

# 4-Phenylcoumarin 衍生物抗氧化活性之研究

## 目 錄

|          | 頁數 |
|----------|----|
| 目 錄      | 1  |
| 縮 寫 表    | 3  |
| 中文摘要     | 4  |
| 英文摘要     | 5  |
| 壹、前 言    | 6  |
| 貳、研究動機   | 15 |
| 參、材料與方法  |    |
| 一、化學試劑   | 16 |
| 二、器 材    | 18 |
| 三、儀 器    | 19 |
| 四、實驗方法   | 20 |
| 肆、結 果    | 30 |
| 伍、討 論    | 37 |
| 陸、參考文獻   | 43 |
| 柒、圖、表    |    |
| Table 1  | 54 |
| Table 2  | 55 |
| Table 3  | 56 |
| Table 4  | 57 |
| Table 5  | 58 |
| Table 6  | 59 |
| Table 7  | 60 |
| Table 8  | 61 |
| Figure 1 | 62 |
| Figure 2 | 63 |
| Figure 3 | 64 |
| Figure 4 | 65 |
| Figure 5 | 66 |

|           |    |
|-----------|----|
| Figure 6  | 67 |
| Figure 7  | 68 |
| Figure 8  | 69 |
| Figure 9  | 70 |
| Figure 10 | 71 |
| Figure 11 | 72 |
| Figure 12 | 73 |

## 縮寫表

**ROS** : reactive oxygen species

. **OH** : hydroxyl radicals

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** : superoxide anion

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : hydrogen peroxide

**NO** : nitric oxide

**DPPH** : 1,1diphenyl-2-picrylhydrazyl

**t-BHP** : tert-butylhydroperoxide

**SNP** : sodium nitroprusside

**MTT** : 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

**LDH** : lactate dehydrogenase

**ALT** : alanine transaminase

**AST** : aspartate transaminase

**MDA** : malondialdehyde

**GSH** : glutathione

**GSSG** : glutathione disulfide

**LDL** : low density lipoprotein

**REM** : relative electrophoretic mobility

## 中文摘要

生物體過多的活性氧系(ROS:  $\cdot$ OH、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、RO $\cdot$  etc)堆積將導致氧化性傷害，此一過程與發炎、癌症或退行性疾病有密切關係，且近年來陸續有許多報告提出：抗氧化天然物或藥物在保健上扮演一重要角色。已知含有 4-Phenylcoumarin 衍生物之豆科降香檀(*Dalbergia odorifera* Chen) 具有鎮靜、鎮痛、抗惊；抑制血小板凝聚、抗瘀血、抗炎和降血脂等作用，但其作用機制尚不清楚，所以本研究在於探討經由合成 4-Phenylcoumarin 所獲得之七種衍生物中，在抗氧化和抗癌活性上之影響。首先由實驗發現 4-Phenylcoumarin 衍生物中：DHCO、DHPC 能有效捕捉 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)，其  $EC_{50}$  分別為 5.8 和 7.5  $\mu$ M。進一步的以 t-BHP 誘發鼠肝細胞氧化性傷害之模式，進行 DHCO 和 DHPC 之抗氧化活性分析，實驗顯示培養基中 LDH、ALT 和 AST 等酵素含量、肝細胞脂質過氧化產物 MDA 的上升及 GSH 因 t-BHP 的代謝消耗而降低，均能顯著地被 DHCO 和 DHPC (100 $\mu$ M)所抑制。另以 SNP 誘發巨噬細胞過氧化作用為模式進行實驗，也顯示了 DHCO 能抑制經由 SNP 所誘導巨噬細胞過氧化作用。

以上結果證明：4-Phenylcoumarin 衍生物能經由捕捉自由基的能力，來抑制由 t-BHP 或 SNP 誘導的氧化壓力所造成之細胞損傷。

關鍵字：4-Phenylcoumarin 衍生物、降香檀、抗氧化作用

## 英文摘要

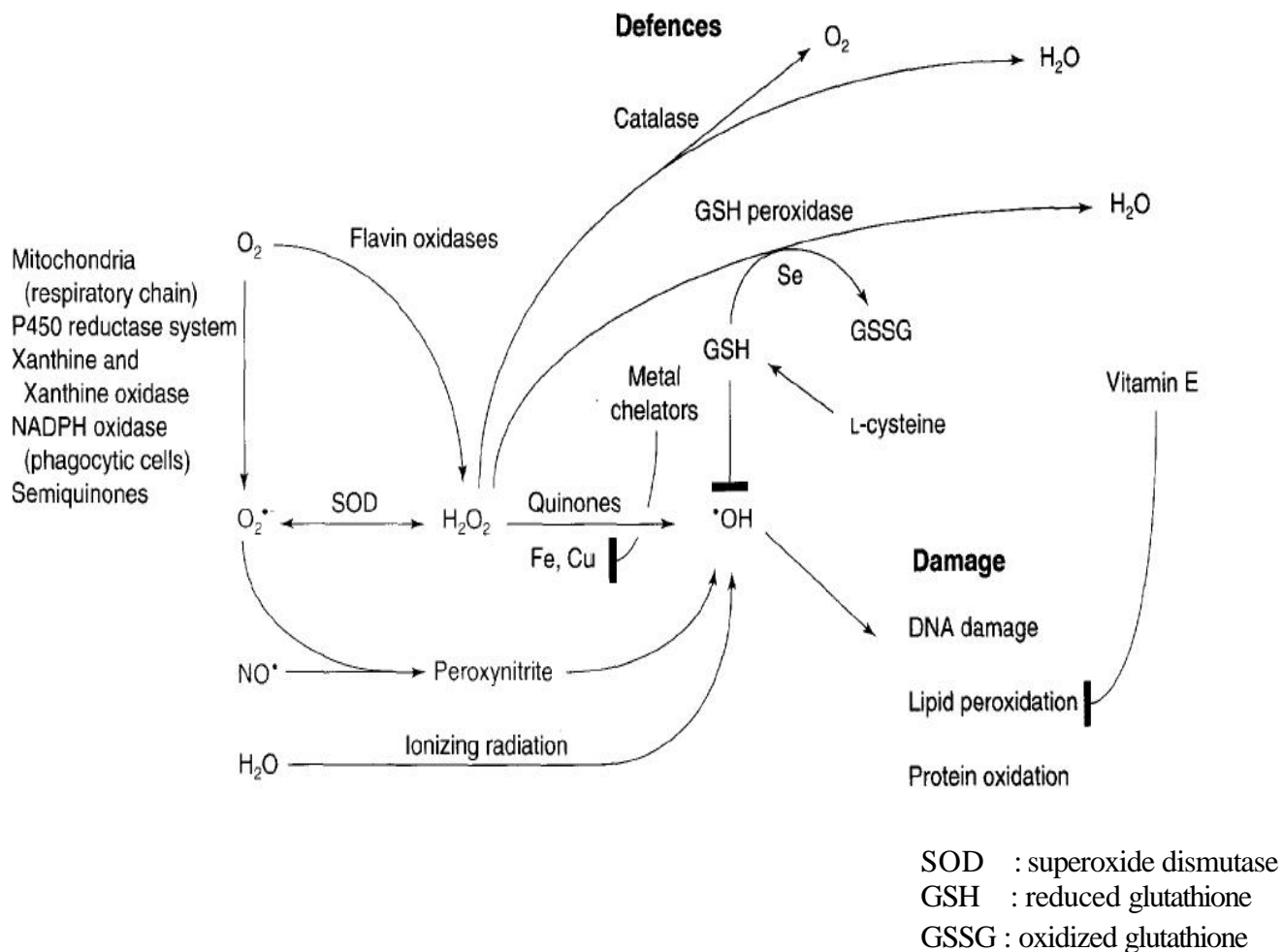
Excessive formation of oxidants in biological systems is suggested involving several inflammatory diseases and cancer. Therefore, many studies have supported that antioxidant nutrients or/and medicines play a protective role in human health. The biological role of 4-phenylcoumarins containing in Leguminosea such as *Dalbergia odorifera* Chen, is not well understood. We obtained seven 4-phenylcoumarin analogues from total synthesis of 4-phenylcoumarin. In this experiment, we preliminarily examined the free radical quenching capacity of these seven compounds in vitro by 1,1-diphenyl-1,2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals. DHCO and DHPC showed the greatest capacity of scavenging ( $EC_{50} = 5.8 \mu\text{M}$  and  $7.5 \mu\text{M}$ ). Furthermore, antioxidant bioactivities of DHCO and DHPC was investigated using a model of tert-butylhydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. DHCO and DHPC decreased the leakage LDH, ALT, AST and the formation of MDA induced by t-BHP in vitro. In addition, antitumor activity of these seven analogues were tested by MTT assay on HL-60 leukemia cells and Hep3B. The DHCO showed the greatest cytotoxicity on HL-60 cells specifically. Although the mechanism of antitumor activity for these compounds needs further investigation, the results suggest that 4-phenylcoumarin analogues possess potential as chemopreventers.

Key words: 4-phenylcoumarin analogues, antioxidant, chemopreventers

## 壹、前 言

近年來有許多報告提出生物體過多的活性氧系(ROS:  $\cdot$ OH、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、 $RO\cdot$  etc)堆積將導致氧化性傷害如附圖一 (1)，此一過程與發炎、癌症或退行性疾病有密切關係 (2-5)，而活性氧系的來源很多如：由飲食攝入、細菌或病毒感染、抽煙及生理代謝等等 (6)，雖然生物體有一套完整系統可以降低或消除氧化性傷害如 Glutathione、ceruloplasmin、抗氧化酵素 (catalase、GSH-peroxidase) 等等，但是過量或急遽的活性氧系將產生不可逆的氧化性傷害，因此由飲食中攝取具有抗氧化活性或活化抗氧化酵素之物質，可能具有保健之效。又據流行病學調查中顯示多攝取蔬菜水果可減少心血管疾病及癌症之發生 (7-10)，近年來更有學者指出某些飲料如綠茶、葡萄酒等都因其含有多酚化合物，在體外或體內系統之實驗上都含有良好的抗氧化活性 (11-14)，所以由探討中得知多酚化合物扮演著一重要角色。

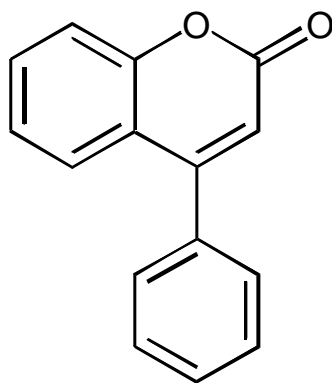
附圖一：



Major ROS pathways and antioxidant defences.

ref: *TIBS*. 1996. 21, 83-86

4-Phenylcoumarin 是 coumarin 的衍生物之一，已知 coumarin 在生物活性上具有良好的抗氧化作用、抗炎、抗凝血和抗腫瘤等等活性 (15-17)，而 Chang 等也說明了各種 coumarin 之衍生物其具有抗氧化功效，能夠抑制 xanthine oxidase 活性，進而抑制代謝過程中 superoxide anion 的產生(18-19)。在傳統藥用植物中茜草科之 *Exostema caribaeum*、*Exostema mexicanum*、*Exostema acuminatum* (20-23)和豆科之降香檀(*Dalbergia odorifera* Chen)、漆樹科之黃練芽(*Pistacia chinensis* Bge.)中均含有此類衍生物，為多酚化合物結構，在歐美傳統醫學上 *Exostema caribaeum*、*Exostema mexicanum* 和 *Exostema acuminatum* 常做為抗痢疾藥物使用，而在中國”本草綱目”中降香檀取乾燥心材(稱降香 *Jiangxiang*)做為對中樞神經系統的抑制作用：鎮靜、鎮痛、抗驚；抑制血小板凝聚、抗瘀血、抗炎和降血脂等作用 (24-25)，黃練芽(黃連芽)在”綱目拾遺”中取黃連木之葉芽主治清熱、解毒、止渴。



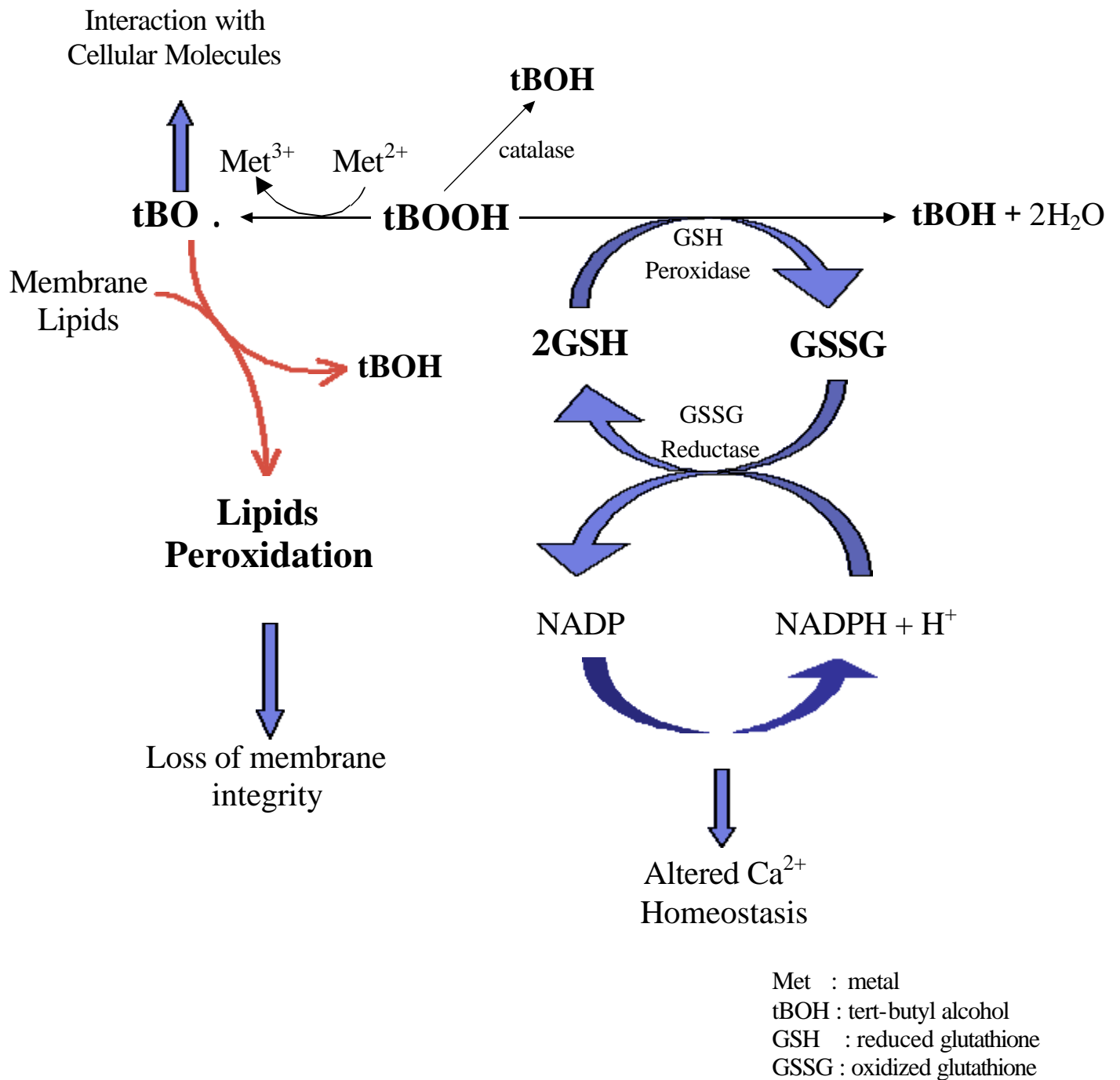
4-Phenylcoumarin



tert-Butylhydroperoxide (t-BHP)之過氧化作用：

t-BHP 可藉由 cytochrome p450(在肝細胞中)或是血色素(在紅血球中)代謝形成自由基，自由基會引發脂肪的過氧化反應，進而影響到細胞的完整性，並會與細胞中的分子形成共價鍵結造成細胞損傷 (26)，其可能造成細胞毒性機制如附圖二。t-BHP 在細胞內很快的被 glutathione peroxidase 代謝成 tert-butyl alcohol 和 glutathione disulfide(GSSG)；接著 GSSG 被 glutathione reductase 再氧化回 GSH 而造成 NADPH 的氧化 (27-28)，進一步影響到鈣離子的平衡 (29-30)，另外 t-BHP 於金屬離子的存在下會還原成 t-BHP 自由基，而造成細胞膜脂質之過氧化 (31-32)，此自由基或相伴產生的自由基攻擊細胞內之分子而造成毒性，如·OH 等小分子產生而攻擊 DNA (33)。

