

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 : Isorhapontigenin 抑制骨肉瘤的侵襲轉移、上皮兼職 \*  
\* 名稱 : 轉換與基質金屬蛋白酶之研究分析 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 黃冠智  
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-041-B  
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月  
指導教授： 陳霽霓

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 106年03月30日

# 成果報告書

Isorhapogenin 抑制骨肉瘤的侵襲轉移、上皮間質轉換與金屬基質蛋白

酶原之研究分析

指導老師：陳霈霓 老師

學生：黃冠智

(一) 摘要

(二) 研究動機與研究問題

(三) 文獻回顧與探討

(四) 研究方法與步驟

(五) 實驗結果

(六) 討論

(七) 參考文獻

## 一、摘要

癌症，衛生署公布之台灣十大死因之首，居高不下，而在這個研究要討論的是骨癌。骨癌 ( Bone cancer )，由骨骼系統長出的惡性腫瘤，根據其發生的原因而分類成原發性骨癌 ( Primary bone cancer ) 和次發性骨癌 ( Secondary bone cancer )；而原發性骨癌中的骨肉瘤 ( Osteosarcoma ) 是這個實驗中主要研究的細胞。在這個實驗中，使用了根皮素 ( Phloretin )、大豆黃酮 ( Daidzen )、異丹葉大黃素 ( Isorhaptigenin ) 進行篩藥，經過細胞存活率分析 ( MTT assay ) 及 gelatin zymography、casein zymography 對於細胞分泌的 matrix metalloproteinase-2 ( MMP-2 )、matrix metalloproteinase-9 ( MMP-9 ) 和 urokinase-type plasminogen activator ( u-PA ) 進行分析後，我們發現，Isorhaptigenin 的確可以抑制 143B 的 EMT。

## 二、研究動機與研究問題

骨癌分兩大類，原發性及轉移性骨癌，而原發性骨癌中常見的有惡性骨肉瘤 ( osteosarcoma )、骨髓瘤 ( myeloma )、軟骨肉瘤 ( chondrosarcoma )、依汶式肉瘤 ( Ewing's sarcoma ) 和纖維肉瘤 ( fibrosarcoma ) 等。其中惡性骨肉瘤約佔所有骨癌中的 20%，具有很高的侵襲性及管一能力，是臨床上常見的一種人類骨腫瘤，號發於 10-19 歲的小孩及青少年。骨癌發生的原因目前仍未清楚，但最常見的惡性骨癌多由其他癌症轉移到骨頭所造成的，多轉移到脊椎骨及骨盆骨，而骨肉瘤病人最常發生的轉移器官是肺臟和肝臟，也是原發性骨癌主要的致死原因，這次實驗所使用的 143B 細胞也是屬於人類 osteosarcoma，是一種高侵入性的惡性癌細胞。

近期中草藥抑制癌症這方面研究十分熱門，而在許多研究也證實了中草藥對於癌症確實有治療的重要功能，而中草藥的萃取物更是研究的一大重點，在進行篩藥處理過後，選擇使用 Isorhaptigenin 這個化合物。Isorhaptigenin 是 rhaptigenin 的異構體和白藜蘆醇的類似物，在 *Gnetum cleistostachyum* 的葉子中和 *Aiphanes aculeata* 的種子中被找到。

因初步的篩藥結果，所以決定要使用 Isorhaptigenin，並在這次的實驗中深入的探討 Isorhaptigenin 對於抑制 osteosarcoma 的效果。

## 三、文獻回顧與探討

### 1. 骨肉瘤 ( osteosarcoma )

一種原發性骨癌中發病率最高的骨癌，發生率佔所有骨癌的一半，骨肉瘤發病部位主要在膝關節周圍，約偶 50% 的機率，另外還有位於手臂長骨也是發生機率較高的部位，與其他腫瘤不同，骨肉瘤好發於喜歡運動的青少年，所以常被誤以為是生場痛或是運動時的扭傷，但也對少數老年神有影響；骨肉瘤也有比較明顯的症狀，如關節間歇性疼痛、夜

間疼痛嚴重，關節可觸摸到腫塊等。骨肉瘤是最常見的惡性、原發性骨腫瘤，其惡性程度高、發展迅速，如未經正規治療，會因為轉移性強，常常轉移到病人的肝臟或肺臟，導致死亡[1]。

