay 來觀察其對於 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞是否可以減少 baicalein 所造成的細胞存活率下降，結果發現給予各種 coumarin 衍生物皆沒有明顯的影響。各種 coumarin 衍生物在不同系統的抗氧化程度可供日後繼續探討其機轉的參考。

Abstract

In our previous study, we demonstrated that baicalein induced superoxide and hydroxyl radical formation in B16F10 mouse melanoma cell line. We also found the reactive oxygen species (ROS) production is related to the arachidonic acid (AA) metabolism way. Simultaneously baicalein caused reduction of cellular viability and cell apoptosis. In this study, we use electron spin resonance (ESR) to analyze different systems, investigating the antioxidant activity of coumarin derivatives. System I using DPPH and found that coumarin derivatives all have the antioxidant activity. System II is xanthine oxidase / hypoxanthine system, directly investigating the superoxide intensity, and we found that coumarin derivatives also all have the antioxidant activity. System III directly analyze baicalein induced hydroxyl radical formation in B16F10 mouse melanoma, we found that coumarin derivatives Mei-174、Mei-215、Mei-228 and Mei-234 have the antioxidant activity. We also use coumarin derivatives to observe whether they can reduce the reduction of cellular viability effect to baicalein in B16F10 cell by MTT assay, the data show that coumarin derivatives have no obvious effect on cellular

viability. The antioxidant activity of coumarin derivatives in different systems can refer to the future study of their mechanism.



縮寫表

AA	Arachidonic acid
BSA	Bovine serum albumin
DMEM	Dubecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulphoxide
DTPA	Diethylene triamine pentaacetic acid
EPR	Electron paramagnetic spin resonance
ESR	Electron spin resonance
FCS	Fetal calf serum
HPX	Hypoxanthine
MTT	Tetrazolium dye 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate-buffered saline
XO	Xanthine oxidase

壹、緒論

1. Coumarin

Coumarin (1,2-benzopyrone)包括融合的苯環以及 α -pyrone 環，是一系列重要的低分子量酚類 (Fylaktakidou *et al.*, 2004)。Coumarins 包括一系列天然的酚類化合物，根據化學結構可以分成許多種不同的種類；它們可以在很多植物及食物製品中發現，像是柑橘類的水果、蔬菜以及綠茶中。目前已經有上千種的 coumarin 衍生物被分離出來，有些來自於大自然，有些是經由實驗室合成 (Egan *et al.*, 1990, Hoult & Paya, 1996)。

Coumarin 及其衍生物有生物活性及藥理活性，而且對於人體的健康有潛在的益處所以受到注意 (Hoult & Paya, 1996)。之前的研究中發現 coumarin 及其衍生物有抗愛滋 (Lee, 2004, Bedoya *et al.*, 2005)、抗凝血 (Kidane *et al.*, 2004)、抗菌 (Appendino *et al.*, 2004, Khan *et al.*, 2004)、抗腫瘤 (Ito *et al.*, 2003, Kostova, 2005)、驅蟲 (Lee *et al.*, 1998)、抗發炎 (Ghate *et al.*, 2003, Kontogiorgis & Hadjipavlou-Litina, 2005)以及抗氧化的活性 (Hoult & Paya, 1996, Raj *et al.*, 1998, Kontogiorgis & Hadjipavlou-Litina, 2004, Wu *et al.*,

2007)。典型的例子來看，warfarin 有殺蟲以及抗凝血的活性；phenprocoumon 有抗病毒以及抗愛滋的活性。因為其所擁有的這些特性，使的 coumarin 的衍生物成為本次研究的重心。

Coumarin 及其衍生物之前曾經被當作 arachidonic acid (AA)代謝路徑的 lipoxygenase (LOX) 和 cyclooxygenase (COX) 抑制劑 (Kontogiorgis & Hadjipavlou-Litina, 2003)。也有研究探討過 coumarin 的 structure activity relationships (SARs)和酵素之間的關係 (Chang & Chiang, 1995, Ferrari *et al.*, 2007)。研究發現 coumarin 的苯乙烯羰基衍生物有著明顯的抗發炎活性 (Ghate *et al.*, 2005, Khan *et al.*, 2005)。在之前的研究中使用了 cloricromene (8-monochloro-3-b-diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxy-carbonyl-methoxy coumarin)以及一些合成的類似物，發現有抗發炎及抗氧化的活性 (Maltese *et al.*, 2007)。另外有一些 aminocoumarin 的類似物在雜環的 C3 上有氨基鑰結，可以作為強力的抗生素，像是 novobiocin、chlorobiocin、coumermycin 以及 simocyclinone (Tao *et al.*, 2003, Galm *et al.*, 2004)。也有一種新的 4-hydroxycoumarin-3-carboxamide 合成衍生物，用來治療 Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM)。

因為研究類黃酮潛在的抗氧化活性，對於找到有效的抗氧化物吸引了研究人員的注意 (Justino *et al.*, 2004)。在文獻中有很多證據指出多酚類是還原劑，可以捕捉自由基以及參與製造維他命 E 等抗氧化物 (Rice-Evans *et al.*, 1996)。很多 coumarin 衍生物有特殊的能力去捕捉 ROS，而且會去影響自由基所造成的傷害 (Liu *et al.*, 1999)。Coumarins 擁有抗氧化的能力可能是因為其結構上類似類黃酮和苯甲酮的關係 (Farombi & Fakoya, 2005)。事實上這種結構會和過渡金屬元素鍵結，像是三價的鐵離子，所以 Fenton's reaction 所產生的氫氧自由基以及過氧化氫的生成可以被其抑制。另外因為電子會經過分子進行移位，結構上的氫氧基對於自由基的接受者是強力的氫離子供給者 (Martins *et al.*, 2004, Sharma *et al.*, 2005)，所以 coumarin 衍生物可以作為強力的 ROS 捕捉劑和金屬的螯合劑。本篇著重在抗氧化的探討上，針對本校藥物化學研究所合成的十一種新的 coumarin 衍生物利用不同系統來偵測其氧化的活性。

2. Baicalein

(5,6,7-trihydroxyl-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)

Scutellaria baicalensis Georgi 是唇形科植物黃芩的塊狀根，為一種常用的中藥，主要功能有清熱燥濕、瀉火解毒、止血和安胎等。

黃芩含有多種類黃酮 (flavonoids)的衍生物，而 baicalein (5,6,7-trihydroxyl-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)就是其中的一種，它的藥物特性包含有抗血栓、抗發炎、抗癌、抗氧化、抗原生生物、抗纖維化等作用 (Hsu *et al.*, 2001, Schuppan & Popov, 2002, Wang *et al.*, 2004, Fujita *et al.*, 2005)。過去許多文獻已證明，baicalein 具有強烈選擇性的抑制 12-lipoxygenase (12-LOX) (Natarajan *et al.*, 1988, Okuda *et al.*, 1994)。

在心血管研究方面，Liu *et al.* 的研究認為在人類臍靜脈血管內皮細胞內 baicalein 可以明顯抑制 matrixmetalloproteinase-2 (Hess *et al.*) 的活性因而認為這物質具有調控血管增生的功能 (Liu *et al.*, 2003)。在小牛頸動脈中，baicalein 可以抑制 arachidonic acid 6 和 platelet derived growth factor (PDGF)所誘發的細胞遷移(migration) (Kanayasu-Toyoda *et al.*, 1998)。另外在 Nishio 和 Watanabe 發現 baicalein 在主動脈血管平滑肌細胞具有明顯抗細胞增生的作用 (Nishio & Watanabe, 1997)。Baicalein 在人類臍靜脈血管內皮細胞可以抑制 thrombin 引發的 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 表現 (Kimura *et al.*, 1997)。而且 baicalein 可以抑制血小板 lipoxygenase (LOX)同時也作為一個強效的降血壓物質 (Chen *et*

al., 2004)。另外，baicalein 可以加強血管收縮物質 (從兔子動脈血管純化)像是 noradrenaline, phenylephrine, serotonin 和 vasopressin 對其接受器的敏感性 (Huang *et al.*, 1994)。

在癌症的研究當中 baicalein 也具有其抗癌的特性；之前的研究指出，baicalein 被發現具有誘導多種癌細胞 antiproliferation 及 apoptosis 的效果 (Sekiya & Okuda, 1982)。Nie *et al.* 的研究發現 baicalein 在人類前列腺癌細胞 PC-3 可以經由抑制 12-lipoxygenase 來減低 VEGF 的表現，進而調節癌細胞所造成的血管新生作用 (Nie *et al.*, 2006)。也有研究發現 baicalein 在人類的舌癌細胞上會促進一些 apoptotic protein 表現，像是 p53, BAX, cytochrome c, 和 capase-3 等等，並減低 BCL-2 的表現。在 Chao Ji *et al.* 的研究中證實了 baicalein 相對於其他的 flavonoids，可以明顯的抑制人類膀胱癌細胞生長和凋亡 (Lin *et al.*, 2007b)。

3. Reactive Oxygen Species (ROS)

在呼吸的過程，adenosine-di-phosphate (ADP)轉變成 adenosine-triphosphate (ATP) 必須依靠電子在粒線體中各種 complexes 之間的傳遞而形成氫離子梯度。Oxygen (O₂)在呼吸傳遞鏈 (respiratory chain)中扮演最後的電子接受者，最終和四個 H⁺ 結

合而形成兩分子的 H_2O 。但是電子傳遞鏈過程並不能非常有效的去完成整體傳遞的動作，有些電子仍會從粒線體電子傳遞鏈複合物 (electron transport complexes) 中流失 (Jezek & Hlavata, 2005)。

大約 1-5% 的氧分子會接收電子，轉變成超氧自由基 superoxide (O_2^-)，再進而還原成各種不同的氧原子代謝物，我們通稱這類物質為 Reactive Oxygen Species (ROS) (Karihtala & Soini, 2007)。過去的研究認為 ROS 由白血球釋放後，具有保護細胞的功能並且能破壞外來病原體。但近來的研究發現，ROS 在細胞生長過程所需的訊息傳遞上也扮演重要的角色。變異的 ROS 訊息可能會造成一些生理上或病理上的改變，如細胞週期進行的改變、aging、infarction/reperfusion 的傷害、和一些 complex diabetes 等 (Wu, 2006)。