附圖二：



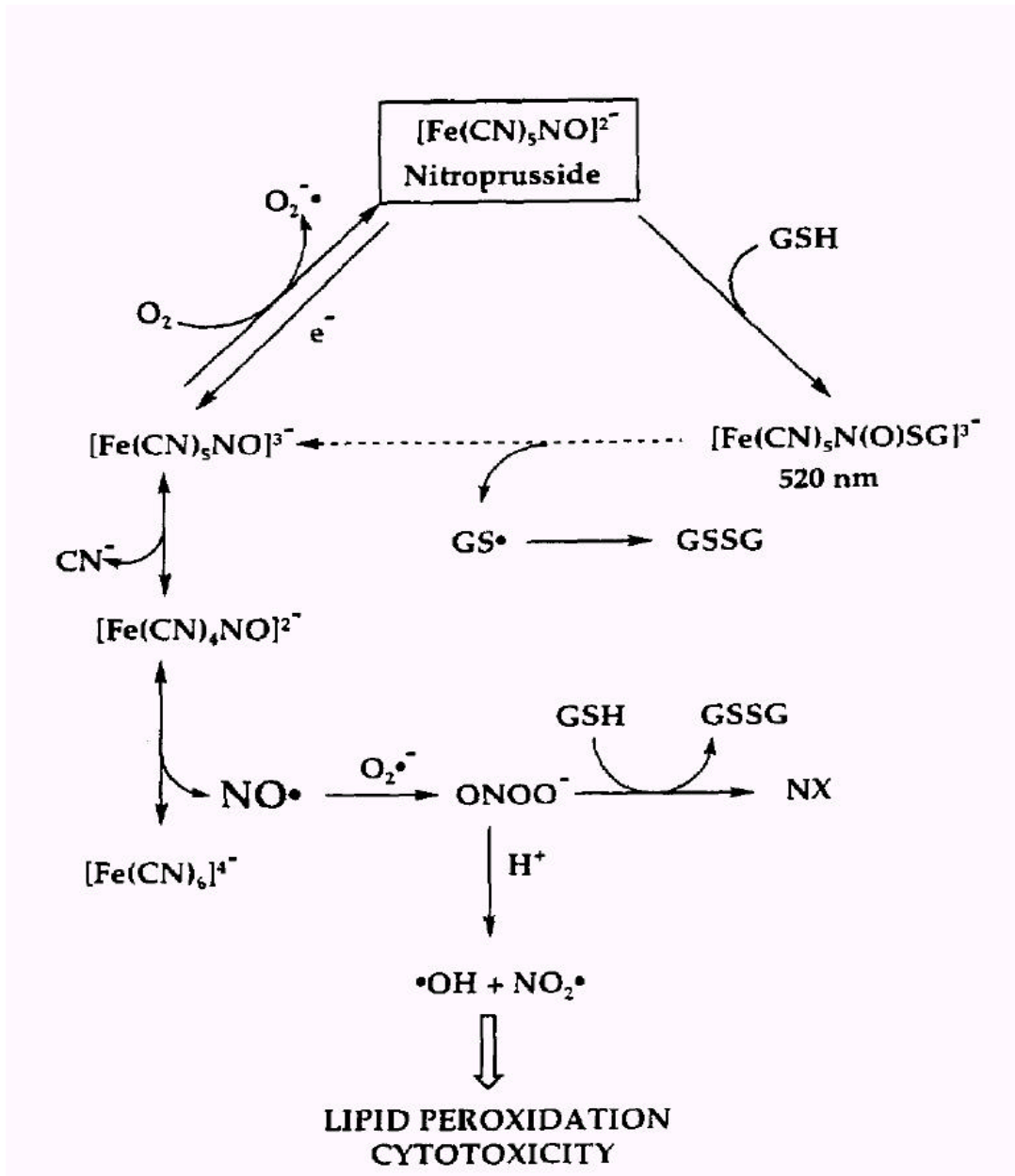
Proposed mechanism of cell death induced by tert-butylhydroperoxide

Sodium nitroprusside ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ; SNP) :

Sodium nitroprusside 是一抗高血壓藥物，直接作用於血管擴張使得動脈與靜脈血管平滑肌的鬆弛 (34)，在臨床和藥理學上及生物醫學研究上則作為一 NO donor。然 SNP 會促使細胞釋放 iron 並伴隨 superoxide 和 peroxynitrite 的產生，而誘發細胞的脂質過氧化作用及 cyanide (CN) 的釋放，而產生細胞毒性如附圖三 (35-37)。

先前的研究發現 NO donors 會阻斷由銅離子等所誘發脂質過氧化的連鎖反應而抑制細胞對 low density lipoprotein (LDL) 的氧化 (38)，故 NO donor 可用來防禦心血管疾病的產生，SNP 也是 NO donor 中的一員，但作用卻是相反，會促進巨噬細胞氧化 LDL，其機轉為 SNP 在巨噬細胞中釋出  $\text{Fe}^{2+}$  並伴隨 superoxide 的產生因而增加氧化壓力而促進細胞對 LDL 的氧化，其中 SNP 的作用與 NO release 較無關連，據文獻提到當巨噬細胞產生脂質過氧化或 GSH 的下降時，會促使巨噬細胞對 LDL 的氧化 (39)。由於 SNP 會造成巨噬細胞脂質過氧化的形成，GSH 的下降，並會促進巨噬細胞對 LDL 氧化的模式 (40)，來看 4-phenylcoumarin 保護作用。

附圖三：



Proposed mechanism of metabolism and cytotoxicity of SNP.

ref: *Biochem. Pharmacol.* 1996. 51, 1031-1039

## 脂質過氧化作用：

脂質曝露於空氣中會自動氧化 (autooxidation)，不但造成食物的腐敗，同時也會傷害活體內的組織如癌症的產生、發炎疾病、動脈硬化、老化等等致病原因。這種有害的作用係由各種自由基 (ROO·、RO·、OH·) 所引發。英國學者 Harman 等人於 1962 年提出“自由基”學說以來，已經發現自由基與許多疾病或病理過程有關 (41)。自由基之間除了可以相互轉變外，也可以氧化生物體內巨分子，例如：DNA。內生性的氧化作用在細胞膜上會進行脂質過氧化作用，使得細胞膜上的脂質裂解，產生各種複雜的脂質自由基 (42-43)。malondialdehyde (MDA) 即是脂質過氧化作用的重要裂解產物 (44)。

天然的多不飽和脂肪酸中，常帶有兩個氫鍵夾著一個甲烯基 (diene) 之構造，這種構造發生過氧化反應時，即會生成自由基，而觸發脂質的過氧化反應。脂質過氧化作用是一種連鎖反應，它不斷產生自由基，以供觸發進一步的過氧化。其過程如下：



由於 RH 雙鍵上的氫原子，極易受到自由基的攻擊而形成 R<sup>•</sup>，R<sup>•</sup> 又自發的與氧起反應成為 ROO<sup>•</sup>，ROO<sup>•</sup> 又吸引一個氫原子 (使另一個多不飽和脂肪酸分子過氧化)，而形成一種較穩定的 ROOH 及一個分子的 R<sup>•</sup>。脂質過氧化反應之產物 ROOH，為引發連鎖反應之前驅物質，所以脂質的過氧化反應具有潛在的破壞作用。

MDA 是脂質過氧化作用的裂解產物。MDA 是極活潑的交聯劑 (cross linking agent)，因此可使細胞發生交聯而失去活性。最近有許多研究顯示在人類及嚙齒類，未經致癌物處理 (carcinogen treatment) 而測到 exocyclin propano，etheno 及 MDA 在 DNA 上形成 DNA adducts。這些在 DNA 上形成的 exocyclin adduct 會引起細菌和人類種種突變，包括 substitutions 和 frameshift (45-46)。MDA 可作為測定自由基引起脂質過氧化的一種指標 (47)。

## 貳、研究動機

截至目前為止 4-Phenylcoumarin 之機能性功能尚不清楚，因此本研究利用 t-BHP 誘發老鼠初代肝細胞氧化性傷害及 SNP 誘發巨噬細胞氧化性傷害之模式，來探討 4-Phenylcoumarin 之抗氧化作用。

## 參、材料與方法

### 一、化學試劑

[1] 購自美國 GIBCO BRL 公司:

| <u>名 稱</u>             | <u>英文全名</u>                            |
|------------------------|--|
| RPMI 1640 medium       |  |
| DMEM :                 | Dulbecco' s Modified eagle medium      |
| William' s medium E    |  |
| HBSS :                 | Hanks balanced salt solution           |
| PSN antibiotic mixture |  |
| NEAA :                 | MEM non-essential amino acids solution |
| FBS :                  | Fetal bovine serum                     |
| PBS :                  | Phosphate buffer saline                |
| Trypsin-EDTA           |  |

[2] 購自美國 Sigma 公司:

| <u>名 稱</u> | <u>英文全名</u>  |
|------------|--|
| DPPH :     | 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl                                    |
| MTT :      | 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl<br>tetrazolium bromide |
| TBA :      | Thiobarbituric acid  |
| t-BHP :    | Tert-butylhydroperoxide  |
| SNP :      | sodium nitroprusside   |
| GSH :      | glutathione reduced form   |
| GSSG :     | glutathione oxidized form  |
| NEM :      | N-ethylmaleimide   |



OPT : o-phthalaldehyde  
ferrozine  
Cytochrome C  
CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzene  
SDS : Sodium dodecyl sulfate

[3] 購自美國 Bio-Rad 公司:

| <u>名 稱</u>        | <u>英文全名</u>                                   |
|-------------------|---|
| Protein assay kit |   |
| BSA :             | Lyophilized Bovine Serum Albumin              |
| Glycine           |   |
| Tris-HCl :        | Tris (hydroxymethyl)-aminoethan hydrochloride |

[4] 購自美國 BECKMAN 公司:

| <u>名 稱</u>               |  |
|--------------------------|--|
| Beckman Paragon LIPO Gel |  |

[5] 購自德國 Boehringer Mannheim 公司:

| <u>名 稱</u>  |  |
|-------------|--|
| collagenase |  |

[6] 其他:

| <u>名 稱</u>  | <u>英文全名</u> |
|-------------|-------------|
| Methanol    |             |
| Ethanol     |             |
| Isopropanol |             |

n-butanol  
percoll  
NaHPO<sub>4</sub> : sodium phosphate  
NaCl : sodium chloride  
Phosphotungstic acid  
Tween-20#  
Bromophenol blue  
glycerol  
Ammonium persulfate  
hydroxylamine hydrochloride  
ammonium acetate  
Ammonium hydroxide  
Coomassie blue

## 二、器 材

[1] 購自 FALCON 公司:

### 名 稱

Tissue culture Dish  
Tissue culture Flask  
Microtest culture plates  
Polypropylene conical tubes

[2] 購自 Millipore 公司:

### 名 稱

Sterivex - GV 0.22μm filter unit

[3] 其他:

名 稱

Filtertips

Micro test tubes

Disposable syringe

### 三、儀 器

中文名稱

英文名稱/廠商型號

二氧化碳培養箱:

NUATR CO<sub>2</sub> water-Jacketed incubator

冷藏冰箱:

Whirlpool

無菌操作台:

NUATR Biological Safety Cabinots

分光光譜儀:

UV and Visble Spectrophotometer

HITACHI/U2000

螢光分光光譜儀:

Fluorescence Spectrophotometer

HITACHI/F2000

倒立式顯微鏡:

Nikon/Diaphot 300

電泳分析儀:

Beckman paragon lipo gel electrophoresis system

震盪器:

Scientific industries vortex genie 2

超高速離心機:

Beckman TL-100

桌上型離心機:

KUBOTA 2010

微量離心機:

Shelton VS 15

冷凍離心機:

Universal 32/32R

乾浴槽:

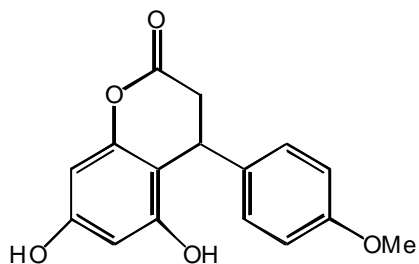
T hermolyne

|              |                    |
|--------------|--------------------|
| 水浴槽:         | Techne TE 8J       |
| 電子天秤:        | Sartorius analytic |
| 電磁攪拌加熱器:     | CORNING            |
| 酸鹼值測定儀:      | JENCO electronics  |
| 三度空間震盪器:     | pippet shaker      |
| Homogenizer: | EYRLA MAZELA Z     |

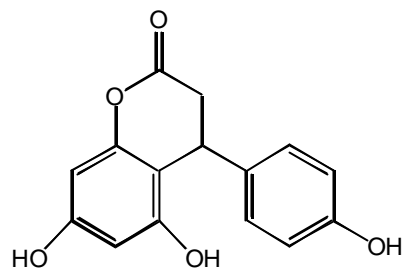
## 四、實驗方法

材料來源：4-phenylcoumarin 衍生物由國立彰化師範大學化學系

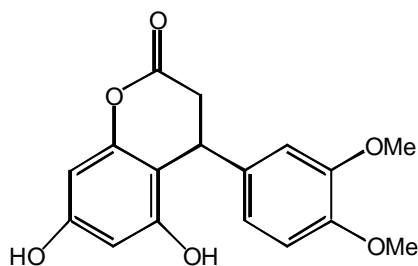
李衍彰教授所提供。



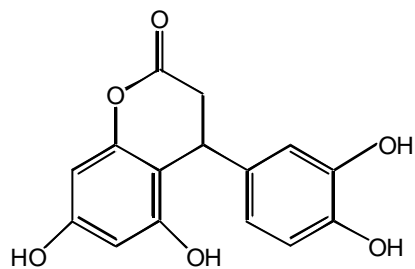
5,7-Dihydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-chroman-2-one (MMCO)



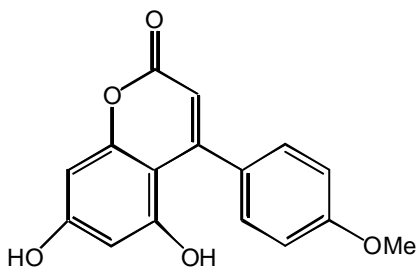
5,7-Dihydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-chroman-2-one (MHCO)



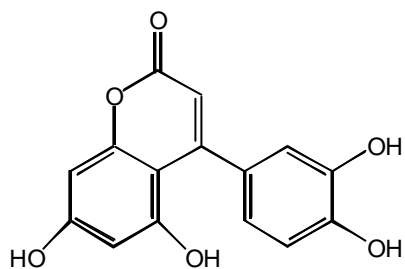
5,7-Dihydroxy-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-chroman-2-one (DMCO)



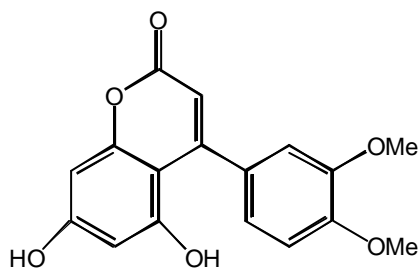
5,7-Dihydroxy-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-chroman-2-one (DHCO)



5,7-Dihydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-coumarin (MMPC)



5,7-Dihydroxy-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-coumarin (DMPC)



5,7-Dihydroxy-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-coumarin (DMPC)