## 2. 癌細胞的侵襲與轉移 ( **cancer cell invasion and metastasis** )

細胞在正常情況下，增生、分化、死亡都有依定的規律，但如果因為某些原因而造成細胞的基因多數損傷或改變並且無法修復時，細胞會無法受到控制，可能會過度增值且死亡機率降低，正常細胞因而可能轉變成癌細胞後形成腫瘤[2]。

癌細胞擁有避免細胞凋亡的能力，可以無限複製且不斷增生，他能躲避不利生長的訊號，同時產生立於自身生長的訊號，也能藉著侵襲與轉移的能力，讓細胞往別的組織擴散，並且依賴長出來的心血管來獲得生長所需的營養。

癌症致死的原因，主要是癌細胞的侵襲與轉移；初期只生長在局部的癌細胞稱為原位癌，若在這個時候檢測到並且妥善滯留，則成功率較高[3]，轉移性癌則是癌細胞藉由淋巴跟血液轉移到身體其他部位而成為惡性腫瘤[4]，癌細胞穿過血管侵襲進入血液循環後能逃脫免疫機制，經由血流運送到遠端的目的地。

癌細胞會產生包圍基質分解酶，其中與癌細胞侵襲與移動最有關聯的是 matrix metalloproteinase ( MMP ) 中的 MMP-2、MMP-9 還有 plasminogen activator ( PA ) 中的 u-PA，這些酵素在破壞包外基質的機制中扮演重要的角色，因此，當在癌細胞中發現較高的 MMPs 時，代表這些酵素有較強的侵襲及轉移能力，因為 MMPs 是協助癌細胞分解基質的重要物質[5,6]。

## 3. 基質金屬蛋白水解酵素 ( **matrix metalloproteinase** ) 與癌細胞轉移

基質金屬蛋白水解酵素 ( matrix metalloproteinase ) 簡稱 MMPs，其具有水解細胞外基質蛋白的功能[7]，兒喜多的研究都指出 MMPs 與癌細胞的侵襲與轉移有著極大的關聯性[8]。

MMPs 是一群結構相似且含鋅離子的蛋白水解酶[9]要靠金屬離子像是  $Zn^{2+}$  或是  $Ca^{2+}$  並與其活化位置結合後才能活化[10]；大部分的基質金屬蛋白酶是以為活化的狀態 ( 稱 zymogen ) 被分泌到細胞外後才活化。

細胞外基質 ( extracellular matrix, ECM ) 是細胞在轉移 ( metastasis ) 時的阻礙，需先降解才能讓癌細胞穿過組織細胞，因此蛋白質水解酶 ( proteinase ) 降解細胞外基質的功能，對於癌細胞的轉移來說是非常重要的。而和癌症轉移過程有關的四種肽酶 ( endopeptidases ) 為：絲胺酸 ( serine ) 蛋白酶、胱胺酸 ( cystine ) 蛋白酶、天門冬胺酸 ( aspartyl ) 蛋白質和基質金屬蛋白酶 ( MMPs )；其中 MMPs 是癌細胞降解細胞外基質的蛋白質水解酶中最重要的一種。

這個實驗中主要有使用到的是明膠分解酶 ( gelatinases )，包含

gelatinase A ( MMP-2 ) 和 gelatinase B ( MMP-9 )。主要是作用在 type IV collagens，在許多惡性腫瘤中都能見到 MMP-2 和 MMP-9 大量分泌，其與癌症的侵襲與轉移有高度相關[11,12]。

4. 纖維蛋白溶解酶原活化因子 ( **plasminogen activator, PA** ) 與癌細胞轉移  
對 plasminogen 有高度專一性的一種 serine proteinases 是纖維蛋白溶解酶原活化因子 ( plasminogen activator, PA )，能把 plasminogen 水解活化成 plasmin，使 plasmin 具有蛋白水解酵素的能力，能活化其他蛋白水解酵素，也能將血液凝塊的 fibrin 溶解以防止血栓的形成。Plasminogen activator 有組織型 ( tissue-type plasminogen activator; t-PA ) 和尿激酶型 ( urokinase-type plasminogen activator; u-PA ) 兩種[13]。

