

R  
008.8  
4424-3  
88

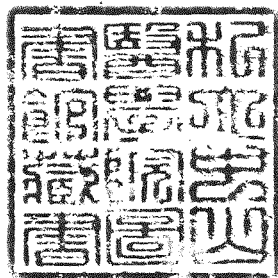
# 私立中山醫學院毒理學研究所碩士論文

**Master Thesis, Institute of Toxicology, Chung  
Shan Medical and Dental College**

蜂膠天然物及類似物之全合成及其活性之探討

Total synthesis of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) -  
like analogues and study on their Biological activity

指導教授：陳文貴教授 (Wen-Kang Chen)



研究生：蔡佳芳 (Chia-Fang Tsai) 撰

借  
不  
恕  
如  
書  
參  
中華民國八十八年七月

中山醫學院圖書館



C055152

# 授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 毒理學研究所  
\_\_\_\_\_組 八十七 學年度第 二 學期取得 碩士 學位之論文。

論文名稱：蜂膠天然物及類似物之全合成及其活性之探討

同意  不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號: \_\_\_\_\_)

同意  不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名:陳文貴 教授

研究生簽名:  
(親筆正楷)

學號:R86502  
(務必填寫)

日期:民國 88 年 07 月 25 日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄 106-36 台北市和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 王淑貞。(本授權書諮詢電話:02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

## 簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在兩種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站 [www.stic.gov.tw](http://www.stic.gov.tw)，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 [www.ncl.edu.tw](http://www.ncl.edu.tw)。

2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。

3. 全國博碩士論文全文資料整合計畫的宏觀效益:

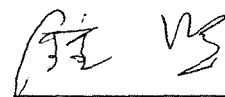
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位必備條件之一，經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

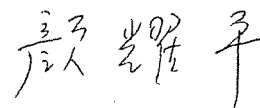
國立清華大學原子科學研究所教授

鍾 堅 博士



靜宜大學應用化學研究所教授

顏耀平 博士



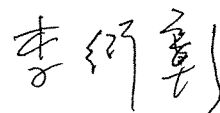
大仁技術學院工業安全衛生系副教授

仇 敏 博士



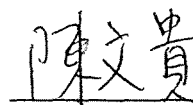
彰化師範大學化學系副教授

李衍彰 博士



中山醫學院毒理學研究所教授  
(本論文指導教授)

陳文貴 博士



中華民國八十八年七月

學生蔡佳芳論文題目為蜂膠天然物及類似物之全合成及其活性之探討，其論文已經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並經由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：陳文貴 教授

簽名：陳文貴

中華民國八十八年七月

## 謝 誌

兩年的碩士班生活中，感謝恩師陳文貴教授及李衍彰副教授，不論在研究方向之細心指導或做人處事上之諄諄教誨，都讓我獲益良多，也使我深切體認到研究工作的重要性及研究本身所賦予的樂趣，在此致上最衷心的感激。

文稿初成，復蒙清華大學原子科學研究所鍾 堅教授及靜宜大學應化所顏耀平教授及大仁技術學院仇 敏副教授之撥冗審閱，對本論文悉心審查、詳加斧正，並提供諸多寶貴意見，使本論文得以更臻完善，在此致上誠摯的謝意。

兩年的實驗室生活，特別感謝楊繼江老師以及胡超群老師對我的指導，讓我的論文得以順利完成。

感謝彥敏學長和培湖同學在實驗上的幫助，另外也謝謝暉真、芳萍、朝棟、幸鈴、惠雯、思綺、欽誌等學弟妹在實驗上的幫忙。感謝嘉文鼓勵我考上研究所並陪伴我渡過最忙與最辛苦的時候。

最後感謝我的爸媽及妹妹，給予我最大的支持。謹以此論文獻給我的爸媽，沒有他們的栽培與教誨，我無法有今天的成績，願與他們一起分享我的成果。

蔡佳芳 謹誌於  
中山醫學院毒理學研所  
中華民國八十八年七月

# 目 錄

	頁碼
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
緒論.....	3
研究目的.....	13
實驗材料及方法.....	14
結果.....	32
討論.....	41
結論.....	45
參考文獻.....	47
表.....	55
圖.....	66
附件一、NMR 光譜圖.....	78
附件二、已發表之文章.....	93

附表(圖)

Table 1. Cytotoxicity of CAPE, MC, and PEDMC on PBMC.....	55
Table 2. Quenching effect of CAPE on DPPH.....	56
Table 3. Cytotoxicity of 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	57
Table 4. Cytotoxicity of 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	58
Table 5. Cytotoxicity of 3-(4-methoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	59
Table 6. Cytotoxicity of 3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	60
Table 7. Cytotoxicity of 3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	61
Table 8. Cytotoxicity of PEDMC in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	62
Table 9. Cytotoxicity of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid methyl ester (MC)in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	63
Table 10 Cytotoxicity of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid ethyl ester (EC)in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	64
Table 11 Cytotoxicity of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (CAPE)in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.....	65
Fig. 1 CAPE 在 PBMC 感染 M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3)或 Dual tropic (89.6)之 HIV-1 isolates 的作用 .....	66
Fig. 2 PEDMC 在 PBMC 感染 M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3)或	