The chemical structure of  
4-phenylcoumarin analogus

## (一) 初代鼠肝細胞之培養

初代培養之肝細胞係根據 Bonney 氏等之方法 (48)，以肝臟灌流方法取得(two-stage liver perfusion method)。由購自台中榮民總醫院 Sprague-Dawley 品系大鼠腹腔注射戊基巴比妥(pentobarbital) (50 mg/ml)劑量每 100 公克體重為 0.2 ml，麻醉後，打開腹腔，以 20G 血管導管穿刺肝門脈，固定之後以加有 EDTA 不含鈣、鎂離子之 HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)緩衝液 100ml 灌流，同時剪斷下腔靜脈放血，再以含膠原酵素(collagenase)之 HBSS 緩衝液灌流 100ml 後，取下肝臟，分離肝細胞，以  $1 \times 10^6$  cells/ml 之細胞密度培養於含 10% 胎牛血清、1% PSN 和 1% glutamine 之 William's E 培養基中(Gibco)，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 中培養。於最初四小時更換培養基，除去未貼壁之細胞，當作以下各種實驗之細胞材料。

## (二) MTT 法之細胞活性分析

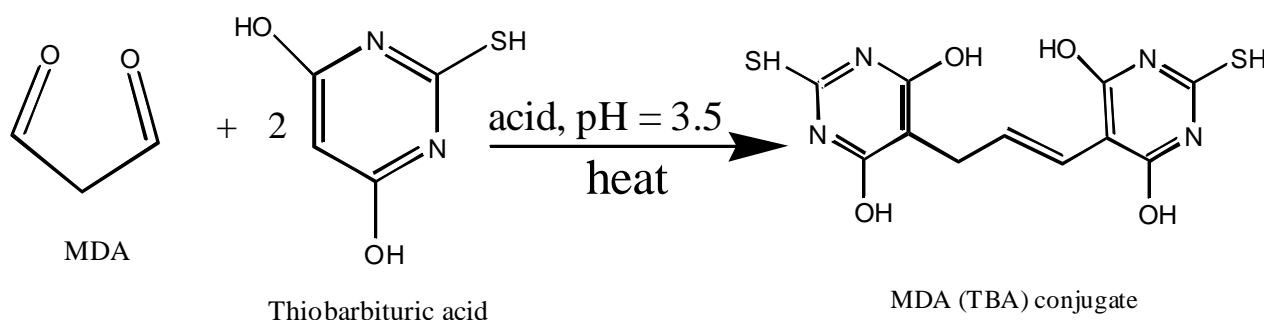
細胞活性分析係根據 Alley 等之方法 (49)，其原理是存活的肝細胞能將 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)經由粒線體中的 dehydrogenase 作用代謝還原成 formazan crystal，來測其細胞存活。實驗方法：是在 24 well 的培養皿中置入一定量肝細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/ml)，於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 中培養四小時，然後加入 10 $\mu$ M、20 $\mu$ M、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M 的 4-phenylcoumarins，培養 24 小時後，除去培養基，加入新的培養基及 100 $\mu$ l MTT (final 0.5mg/ml)，作用 4 小時後，除去培養基，加入 1 ml isopropanol 將 formazan 溶解，於波長 563 nm 下測定 OD 值。

### (三) 自由基捕捉劑之測定

本實驗使用 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基，因其在結構上可以產生穩定的共振，可在適當的狀態下長時間保存 (50)，且其在 571nm 的波長下有獨特的吸光值，當 DPPH 的濃度降低，其吸光值亦隨之降低。測定係將不同濃度 4-phenylcoumarins 溶於 DMSO 中及以 DMSO 為控制組，均取 100 $\mu$ l 加入含 2.87 ml methanol 和 30 $\mu$ l 10mM DPPH 的 reaction mixture，於室溫中反應 30 分鐘，再加入 1 ml redistilled water 與 3 ml 的 toluene 充分混合，之後以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液置 spectrophotometer 於 571nm 波長下測其吸光值。

### (四) MDA 生成濃度之分析

肝細胞中脂質過氧化係根據 Yagi 氏等修飾之螢光測定法 (51) 藉著 thiobarbituric acid (TBA)，來測定 malondialdehyde (MDA) 的生成濃度。其測定原理為：



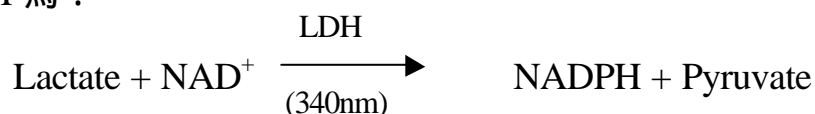
實驗方法：是在肝細胞  $1 \times 10^6$  cells/ml，加入 10 $\mu$ M、20 $\mu$ M、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M 的 4-phenylcoumarins 前處理 1 小時後，再加入 1.5 mM tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) 繼續培養 30 分鐘，另以單獨處理 t-BHP 者作為控制組。除去培養基，以 PBS wash 及 1 ml 50 mM phosphate buffer 收集細胞，取 0.5 ml 細胞懸浮液加入 3% SDS、0.1N HCl、10%

phosphotungstic acid、0.7% 2-thiobarbituric acid 之後，避光下加熱 100 30 分鐘，再加入 2 ml n-butanol 萃取，最後以 3000 rpm 離心 10 分鐘取上清液測定。採用 1,1,3,3-tetramethoxypropane 當作 standard，於 Ex 515 nm/Em 553 nm 下測定螢光強度。取 0.1 ml 細胞懸浮液用 protein assay kit (Bio Rad)，以 BSA 當 standard，定量蛋白質含量。

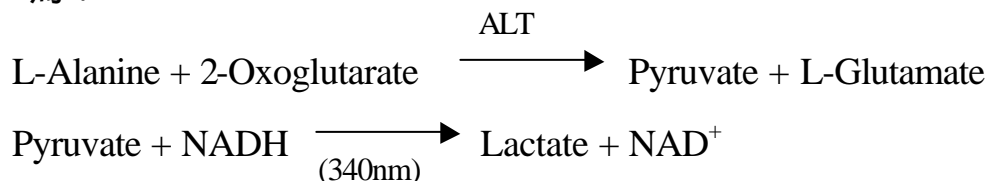
## (五) 肝細胞毒性分析

以肝功能診斷酵素包括 LDH、ALT、AST 作為急性肝細胞毒性分析的指標 (52)。測定係將不同濃度的 4-phenylcoumarins 10 $\mu$ M、20 $\mu$ M 50 $\mu$ M 100 $\mu$ M 先加入培養之肝細胞培養基中前處理 1 小時後，再加入 1.5 mM tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) 繼續培養 30 分鐘，以單獨處理 t-BHP 作為控制組，之後收集培養基，分別取 1 ml 的培養基，以 Sigma 公司的 Lactate dehydrogenase (LDH) kit、Aspartate aminotransferase (ALT) kit 和 Aspartate aminotransferase (AST) kit 在波長 340 nm 下測定 NADH 的生成增加或減少表示 LDH、ALT 和 AST 的活性，其測定原理分別為：

LDH 為：

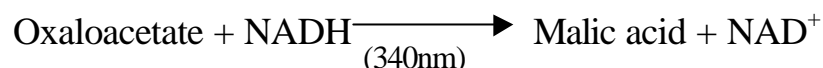


ALT 為：





AST 為：



## (六) GSH、GSSG 定量分析

GSH、GSSG 的定量分析方法主要是根據 Hissin 等人的方法 (53)，在 4℃ 下將細胞均質化並離心取其上清液再加入螢光呈色劑 OPT (o-phthalaldehyde) 與 GSH、GSSG 反應形成螢光物質，以 Fluorescence spectrophotometer 於激發波長 Ex 350 nm，放射波長 Ex 420 nm 下測其吸光，最後以  $\mu\text{ mole GSH} / \text{mg protein}$  表示之。鼠肝細胞  $1 \times 10^6$  cells 種於 60 mm dish 內，加入 10 $\mu\text{M}$ 、20 $\mu\text{M}$ 、50 $\mu\text{M}$ 、100 $\mu\text{M}$  的 4-phenylcoumarins 一小時後，再加入 1.5 mM tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) 繼續培養三十分鐘，另以單獨處理 t-BHP 者作為控制組。去除舊 medium 並在冰上操作以 1ml 冰的 PBS wash 二次，再以冰的 homogenizer buffer [0.3 ml 25% HPO<sub>3</sub> + 1.2 ml phosphate-EDTA (0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 5 mM EDTA) PH: 8.0] 括下細胞，再經 homogenize 後，以冷凍離心機 4℃，11500 rpm，離心 30 分鐘。

### GSH assay

取 100 $\mu\text{l}$  supernatant + 1.8 ml GSH buffer + 100 $\mu\text{l}$  OPT (溶於 MeOH)、充份混合後，室溫避光反應 15 分鐘，並以螢光分光光度儀 Ex 350 nm/Em 420 nm 下定量。

## GSSG assay

取 500 $\mu$ l supernatant + 200 $\mu$ l 0.04M NEM (N-ethylmaleimide)之水溶液，在室溫 incubate 30 分鐘，然後取 100 $\mu$ l mixture + 1.8 ml GSSG buffer + 100 $\mu$ l OPT (溶於 MeOH)、充份混合後，室溫避光反應 15 分鐘，並以螢光分光光度儀 Ex 350 nm/Em 420 nm 下定量。

## (七) 動物實驗

### 一、動物來源

Sprague-Dawley 品系雄性大鼠(230  $\pm$  20 g)購自台中榮民總醫院，實驗前至少飼養於動物房一週，使其適應環境；在動物房中，以 Purina Lab Chow 為飼料，蒸餾水不限制使用，並維持在日夜 12 小時循環中。

### 二、動物分組及藥物處理

將 Sprague-Dawley 品系雄性大鼠每六隻一組分為正常組及實驗組，實驗組分別以皮下注射 DHCO 0.05 mg/kg、0.5 mg/kg、2 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg，連續五天，然後斷食一夜(18h)，將老鼠斷頭，取其血液分析。

### 三、血清中肝酵素毒性分析

以肝功能診斷酵素包括 ALT、AST 和 LDH，作為肝毒性分析的指標。而以腎功能診斷酵素包括 BUN、Creatinine 和 Uric Acid，作為腎毒性分析的指標。

## (八) 脂蛋白製備 (Lipoprotein preparation)

取健康志願者的血液，靜置待血液凝固後，以 3000rpm 離心十分鐘，取上清液即為血清。然後以血清來製備 LDL (54-56)。

取血清 2.0ml 加入 0.15M NaCl 及 0.3mM EDTA (PH7.4) 放入 Beckman TL-100 桌上型超高速離心機，以  $9 \times 10^4$  rpm、10 離心 10 分鐘，除去上層液，再加入 0.15M NaCl 及 0.3mM EDTA (PH 7.4)， $9 \times 10^4$  rpm、10 ，離心 3.5hrs，除去上層液，再加入 KBr，再離心 3.5hrs，上層液即為 LDL。

由於 LDL 在純化過程中加入 EDTA，所以必須以透析法去除 LDL 的 EDTA (57-58)，我們用 column PD-10 (G-25 PD-10 Sephadex column; Pharmacia)，先以 25ml PBS 過 PD-10 column，再加 2.5ml sample (LDL)，然後再加 3.5ml PBS，去除前面 0.5ml 剩下 3ml 即為去 EDTA 之 LDL。

## (九) relative electrophoretic mobility (REM)

以 Beckman paragon lipo gel electrophoresis system (Beckman analytic, milan, Italy)，目的在測量脂蛋白的 electrophoretic mobility。將 RAW 細胞培養於 RPMI medium 中含 10% serum 及 1% antibiotics (penicillin、streptomycin、neomycin)，種植  $2.5 \times 10^5$  cells/ml over night 貼壁後，改換為 Dulbecco's modified serum free medium (DMEM-F12)，然後加入 0.1 mM sodium nitroprusside 及 100  $\mu$ g/ml LDL 反應 20hrs，取 medium 測定 LDL 之 MDA、REM。將 sample 5  $\mu$ l loading 至 agarose gel 中進行 electrophoresis，以 100 V 跑 30 分鐘，然後取 gel 烘乾，染色，脫色。其詳細流程如下：

< 電泳步驟 >

gel  
↓  
濾紙吸取多餘水份  
↓  
loading LDL sample 5 $\mu$ l, 5min  
↓  
長條濾紙吸多餘 sample  
↓  
架膠, 加 buffer 至線齊  
↓  
100V、30min (注意正負極)  
↓  
固定液 5min  
↓  
烘乾 (務必全乾)  
↓  
染色 5min  
↓  
脫色I、II、III  
↓  
烘乾

< 試劑配置 >

\* buffer : 18.2g 可泡成 1500ml  
6.07g/500ml 泡好室溫可保持 60 天

\* 固定液 : 180ml 酒精

+

90ml 水

+

30ml 冰醋酸

↓ mix 完全

室溫保存

\* 染色液 : 165ml 酒精

+

3ml paragon Lipo stain

+

135ml 水

↓ mix 5-10 min

室溫可保存 7 天

\* 脫色液I、II、III :

450ml 酒精

+

550ml 水

↓ mix 完全

室溫保存

## (十) Superoxide assay

將培養中之巨噬細胞(RAW264.7 cell)調整細胞濃度為  $2.5 \times 10^5$  cell/ml, 隔夜貼壁後, 換 RPMI 1640 之無色培養基並加入  $5\mu\text{M}$   $10\mu\text{M}$   $20\mu\text{M}$  和  $50\mu\text{M}$  等不同濃度的 DHCO 並加入  $0.1\text{mM}$  SNP 當實驗組, 以單獨處理 SNP 作為控制組, 培養 20 小時之後收集培養基, 分別取  $0.9\text{ ml}$  的培養基, 加  $0.1\text{ ml}$   $1.2\mu\text{M}$  cytochrome C, 於  $37^\circ\text{C}$  水浴中反應 10 分鐘, 置於冰上 5 分鐘停止反應, 於  $550\text{nm}$  波長下測其吸光值 (59)

## (十一) Iron assay

將培養中之巨噬細胞(RAW264.7 cell)調整細胞濃度為  $2.5 \times 10^5$  cell/ml, 隔夜貼壁後, 換 RPMI 1640 之無色培養基並加入  $5\mu\text{M}$   $10\mu\text{M}$   $20\mu\text{M}$  和  $50\mu\text{M}$  等不同濃度的 DHCO 並加入  $0.1\text{mM}$  SNP 當實驗組, 以單獨處理 SNP 作為控制組, 培養 20 小時之後收集培養基, 分別取  $1\text{ ml}$  的培養基, 加  $0.02\text{ ml}$  acid reagent, 於水浴中煮沸 10 分鐘, 冷卻至  $20^\circ\text{C}$ , 再加入  $0.02\text{ ml}$  buffer solution 混合 1 分鐘, 於  $562\text{nm}$  波長下測其吸光值 (60)。

## 肆、結 果

### 一、4-Phenylcoumarin analogus 對自由基捕捉能力之測定

利用 DPPH 實驗測定結果顯示 4-Phenylcoumarin analogus 對自由基之捕捉能力，如 Table 1. 所示以 DHCO、DHPC、Esculetin 之捕捉能力最強， $EC_{50}$  分別為 5.8  $\mu$ M、7.5  $\mu$ M 和 6.9  $\mu$ M。

### 二、DHCO 之抗氧化活性

#### (一)、DHCO 對自由基捕捉能力之測定

利用 DPPH 實驗測定結果，顯示 DHCO 對自由基之捕捉作用，具有劑量依存性關係，如 Fig. 2 所示在實驗濃度 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 下之捕捉能力分別為 12.92 %、84.67 % 和 95.22 %。

#### (二)、DHCO 對鼠肝細胞毒性之分析

如 Fig. 3 所示，利用 MTT 方法測定細胞活性時，在實驗濃度為 10  $\mu$ M，20  $\mu$ M，50  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 時顯示對細胞沒有影響，因此本研究採用 10  $\mu$ M，20  $\mu$ M，50  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 等四個濃度作為實驗之非毒性劑量。

### (三)、DHCO 對於 t-BHP 誘發脂質過氧化的影響

本實驗以 MDA 生成濃度作為脂質過氧化之指標，結果如 Fig. 4 所示，單獨以 1.5 mM t-BHP 處理之控制組，其初代培養鼠肝細胞中 MDA 濃度顯著升高。但先經以 DHCO 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 前處理 1 小時後，再以 1.5 mM t-BHP 處理 30 分鐘，結果與單獨處理 t-BHP 之控制組相比較，MDA 的生成濃度明顯地分別降低了 32.7 %、41.6 %、64.4 % 和 70.0 %。