這個實驗主要討論的是由腎臟及血管內皮細胞所分泌的 u-PA，是屬於單胜鍊型，分子量為 50kDa；u-PA 也是分泌型的酵素，但是必須與細胞膜表面接受器 ( u-PAR, CD87 ) 結合，才有較強的蛋白水解活性已分解細胞外基質。被認為與癌細胞的侵襲與轉移有關，因為 u-PA 為能降解細胞外基質的成分[14,15]。

5. 上皮間質細胞轉換 ( **Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT** ):

當癌細胞發生轉移 ( metastasis ) 時，常會伴隨著上皮間質化轉換 ( Epithelial-Mesenchymal transition, EMT ) 的現象，從上皮 ( epithelial ) 的型態轉變為間質 ( mesenchymal ) 的外觀，此時細胞具有移動 ( migration ) 和侵襲 ( invasion ) 的能力，能降解並通過細胞外基質，然後經由血液或淋巴系統移動到遠端的組織或器官，完成轉移的過程。

正常的細胞因為有黏附因子 ( adhesion molecule ) 所以細胞與細胞 ( cell-cell ) 間會互相連結，且細胞與基質也會互相連接來固定位置得以穩定排列生長。所以細胞與細胞間、細胞與基質間的連結要消失，並且降解基底膜，使彼此不再穩固相連，細胞股價也會重組，細胞外觀改變且具有移動能力，癌細胞才能夠轉移，此即為 EMT。細胞在進行 EMT 時，上皮細胞的 E-cadherin、 $\alpha$ -catenin、claudin 和 occludin 的表現量會下降，而間質細胞的 N-cadherin、vimentin 等表現亮則會上升，依些特定的轉錄調控因子的蛋白表現量也會上升，例如：snail、slug 和 Twist 等均能促進細胞進行 EM[16]。

6. **Isorhapontigenin** :

Isorhapontigenin 是從 *Blamcanda chinensis* 分離出來的，同時也是二本基以西的衍生物，也是白藜蘆醇的類似物。在人類的日常飲食中，紅酒及葡萄是白藜蘆醇的主要來源；而最近也在釀酒葡萄中找到 Isorhapontigenin 的蹤影[17]。在最近發表的文章中提到，有相似結構的化合物也會有相似的生物活性。依些近期的研究發現，經由抑制低密度脂蛋白的證據證明 Isorhapontigenin 有抗氧化的功能[18,19]。在人體中，正常新陳代謝本身就是一種氧化作用，而自由基是代謝作用的副產品，

他可以導致 DNA 的突變，並且造成細胞的不正常生長，所以認為 Isorhapontigenin 可能可以透過抗氧化來減少自由基的傷害[20]，降低 DNA 的突變，進而減少癌症的發生機率。