除了粒線體內的電子傳遞外細胞內還有許多地方也會生成 ROS，如 cytochrome P450 enzyme 內質網膜 (Rashba-Step *et al.*, 1993)。

hydrogen peroxide (H_2O_2) 在 peroxisome 經由 flavin oxidases 催化形成；發炎細胞和血管內皮細胞內的 NADPH oxidases (Babior, 2000, Forman & Torres, 2002)。

還有利用 UV 光活化氧原子 (Ichihashi *et al.*, 2003) 等等。ROS 依其電子成對性可以細分為兩種不同的群

體，一種為 non-radical species，另一種為 radical species。像是 (superoxide $O_2^{\cdot -}$)、hydroperoxyl radical ($HO_2^{\cdot -}$)、hydroxyl radical (OH^{\cdot})、carbonate ($CO_3^{\cdot -}$)、alkoxyl (RO^{\cdot}) 屬於 radical species。而 non-radical species 包含了 H_2O_2 、hydrogen chloride (HOCl)、fatty acid hydroperoxide (FaOOH)、reactive aldehydes 和單氧活化物 (singlet oxygen) 等等 (Jezek & Hlavata, 2005)。

至於 ROS 對細胞的傷害主要是依據是否形成反應性高的 ROS 或其在細胞間擴散的情形，如果造成細胞的傷害過大就會使細胞趨向死亡。儘管 ROS 和其存在的環境所進行的交互作用看似對細胞沒有益處，但是它們同時也有訊息傳遞的功用。在眾多的研究中發現少量的 ROS 具有顯著的調節基因的 transcription，cell proliferation 和 differentiation 的功用 (Finkel, 2001, Liu *et al.*, 2005, Fruehauf & Meyskens, 2007)。因此在正常情況下，細胞內會存在著製造跟解毒 (detoxification) 的機制去維持 ROS 的恆定。如果這樣的恆定因為 ROS 大量的製造或是解毒的功效喪失而失去平衡，則會使得細胞內的 ROS 含量上升而造成氧化壓力提高 (Finkel, 2001)。但是如果細胞只有少量甚至沒有 ROS 的存在，那會使的細胞停留在休止期 (quiescence) 狀態，而過量的 ROS 則會高度地刺

激細胞的信號傳遞，最後造成細胞 proliferation 或 apoptosis (Mates & Sanchez-Jimenez, 2000)。

4. Electron spin resonance (ESR)

Electron spin resonance (ESR) 又稱 Electron paramagnetic spin resonance (EPR)，一般而言，電子角動量量子化的方向為任意的，但若原子是在一外加的強磁場中時，則角動量量子化的方向乃指向磁場方向。在常溫時若一群軌道角動量為零的原子被置於一外加均勻強磁場中時，根據查曼效應 (Zeeman Effect) $E = \epsilon = h\nu = g_e\mu_B B_0$ ，由於電子的自旋磁偶極矩在磁場中可以有順磁和逆磁兩個方向，使得電子在原本只有一條的能階在磁場中會分裂成二條。因為電子的磁量子數 m_s 等於 $1/2$ 或 $-1/2$ ，分裂後的能階差可證得只與外加磁場強度成正比。

若在水平方向輸入一電磁波 (microwave) 能量，而給的能量剛好為該能階差，即可將低能階狀態 (此時 $m_s = +1/2$) 的電子激發至高能階 ($m_s = -1/2$)，這種電子吸收電磁波能量而產生能階跳躍的現象即稱為電子順磁共振。因此可知，不同的自由基具有不同的 g factor (即 g_e 值)，使得 ESR 圖譜中每個 peak 的間格和數目也不同，大致上來說，和電子相互作用的核的自旋形式、強度、數量

有很密切的關係。

在偵測各種 coumarin 衍生物的抗氧化活性上，本篇使用了三個 ESR 分析系統。第一個系統 (Lin *et al.*, 2008) 藉由 DPPH 產生的自由基，直接來看各種 coumarin 衍生物抑制自由基生成的情形。在第二個系統中 (Lin *et al.*, 2008)，藉由分析 xanthine oxidase / hypoxanthine 系統，在含有酵素的環境下分析各種 coumarin 衍生物的抗氧化活性。在第三個 ESR 分析系統中 (Chou *et al.*, 2005, Chou *et al.*, 2009)，藉由 baicalein 誘發 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞株產生 hydroxyl radical，在含有細胞的情況下偵測抗氧化的活性則更能符合生理上的意義。

因為自由基的半衰期很短，所以在第二個和第三個系統中，使用了 spin trapping 的技術。ESR 利用 DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide) 當作自由基的受質，作為電子自旋的捕捉劑，可以廣泛的用來偵測 superoxide anion radical (Finkelstein *et al.*, 1979)。本次所使用的電子捕捉劑 DMPO 和氫氧自由基作用後，其 N 端上氧的不成對電子會和 N 和鄰近的 H 進行共振作用。

舉例來說，在第三個 ESR 分析系統中，根據電子的躍遷作用原理，氮的磁量子數 $M_I = -1, 0, 1$ ，電子自旋量子數 $M_S = +1/2, -1/2$ 會有六個自旋狀態相對應的能量，分別為

$$E_1 (+1/2, 1)$$

$$E_2 (+1/2, 0)$$

$$E_3 (+1/2, -1)$$

$$E_4 (-1/2, 1)$$

$$E_5 (-1/2, 0)$$

$$E_6 (-1/2, -1)$$



在此六個能階中，只能產生三個躍遷選擇，即 $\Delta E_1 E_6$ 、 $\Delta E_2 E_5$ 、和 $\Delta E_3 E_4$ ，因此可以在 ESR 中看見三條光譜線。而後在 H 原子上（氮磁量子數 $M_I = +1/2, -1/2$ ，電子自旋量子數 $M_S = +1/2, -1/2$ ），會產生兩條光譜線（ $\Delta E_1 E_4$ 、 $\Delta E_2 E_3$ ）進行疊加的作用，因而最終得到的是 1:2:2:1 強度的光譜。

5. Melanoma cell

惡性黑色素瘤在各種癌症中屬於一種高侵入性和高轉移性的癌細胞，而黑色素瘤同樣的也可漸進式的形成惡性腫瘤；而它的死亡

率和其他癌症相比較起來在近年來有迅速增加的趨勢。現今針對惡性黑色素瘤主要治療方針，主要是外科切除手術和全身性的化學治療 (Abe *et al.*, 2007)。黑色素瘤主要在表皮細胞基底層內的色素細胞(melanocyte)中生成，色素細胞初期不正常的增生會增加表皮細胞內形成黑色素細胞 (melanocytic naevi)，且依不同增生的情形可分為多種病程；過程大多不會形成具有致死性的疾病，但是少數會開始擴散。初期異常增生的黑色素細胞在表皮細胞或其附近幾乎是以橫向發展的方式蔓延；我們稱這時期為輻射狀生長期 Radial Growth Phase (RGP)，這時期通常都有良好的預後。然而進入垂直生長期 Vertical Growth Phase (VGP)，代表異常增生的黑色素細胞侵入到皮層 (dermis)內，在臨床上相較於前期危險性更高 (Gaggioli & Sahai, 2007)。研究發現在各種人類黑色素瘤細胞株中有 12-LOX 的表現，認為 12-LOX 和黑色素細胞生長有關以至於可以做為一個治療指標 (Winer *et al.*, 2002)。

6. Reactive Oxygen Species and melanoma

在正常皮膚的表皮細胞內的 melanocyte 是一個適度缺氧的地方，因其介於皮膚和表現微血管之間；而在最近研究中發現 melanocytes 會表現出 hypoxia induce factor-1alpha (HIF-1 α)並且需要 AKT 去介入其中 transformation (Bedogni *et al.*, 2005)。AKT 是

一個 serine/threonine kinase 並可以調節一些生長因子和細胞外的訊息 (extracellular signals) 進而去控制細胞反應，平時並不會表現在人類皮膚表面，但是在 melanoma cell 裡面可以發現高活性的 AKT。活化 AKT 可以產生 ROS 進而去抑制一些 proapoptotic 因子，像是 BAD、caspase 9、forkhead transcription factor、GSK3 和 IKK α (Govindarajan *et al.*, 2007)。而且在小鼠 melanoma cell 中，AKT 也可以去誘發 NADPH oxidase 中 NOX 4 的活性進而去產生 ROS (Govindarajan *et al.*, 2007)。最近的研究認為在 melanoma cell 表現的 MAPK 可以去調節細胞內 ROS 的表現來抑制細胞的凋亡進而可以維持 melanoma 的存活率 (Verhaegen *et al.*, 2006)。此外，ROS 也可以活化 AP-1；一個 transcription factor 會介入 ras 所誘發的致癌基因轉變 (oncogenic transformation) (Xanthoudakis *et al.*, 1992)。然而也有研究發現 ROS 所造成 melanoma cell 的凋亡會引發血管生成凝態 (vasculogenic mimicry)，這種模擬活化的內皮細胞過程最終會形成液態導流的網狀基質結構 (fluid-conducting matrix-rich meshwork) 進而促進 melanoma progression (Hendrix *et al.*, 2003, Postovit *et al.*, 2006)。所以以目前的研究皆認為 ROS 扮演 proapoptotic 和 antiapoptotic 的角色階段會促進 melanoma cell 的生長 (Baldi *et al.*, 2005)。這些研究結果指出不論是 primary melanoma

或是 metastatic melanoma 存在著一些抗氧化的機制去拮抗細胞內的氧化壓力；所以在第三個 ESR 的分析系統中，我們選擇使用 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞株來分析各種 coumarin 衍生物抗氧化的活性。



貳、材料與方法

➤ 實驗材料

一、實驗試藥

1. Coumarin 衍生物由台北醫學大學藥物化學研究所合成，依

據分子量的不同分成十一種：

序號	代號	分子量
1	Mei-174	254.24
2	Mei-175	338.35
3	Mei-215	276.28
4	Mei-219 ⁶⁰	290.31
5	Mei-228	358.34
6	Mei-234	324.33
7	Mei-236	262.26
8	Mei-249	248.23
9	Mei-252	304.34
10	Mei-255	316.35
11	Mei-257	352.38