### (四)、DHCO 對 t-BHP 誘發鼠肝細胞毒性之影響

鼠肝細胞在 DHCO 無毒劑量下(10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M)前處理 1 小時後，再以 1.5 mM t-BHP 處理 30 分鐘，使誘發產生細胞毒性。由鼠肝細胞外漏之 LDH、ALT 和 AST 等值的變化，來判斷其對肝功能的保護效果如何？由 Table 2. 所示，單獨加入 1.5 mM t-BHP 控制組之 LDH、ALT、AST 值明顯增加；而 DHCO 能顯著地抑制由 t-BHP 所誘導的肝細胞培養基中所滲漏的 LDH、ALT、AST 值升高現象，且在 100  $\mu$ M 前處理時有意義的降低 LDH 值 59.4 %、ALT 值 58.8 %、AST 值 62.4 %。

### (五)、DHCO 對 t-BHP 誘發鼠肝細胞 GSH 和 GSSG 之影響

由 Table 3. 所示，單獨以 1.5 mM t-BHP 處理之控制組，其初代培養鼠肝細胞中 GSH 和 GSSG 的含量明顯受到抑制。但先經以 DHCO 10  $\mu$ M，20  $\mu$ M，50  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 前處理 1 小時後，再以 1.5 mM t-BHP 處理 30 分鐘，結果與單獨處理 t-BHP 之控制組相比較，GSH 和 GSSG 的含量皆上升且有統計學上意義。

### (六)、DHCO 對大鼠血清肝、腎功能之影響

鼠肝、腎組織之損傷，可由血清中一些酵素的升高作為指標，當以最大劑量 10 mg/kg DHCO 連續五天皮下注射後，在肝功能方面之影響如 Table 4. 所示，LDH、ALT 和 AST 值並無統計學上意義；而在腎功能方面之影響如 Table 5. 所示，BUN、Creatinine 和 Uric Acid 值亦同。由以上結果得知 10 mg/kg 之 DHCO 連續五天皮下注射後，對實驗之大鼠並未產生肝、腎細胞毒性。

## 三、DHPC 之抗氧化活性

### (一)、DHPC 對自由基捕捉能力之測定

利用 DPPH 實驗測定結果，顯示 DHPC 對自由基之捕捉作用，具有劑量依存性關係，如 Fig. 5 所示在實驗濃度 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M 和



100  $\mu\text{M}$  下之捕捉能力分別為 12.19 %、65.08 % 和 91.82 %。

## (二)、DHPC 對鼠肝細胞毒性之分析

如 Fig. 6 所示，利用 MTT 方法測定細胞活性時，在實驗濃度為 10  $\mu\text{M}$ ，20  $\mu\text{M}$ ，50  $\mu\text{M}$  和 100  $\mu\text{M}$  時顯示對細胞沒有影響，因此本研究採用 10  $\mu\text{M}$ ，20  $\mu\text{M}$ ，50  $\mu\text{M}$  和 100  $\mu\text{M}$  等四個濃度作為實驗之非毒性劑量。

## (三)、DHPC 對於 t-BHP 誘發脂質過氧化的影響

本實驗以 MDA 生成濃度作為脂質過氧化之指標，結果如 Fig. 7 所示，單獨以 1.5 mM t-BHP 處理之控制組，其初代培養鼠肝細胞中 MDA 濃度顯著升高。但先經以 DHPC 10  $\mu\text{M}$ ，20  $\mu\text{M}$ ，50  $\mu\text{M}$  和 100  $\mu\text{M}$  前處理 1 小時後，再以 1.5 mM t-BHP 處理 30 分鐘，結果與單獨處理 t-BHP 之控制組相比較，MDA 的生成濃度明顯地分別降低了 43.2 %、63.7 %、75.8 % 和 80.5 %。

## (四)、DHPC 對 t-BHP 誘發鼠肝細胞毒性之影響

鼠肝細胞在 DHPC 無毒劑量下(10  $\mu\text{M}$ ，20  $\mu\text{M}$ ，50  $\mu\text{M}$  和 100  $\mu\text{M}$ )前處理 1 小時後，再以 1.5 mM t-BHP 處理 30 分鐘，使誘發細

胞毒性。由鼠肝細胞外漏之 LDH、ALT 和 AST 等值的變化，來判斷其對肝功能的保護效果如何？由 Table 6. 所示，單獨加入 1.5 mM t-BHP 控制組之 LDH、ALT、AST 值明顯增加。而 DHPC 能顯著地抑制由 t-BHP 所誘導的肝細胞培養基中所滲漏的 LDH、ALT、AST 值升高現象，且在 100  $\mu$ M 前處理時有意義的降低 LDH 值 60.9 %、ALT 值 57.9 %、AST 值 39.2 %。

#### (五)、DHPC 對 t-BHP 誘發鼠肝細胞 GSH 與 GSSG 之影響

由 Table 7. 所示，單獨以 1.5 mM t-BHP 處理之控制組，其初代培養鼠肝細胞中 GSH 和 GSSG 的含量明顯受到抑制。但先經以 DHCO 10  $\mu$ M，20  $\mu$ M，50  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 前處理 1 小時後，再以 1.5 mM t-BHP 處理 30 分鐘，結果與單獨處理 t-BHP 之控制組相比較，GSH 和 GSSG 的含量皆上升且有統計學上意義。

### 四、DHCO 對 SNP 活化巨噬細胞氧化能力之影響

#### (一)、DHCO 對巨噬細胞毒性之分析

如 Fig. 8 所示，利用 MTT 方法測定細胞活性時，DHCO 在實驗濃度為 5  $\mu$ M，10  $\mu$ M，20  $\mu$ M 和 50  $\mu$ M 時顯示對細胞沒有影響，因此本研究採用 5  $\mu$ M，10  $\mu$ M，20  $\mu$ M 和 50  $\mu$ M 等四個濃度作為

實驗之非毒性劑量。

## (二)、DHCO 對於 SNP 誘發巨噬細胞脂質過氧化的影響

本實驗以 MDA 生成濃度作為脂質過氧化之指標,結果如 Fig. 9 所示,單獨以 0.1 mM SNP 處理之控制組,其 RAW 264.7 cell 中 MDA 濃度顯著比正常組升高 3.2 倍。但經以 DHCO 5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M、50  $\mu$ M 和 0.1 mM SNP 一起作用後,結果與單獨處理 SNP 之控制組相比較,MDA 的生成濃度明顯地分別降低了 27.7%、39.8 %、49.2 % 和 59.8 %。

## (三)、DHCO 對於 SNP 誘發巨噬細胞 LDL 脂質過氧化的影響

如 Fig.10、11 所示,SNP 會誘發巨噬細胞氧化 LDL 而產生大量 MDA 及負電荷增加,但加入 DHCO 時則具有明顯抑制 LDL 之 MDA 產生及負電荷的形成。由結果顯示 DHCO 具有保護 LDL 免於 SNP 誘發巨噬細胞而被氧化及防止巨噬細胞 MDA 產生。

## (四)、DHCO 對於 SNP 誘發巨噬細胞 GSH 與 GSSG 之影響

由 Table 8. 所示,單獨以 0.1 mM SNP 處理之控制組,其 RAW 264.7 cell 中 GSH 含量明顯受到抑制;而 GSSG 含量上升。

但經以 DHCO 5  $\mu$ M、 10  $\mu$ M、 20  $\mu$ M、 50  $\mu$ M 和 0.1 mM SNP 一起作用後，結果與單獨處理 SNP 之控制組相比較，GSH 有劑量依存性的上升。

#### (五)、 DHCO 對於 SNP 誘發巨噬細胞釋放 Iron 之影響

由 Fig. 12. 所示，單獨以 0.1 mM SNP 處理之控制組，其 RAW 264.7 cell 之培養基中 Iron (II)含量顯著比正常組升高 3.2 倍。但經以 DHCO 5  $\mu$ M、 10  $\mu$ M、 20  $\mu$ M、 50  $\mu$ M 和 0.1 mM SNP 一起作用後，結果與單獨處理 SNP 之控制組相比較，有明顯之下降。

#### (六)、 DHCO 對於 SNP 誘發巨噬細胞釋放 Superoxide 之影響

由 Fig. 13. 所示，單獨以 0.1 mM SNP 處理之控制組，其 RAW 264.7cell 之培養基中 superoxide 含量升高。但經以 DHCO 5  $\mu$ M、 10  $\mu$ M、 20  $\mu$ M、 50  $\mu$ M 和 0.1 mM SNP 一起作用後，結果與單獨處理 SNP 之控制組相比較，亦有下降之趨勢。

## 伍、討 論

近年來許多注意力都集中在生物系統中天然具有保護生化功能的抗氧化物質，與其作用機制。其中廣泛存在於植物中的多酚化合物，扮演著食物中抗氧化劑的角色並可避免肝臟的氧化損傷 (61-62)。

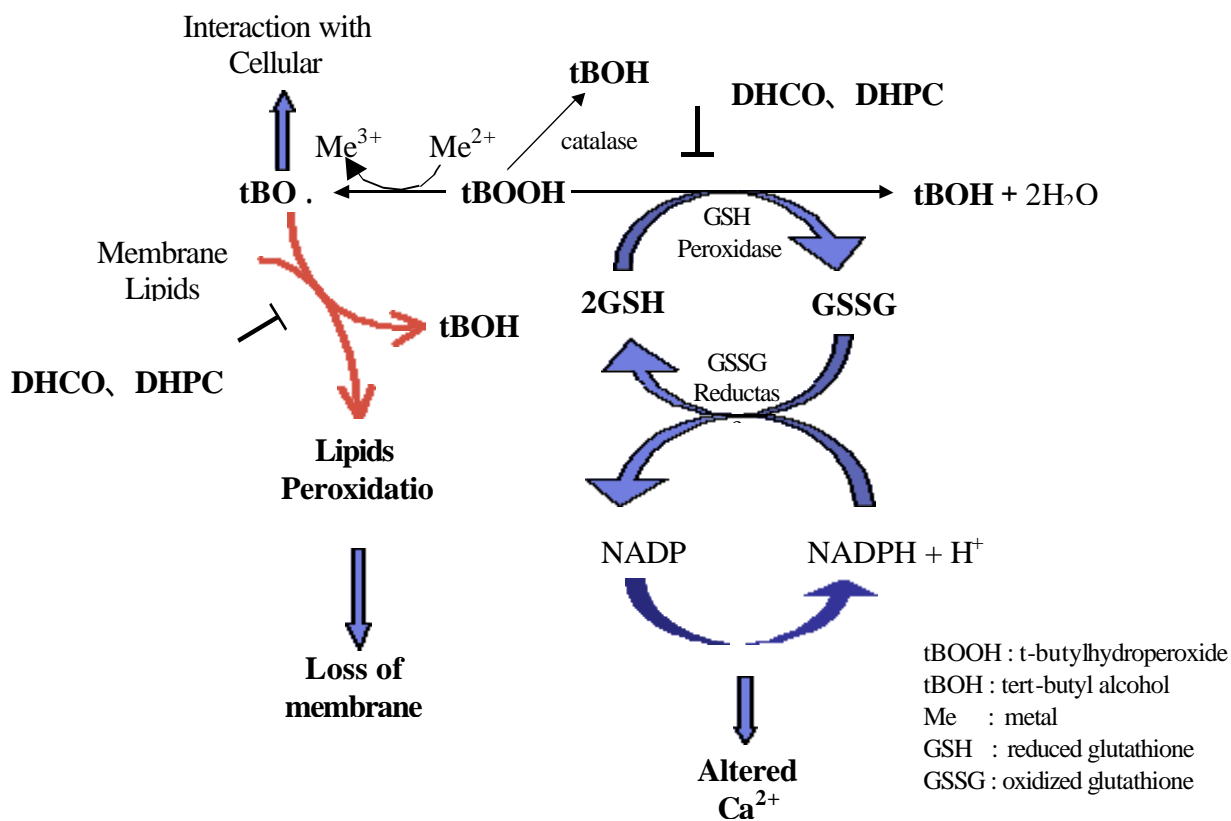
本研究以合成 4-Phenylcoumarin 所獲得之七種衍生物為樣品，首先在 *in vitro* 實驗中測定它們對自由基捕捉之能力，由 table 1 得知 DHCO 和 DHPC 對自由基之捕捉能力最強， $EC_{50}$  分別為 5.8  $\mu\text{M}$  和 7.5  $\mu\text{M}$  且具有劑量依存性之關係。一般帶有 ortho 或 para dihydroxy group 的芳香環，在與自由基反應後，ortho-dihydroxy 或 para-dihydroxy 會形成共振式，而來穩定芳香環的 free radical form 但 meta-dihydroxy 則無法形成共振式。若在 hydroxy group 的 ortho 或 para 位置有 electron-donor group 則更能穩定帶有 partial positive charge 的 aryloxy radical。DHCO 和 DHPC 在 3' 和 4' 位置由於含有 ortho-dihydroxy，且有多處共振位置，所以其抗氧化能力最強。

完整的細胞膜是維持細胞功能的重要因素，但細胞膜上的脂質過氧化分解反應會造成化學性誘發的毒性。有機過氧化物 t-BHP 能在生物體系統中提高 oxidative stress，對肝細胞能造成明顯的脂質過氧化作用，故能使脂質過氧化產物 MDA 的濃度大為增加，以及 GSH/GSSG 的比值下降，並急速提高 lactate

dehydrogenase (LDH) , alanine aminotransferase (ALT)等酵素之釋放，開啟一連串有害反應而導致細胞的死亡；亦可在顯微鏡下觀察到細胞器形態之改變。除此，過去研究發現，t-BHP 能造成 human erythrocytes 提高 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)及 MDA 的產生，抑制了 Ca<sup>2+</sup> pump ATPase activity,進一步以 t-BHP 與 hemoglobin (Hb)和 methemoglobin (metHb)作用則發現會引起 superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)與 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的增加；因此利用 t-BHP 所誘導的脂質過氧化及酵素滲漏，可作為評估實驗材料是否具有抗氧化作用和抗肝毒活性的良好模式 (63-64)。所以在本實驗中我們利用 t-BHP 來產生肝細胞的毒性傷害，而以 LDH、ALT 和 AST 等酵素作為肝細胞毒性的基本指標。由 Table 2 和 Table 6 所示；預處理 DHCO 與 DHPC 結果發現可以抑制 t-BHP 對肝細胞的毒性。接著再以 MDA 當作脂質過氧化指標，由 Fig. 4 和 Fig. 7 發現；以 t-BHP 單獨處理之控制組，與正常組相比較其初代培養鼠肝細胞中 MDA 濃度顯著升高。但先經以 DHCO 與 DHPC 預處理後，結果與單獨處理 t-BHP 之控制組相比較，MDA 的生成濃度明顯地降低且具有劑量依存性關係。

Glutathione 是保護細胞對抗化學毒性物質的重要分子，GSH 降低是因其與過氧化氫或是自由基作用而減少。t-BHP 有二種不同的代謝路徑，一是經由 cytochrome p450 代謝為自由基物質 (RO<sup>.</sup>)，進而傷害組織或細胞 (26)；另一是經由 GSH peroxidase

轉換 t-BHP 成為 t-butanol 與 GSSG，而大量消耗 GSH 將影響細胞的訊息傳遞、基因表現及防止細胞受氧化性傷害的能力 (65)。由於 t-BHP 在細胞內代謝會消耗大量的 GSH，故可經由 GSH 的定量來探討 DHCO 與 DHPC 抑制過氧化物(peroxide)之路徑。由 Table 3 和 Table 7 結果顯示 t-BHP 會抑制 GSH 生成，但若以高濃度的 DHCO 與 DHPC 預處理，則有效的抑制此現象。另外 t-BHP 導致 GSH 減少並無伴隨 GSSG 增加，顯示 t-BHP 是直接和 GSH 作用。因此初步認為 DHCO 與 DHPC 是藉由直接在細胞外或細胞內捕捉自由基或過氧化物來降低細胞膜的脂質過氧化作用。