#### 四、研究方法及步驟：

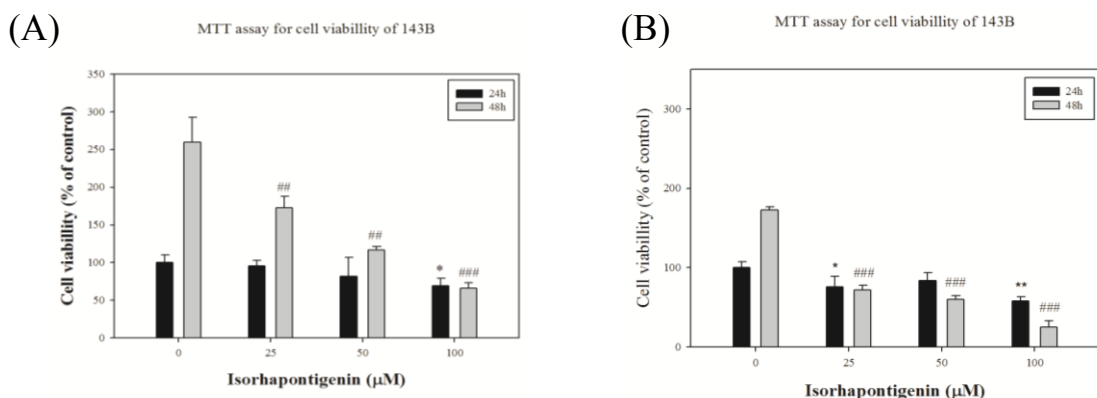
1. MTT assay 細胞存活率分析：將細胞以  $4 \times 10^4$ /well 細胞數分至 24 孔盤中， $37^\circ\text{C}$  培養 16 小時後，去除舊的細胞培養液，再加入含有 Isorhapontigenin 的培養液處理 24 小時。處理完畢後將培養液吸除，每孔加入 1 mL 以細胞培養液 10 被稀釋的 MTT reagent (final concentration 0.5 mg/mL) 培養 3 小時。最後將含有 MTT reagent 的培養液吸除，以異丙醇溶解藍紫色結晶，利用分光光度計 (波長：563 nm) 測定溶液吸光質，由光強度可得知細胞存活量。
2. Zymography 細胞酵素分析：將細胞以  $4 \times 10^4$ /well 細胞數分至 24 孔盤中， $37^\circ\text{C}$  培養 16 小時後，去除舊的細胞培養液，再加入不含 FBS 含有 Isorhapontigenin 的培養液處理 24 小時。處理完畢後，收集細胞培養液並與 5 倍濃度染劑均勻混和。將 0.1% gelatin-8% SDS-PAGE 及 2% casein-8% SDS-PAGE 電泳膠片置於電泳槽中，到入電泳緩衝液，並將混和染劑的培養液注入膠片，先以 100V 電壓進行聚焦，再以 140V 電壓進行分離。電泳結束後，將膠片取出，以 wash buffer 洗兩次各 30 分鐘，加入 reaction buffer 於  $37^\circ\text{C}$  培養箱中搖晃反映 16 小時。反應完畢後以 Coomassie brilliant blue R-250 染色液染色 30 分鐘，再加入褪色液褪色即可觀察結果。
3. Wound healing 傷口癒合實驗：將 culture-insert 固定在 6 孔盤中，將 143B 細胞株，以  $1.0 \times 10^4$ /well 細胞數分至每個 culture-insert kit 中， $37^\circ\text{C}$  培養 24 小時後，將 6 孔盤中的 culture-insert 取下，以 PBS buffer 洗淨死亡或是未貼附的細胞，再加入僅含有 1% 血清的培養液含有不同濃度的 Isorhapontigenin (0, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，在 0, 24, 36 小時以目鏡 10X、物鏡 4X 的條件在顯微鏡下觀察固定位置的傷口癒合狀況，記錄拍照後，將照片彙整成圖。
4. 2D colony formation：於 6 孔盤的每個 well 種入  $0.5 \times 10^4$  個細胞，放置一天等待貼盤；待貼盤後加藥處理 7 天；將 6well 取出並吸掉 medium 加入 PBS 進行 wash 5 分鐘，加入 1 c.c. 甲醇固定 30 分鐘，再 wash 5 分鐘，加入 GIEMSA 染色 30 分鐘，以 PBS 進行 wash 至無色後拍照。得到以下結果。
5. Western blot：
  - i. 將細胞以  $80 \times 10^4$  細胞數分至 10 cm dish 中，於  $37^\circ\text{C}$  培養 16 小時後，去除舊的細胞培養液，再加入不含 FBS 的培養液，於  $37^\circ\text{C}$  培養 5 小時後，將就的細胞培養液去除，加入含有 FBS 的培養液，並加藥處理 16 小時。