2. 化合物 DPPH，分子量 618.76，購自 Sigma-Aldrich (USA)。

3. 藥物 Baicalein，分子量 270.24，購自 Sigma-Aldrich (USA)。

實驗所使用之溶劑為 DMSO，加入細胞培養液中之 DMSO

總量以不超過 0.2% (v/v) 為主。

二、實驗細胞

B16F10 黑色素細胞瘤細胞株，構自食品工業發展研究所菌種中心 (台灣新竹)，細胞株來源為 ATCC ARL-6475。細胞培養液為 DMEM，外加 1.5 g/L sodium bicarbonate，20 mM HEPES，2 mM L-glutamine，100 U/ml penicillin，100 μ g/ml streptomycin 及 10% 去活性之小牛血清 (heat-inactivated fetal calf serum, FCS)。

● 實驗藥品

1. 下列為美國 **Gibco BRL (Invitrogen)** 公司之產品

Amphotericin B (Fungizone)

Dubecco's modified eagle medium (DMEM)

Porcine Elastase

Fetal calf serum (FCS)

L-glutamine

Penicillin/Streptomycin

Sodium pyruvate

Trypane blue stain

Trypsin-EDTA

2. 下列為美國 **Cyto Pulse Sciences** 公司之產品

Cytoporation Medium

3. 下列為美國 **Sigma** 公司之藥品

Baicalein

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO)

Hypoxanthine, minimum 99%

Tetrazolium dye 3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,

5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

Xanthine oxidase from bovine milk, Grade I



4. 耗材

Cell culture dish, plate, flask, tube (Corning)



➤ 實驗方法

1. 細胞之培養

B16F10 老鼠黑色素瘤細胞取自 NHRI 細胞庫 (台灣·新竹)，這些細胞利用 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY) 培養，其中含有 10% 的小牛血清 (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) 和抗生素。每次培養液約 1-2 天更換一次直到細胞在培養皿上達到適當的滿度。繼代的培養我們會將培養液吸乾，並利用 phosphate-buffered saline 清洗三次後加入 Trypsin-EDTA solution (Gibco)。經過適當的震搖後移至 37°C 培養箱約 40 秒。取出後利用 phase-contrast microscope 去觀察細胞確定其貼附情形喪失後再給予 10 mL DMEM 使 Trypsin 功能喪失以解低其對細胞的傷害。離心 (900 G 五分鐘)後底部的沉積物再利用 DMEM 將其打散並種植在新的培養皿上。實驗前會先將 medium 改成 DMEM contain 1% serum 進行培養。

2. 電子順磁共振儀 (ESR)偵測自由基釋放

本實驗為了偵測各種化合物的抗氧化程度分為三個系統：

第一個系統是根據 Hsiu-Chen Lin 等人的方法 (Lin *et al.*, 2008)，製備 250 μ M 的 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) 在 3 mL 的

甲醇裡，在此加入各種coumarin衍生物100 μ M和vitamin C 100 μ M，避光且在室溫反應一個半小時。接著以電子順磁共振儀 (ESR) 直接分析，和無加入coumarin衍生物的control DPPH相比，分析各種coumarin衍生物和vitamin C抑制自由基產生的情形。

Percent of control value for ROS scavenger =

signal height (coumarin derivatives)

Signal-height (control DPPH)

第二個系統是根據 Hsiu-Chen Lin 等人的方法 (Lin *et al.*, 2008)，superoxide 是由 xanthine oxidase/ hypoxanthine 系統所產生。XO/HPX 系統的反應混合物包括 xanthine oxidase 0.4 U/mL 50 μ L、hypoxanthine 5 mM 50 μ L、DTPA(diethylene triamine pentaacetic acid) 1.5 μ L，再加入待測的 sample solution 50 μ L(coumarin 衍生物 20 μ M 和 vitamin C 20 μ M)，反應三分鐘。本實驗以 DMPO (100 mM)當作電子自旋捕捉劑。接著以電子順磁共振儀 (ESR)直接分析產生的 superoxide，和無加入 coumarin 衍生物的 solvent control 相比，觀察各種 coumarin 衍生物和 vitamin C 抑制自由基的情形。

Percent of control value for ROS scavenger =

signal height (coumarin derivatives)

Signal-height (control)

第三個系統是根據 Duen-Suey Chou 等人的方法 (Chou *et al.*, 2005, Chou *et al.*, 2009)，電子順磁共振儀 (ESR)直接分析 B16F10 老鼠黑色素瘤腫瘤細胞受到 baicalein 刺激後所釋放之 Hydroxyl radical (OH[·])，再加入 coumarin 衍生物 20 μM 和 vitamin C 20 μM 觀測其抑制的情形。本實驗以 DMPO (100 mM)當作電子自旋捕捉劑，並將 B16F10 打散成懸浮液。

ESR 偵測其 baicalein 刺激自由基之產生藉由下列的公式做比較

Percent of control value for ROS scavenger =

signal height (coumarin derivatives)

Signal-height (baicalein)

電子順磁共振儀 (ESR)的其他參數如下：microwave power, 20 mW; modulation frequency, 100 kHz; modulation amplitude 1 G; sweep time, 100 G; time constant, 40.96 ms (20.97 ms); conversion time, 40.96 ms; sweep time 42s; receiver gain 2×10^4 ; number of data points, 1024.

3. 細胞存活率測定 (MTT assay)

我們將 B16F10 黑色素瘤細胞經過適當天數的培養後，以 1×10^5 細胞數/well 種殖在 96 well 盤上，培養一天待細胞貼附在底層後給予 coumarin 衍生物 20 μM 和 Vitamin C 20 μM。給藥 1 小時後，給

予 baicalein 50 μ M。給藥 24 小時後，吸乾上面的培養液並將 MTT 以 0.5 mg/ml 的方式泡製在 DMEM 中給予 3 小時避光的 treatment，而後將培養液吸乾後避光給予 DMSO 300 μ L wash。30 分鐘後將每個 well 取出 200 μ L 置於 ELISA 盤去測吸光值。此實驗目的主要是利用活細胞內粒線體中 reductase 將黃色的 MTT 試劑去還原成 formazan 的紫色結晶並堆積於細胞中，當加入 DMSO 使其溶解，即可利用測定 OD 值得知細胞還原 MTT 的能力，此 OD 值代表了活細胞內粒線體的 reductase 活性，即活細胞數目。每次試驗各實驗控制組皆會以 triplicate 方式種殖，並以平均值去做統計。

$$\text{細胞存活百分比 (\%)} = \frac{\text{加藥 24 小時後的細胞吸光值}}{\text{控制組 24 小時後的細胞吸光值}} \times 100 (\%)$$

4. 統計分析

實驗數據皆以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) 表示，控制組與實驗組之間的比較以 One-Way ANOVA 做統計分析。若 $p < 0.05$ 則表示有意義的差別。

參、結果

1. 利用 ESR 測定 coumarin 衍生物的抗氧化情形

在第一個系統中，250 μM 的 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) 在 3 mL 的甲醇裡，以此作為 control (Fig. 1a)。接著在此加入各種 coumarin 衍生物 100 μM 避光且在室溫反應一個半小時。電子順磁共振儀 (ESR) 分析的結果顯示，全部的 coumarin 衍生物都有抗氧化的情形，其中的 Mei-234 抗氧化程度最強 (Fig. 1b ~ Fig. 1l)。維他命 C 50 μM , 100 μM 在這邊當作 positive control (Fig. 1m, 1n)。



Coumarin 衍生物抗氧化的強度如下：

Mei-234 > Mei-257 > Mei-255 > Mei-219 > Mei-174 > Mei-215 >
Mei-175 > Mei-209 > Mei-252 > Mei-236 > Mei-228。

統計圖詳見 Fig. 2。

在第二個系統中，xanthine oxidase/ hypoxanthine 系統的反應混合物包括 xanthine oxidase 0.4 U/mL 50 μL 、hypoxanthine 5 mM 50 μL 、DTPA(diethylene triamine pentaacetic acid) 1.5 μL 、DMPO 1.5

μL ，以此為 control，可以觀察到 superoxide 的產生 (Fig. 3a)。接著加入 $20\ \mu\text{M}$ 的各種 coumarin 衍生物，反應三分鐘。電子順磁共振儀 (ESR) 分析的結果顯示，全部的 coumarin 衍生物都有抗氧化的情形，其中的 Mei-215 抗氧化程度最強 (Fig. 3b ~ Fig. 3l)。維他命 C $20\ \mu\text{M}$ 在這邊當作 positive control (Fig. 3m)。

Coumarin 衍生物抗氧化的強度如下：

Mei-215> Mei-236> Mei-209> Mei-257> Mei-255> Mei-219>
Mei-175> Mei-252> Mei-228> Mei-234> Mei-174。

統計圖詳見 Fig. 4。



在第三個系統中，在 B16F10 melanoma cell suspension $150\ \mu\text{L}$ 中加入 $1.5\ \mu\text{l}$ DMPO 作為 resting 組，可以發現不會產生 hydroxyl radical (Fig. 5a)，以此為 resting 組；但給予 $5\ \text{mM}$ baicalein $1.5\ \mu\text{l}$ 使其最終濃度為 $50\ \mu\text{M}$ 則可以明顯的看見 hydroxyl radical 的生成，以此為 control 組 (Fig. 5b)。在此加入各種 coumarin 衍生物 $100\ \mu\text{M}$ 避光且在室溫反應一個半小時。電子順磁共振儀 (ESR) 分析的結果顯示，coumarin 衍生物的抗氧化情形，Mei-174、Mei-215、Mei-228、Mei-234 在統計上有意義，其中的 Mei-215

抗氧化程度最強 (Fig. 5c ~ Fig. 5m) 。維他命 C 100 μ M 在這邊當作 positive control (Fig. 5n) 。

Coumarin 衍生物抗氧化的強度如下：

Mei-215> Mei-174> Mei-228> Mei-234> Mei-209> Mei-252>
Mei-236> Mei-175> Mei-257> Mei-219> Mei-255 。