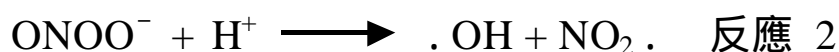


另外，我們也以 SNP 活化巨噬細胞氧化作用之模式，來探討 DHCO 在巨噬細胞中之抗氧化能力。當血液中含過量低密度脂蛋白質(LDL)時，過多的 LDL 會浸潤在血管的內膜，而這些 LDL 受到自由基作用，形成氧化型低密度脂蛋白質 (ox-LDL)，就很容易被巨噬細胞吞噬而形成 foam cell，是動脈粥狀硬化過程中最早可辨識的病灶。LDL 目前已被證明能被形成自由基的細胞如吞噬細胞、血管內皮細胞及平滑肌細胞所修飾(66)。經氧化修飾的 LDL 在物理、化學和生化的特性上都和 native LDL 有很大差異，例如 apo B lipoprotein 上 lysine 的  $\epsilon$ -amino group 會和脂肪酸的氧化產物共價健結，並因而造成 LDL 正電荷的減少。一般而言除了正電荷增加及不能被正常 LDL receptor 辨認而被 scavenger receptor 辨認外(67-68)，LDL 還有下列的變化如脂肪酸過氧化作用的產物增加，LDL 上 apo B lipoprotein 會裂解及將 lecithin 水解成 lysolecithin (69)。即使 LDL 只被初步氧化，仍然會釋出傷害血管內皮細胞或體內其他細胞功能的 cytotoxic 產物或 cytotoxic lipid。

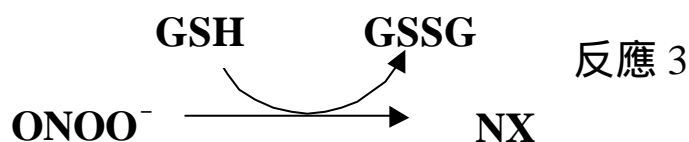
由於 SNP 活化巨噬細胞後會釋出 iron 且伴隨著 superoxide 的產生，因而增加氧化壓力而活化巨噬細胞的脂質過氧化作用，所以當 superoxide 和 nitric oxide 反應形成 peroxynitrite (反應 1)，然後 peroxynitrite 再分解成  $\text{NO}_2$  和 hydroxyl radicals (反應 2)，則迅速起始了脂質過氧化作用。由 Fig. 9 和 Fig.10 發現；以 SNP



單獨處理之控制組與正常組相比較其 MDA 濃度顯著升高 3.2 倍。若以 DHCO 和 SNP 一起作用後，結果與單獨處理 SNP 之控制組相比較，MDA 的生成濃度明顯地降低且具有劑量依存性關係。Fig. 11 顯示 SNP 會促進巨噬細胞對 LDL 的氧化而增加負電荷，此現象亦為 DHCO 所抑制。

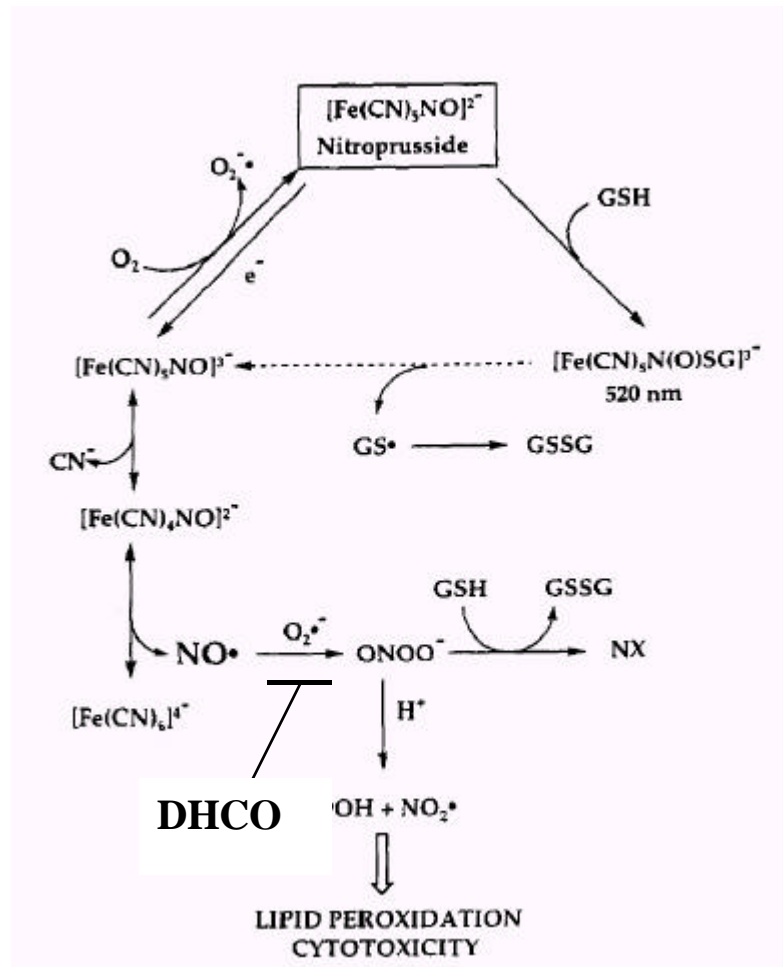


由 Table 8 結果顯示單獨處理 SNP 時，會促使 GSH 下降並伴隨著 GSSG 增加 (反應 3)，但若以 DHCO 和 SNP 一起作用後，則有效的抑制此現象。



由於 SNP 活化巨噬細胞後會釋出 iron 且伴隨著 superoxide 的產生，所以由 Fig. 12 和 Fig. 13 顯示；單獨處理 SNP 時，其 RAW 264.7 cell 之培養基中 iron (II) 含量顯著比正常組升高出 3.2 倍 (反應 4)，而 superoxide 也有明顯增加。若以 DHCO 和 SNP 一起作用後，亦有效的抑制此現象。





由以上結果顯示：抗氧化劑和 iron chelator 能有效預防因 SNP 所誘導的脂質過氧化作用和細胞毒性。

## 陸、參考文獻

1. Michael D.J. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS*. **21**, 83-86.
2. Reilly P.M., Schiller H.J. and Bulkley G.B. (1991). Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* **161**, 488-503.
3. Cerutti P.A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*. **227**, 375-381
4. Poggetti R.S., Moore F.A., Moore E.E., Koeike K. and Banerjee A. (1992). Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J. Trauma-Injury Infec. Critci. Care.* **32**, 723-728.
5. Shimoda R., Nagashima M., Sakamoto M., Yamaguchi N., Hirohashi S., Yokota J. and Kasai H. (1994). Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res.* **54**, 3171-3172.
6. Kukielka E., Dicker E. and Cederbaum A.I. (1994). Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 377-386.
7. Block G. (1992). The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr. Rev.* **50**, 207-213.
8. Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B. and Kromhout D.

- (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. **342**, 1007-1011.
9. Huang M.T., Ho C.T., Wang Z.Y., Ferraro T., Finnegan-Olive T., Lou Y.R., Mitchell J.M., Laskin J.D., Newmark H. and Yang C.S. (1992). Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis*. **13**, 947-954.
10. Renaud S. and de Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. **339**, 1523-1526.
11. Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P. and Rice-Evans C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 339-346.
12. Namiki M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**, 273-300.
13. Wang ZY., Huang M.T., Ho C.T., Chang R., Ma W., Ferraro T., Reuhl K.R., Yang C.S. and Conney A.H. (1992). Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. *Cancer Res.* **52**, 6657-6665.
14. Yamane T., Hagiwara N., Tateishi M., Akachi S., Kim M., Okuzumi J., Kitao Y., Inagake M., Kuwata K. and Takahashi T. (1991). Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenol fraction. *Jp. J. Cancer Res.* **82**, 1336-1339.

15. Lake B.G. (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 423-453.
16. Herman W.W., Konzelman J.L., Jr. and Sutley S.H. (1997). Current perspectives on dental patients receiving coumarin anticoagulant therapy. . *Amer. Dental Assoc.* **128**, 327-335.
17. Venook A.P. (1989). Activity of coumarin and cimetidine in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **7**, 402-403.
18. Chang W.S., Lin C.C., Chuang S.C. and Chiang H.C. (1996). Superoxide anion scavenging effect of coumarins. *Amer. J. Chine. Med.* **24**, 11-17.
19. Chang W.S. and Chiang H.C. (1995). Structure-activity relationship of coumarins in xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res.* **15**, 1969-1974.
20. Mata R., Calzada F., Garcia MR. and Reguero MT. (1987). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *J. Natu. Prod.* **50**, 866-871.
21. Mata R., Calzada F. and Garcia M.R. (1988). Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, VI. Additional new 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *J. Natu. Prod.* **51**, 851-856.
22. Ito Aiko, Chai Hee-Byung, Shin Young Geun, Garcí a Ricardo and Mejí a Miliciades (2000). Cytotoxic Constituents of the Roots of *Exostema acuminatum*. *Tetrahedron.* **56**, 6401-6405.

23. Mata R., Albor C., Pereda-Miranda R. and McLaughlin J.L. (1990). Cytotoxic constituents of *Exostema mexicanum*. *Planta Med.* **56**, 241.
24. Cheng Z.J., Kuo S.C., Chan S.C., Ko F.N. and Teng C.M. (1998). Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1392**, 291-299.
25. Chan S.C., Chang Y.S., Wang J.P., Chen S.C. and Kuo S.C. (1998). Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. *Planta Med.* **64**, 153-158.
26. Rush G.F., Gorski J.R., Ripple M.G., Sowinski J., Bugelski P. and Hewitt W.R. (1985). Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **78**, 473-483.
27. Sies H. and Gerstenecker C. (1972). Oxidation in the NADPH system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathion by hydroperoxides. *FEBS Lett.* **27**, 171-175.
28. Lotscher H.R., Winterhalter K.H., Carafoli E. and Richter C. (1979). Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4340-4344.
29. Jewell S.A., Bellomo G., Thor H., Smith M.T. and Orrenium S. (1982). Bled formation in isolated hepatocytes during drug metabolism is cause

- by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science*. **217**, 1257-1259.
30. Bellomo G., Thor H. and Orrenius. (1984). Increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration during t-butylhydroperoxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *FEBS Lett.* **168**, 38-42.
31. Thornally P., Trotta R.J. and Stern A. (1983). Free radical involvement in the oxidative phenomena induced by tert-butylhydroperoxide in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* **759**, 16-22.
32. Hogberg J., Orrenius S. and O'Brine P. (1975). Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **59**, 449-455.
33. Breimer L.H. (1990). Molecular mechanism of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. *Mol. Carcinogenesis* **3**, 188-197.
34. Rao D.N.R., Elquindi S. and O'Brien P.J. (1991). Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 30.
35. Niknahad H. and O'Brien P.J. (1996). Involvement of nitric oxide in nitroprusside-induced hepatocyte cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1031-1039.

36. Wink D.A. and Mitchell J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.* **25**, 434-456.
37. Wink D.A., Hanbauer I., Grisham M.B., Laval F., Nims RW., Laval J., Cook J., Pacelli R., Liebmann J., Krishna M., Ford P.C. and Mitchell J.B. (1996). Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Current Top. Cellu. Regulation.* **34**, 159-187.
38. Steinberg, D., S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo, and J. L. Witztum (1989). Beyond Cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**, 915-924.
39. Aviram M. (1996). Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **34**, 599-608.
40. Hogg, N., A. Struck, S. P. A. Goss, N. Santanam, J. Joseph, S. Parthasarathy, and B. Kalyanaraman (1995). Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric oxide donors. *J. Lipid Res.* **36**, 1756-1762.
41. Van Hinsbergh V.W.M., Scheffer M., Havekes L. and Kempen H.J.M. (1986). Role of endothelial cells and their products in the modification of low-density lipoproteins. *BBA.* **878**, 49-64.
42. Morel D.W., Dicorleto P.E. and Chisolm G.M. (1984). Endothelial and



- smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis*. **4**, 357-364.
43. Heinecke J.W. (1987). Free radical modification of low density lipoprotein mechanisms and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.* **3**, 65-73.
44. Bedwell S., Dean R.T. and Jessup W. (1989). The action of defined oxygen-centred free radicals on human low-density lipoprotein. *Biochem. J.* **262**, 707-712.
45. Peter A.C. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*. **227**, 375-381.
46. Chung F.L., Chen, Candy H.J. and Raghu G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adduces. *Carcinogenesis*. **17**, 2105-2111.
47. Henriksen T., Mahoney E.M. and Steinberg D. (1981). Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**, 6499-6503.
48. Butterworth B.E. (1987). A protocol and guide for the in vitro rat hepatocyte DNA repair assay. *Mutation Res.*, **122**, 113-121.
49. Alley M.C. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-592.

50. Ursim F., Maiorino M., Morazzonip, Rover A. and Oufferu G. (1994). A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Rad. Biol. Med.* **10**, 547-553.
51. Yagi K. (1987). Lipid peroxidation and human disease. *Chem. Phys. Lipids.* **45**, 337-351.
52. Joyeux M., Rolland A., Fleurentin J., Mortier F. and Dorfman P. (1990). tert-Butylhydroperoxide induced injury in isolated rat hepatocytes. A model for studying antihepatotoxic crude drugs. *Planta Medica.* **56**, 171-174.
53. Hissin P. J. and Hilf R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathion in tissues. *Anal. Biochem.* **74**, 214-226.
54. Bronzert T.J. and Brewer H.B. (1977). New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fraction. *Clin. Chem.* **23**, 2089.
55. Keaney J.F., Simon D.I. and Freedman J.E. (1999). Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *FASEB J.* **13**, 965-976.
56. Kim H., Shim J., Han P.I. and Choi F.J. (1997). Nitric oxide modulates the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activity through activating c-Jun N-terminal kinase kinase. *Biochemistry.* **36**, 13677-13681.

57. Kleinveld H.A., Heidi L.M., Hectors M.P.C., Nanneke J., Demacker P.N.M. and Stalenhoef A.F.H. (1995). Vitamin E and fatty acid intervention does not attenuate the progression of atherosclerosis in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atheroscler Thromb Biol.* **15**, 290-297.
58. Munday J.S., Thompson K.G., James K.A.C. and Manktelow B.W. (1998). Dietary antioxidants do not reduce fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Atheroscler Thromb Biol.* **18**, 114-119.
59. Stotokey L.L. (1971). Ferrozine a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* **42**, 779-781.
60. Takeuchi T., Nakajima M. and Morimoto K. (1994). Establishment of a human system that generates O<sub>2</sub><sup>-</sup> and induces 8-hydroxydeoxyguanosine, typical of oxidative DNA damage, by a tumor promotor. *Cancer Res.* **54**, 5837-5840.
61. Tseng T.H., Kao E.S., Chu C.Y., Chou F.P., Lin Wu H.W. and Wang C.J. (1997). Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* **35**, 1159-1164.
62. Tseng T.H., Wang C.J., Kao E.S. and Chu H.Y. (1996). Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions.* **101**, 137-148.

63. Lin W.L., Wang C.J., Tsai Y.Y., Liu C.L., Hwang J.M. and Tseng T.H. (2000). Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver. *Arch. Toxicol.* **74**, 467-472.
64. Wang C.J., Wang J.M., Lin W.L., Chu C.Y., Chou F.P. and Tseng T.H. (2000). Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 411-416.
65. Meister A. (1991). Glutathion deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal application in research and therapy. *Pharmac. Ther.* **51**, 155-194.
66. Hogg N., Struck A., Goss S.P., Santanam N., Joseph J., Parthasarathy S. and Kalyanaraman B. (1995). Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric-oxide donors. *J. Lipid Res.* **36**, 1756-1762.
67. Van Hinsbergh V.W.M., Scheffer M., Havekes L., Kempen H.J.M. (1986). Role of endothelial cells and their products in the modification of low-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **878**, 49-64.
68. Fong L.G., Parthasarathy S., Leake D.S., Witztum J.L., Steinberg D. (1987). Nonenzymatic oxidation cleavage of peptide bounds in apoprotein B-100. *J. Lipid. Res.* **28**, 1466-1477.
69. Steinbrecher U.P., Parthasarathy S., Leake D.S., Witztum J.L., Steinberg D. (1984). Modification of low-density lipoproteins by endothelial cells involves lipid peroxidative ion and degradation of low

density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 3883-3887.