- ii. 將培養皿內的培養液吸取後，以 PBS 沖洗兩次，刮取系並加入 TD buffer、蛋白質酵素抑制劑以及界面活性劑 NP-40，在 4°C 下抓鎮兩次每次間隔 10 分鐘。在 4°C 下，以 12000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取上清液加入 Glycerol 並存於 -20°C (質蛋白)。再將沉澱物加入 BL buffer 以及蛋白質酵素抑制劑，在 4°C 下震盪 1 小時，破除細胞和模後，在 4°C 下，以 12000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取上清液存於 -20°C (核蛋白)。
- iii. 取 798 $\lambda$  的 ddH<sub>2</sub>O 置於 eppendorf 中，加入 2 $\lambda$  的蛋白質樣品後，加入 Bradford dye 於分光光度計中，測量吸光質，進行細胞定量。
- iv. 取等量的蛋白質樣品，加入含有  $\beta$ -MSH 的 5 倍濃度染劑均勻混和。在 95°C 加熱 10 分鐘後，置於 4°C 碎冰 10 分鐘，經過快速離心後，將樣品注入 SDS-PAGE 電泳膠內，接著分別以 100V 電壓進行聚焦，再以 140V 電壓進行分離。
- v. 將 NC paper 置於 transfer buffer 中浸潤 5 分鐘，在將膠片放置於 NC paper 上。在 4°C 下，以 100V 電壓進行轉自 1.5 小時。轉漬完成後，將 NC paper 以 Ponceau S 染色，並剪取所需的範圍後，以 TBS-T buffer 沖洗至無色，接著以 5% 脫脂奶粉在室溫下進行 blocking 1 小時。
- vi. Blocking 完成後，以 TBS-T buffer 沖洗 3 次各 10 分鐘，加入一及抗體並至於冷房中搖晃反應 16 小時，然後以 TBS-T buffer 沖洗 3 次各 10 分鐘，再加入二及抗體並在室溫下作用 1 小時，接著以 TBS-T buffer 沖洗 3 次各 10 分鐘。最後以冷光螢光顯影系統 (mini LAS-4000) 拍照。

## 五、實驗結果

在先前的初步實驗中，我們透過 MTT assay 得知 Isorhapongenin 對細胞沒有毒殺性，透過 zymography 酵素分析實驗觀察到，Isorhapongenin 的確可以抑制 u-PA 和 MMPs 的分泌，有了這個結果後，我們就進行後續的實驗。

### 1. MTT assay 細胞存活率分析

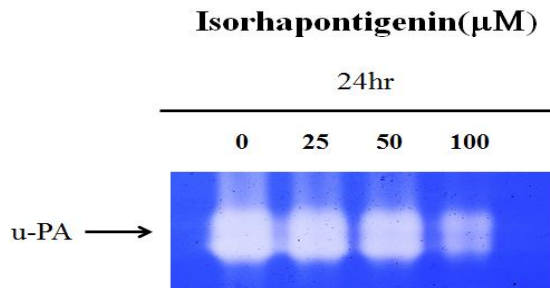


圖(A)是培養液含有 FBS 的組別。處理 24 小時，藥物對細胞的毒殺性很低，

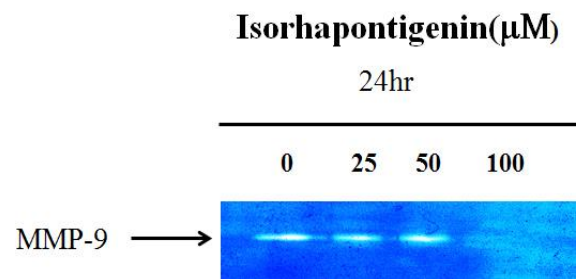
而處理 48 小時後，25  $\mu\text{M}$  的濃度使細胞存活率下降了快 50%。圖(B)是培養液中不含 FBS 的組別。處理 24 小時，藥物對細胞的毒殺性很低，而處理 48 小時後，25  $\mu\text{M}$  的濃度使細胞存活率下降了將近 100%。

## 2. Zymography 細胞酵素分析

(C)



(D)

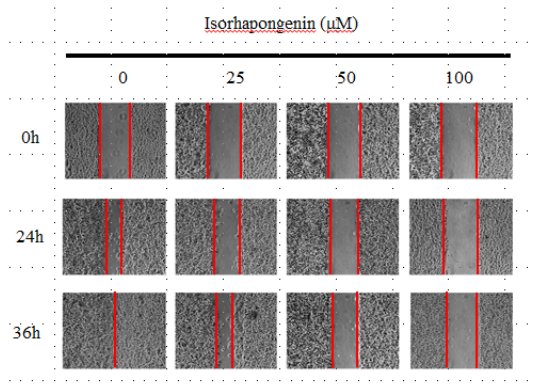


因為加藥處理 48 小時對細胞毒殺性過強，所以在 zymography 細胞酵素分析經過 24 小時的加藥條件。圖(C)是以圖(B)取得的 sample 作 casein zymography 分析後的結果，經過加藥 24 小時的處理後，u-PA 有隨著藥物濃度的上升而下降。圖(D)是以圖(B)取得的 sample 做 gelatin zymography 分析後的結果，經過加藥 24 小時處理後，MMP-9 有隨著藥物濃度上升而下降。