統計圖詳見 Fig. 6 。

2. 探討 coumarin 衍生物對 B16F10 黑色素瘤細胞生存率之影響

為了探討 Coumarin 衍生物能否減少 baicalein 所造成的 B16F10 黑色素細胞瘤死亡率的下降，我們利用 MTT assay 來觀察。因為各種 coumarin 衍生物在 DMEM 中濃度過高會導致結晶析出，所以首先給予 B16F10 黑色素細胞瘤 coumarin 衍生物 20 μ M，一小時後再給予 baicalein 50 μ M。因為各種 coumarin 衍生物濃度只有給予 20 μ M，結果可以發現各種 coumarin 衍生物對於 baicalein 所造成的 B16F10 黑色素細胞瘤死亡率並沒有明顯的影響。統計圖詳見 Fig. 7 。

肆、討論

類黃酮因為有著對抗氧化壓力的潛力，可以改善或是治癒疾病，所以在尋找新的藥物上扮演一個重要的角色。早期的研究發現它們甚至比一些抗氧化的維他命效力更強，另外在體外的實驗，基於藥理的濃度相互比較可以發現類黃酮比有機硒複合物效力來的強 (Kade *et al.*, 2008)。植物當中具有廣大的類黃酮種類，有一些具有結構相關性，而且這些結構的差異可能對於植物的生存是不可或缺的。令人感興趣的是有很多類黃酮因為可以對抗氧化壓力，現在已經拿來治療人類的疾病。



一般來說，coumarin 衍生物的抗氧化活性可以藉由評估它們抑制、抵銷和捕捉自由基的能力，或是螯合過渡金屬的能力來判斷。DPPH 是一個穩定的自由基，可以接收一個電子或氫的自由基而成為穩定的反磁性分子。Fig. 1 是藉由本篇 ESR 分析系統的第一個系統，分析各種 coumarin 衍生物減少 DPPH 訊號的程度。因為和抗氧化物去轉換電子和氫原子到氧化劑和自由基有關，各種 coumarin 衍生物都有還原 DPPH 的能力 (Fig. 2)，而且可以被視為一種防禦的機制。

次黃嘌呤/黃嘌呤氧化酶系統是一個重要的自由基產生的來源，在很多的生理、病理模式中都有參與。這個酵素會把氧分子還原，變成過氧化氫和 superoxide。次黃嘌呤轉變成黃嘌呤，以及黃嘌呤轉變成尿酸的氧化過程就是由黃嘌呤氧化酶所催化反應，這個過程會產生 superoxide 自由基以及提高有機體的氧化的程度。黃嘌呤氧化酶在之前的研究中發現可以被 coumarin 衍生物所抑制；Fig. 3 是藉由本篇 ESR 分析系統的第二個系統，可以看到 twelve-line 的 superoxide 的訊號，在加入各種 coumarin 衍生物之後可以觀察到訊號強度的降低 (Fig. 4)。



Fig. 5 是藉由本篇 ESR 分析系統第三個系統，利用 50 μM 的 baicalein 明顯的刺激 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞產生 four-line 的 hydroxyl radical 訊號。在先前的電子順磁共振儀 (ESR) 研究結果發現，baicalein 在血小板懸浮液 (platelet suspension) 中可以產生 four-line 的 hydroxyl radical 訊號且認為必須透過 12-LOX 而來 (Chou *et al.*, 2005)。Hydroxyl radical 的生成大多來自細胞內 superoxide 依序經由 SOD 催化形成 hydrogen peroxide 再和亞鐵離子的作用 (fenton reaction) 而來，對於細胞具有強烈的傷害性。Hydroxyl radical 是一種對細胞極具傷害性的 ROS。它可以和生物體內各個巨分子結合 (脂

肪、蛋白質、核酸和碳水化合物)，它的高活性可以使 DNA 和蛋白質交互連結 (cross-link)、DNA 單股或雙股斷裂、脂質過氧化 (lipid peroxidation) 和蛋白質破碎 (protein fragmentation) (Stohs & Bagchi, 1995, Lloyd *et al.*, 1997)。而在各種 coumarin 衍生物中有四個衍生物可以抑制 hydroxyl radical 的訊號 (Fig. 5, Fig. 6)。因為各種 coumarin 衍生物當濃度大於 20 μM 時會於 DMEM 中結晶析出，所以對於 MTT assay 選擇了 20 μM 這個濃度。結果顯示各種 coumarin 衍生物對 baicalein 所造成的細胞死亡並沒有明顯的影響，可能是因為加入的濃度太低所造成 (Fig. 7)。



不同的結構會使的化合物擁有不同的特性，coumarin 衍生物其上的 pyrazoles、pyrazolin-5-ones、4-thiazolidinones 和 1,3,4-oxadiazoles 有明顯的抗氧化 (Saibara *et al.*, 2003, Jeong *et al.*, 2004) 和抗癌的活性 (Kakiuchi *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2007a)。有鑑於 coumarin 衍生物的重要性，越來越多 coumarin 衍生物被合成。本篇實驗結果發現，在比較符合生理系統的第三個 ESR 分析系統，coumarin 衍生物中的 Mei-174、Mei-215、Mei-228、Mei-234 有明顯的抗氧化活性，可供日後繼續探討其詳細機轉。

之前的文獻中做過不同的 coumarin 衍生物，也有找到有抗氧化的依據。而根據本次研究的發現，抗氧化物和受質在和自由基反應時會互相競爭，所以會依據反應常數的不同而造成不同的結果。實驗結果也跟偵測自由基的時間和環境有關，像是本篇 ESR 分析系統的第一個系統是各種 coumarin 衍生物避光下反應一個半小時，而第二個、第三個系統則是在常溫下反應三分鐘，所以在不同的系統偵測會導致結果的不同。

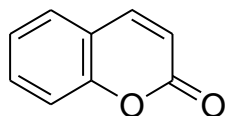


伍、結論與展望

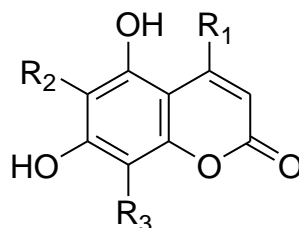
本次的實驗結果證實，各種 coumarin 衍生物對於小鼠黑色素瘤細胞的存活率並沒有明顯的影響。在抗氧化的方面，結果發現在不同的系統中可以觀察到各種 coumarin 衍生物有抑制自由基的活性。因此在未來的展望中，各種 coumarin 衍生物在不同系統的抗氧化程度可供日後繼續探討其詳細機轉的參考。



陸、附圖



coumarin

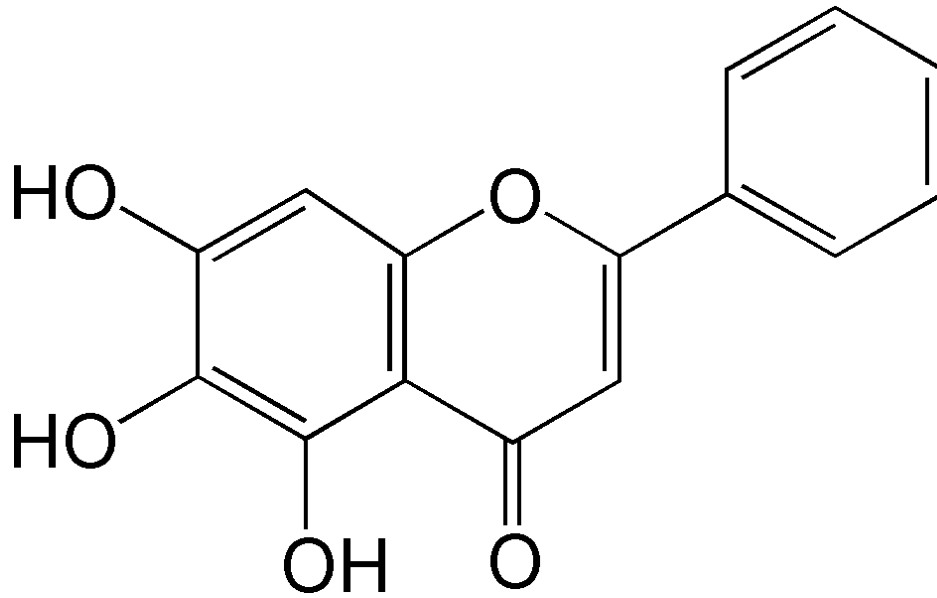


- 1: $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$
- 2: $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_3 = \text{H}$
- 3: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_3 = \text{H}$
- 4: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_3 = \text{H}$
- 5: $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{COPh}$, $R_3 = \text{H}$
- 6: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{Ph}$, $R_3 = \text{H}$
- 7: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$
- 8: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_3$, $R_3 = \text{H}$
- 9: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $R_3 = \text{H}$
- 10: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{COcyclohexyl}$, $R_3 = \text{H}$
- 11: $R_1 = p\text{-CH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_3 = \text{H}$

序號	代號	分子量
1	Mei-174	254.24
2	Mei-175 960	338.35
3	Mei-215	276.28
4	Mei-219	290.31
5	Mei-228	358.34
6	Mei-234	324.33
7	Mei-236	262.26
8	Mei-249	248.23
9	Mei-252	304.34
10	Mei-255	316.35
11	Mei-257	352.38

附圖一。

Chemical structure of 5,7-dihydroxycoumarins



附圖二.