## 柒、圖 表

Table 1. Quenching effect of 4-Phenylcoumarin analogus on DPPH

| Treatment <sup>a</sup> | % of DPPH bleaching <sup>b</sup> |              |              |              | EC <sub>50</sub> (mM) |
|------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|
|                        | 0.001 mM                         | 0.01 mM      | 0.1 mM       | 1 mM         |                       |
| MMCO                   | —                                | 2.28 ± 0.63  | 11.95 ± 0.45 | 39.95 ± 1.29 | 1.257                 |
| MHCO                   | —                                | 1.82 ± 0.33  | 14.81 ± 0.43 | 50.07 ± 0.10 | 0.985                 |
| DMCO                   | —                                | 8.18 ± 0.43  | 14.84 ± 1.21 | 50.33 ± 0.35 | 0.982                 |
| DHCO                   | 12.92 ± 0.85                     | 84.67 ± 2.77 | 95.22 ± 0.14 | —            | 0.0058                |
| MMPC                   | —                                | 8.18 ± 0.90  | 18.95 ± 0.73 | 61.41 ± 1.04 | 0.781                 |
| DHPC                   | 12.19 ± 0.75                     | 65.08 ± 0.91 | 91.82 ± 0.68 | —            | 0.0075                |
| DMPC                   | —                                | 1.94 ± 0.23  | 24.18 ± 2.16 | 62.39 ± 0.87 | 0.764                 |
| Esculetin              | 11.15 ± 1.44                     | 71.04 ± 1.08 | 86.19 ± 0.46 | —            | 0.0069                |

a. The reaction mixture contained, in 3 ml of methanol, 10 mM DPPH and 30 µl of 4-Phenylcoumarin analogus in dimethyl sulfoxide. After 30 min at room temperature, 1 ml of redistilled water and 3 ml of toluene were added and samples were mixed and centrifuged. The absorbance of the upper phase was read at 517 nm against a blank without 4-Phenylcoumarin analogus, processed as above.

b. Percentages of DPPH bleaching = [(absorbance of DMSO - absorbance of test) / absorbance of DMSO] × 100 %

Data represent the mean ± SD. from three independent experiments.

Table 2. Effect of DHCO on the leakage of LDH, ALT and AST treated with 1.5 mM t-BHP for 30 min in primary cultured rat hepatocytes.

| Treatment         | mU / 10 <sup>6</sup> cell |                |                 |
|-------------------|---------------------------|----------------|-----------------|
|                   | LDH                       | ALT            | AST             |
| Solvent(0.2%DMSO) | 216.6 ± 7.6               | 28.3 ± 7.6     | 163.3 ± 14.4    |
| t-BHP             | 825.0 ± 34.6              | 186.6 ± 7.6    | 348.3 ± 7.6     |
| 100 µM            | 221.6 ± 5.7               | 30.0 ± 5.0     | 158.3 ± 7.6     |
| t-BHP + 10 µM     | 656.6 ± 10.4 **           | 146.6 ± 2.8 ** | 255.0 ± 5.0 **  |
| t-BHP + 20 µM     | 670.0 ± 22.9 **           | 151.6 ± 5.7 *  | 236.6 ± 7.6 **  |
| t-BHP + 50 µM     | 603.3 ± 32.5 **           | 150.0 ± 8.6 *  | 236.6 ± 10.4 ** |
| t-BHP + 100 µM    | 335.0 ± 26.4 **           | 70.0 ± 10 **   | 156.6 ± 5.7 **  |

a. Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

b. \*P < 0.01; \*\*P < 0.001, compared to treatment with t-BHP alone.

Table 3. Effect of DHCO on GSH and GSSG treated with 1.5 mM t-BHP for 30 min in primary cultured rat hepatocytes.

| Treatment         | µg/ml protein   |                | GSH/GSSG    |
|-------------------|-----------------|----------------|-------------|
|                   | GSH             | GSSG           |             |
| Solvent(0.2%DMSO) | 1.15 ± 0.06     | 1.08 ± 0.10    | 1.06 ± 0.16 |
| t-BHP             | 0.31 ± 0.06     | 0.54 ± 0.01    | 0.58 ± 0.13 |
| 100 µM            | 1.07 ± 0.05     | 0.88 ± 0.03    | 1.21 ± 0.02 |
| t-BHP + 10 µM     | 0.32 ± 0.02     | 0.71 ± 0.04 ** | 0.45 ± 0.03 |
| t-BHP + 20 µM     | 0.46 ± 0.02 *   | 0.74 ± 0.06 ** | 0.63 ± 0.07 |
| t-BHP + 50 µM     | 0.57 ± 0.11 *   | 0.94 ± 0.11 ** | 0.61 ± 0.11 |
| t-BHP + 100 µM    | 0.75 ± 0.06 *** | 0.99 ± 0.22 *  | 0.77 ± 0.16 |

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001, compared to treatment with t-BHP alone.



Table 4. Effect of DHCO on the liver function in rats

| Treatment          | LDH (IU/L) | ALT (IU/L) | AST (IU/L)   |
|--------------------|------------|------------|--------------|
| Normal             | 1718 ± 87  | 84.6 ± 5.5 | 290.3 ± 56.5 |
| Solvent (0.2%DMSO) | 1820 ± 98  | 89.0 ± 6.5 | 306.3 ± 17.3 |
| 0.05 mg/kg         | 1960 ± 61  | 87.6 ± 8.3 | 352.3 ± 43.8 |
| 0.5 mg/kg          | 1642 ± 70  | 92.0 ± 7.0 | 314.3 ± 30.2 |
| 2 mg/kg            | 1574 ± 31  | 82.6 ± 8.6 | 310.0 ± 48.8 |
| 5 mg/kg            | 1551 ± 50  | 84.6 ± 9.8 | 304.3 ± 15.0 |
| 10 mg/kg           | 1633 ± 56  | 80.3 ± 1.1 | 291.3 ± 17.0 |

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n = 6).

Table 5. Effect of DHCO on the renal function in rats

| Treatment          | BUN (mg/ml) | Creatinine (mg/ml) | Uric Acid (mg/ml) |
|--------------------|-------------|--------------------|-------------------|
| Normal             | 15.6 ± 2.5  | 0.50 ± 0.10        | 2.2 ± 0.3         |
| Solvent (0.2%DMSO) | 13.6 ± 2.1  | 0.46 ± 0.05        | 2.3 ± 0.4         |
| 0.05 mg/kg         | 15.3 ± 1.5  | 0.50 ± 0           | 2.2 ± 0.2         |
| 0.5 mg/kg          | 15.0 ± 3.6  | 0.40 ± 0           | 2.2 ± 0.1         |
| 2 mg/kg            | 15.6 ± 3.0  | 0.43 ± 0.05        | 2.3 ± 0.2         |
| 5 mg/kg            | 15.0 ± 2.0  | 0.40 ± 0.01        | 2.3 ± 0.5         |
| 10 mg/kg           | 16.0 ± 4.3  | 0.46 ± 0.11        | 2.5 ± 0.2         |

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n = 6).

Table 6. Effect of DHPC on the leakage of LDH, ALT and AST treated with 1.5 mM t-BHP for 30 min in primary cultured rat hepatocytes.

| Treatment         | mU / 10 <sup>6</sup> cell |               |                 |
|-------------------|---------------------------|---------------|-----------------|
|                   | LDH                       | ALT           | AST             |
| Solvent(0.2%DMSO) | 333.3 ± 46.4              | 41.6 ± 5.7    | 168.3 ± 20.2    |
| t-BHP             | 956.6 ± 53.4              | 126.6 ± 5.7   | 265.0 ± 18.0    |
| 100 µM            | 295.0 ± 30.4              | 35.0 ± 5.0    | 150.0 ± 17.3    |
| t-BHP + 10 µM     | 755.0 ± 63.8 *            | 106.6 ± 5.7 * | 248.3 ± 22.5    |
| t-BHP + 20 µM     | 543.3 ± 22.5 **           | 76.6 ± 5.7 ** | 216.6 ± 5.7 *   |
| t-BHP + 50 µM     | 518.3 ± 30.1 **           | 75.0 ± 8.6 ** | 195.0 ± 8.6 *   |
| t-BHP + 100 µM    | 373.3 ± 17.5 **           | 53.3 ± 7.6 ** | 160.0 ± 13.2 ** |

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.01; \*\*P < 0.001, compared to treatment with t-BHP alone.

Table 7. Effect of DHPC on GSH and GSSG treated with 1.5 mM t-BHP for 30 min in primary cultured rat hepatocytes.

| Treatment         | µg/ml protein  |                | GSH/GSSG    |
|-------------------|----------------|----------------|-------------|
|                   | GSH            | GSSG           |             |
| Solvent(0.2%DMSO) | 0.99 ± 0.04    | 1.75 ± 0.23    | 0.57 ± 0.10 |
| 100 µM<br>t-BHP   | 1.19 ± 0.14    | 1.36 ± 0.04    | 0.87 ± 0.08 |
| t-BHP + 10 µM     | 0.12 ± 0.01    | 0.77 ± 0.06    | 0.16 ± 0.01 |
| t-BHP + 20 µM     | 0.15 ± 0.02    | 0.71 ± 0.02    | 0.20 ± 0.03 |
| t-BHP + 50 µM     | 0.16 ± 0.01 *  | 1.30 ± 0.14 *  | 0.12 ± 0.01 |
| t-BHP + 100 µM    | 0.18 ± 0.02 *  | 1.60 ± 0.10 ** | 0.11 ± 0.01 |
| t-BHP + 100 µM    | 0.25 ± 0.04 ** | 1.58 ± 0.14 ** | 0.16 ± 0.04 |

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.05; \*\*P < 0.01, compared to treatment with t-BHP alone.

Table 8. Effect of DHCO on GSH, GSSG formation induced by SNP-stimulating macrophages.

| Treatment         | µg/ml protein |                | GSH/GSSG    |
|-------------------|---------------|----------------|-------------|
|                   | GSH           | GSSG           |             |
| Solvent(0.2%DMSO) | 0.42 ± 0.02   | 1.21 ± 0.04    | 0.34 ± 0.01 |
| SNP               | 0.25 ± 0.03   | 1.55 ± 0.05    | 0.16 ± 0.02 |
| 50 µM             | 0.43 ± 0.01   | 1.21 ± 0.02    | 0.36 ± 0.02 |
| SNP + 5 µM        | 0.27 ± 0.01   | 1.26 ± 0.03 ** | 0.21 ± 0.01 |
| SNP + 10 µM       | 0.30 ± 0.01   | 1.20 ± 0.08 ** | 0.24 ± 0.01 |
| SNP + 20 µM       | 0.31 ± 0.03   | 1.15 ± 0.07 ** | 0.25 ± 0.01 |
| SNP + 50 µM       | 0.37 ± 0.04 * | 1.12 ± 0.04 ** | 0.30 ± 0.04 |

a. Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

b. \*P < 0.05; \*\*P < 0.001, compared to treatment with SNP alone.

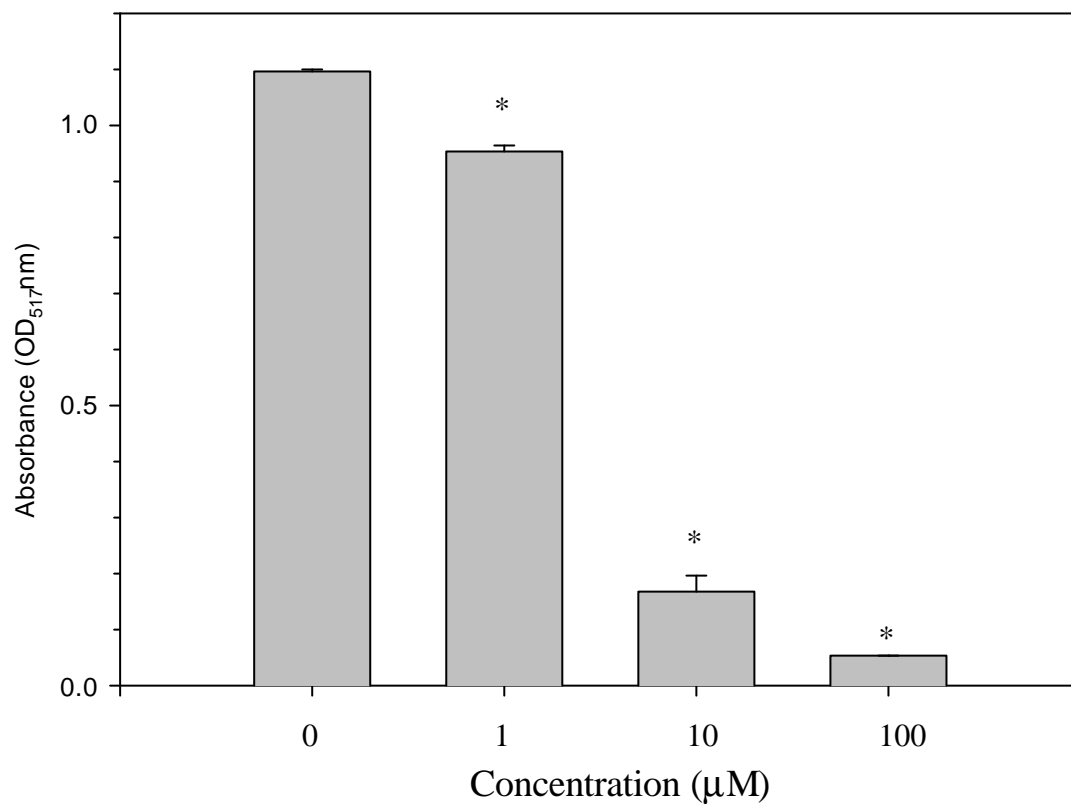


Fig. 1. Effect of DHCO on DPPH radicals. The quenching effect of DHCO on DPPH radicals was evaluated by measuring the absorbance at 517 nm. Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3). \*P < 0.001, compared with solvent control.

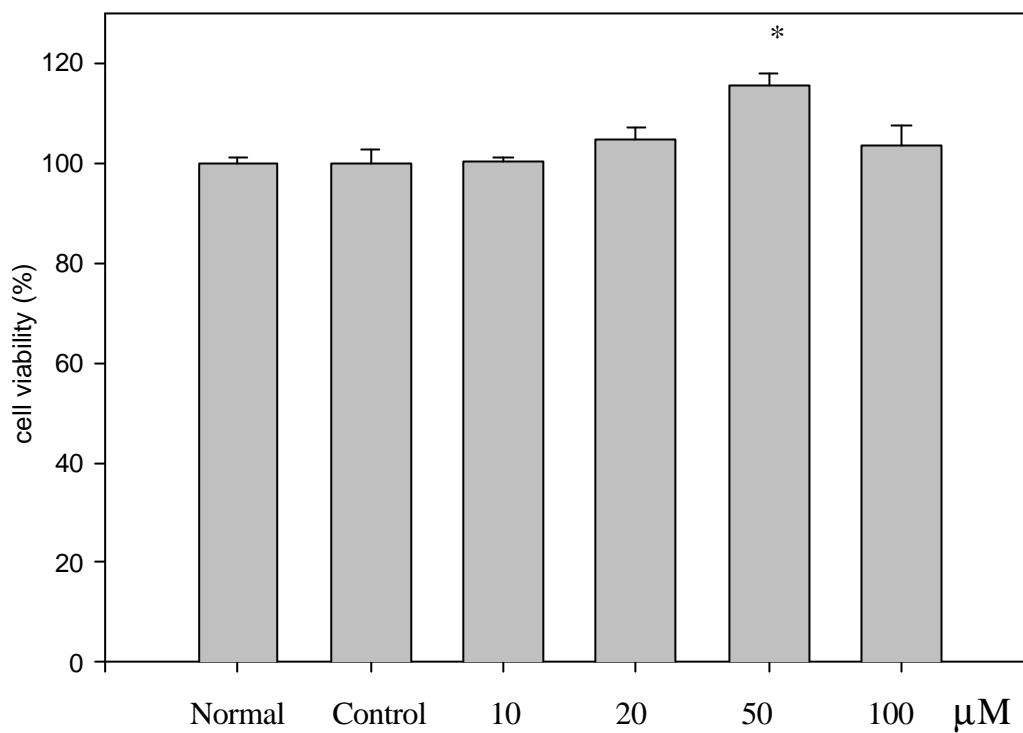


Fig. 2. Cytotoxicity of DHCO in primary cultured rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of DHCO for 24 hours , then incubated with MTT for 4 hours.(control group: 0.2% DMSO)

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.001, compared with solvent control.