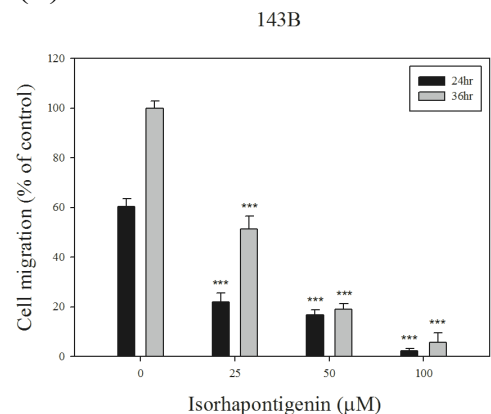
## 3. Wound Healing

有了前面的結果，我們進行了 wound healing 的實驗，這個實驗主要研究細胞的爬行能力，在加藥處理 0、24、36hr 獲得了以下結果。

(E)



(F)

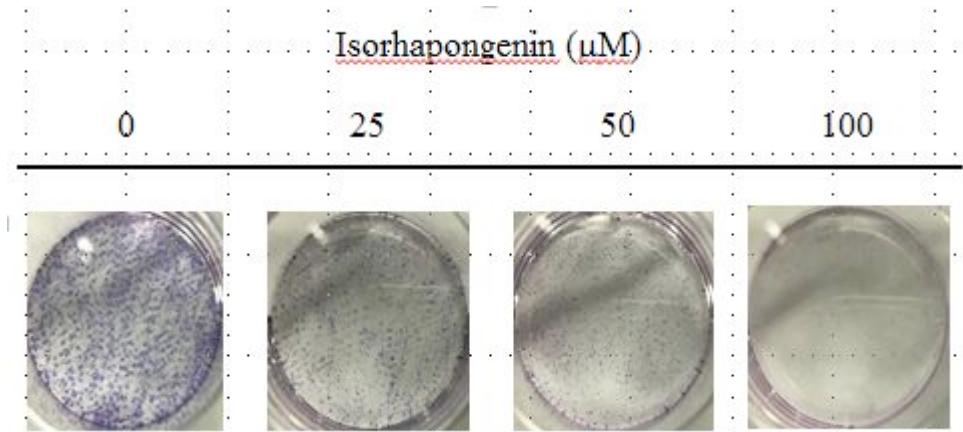


在圖(E)中，因為前面提到，加藥 48hr 對細胞有毒殺性，所以我們做了 24、36hr，我們也發現，細胞爬行的距離隨著加藥濃度的增加而下降；圖(F)是將細胞爬行距離進行量化，發現 143B 的爬行距離的確會因為 Isorhapontigenin 加藥濃度的增加而受到抑制。(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ )

## 4. 2D colony formation



(G)