Chemical structure of baicalin



柒、圖表

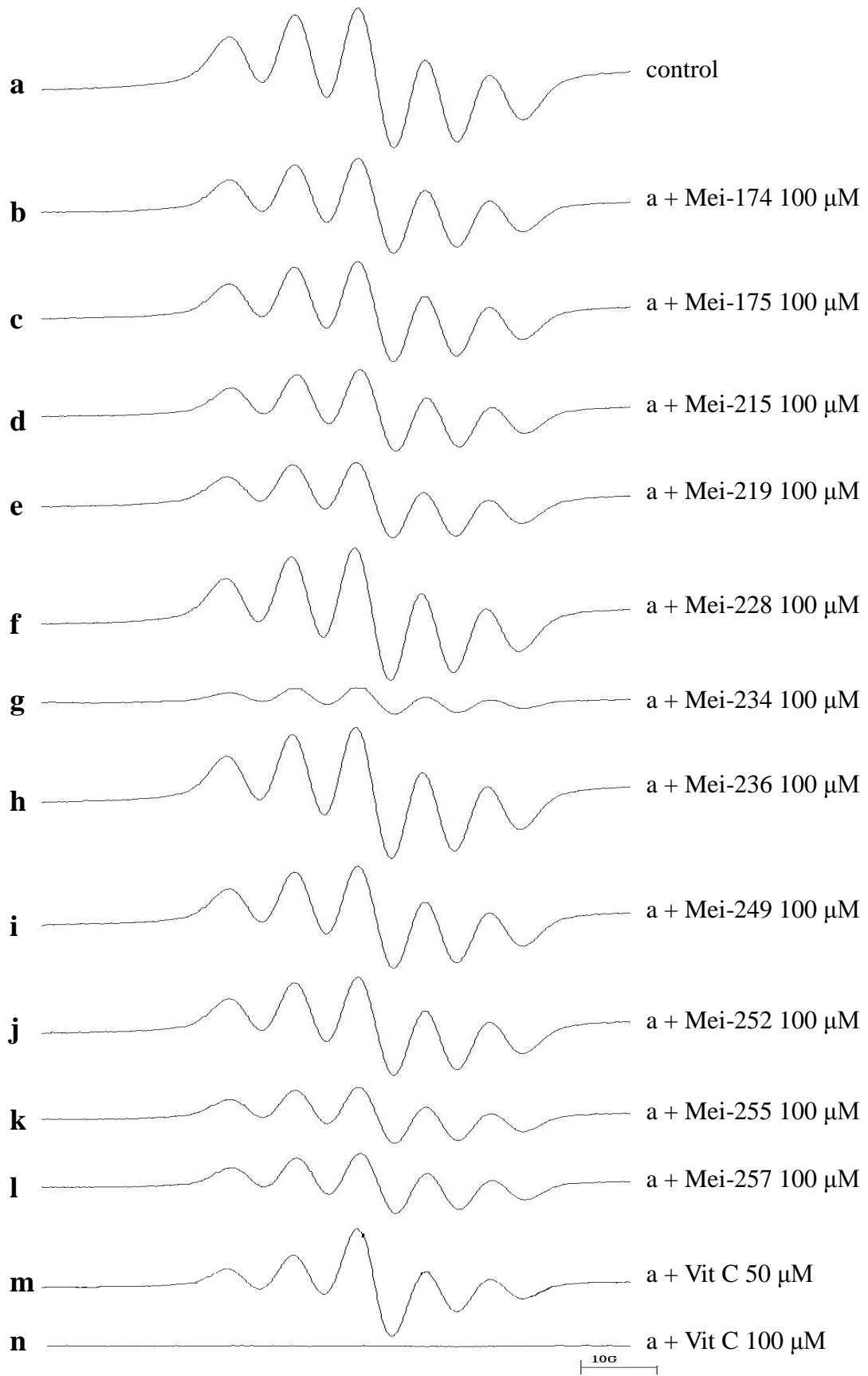


Figure 1.

ESR spectra obtained from the DPPH. DPPH followed by the addition of (a) DMSO (control), (b) to (l) 100 μM coumarin derivatives, and (m) 50 μM vitamin C, and (n) 100 μM vitamin C. The instrument parameters were as follow: modulation amplitude, 1G; time constant, 164ms; scanning for 40.96ms with 6 scans accumulated. The ESR spectra are labeled to show their components : DPPH radical (*).



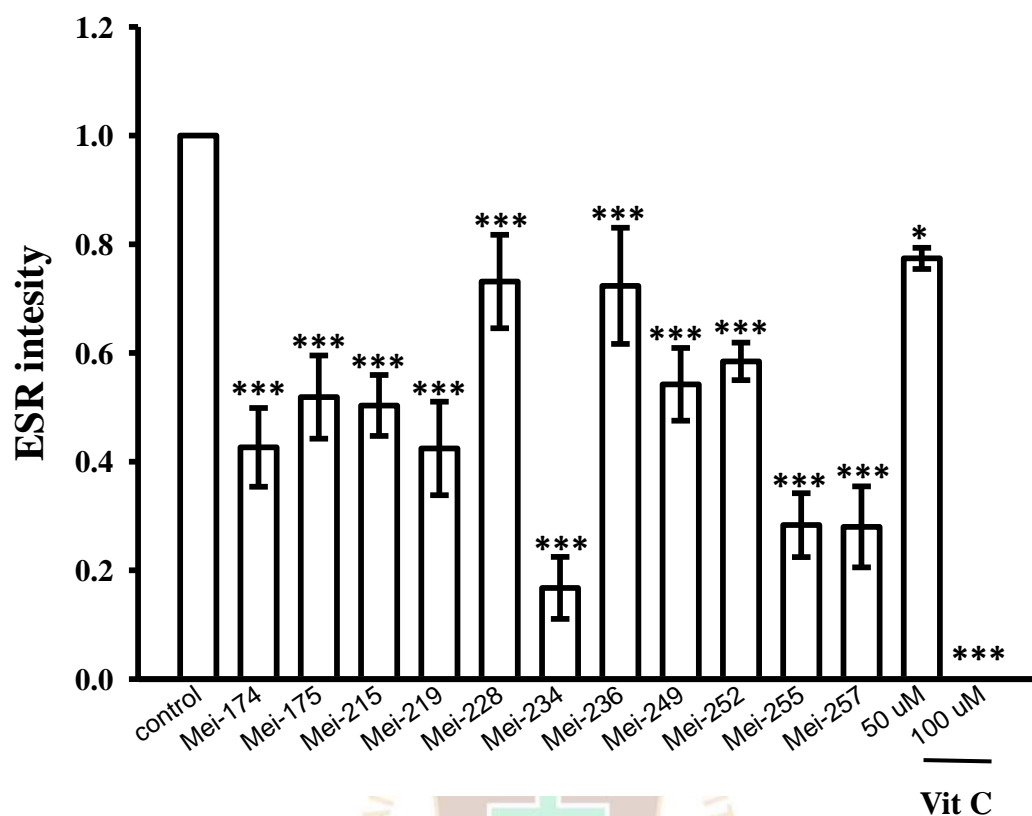


Figure 2.

Effect of 100 uM coumarin derivatives on the intensity of DPPH control solution. The data are shown as the means \pm SEM of five independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ as compare with the control DPPH solution without coumarins. The instrument parameters were exactly the same as those in **Figure 1**.

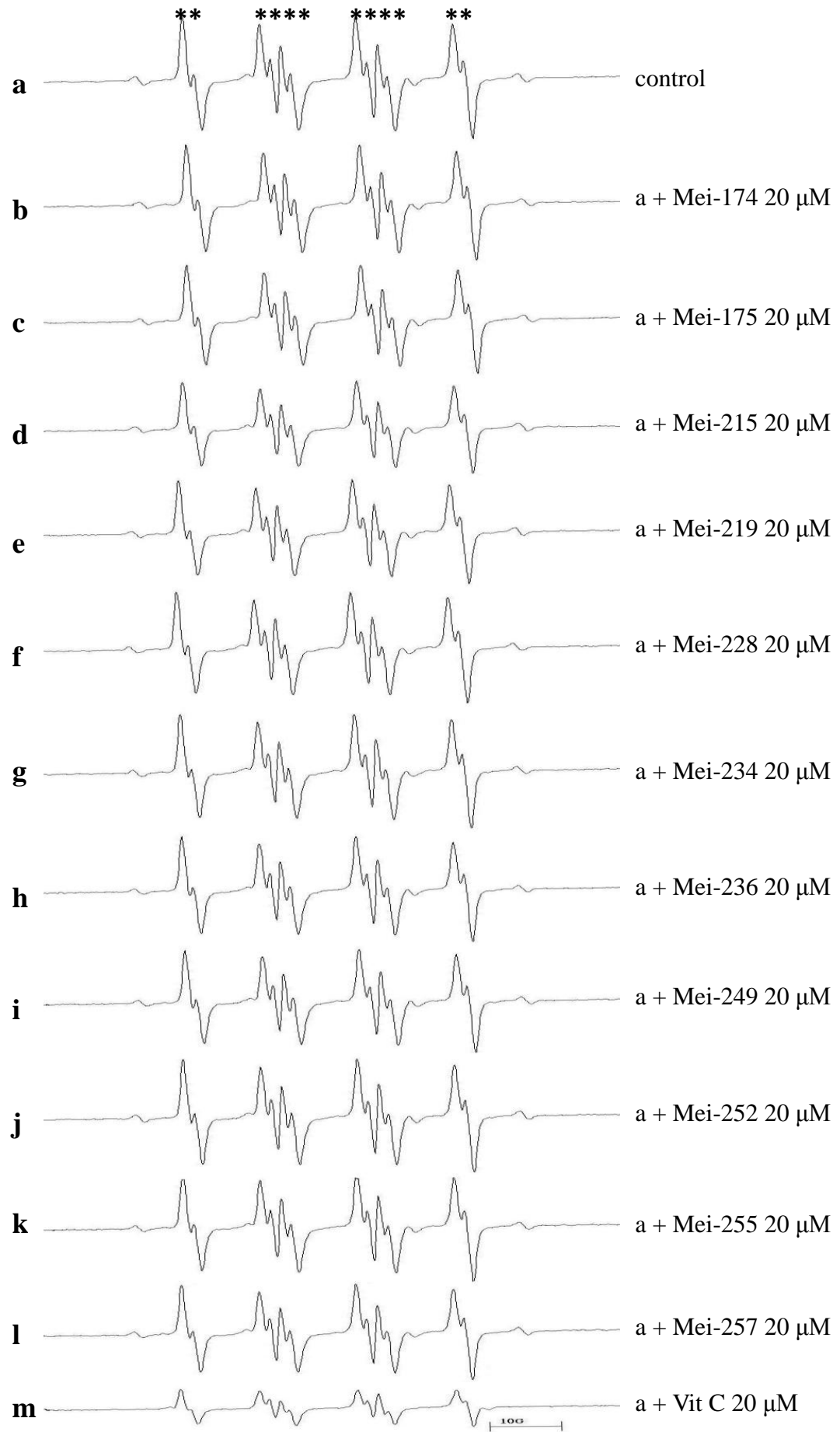
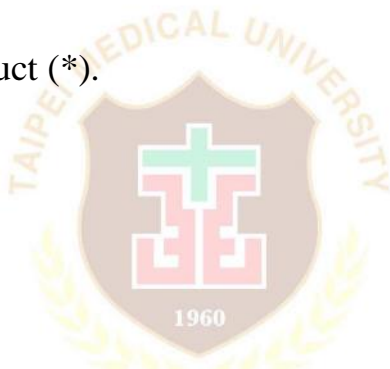


Figure 3.