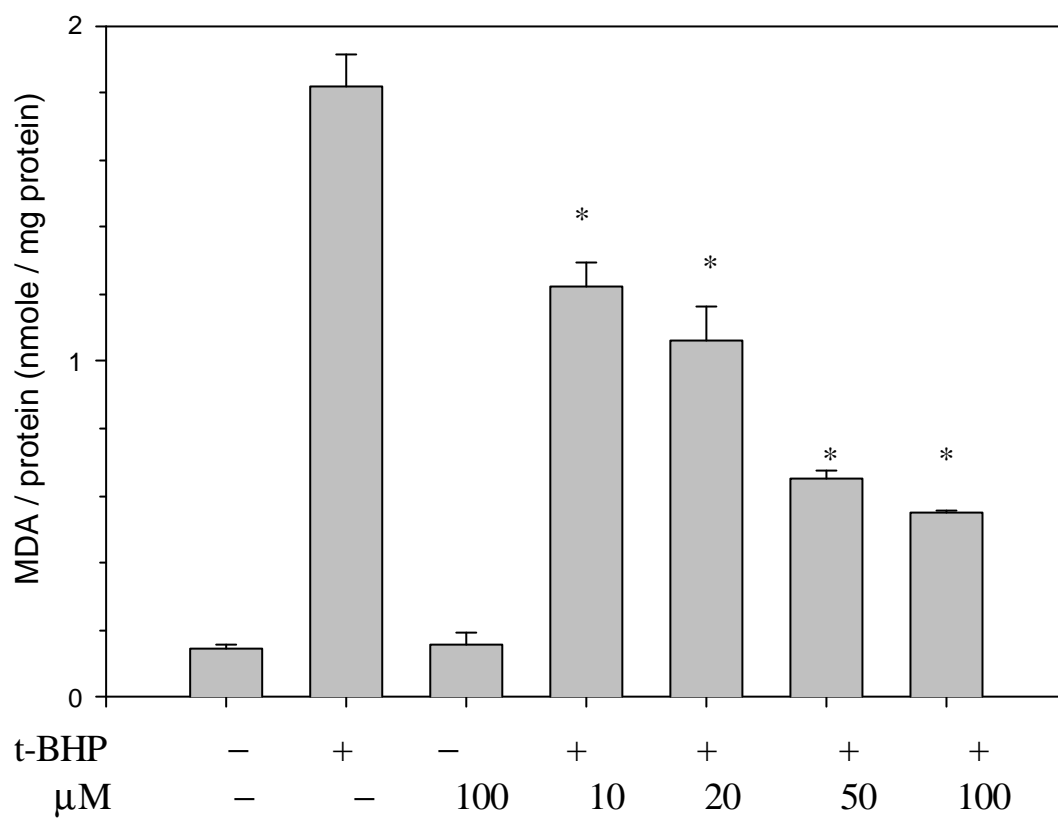


Fig. 3. Effect of DHCO on the t-BHP-induced lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes.

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.001; compared to treatment with t-BHP alone.



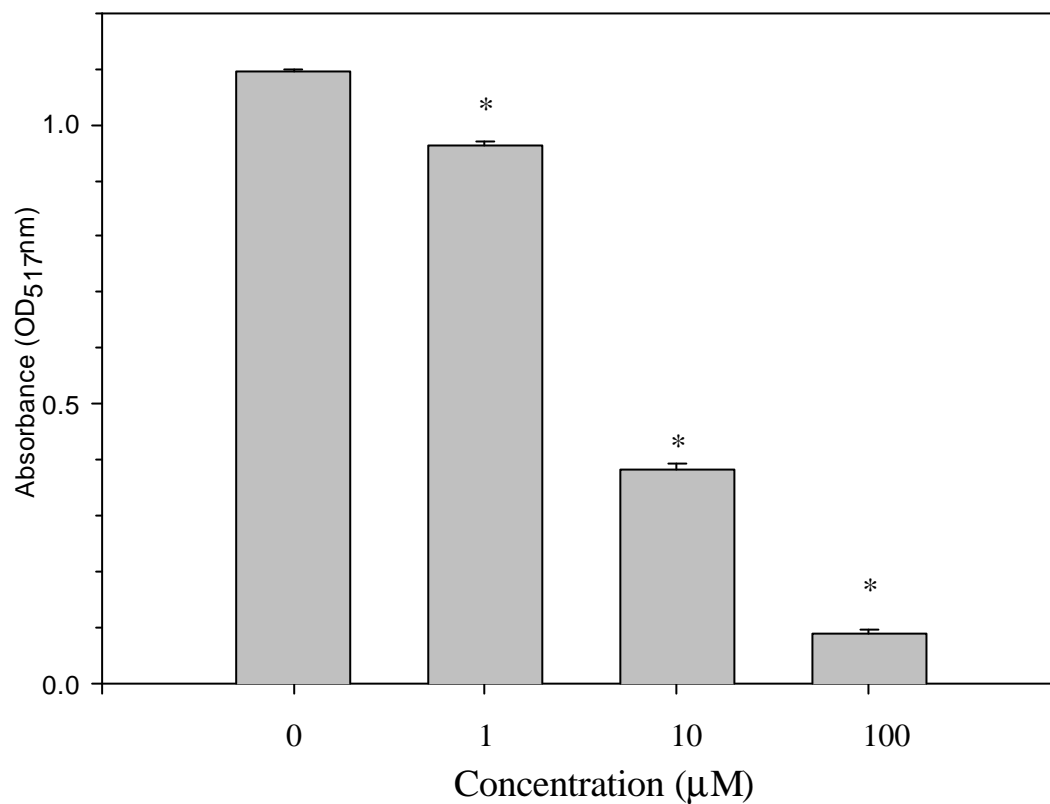


Fig. 4. Effect of DHPC on DPPH radicals. The quenching effect of DHPC on DPPH radicals was evaluated by measuring the absorbance at 517 nm. Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3). \*P < 0.001, compared with solvent control.

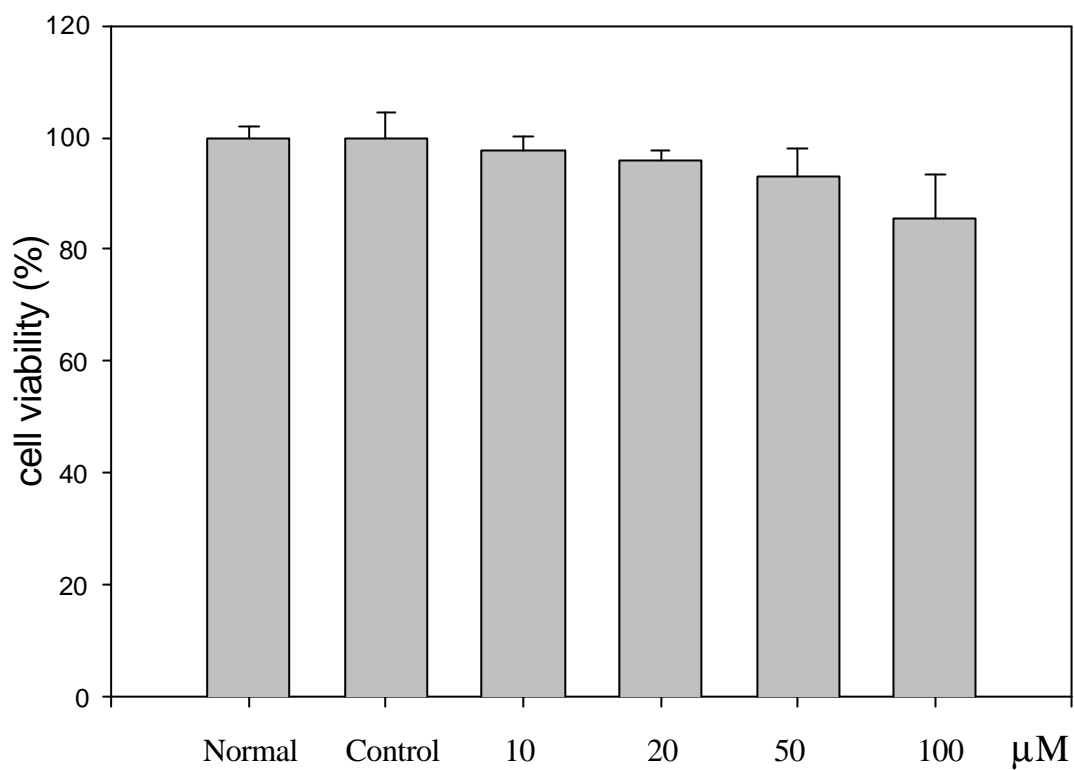


Fig. 5. Cytotoxicity of DHPC in primary cultured rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of DHPC for 24 hours , then incubated with MTT for 4 hours.(control group: 0.2% DMSO)  
Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

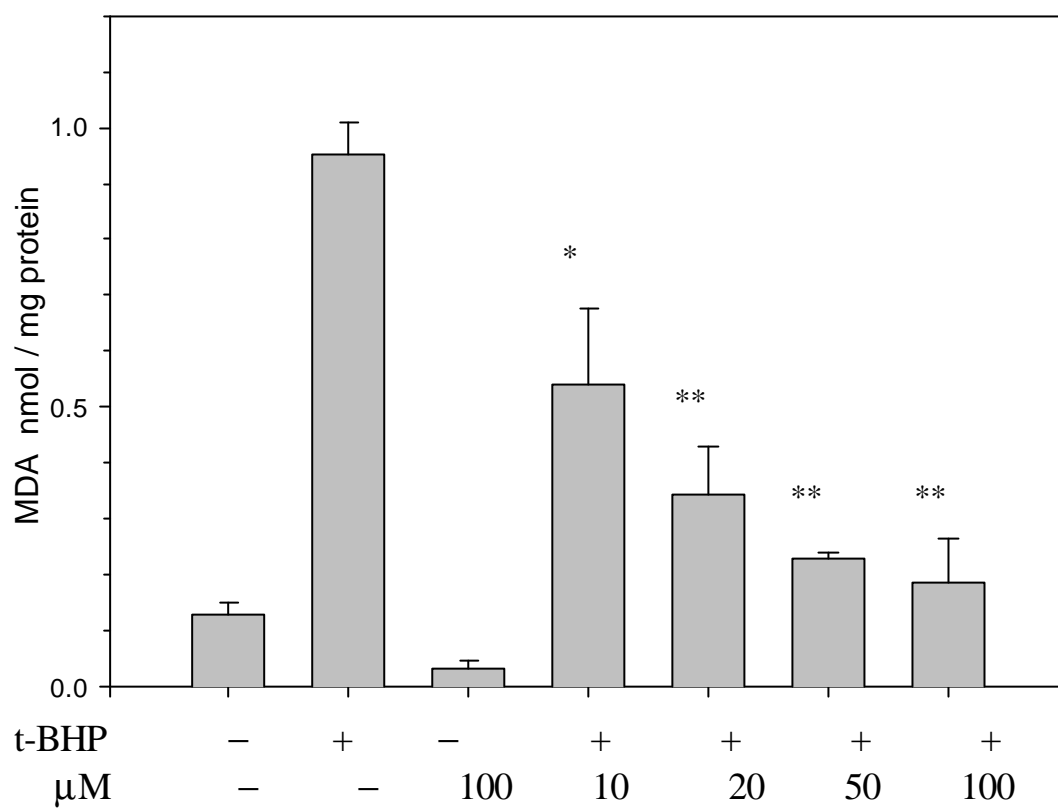


Fig. 6. Effect of DHPC on the t-BHP-induced lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes.

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.01; \*\*P < 0.001, compared to treatment with t-BHP alone.

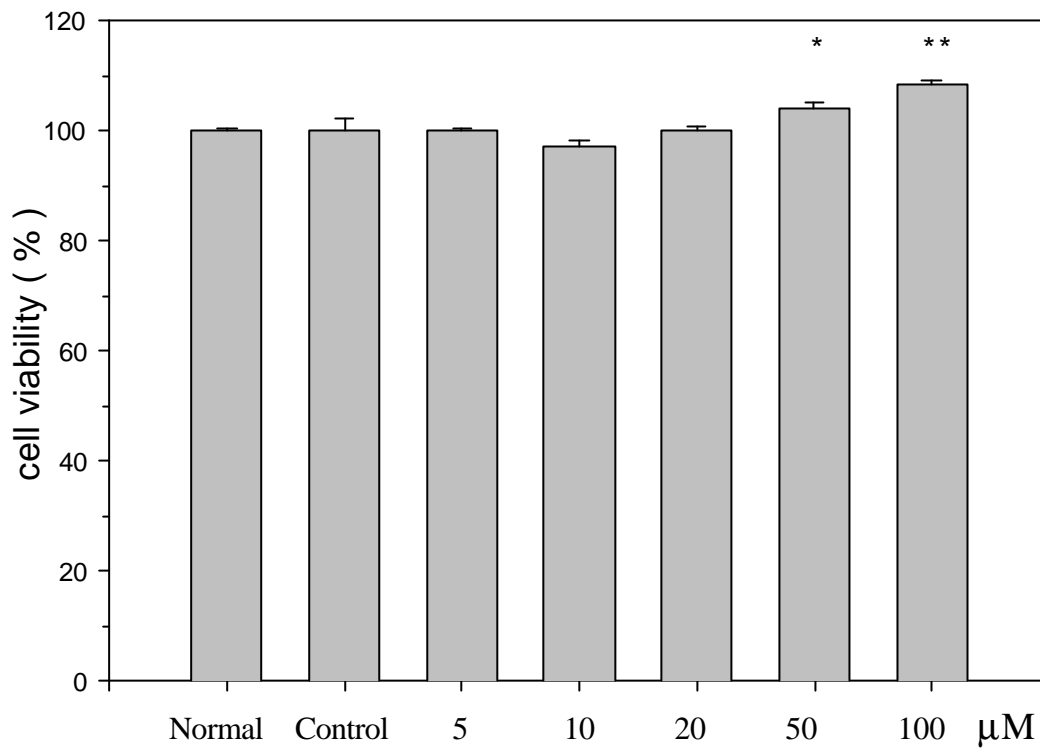


Fig. 7. Cytotoxicity of DHCO in macrophage. Macrophage were treated with various concentration of DHCO for 20 hours , then incubated with MTT for 4 hours.(control group: 0.2% DMSO)

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01, compared to solvent control.