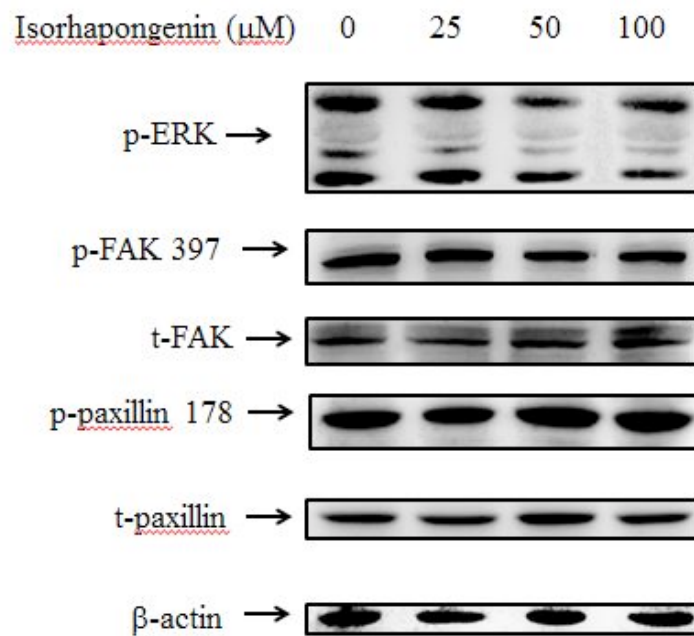


透過以照片我們可以發現，癌細胞的群落會因為加藥濃度的上升，而減少。

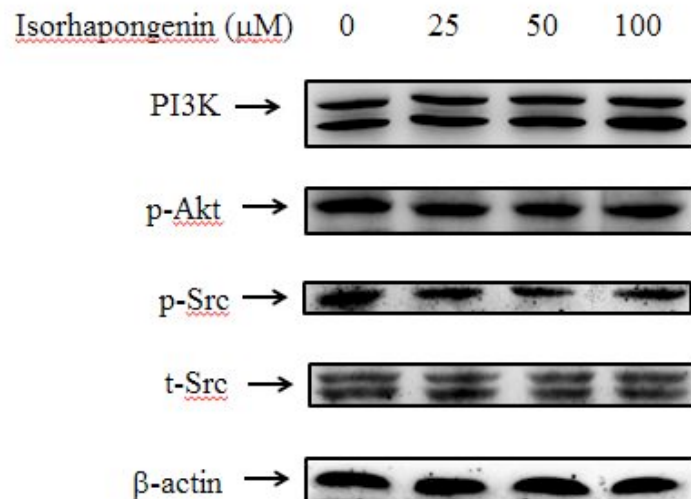
### 3. Western blot

接著我們就進行 Western blot 得到以下結果

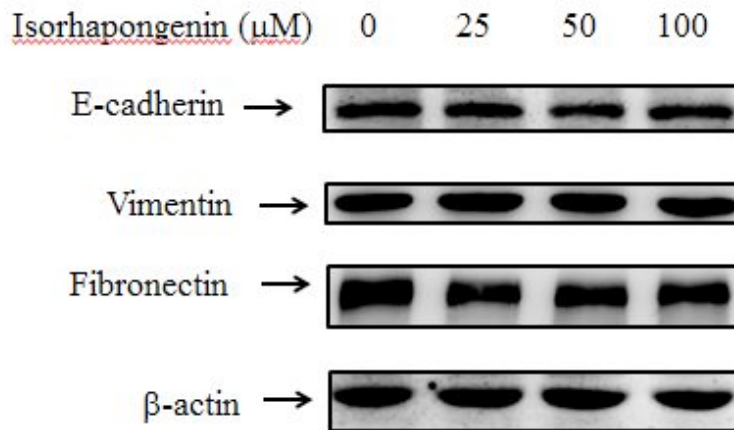
(H)



(I)



(J)



在圖(H)中，我們觀察到，p-FAK 397、t-FAK、p-paxillin 178、t-paxillin、都沒有明顯的變化，但 p-ERK 會因為藥物濃度的提升而有所影響，而 p-ERK 是調節細胞有絲分裂的一個重要蛋白，所以當 p-ERK 表現量下降時，細胞有絲分裂的現象就會受到影響而減緩，進而使癌細胞的轉移速度下降。

在圖(I)中，我們觀察到 PI3K、p-Akt、t-Src 都沒有明顯的變化，但 p-Src 會因為藥物濃度的提升而有所影響，而 Src 是一種 Proto-oncogene tyrosine-protein kinase，他主要調節血管增生、細胞存活、增殖和侵襲的途徑，而腫瘤的形成與血管增生、增殖、侵襲皆有相當大的關聯，所以當 p-Src 下降時，會減緩這些現象的發生，進而減緩癌細胞的轉移。

在圖(J)中，我們觀察到 E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 並沒有因為加藥濃度的上升而有所抑制。

#### 六、 討論：

在細胞實驗中，我們可以看到，zymography 的結果顯示，u-PA、MMP-2、MMP-9 的分泌量明顯減少；Wound healing 的結果顯示，細胞的爬行能力降低；2D colony formation 的結果顯示，細胞形成群落的能力也是下降的；但是在 Western blot 卻只看到 p-ERK、p-Src 的表現量下降。