ESR spectra obtained from the reaction of xanthine oxidase / hypoxanthine in the presence of DMPO. Xanthine oxidase / hypoxanthine preincubated with DMPO (100 mM) followed by the addition of (a) DMSO (control) (b) to (l) 20 μ M coumarin derivatives, and (m) 20 μ M vitamin C. The instrument parameters were as follow: modulation amplitude, 1G; time constant, 164ms; scanning for 40.96ms with 6 scans accumulated. The ESR spectra are labeled to show their components : DMPO-superoxide adduct (*).



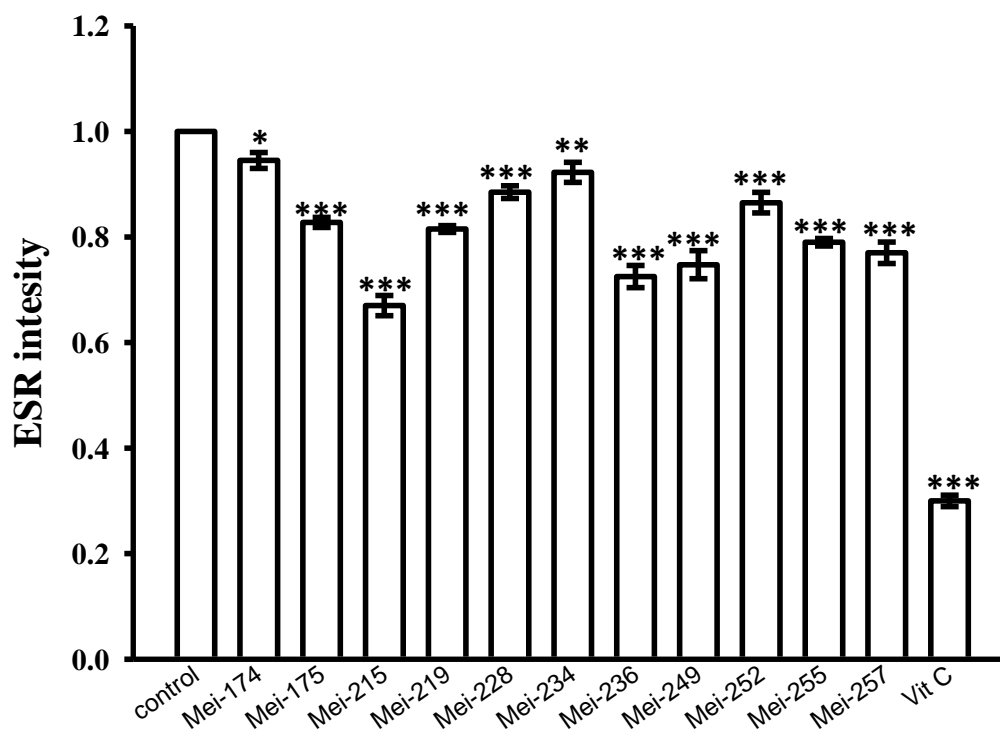


Figure 4.

Effect of 20 μ M coumarin derivatives on the intensity of xanthine oxidase / hypoxanthine induced superoxide. Xanthine oxidase / hypoxanthine preincubated with DMPO (100 mM) followed by the addition of DMSO (control). The data are shown as the means \pm SEM of four independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ as compare with the control only. The instrument parameters were exactly the same as those in

Figure 3.

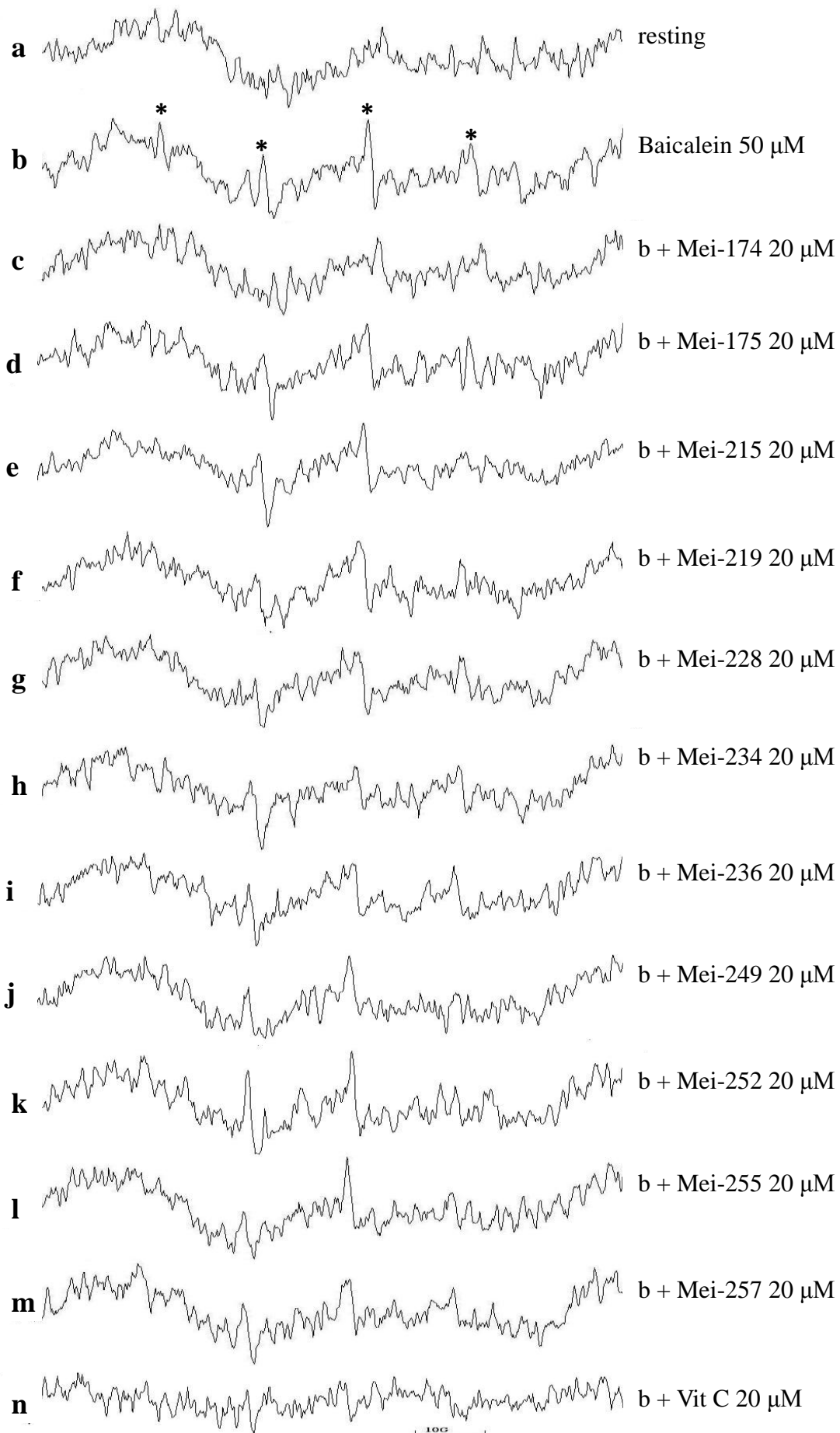
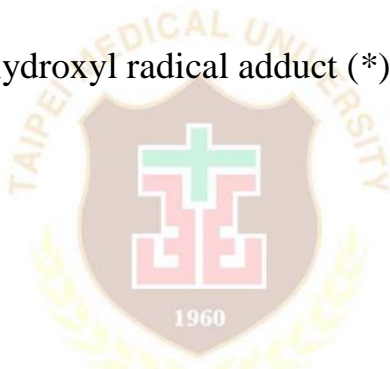


Figure 5

ESR spectra obtained from the reaction of B16F10 melanoma cells (5×10^5 cells/150 μ l) in the presence of DMPO. B16F10 melanoma cells preincubated with DMPO (100 mM) followed by the addition of (a) blank, (b) 50 μ M baicalein, (c) to (m) 20 μ M coumarin derivatives, and (n) 20 μ M vitamin C. The instrument parameters were as follow: modulation amplitude, 1G; time constant, 164ms; scanning for 40.96ms with 12 scans accumulated. The ESR spectra are labeled to show their components : DMPO-hydroxyl radical adduct (*).



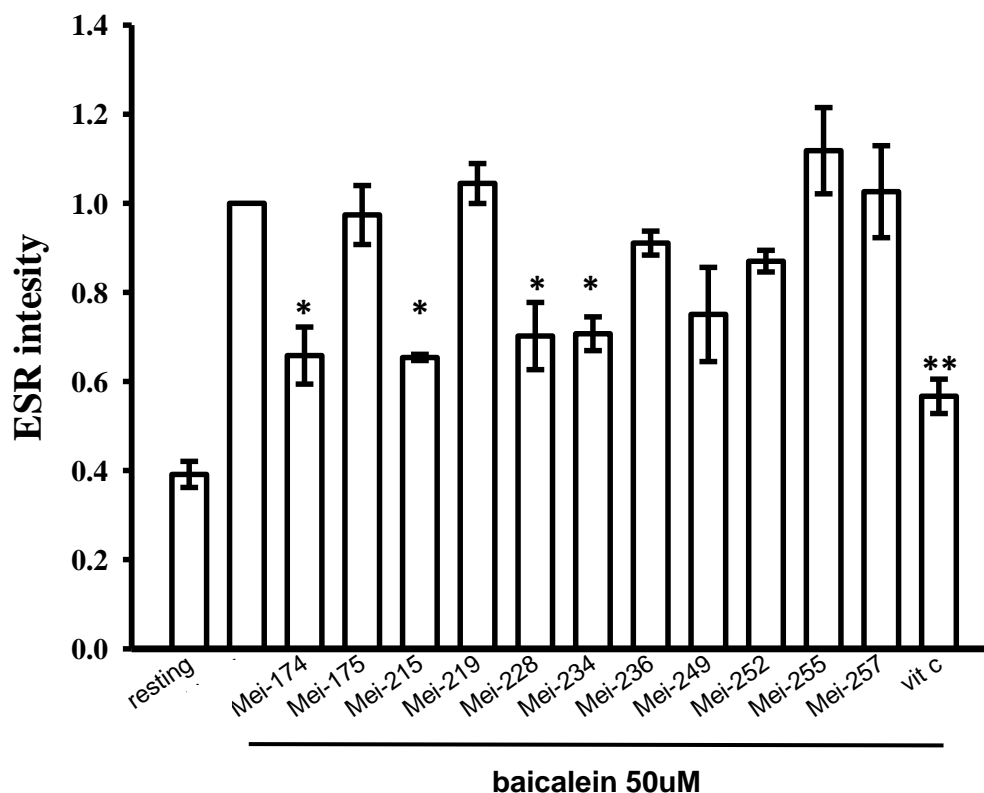


Figure 6.