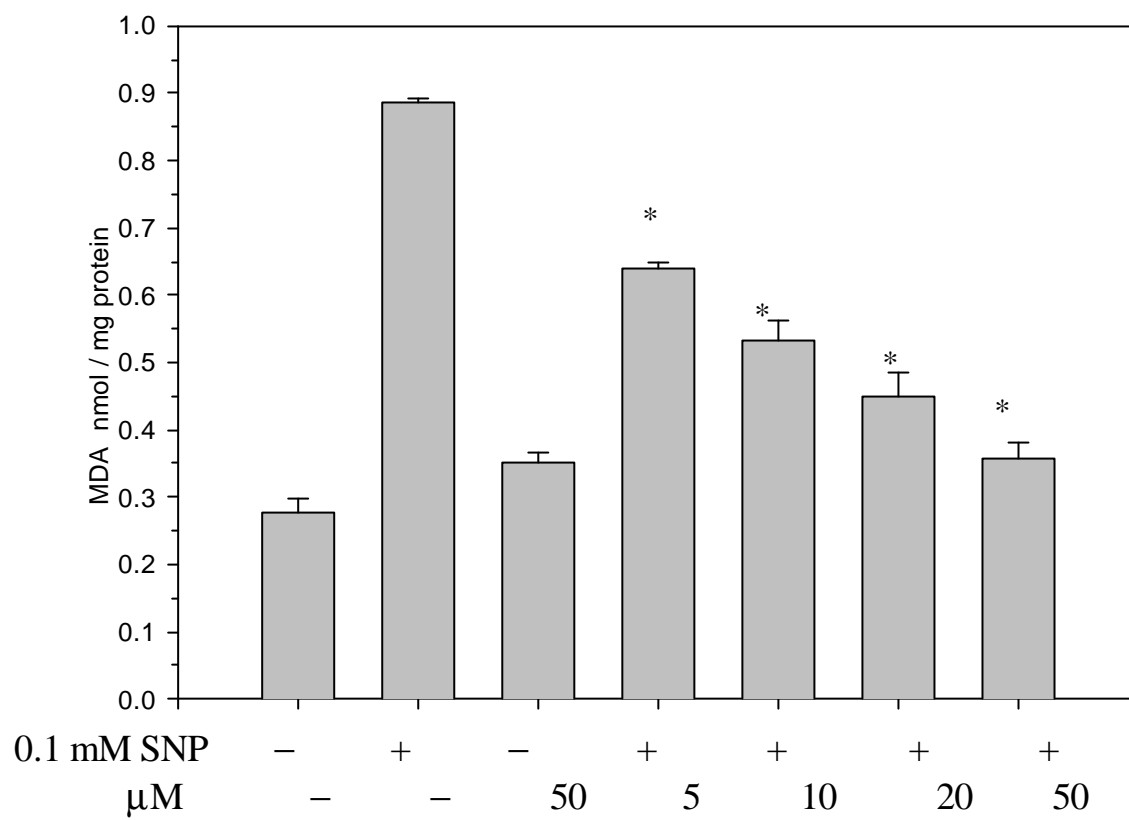


Fig. 8. Effect of DHCO on lipid peroxidation formation induced by SNP-stimulating macrophages.

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.001, compared to treatment with SNP alone.

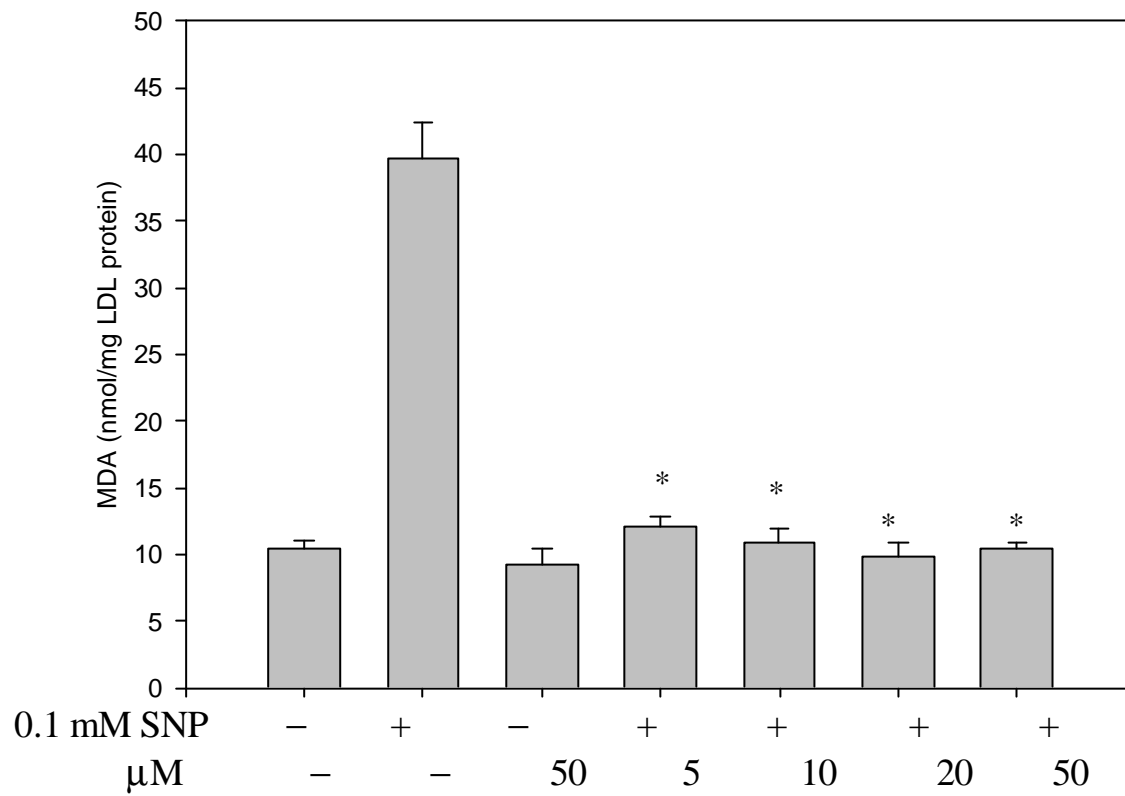


Fig. 9. Effect of DHCO on lipid peroxidation formation of LDL induced by SNP-stimulating macrophages.

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.001, compared to treatment with SNP alone.

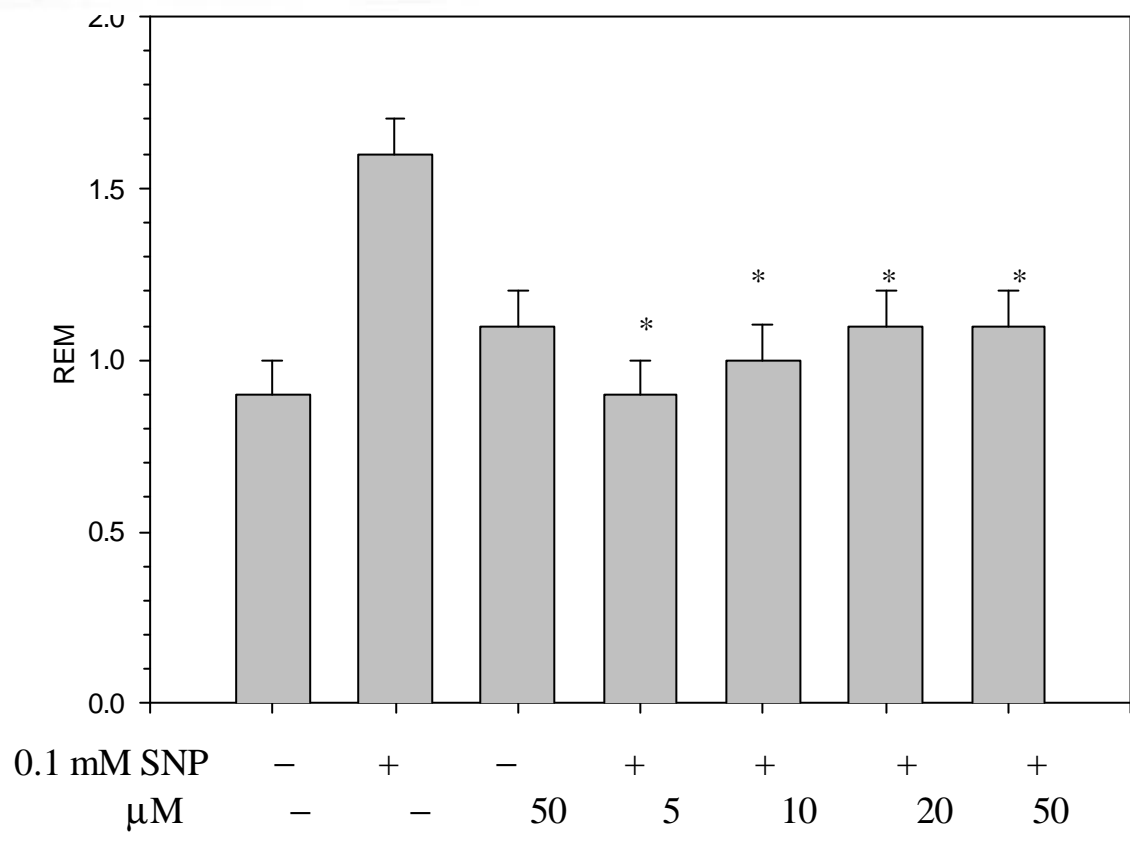
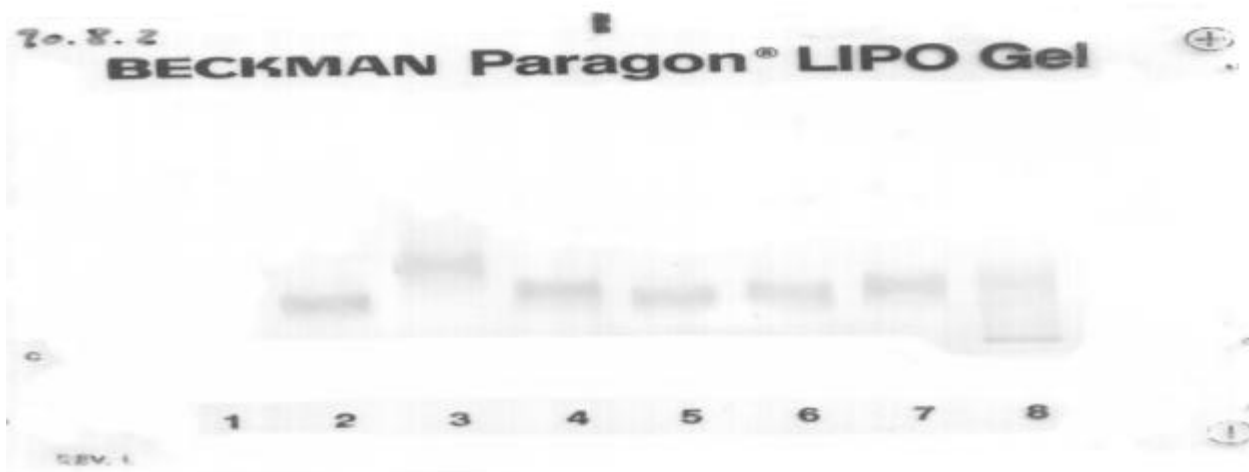


Fig. 10. Effect of DHCO on relative electrophoresis mobility of LDL induced by SNP-stimulating macrophages.

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.001, compared to treatment with SNP alone.

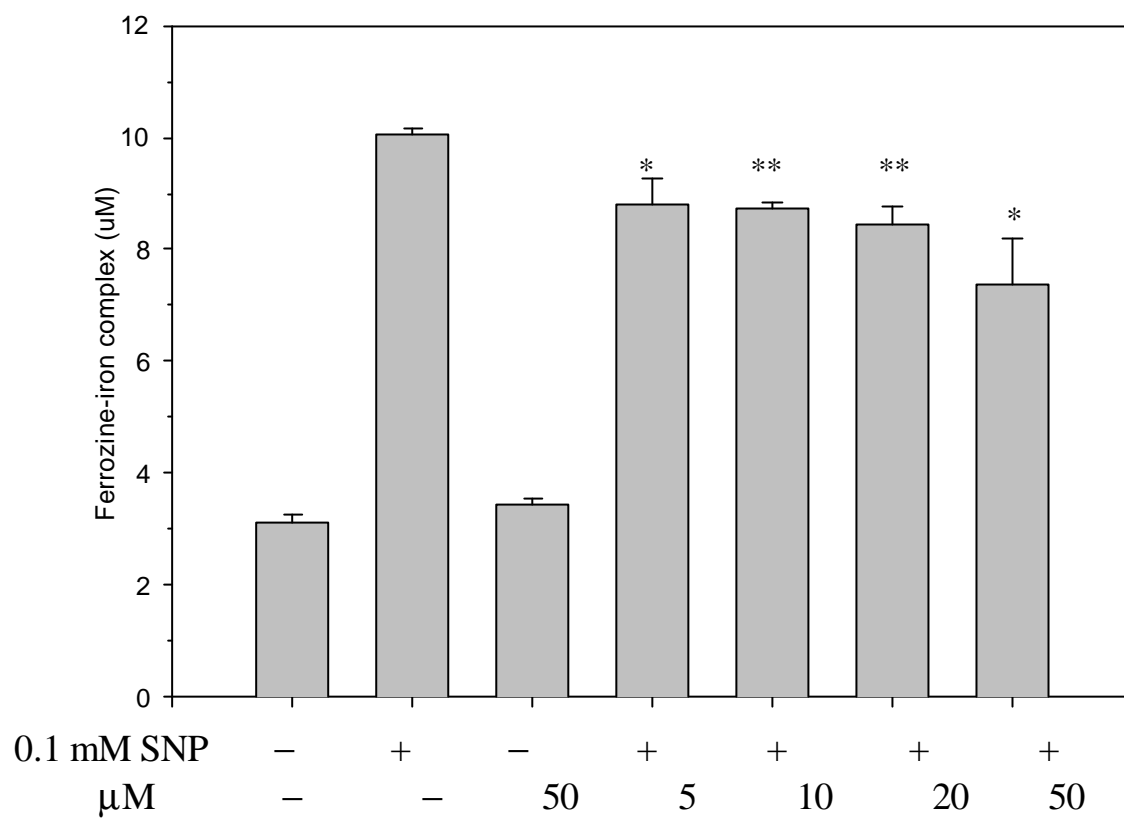


Fig. 11. Effect of DHCO on iron release induced by SNP-stimulating macrophages.

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.01; \*\*P < 0.001, compared to treatment with SNP alone.



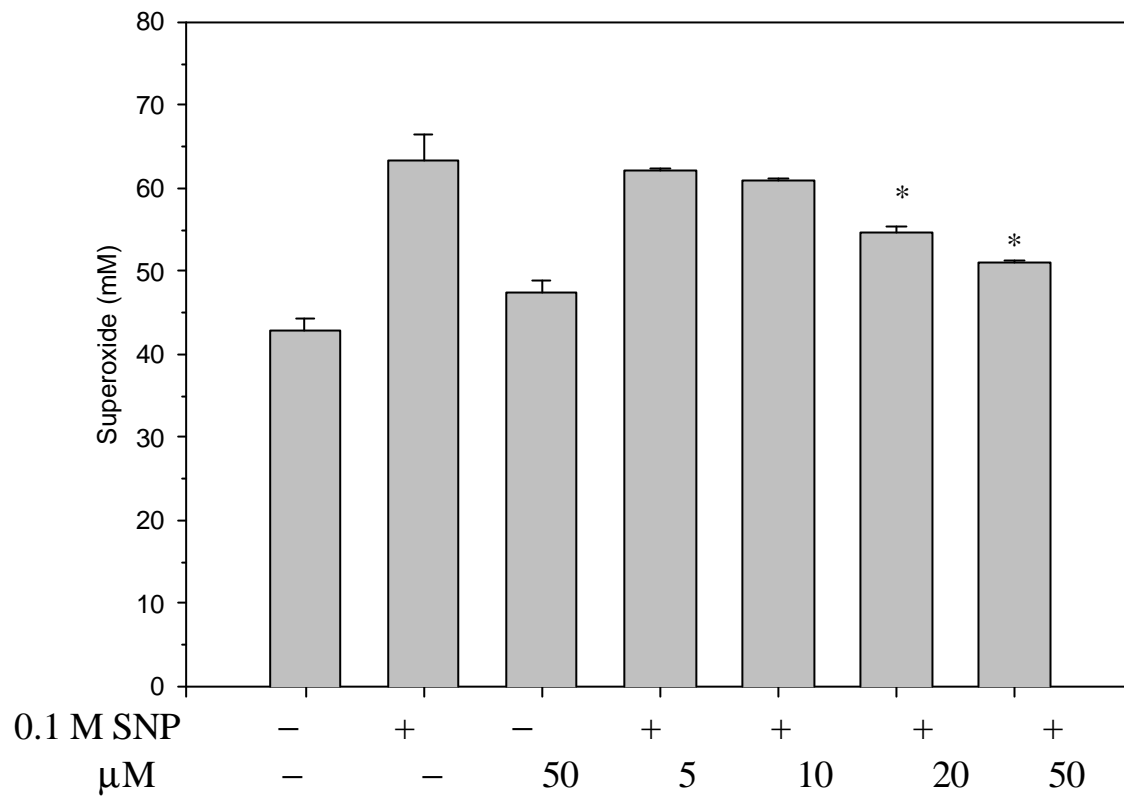


Fig. 12. Effect of DHCO on superoxide release induced by SNP-stimulating macrophages.

Each column represents the mean value and bars the S.D. (n=3).

\*P < 0.01, compared to treatment with SNP alone.