我們推測，這是因為我們的加藥處理的時間只有 24 小時，這是藥物對細胞有影響的時間；而藥物對細胞內蛋白質產生影響的時間可能大於 24 小時。

因此，往後的實驗，我們將會把加藥處理時間拉長至 48 小時後，進行 cell lysate 收取細胞內的蛋白質，繼續進行 Western blot 的實驗，並且進行觀察。

#### 七、 參考文獻：

1. Jia, S.F., L.L. Worth, M. Turan, X.P. Duan Xp, and E.S. Kleinerman,

- Eradication of osteosarcoma lung metastasis using intranasal gemcitabine. Anticancer Drugs, 2002. 13(2):155-61.*
2. Kager L, Pötschger U, Bielack S. Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther Clin Risk Manage.* 2010; 6: 279-286.
  3. Xiao ZP, Peng ZY, Peng MJ, et al. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini Rev Med Chem.* 2011;11(2): 169-77
  4. Wenzel, U., S. Kubtz, M.D. Brendel, and H. Daniel, *Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells.* *Cancer Res,* 2000. **60**(14):3823-31.
  5. Yan, H., W. Wang, C. Dou, F. Tian, and S. Qi, *Securin promotes migration and invasion via matrix metalloproteinases in glioma cells.* *Oncol Lett,* 2015. **9**(6):2895-2901.
  6. Lee YC, Cheng TH, Lee JS, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Mol Cell Biochem.* 2011; 347(1-2): 103-15.
  7. Zhang XM, Huang SP, Zu Q. Quercetin inhibits the invasion of murine melanoma B16-BL6 cells by decreasing pro-MMP-9 via the PKC pathway. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 2(6):507-16.
  8. Qin L, Jin L, Lu L, et al. Naringenin reduces lung metastasis in a breast cancer resection model. *Protein Cell.* 2011; 2(6): 507-16.
  9. Gomis-Ruth, F. X., *Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases.* *Mol Biotechnol,* 2003. **24**(2):157-202
  10. Liu, L.Z., Y. Jing L.L. Jiang, X. E. Jang, Y. Jiang, Y. Rojanasakul, and B.H. Jiang, *Acacetin inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis and growth through AKT/HIF-1alpha pathway.* *Biochem Biophys Res Commun,* 2011. **413**(2):299-305.
  11. Liu S, Luo X, Li D, et al. Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone form *Cirsium japonicum* DC. In

- Immunopharmacol. 2006; 6(9): 1387-93.
12. Hurmath FK, Mittal M, Ramaswamy P, Umamaheswara Rao GS, Dalavaikodihalli Nanjaiah N. Sevoflurane and thiopental preconditioning attenuates the migration and activity of MMP-2 in U87MG glioma cells. *Neurochem Int.* 2016; S0197-0186(16):30012-2
  13. Jin M, Park S, pyo MY. Suppressive effects of T-412, a flavone on interleukin-4 production in T cells. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32(11):1875-9.
  14. Shih YW, Wu PF, Lee YC, Shi MD, Chiang TA. Myricetin suppresses invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells: possible mediation by blocking the ERK signaling pathway. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(9):3490-9.
  15. Tang Z, Sheng H, Zheng X, Ying L, Wu L, Liu D, Liu G. Upregulation of circulating cytokeratin 20, urokinase plasminogen activator and C-reactive protein is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Mol Clin Oncol.* 2015; 3(6): 1213– 1220
  16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
  17. Fernandez-Marin MI, Guerrero RF, Garcia-Parrilla MC, Puertas B, Richard T, Rodriguez-Werner MA, et al. (2012) Isorhapontigenin: a novel bioactive stilbene from wine grapes. *Food Chemistry* 135: 1353–1359.
  18. Stojanovic S, Sprinz H, Brede O (2001) Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 391: 79–89.
  19. Wang QL, Lin M, Liu GT (2001) Antioxidative activity of natural isorhapontigenin. *The Japanese Journal of Pharmacology* 87: 61– 66.
  20. Ruiz, A., M. Zapata, 'C. Mardones, *Flavonols, alkaloids, and antioxidant capacity of edible wild berberis species from Patagonia.* *J Agric Food Chem,* 2014. 62(51):12407-17.