Effect of 20 μM coumarin derivatives on the intensity of baicalein induced hydroxyl radical in B16F10 melanoma cells. B16F10 melanoma cells (5×10^5 cells/ $150 \mu\text{l}$) preincubated with DMPO (100 mM) followed by the addition of DMSO (resting) and 50 μM baicalein. The data are shown as the means \pm SEM of three independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ as compare with the baicalein treatment only.

The instrument parameters were exactly the same as those in **Figure 5**.

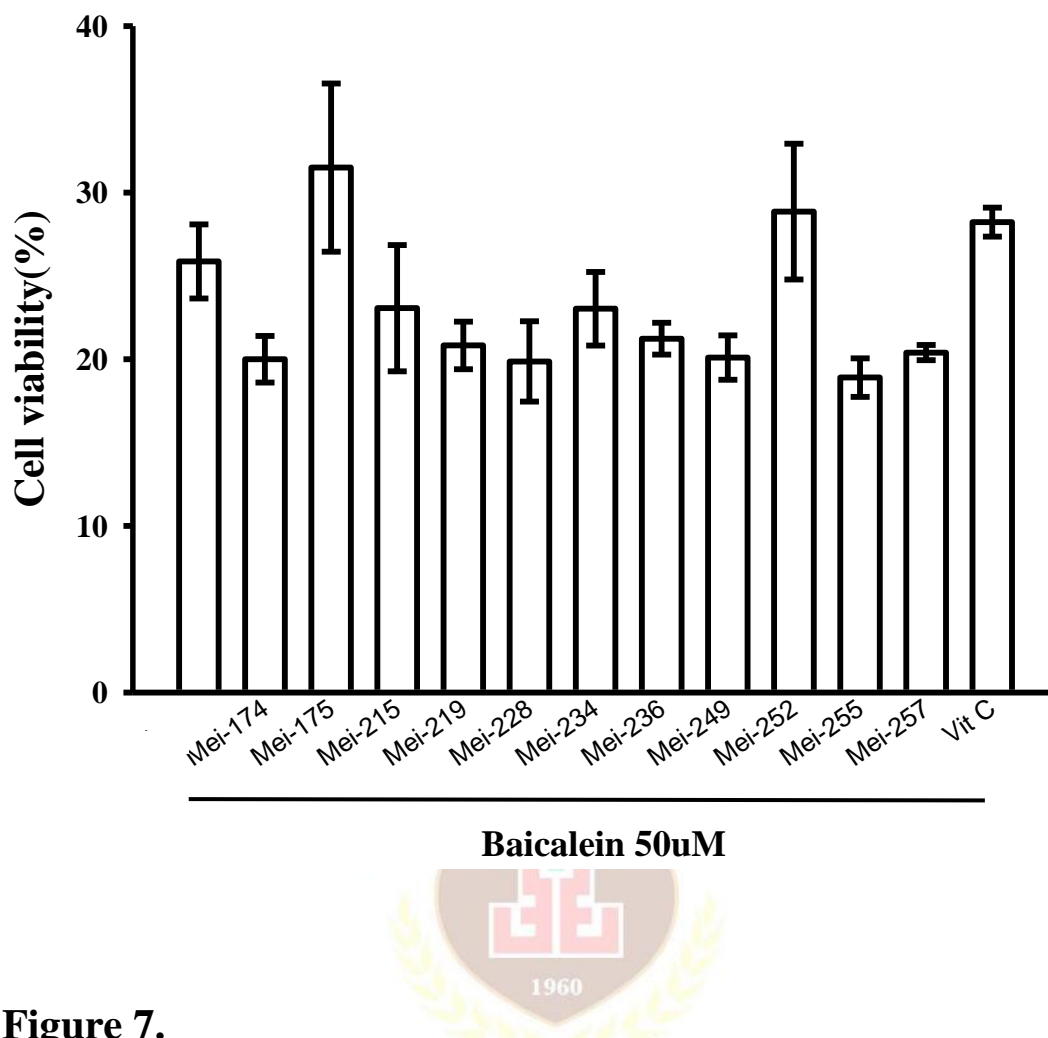


Figure 7.

B16F10 melanoma cells (1×10^6 cells/ ml) were dispensed on 96-well plates. Cells were treated with indicated concentration of 20 μ M coumarin derivatives or 20 μ M vitamin C for 1 hour before treatment with 50 μ M baicalein for 24 hours. Percentage of viability is presented as mean \pm SEM of three independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ as compare with the baicalein treatment only.

柒、參考文獻

- Abe, R., Fujita, Y. & Yamagishi, S. 2007. Angiogenesis and metastasis inhibitors for the treatment of malignant melanoma. *Mini Rev Med Chem* 7: 649-61.
- Appendino, G., Mercalli, E., Fuzzati, N., Arnoldi, L., Stavri, M., Gibbons, S., Ballero, M. & Maxia, A. 2004. Antimycobacterial coumarins from the sardinian giant fennel (*Ferula communis*). *J Nat Prod* 67: 2108-10.
- Babior, B. M. 2000. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life* 50: 267-9.
- Baldi, A., Lombardi, D., Russo, P., Palessandolo, E., De Luca, A., Santini, D., Baldi, F., Rossiello, L., Dell'Anna, M. L., Mastrofrancesco, A., Maresca, V., Flori, E., Natali, P. G., Picardo, M. & Paggi, M. G. 2005. Ferritin contributes to melanoma progression by modulating cell growth and sensitivity to oxidative stress. *Clin Cancer Res* 11: 3175-83.
- Bedogni, B., Welford, S. M., Cassarino, D. S., Nickoloff, B. J., Giaccia, A. J. & Powell, M. B. 2005. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 8: 443-54.
- Bedoya, L. M., Beltran, M., Sancho, R., Olmedo, D. A., Sanchez-Palomino, S., del Olmo, E., Lopez-Perez, J. L., Munoz, E., San Feliciano, A. & Alcami, J. 2005. 4-Phenylcoumarins as HIV transcription inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 4447-50.
- Chang, W. S. & Chiang, H. C. 1995. Structure-activity relationship of

- coumarins in xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res* 15: 1969-73.
- Chen, X., Wang, S., Wu, N., Sood, S., Wang, P., Jin, Z., Beer, D. G., Giordano, T. J., Lin, Y., Shih, W. C., Lubet, R. A. & Yang, C. S. 2004. Overexpression of 5-lipoxygenase in rat and human esophageal adenocarcinoma and inhibitory effects of zileuton and celecoxib on carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10: 6703-9.
- Chou, D. S., Hsiao, G., Lai, Y. A., Tsai, Y. J. & Sheu, J. R. 2009. Baicalein induces proliferation inhibition in B16F10 melanoma cells by generating reactive oxygen species via 12-lipoxygenase. *Free Radic Biol Med* 46: 1197-203.
- Chou, D. S., Hsiao, G., Shen, M. Y., Tsai, Y. J., Chen, T. F. & Sheu, J. R. 2005. ESR spin trapping of a carbon-centered free radical from agonist-stimulated human platelets. *Free Radic Biol Med* 39: 237-48.
- Egan, D., O'Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E. & Thornes, R. D. 1990. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab Rev* 22: 503-29.
- Farombi, E. O. & Fakoya, A. 2005. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Mol Nutr Food Res* 49: 1120-8.
- Ferrari, A. M., Sgobba, M., Gamberini, M. C. & Rastelli, G. 2007. Relationship between quantum-chemical descriptors of proton dissociation and experimental acidity constants of various hydroxylated coumarins. Identification of the biologically active species for xanthine oxidase inhibition. *Eur J Med Chem* 42: 1028-31.
- Finkel, T. 2001. Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB*

Life 52: 3-6.

Finkelstein, E., Rosen, G. M., Rauckman, E. J. & Paxton, J. 1979. Spin trapping of superoxide. *Mol Pharmacol* 16: 676-85.

Forman, H. J. & Torres, M. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166: S4-8.

Fruehauf, J. P. & Meyskens, F. L., Jr. 2007. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 13: 789-94.

Fujita, M., Shiota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. 2005. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 49: 391-6.

Fylaktakidou, K. C., Hadjipavlou-Litina, D. J., Litinas, K. E. & Nicolaides, D. N. 2004. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr Pharm Des* 10: 3813-33.

Gaggioli, C. & Sahai, E. 2007. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res* 20: 161-72.

Galm, U., Dessoy, M. A., Schmidt, J., Wessjohann, L. A. & Heide, L. 2004. In vitro and in vivo production of new aminocoumarins by a combined biochemical, genetic, and synthetic approach. *Chem Biol* 11: 173-83.

Ghate, M., Kusanur, R. A. & Kulkarni, M. V. 2005. Synthesis and in vivo analgesic and anti-inflammatory activity of some bi heterocyclic coumarin derivatives. *Eur J Med Chem* 40: 882-7.

Ghate, M., Manohar, D., Kulkarni, V., Shobha, R. & Kattimani, S. Y. 2003.

Synthesis of vanillin ethers from 4-(bromomethyl) coumarins as anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem* 38: 297-302.

Govindarajan, B., Sligh, J. E., Vincent, B. J., Li, M., Canter, J. A., Nickoloff, B. J., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. A., Oberley, L., Zhang, Y., Slingerland, J., Arnold, R. S., Lambeth, J. D., Cohen, C., Hilenski, L., Griendling, K., Martinez-Diez, M., Cuezva, J. M. & Arbiser, J. L. 2007. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J Clin Invest* 117: 719-29.

Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Hess, A. R. & Seftor, R. E. 2003. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3: 411-21.

Hess, A. R., Seftor, E. A., Seftor, R. E. & Hendrix, M. J. 2003. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 63: 4757-62.

Hoult, J. R. & Paya, M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 27: 713-22.

Hsu, S. L., Hsieh, Y. C., Hsieh, W. C. & Chou, C. J. 2001. Baicalein induces a dual growth arrest by modulating multiple cell cycle regulatory molecules. *Eur J Pharmacol* 425: 165-71.

Huang, H. C., Wang, H. R. & Hsieh, L. M. 1994. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *Eur J Pharmacol* 251: 91-3.

Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanoto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. & Horikawa, T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*

189: 21-39.

- Ito, C., Itoigawa, M., Mishina, Y., Filho, V. C., Enjo, F., Tokuda, H., Nishino, H. & Furukawa, H. 2003. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *J Nat Prod* 66: 368-71.
- Jeong, T. S., Kim, K. S., Kim, J. R., Cho, K. H., Lee, S. & Lee, W. S. 2004. Novel 3,5-diaryl pyrazolines and pyrazole as low-density lipoprotein (LDL) oxidation inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 2719-23.
- Jezek, P. & Hlavata, L. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2478-503.
- Justino, G. C., Santos, M. R., Canario, S., Borges, C., Florencio, M. H. & Mira, L. 2004. Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships. *Arch Biochem Biophys* 432: 109-21.
- Kade, I. J., Paixao, M. W., Rodrigues, O. E., Barbosa, N. B., Braga, A. L., Avila, D. S., Nogueira, C. W. & Rocha, J. B. 2008. Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. *Neurochem Res* 33: 167-78.
- Kakiuchi, Y., Sasaki, N., Satoh-Masuoka, M., Murofushi, H. & Murakami-Murofushi, K. 2004. A novel pyrazolone, 4,4-dichloro-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-methyl-5-pyrazolone, as a potent catalytic inhibitor of human telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1351-1358.

- Kanayasu-Toyoda, T., Morita, I. & Murota, S. 1998. Arachidonic acid pretreatment enhances smooth muscle cell migration via increased Ca²⁺ influx. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 58: 25-31.
- Karihtala, P. & Soini, Y. 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 115: 81-103.
- Khan, I. A., Kulkarni, M. V., Gopal, M., Shahabuddin, M. S. & Sun, C. M. 2005. Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 3584-7.
- Khan, K. M., Saify, Z. S., Khan, M. Z., Zia, U., Choudhary, I. M., Atta Ur, R., Perveen, S., Chohan, Z. H. & Supuran, C. T. 2004. Synthesis of coumarin derivatives with cytotoxic, antibacterial and antifungal activity. *J Enzyme Inhib Med Chem* 19: 373-9.
- Kidane, A. G., Salacinski, H., Tiwari, A., Bruckdorfer, K. R. & Seifalian, A. M. 2004. Anticoagulant and antiplatelet agents: their clinical and device application(s) together with usages to engineer surfaces. *Biomacromolecules* 5: 798-813.
- Kimura, Y., Matsushita, N. & Okuda, H. 1997. Effects of baicalein isolated from *Scutellaria baicalensis* on interleukin 1 beta- and tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Ethnopharmacol* 57: 63-7.
- Kontogiorgis, C. & Hadjipavlou-Litina, D. 2003. Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 18: 63-9.

- Kontogiorgis, C. A. & Hadjipavlou-Litina, D. J. 2004. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin derivatives with a 7-azomethine linkage. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 611-4.
- Kontogiorgis, C. A. & Hadjipavlou-Litina, D. J. 2005. Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives. *J Med Chem* 48: 6400-8.
- Kostova, I. 2005. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5: 29-46.
- Lee, B. H., Clothier, M. F., Dutton, F. E., Conder, G. A. & Johnson, S. S. 1998. Anthelmintic beta-hydroxyketoamides (BKAs). *Bioorg Med Chem Lett* 8: 3317-20.
- Lee, K. H. 2004. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *J Nat Prod* 67: 273-83.
- Lin, H. C., Tsai, S. H., Chen, C. S., Chang, Y. C., Lee, C. M., Lai, Z. Y. & Lin, C. M. 2008. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochem Pharmacol* 75: 1416-25.
- Lin, R., Chiu, G., Yu, Y., Connolly, P. J., Li, S., Lu, Y., Adams, M., Fuentes-Pesquera, A. R., Emanuel, S. L. & Greenberger, L. M. 2007a. Design, synthesis, and evaluation of 3,4-disubstituted pyrazole analogues as anti-tumor CDK inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 4557-61.
- Lin, Y. T., Yang, J. S., Lin, H. J., Tan, T. W., Tang, N. Y., Chaing, J. H., Chang, Y. H., Lu, H. F. & Chung, J. G. 2007b. Baicalein induces apoptosis in SCC-4 human tongue cancer cells via a Ca²⁺-dependent

- mitochondrial pathway. *In Vivo* 21: 1053-8.
- Liu, H., Colavitti, R., Rovira, II & Finkel, T. 2005. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97: 967-74.
- Liu, J. J., Huang, T. S., Cheng, W. F. & Lu, F. J. 2003. Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *Int J Cancer* 106: 559-65.
- Liu, Z. Q., Yu, W. & Liu, Z. L. 1999. Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 103: 125-35.
- Lloyd, R. V., Hanna, P. M. & Mason, R. P. 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 22: 885-8.
- Maltese, A., Maugeri, F., Ward, K. W. & Bucolo, C. 2007. Development and validation of an RP-HPLC-UV method for the determination of BOL-303225-A, a new coumarin-based anti-inflammatory drug, in rat plasma. *Biomed Chromatogr* 21: 351-5.
- Martins, H. F., Leal, J. P., Fernandez, M. T., Lopes, V. H. & Cordeiro, M. N. 2004. Toward the prediction of the activity of antioxidants: experimental and theoretical study of the gas-phase acidities of flavonoids. *J Am Soc Mass Spectrom* 15: 848-61.
- Mates, J. M. & Sanchez-Jimenez, F. M. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 157-70.
- Natarajan, R., Stern, N., Hsueh, W., Do, Y. & Nadler, J. 1988. Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-mediated aldosterone biosynthesis in human adrenal glomerulosa cells. *J Clin Endocrinol*

Metab 67: 584-91.

- Nie, D., Krishnamoorthy, S., Jin, R., Tang, K., Chen, Y., Qiao, Y., Zacharek, A., Guo, Y., Milanini, J., Pages, G. & Honn, K. V. 2006. Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 281: 18601-9.
- Nishio, E. & Watanabe, Y. 1997. Role of the lipoxygenase pathway in phenylephrine-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Eur J Pharmacol* 336: 267-73.
- Okuda, S., Saito, H. & Katsuki, H. 1994. Arachidonic acid: toxic and trophic effects on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 63: 691-9.
- Postovit, L. M., Seftor, E. A., Seftor, R. E. & Hendrix, M. J. 2006. Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. *Cancer Res* 66: 7833-6.
- Raj, H. G., Parmar, V. S., Jain, S. C., Goel, S., Poonam, Himanshu, Malhotra, S., Singh, A., Olsen, C. E. & Wengel, J. 1998. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part I: Dioxygenated 4-methyl coumarins as superb antioxidant and radical scavenging agents. *Bioorg Med Chem* 6: 833-9.
- Rashba-Step, J., Turro, N. J. & Cederbaum, A. I. 1993. Increased NADPH- and NADH-dependent production of superoxide and hydroxyl radical by microsomes after chronic ethanol treatment. *Arch Biochem Biophys* 300: 401-8.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-56.
- Saibara, T., Toda, K., Wakatsuki, A., Ogawa, Y., Ono, M. & Onishi, S. 2003.

- Protective effect of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, a free radical scavenger, on acute toxicity of paraquat in mice. *Toxicol Lett* 143: 51-4.
- Schuppan, D. & Popov, Y. 2002. Hepatic fibrosis: from bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 17 Suppl 3: S300-5.
- Sekiya, K. & Okuda, H. 1982. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem Biophys Res Commun* 105: 1090-5.
- Sharma, S. D., Rajor, H. K., Chopra, S. & Sharma, R. K. 2005. Studies on structure activity relationship of some dihydroxy-4-methylcoumarin antioxidants based on their interaction with Fe(III) and ADP. *Biometals* 18: 143-54.
- Stohs, S. J. & Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18: 321-36.
- Tao, J., Hu, S., Pacholec, M. & Walsh, C. T. 2003. Synthesis of proposed oxidation-cyclization-methylation intermediates of the coumarin antibiotic biosynthetic pathway. *Org Lett* 5: 3233-6.
- Verhaegen, M., Bauer, J. A., Martin de la Vega, C., Wang, G., Wolter, K. G., Brenner, J. C., Nikolovska-Coleska, Z., Bengtson, A., Nair, R., Elder, J. T., Van Brocklin, M., Carey, T. E., Bradford, C. R., Wang, S. & Soengas, M. S. 2006. A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species. *Cancer Res* 66: 11348-59.
- Wang, J., Yu, Y., Hashimoto, F., Sakata, Y., Fujii, M. & Hou, D. X. 2004. Baicalein induces apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in HL-60 cells. *Int J Mol Med* 14: 627-32.

- Winer, I., Normolle, D. P., Shureiqi, I., Sondak, V. K., Johnson, T., Su, L. & Brenner, D. E. 2002. Expression of 12-lipoxygenase as a biomarker for melanoma carcinogenesis. *Melanoma Res* 12: 429-34.
- Wu, C., Chen, F., Wang, X., Wu, Y., Dong, M., He, G., Galyean, R. D., He, L. & Huang, G. 2007. Identification of antioxidant phenolic compounds in feverfew (*Tanacetum parthenium*) by HPLC-ESI-MS/MS and NMR. *Phytochem Anal* 18: 401-10.
- Wu, W. S. 2006. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 25: 695-705.
- Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. C. & Curran, T. 1992. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J* 11: 3323-35.