Dual tropic (89.6)之 HIV-1 isolates 的作用 .....	67
Fig. 3 MC 在 PBMC 感染 M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3)或 Dual tropic (89.6)之 HIV-1 isolates 的作用 .....	68
Fig. 4 MTT assay of 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells.....	69
Fig. 5 MTT assay of 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells .....	70
Fig. 6 MTT assay of 3-(4-methoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells.....	71
Fig. 7 MTT assay of 3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells.....	72
Fig. 8 MTT assay of 3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells.....	73
Fig. 9 MTT assay of PEDMC at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells.....	74
Fig. 10 MTT assay of MC at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells. ....	75
Fig. 11 MTT assay of EC at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells.....	76
Fig. 12 MTT assay of CAPE at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells.....	77



## 摘要

本實驗針對蜂膠成份之主要活性物-CAPE 能抑制結腸癌細胞、白血病細胞、多種被病毒感染的細胞、皮膚癌細胞的生長。以化學療法的觀點，發展並研究出蜂膠的有效成份，以供臨床上抗發炎，抗過敏，抗突變及抗病毒之應用。首先設計出 (1) 結構具有兩個芳香環，(2) 中間有脂類連接和含有羥基的 9 種化合物，命名為 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (CAPE), 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (PEDMC), 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic methyl ester (MC), 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid ethyl ester (EC), 3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester (BrCAPE), 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester, 3-(4-methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester, 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propionic acid ethyl ester, and 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)propionic acid ethyl ester。並以 acyl chloride 的中間產物進行酯化反應，得到高產率的合成方法及縮短反應時間。本實驗以 CAPE、PEDMC 和 MC 作用於抑制 HIV 複製上，利用三株不同的 HIV-1 isolates [M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3) and Dual tropic (89.6)]，結果顯示 CAPE 和 MC 對於 HIV 之複製有明顯抑制作用，於濃度 10  $\mu\text{M}$  至 100  $\mu\text{M}$  之間尤其明顯，PEDMC 的抑制作用沒有 CAPE 和 MC 明顯。在口腔癌方面，我們選用四株人類口腔正常細胞 (BF) 和癌細胞 (OSF, GNM, TSCCa)，以 MTT assay 分析上述 9 種不同化合物 (analogues) 對於正常及癌細胞的細胞毒性，結果顯示以 CAPE、MC 和 EC 對 OSF (癌前細胞)、GNM (齒齦癌細胞) 和 TSCCa (舌癌細胞) 有明顯細胞毒性，其毒性隨濃度增加而增加，但 MC 對於正常 BF 細胞有少許細胞毒性；含 Br-基的化合物，除 BrCAPE 對 GNM (齒齦癌細胞) 有明顯細胞毒性外，2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester 和 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester 並無法有效抑制癌細胞生長，故可推知 caffeic acid 系列的結構具有兩個芳香環或中間有脂類連接和含有羥基，在治療口腔癌部分有明顯效果，因此可深入探討作用機制，預期成為一治療口腔癌的新藥。

## Abstract

Propolis, a honey bee hive product, exhibits a broad spectrum of medical application including antibiotic, antiviral, anti-inflammatory and tumor growth inhibition; some of the observed biological effects may be due to caffeic acid (cinnamic acid) esters that are present in propolis. In the present work we synthesized five caffeic acid esters, namely 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (CAPE), 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (PEDMC), 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic methyl ester (MC), 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid ethyl ester (EC), 3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester (BrCAPE), and four structure-like compounds, namely 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester, 3-(4-methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester, 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propionic acid ethyl ester, 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propionic acid ethyl ester and tested them against the PBMC cell infected by M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3) and Dual tropic (89.6) of HIV-1 isolates. The CAPE and MC show significant inhibition on the growth of HIV-replication in PBMC cell, but the PEDMC shows less inhibition effect than the CAPE and MC. In addition, the effect of these agents on the growth of normal human buccal mucosal fibroblast (BF), oral submucosus fibroblast (OSF), neck metastasis of Gingiva carcinoma (GNM), tongue squamous cell carcinoma (TSCCa) was studied by the MTT assay. Treatment with 25-200  $\mu$ M CAPE and 50-400  $\mu$ M EC shown significant cytotoxicity on OSF, GNM, TSCCa cells, but not on BF cell. The results suggests that CAPE-like compounds be acting as good chemotherapy agents against HIV infection and oral cancer.

## 緒論

蜂膠中所含之多種天然物，具抗發炎<sup>55-57</sup>，抗過敏<sup>58,59</sup>，抗突變<sup>59</sup>及抗病毒<sup>60-65</sup>活性。蜂膠所含之抗病毒(包括 DNA 及 RNA 病毒)有效成份-CAPE (3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester)，而其作用機制為有效地抑制病毒之感染活性或複製活性。但目前，有關蜂膠抗 HIV 的研究尚在研究階段，Zhao, H. et al. 指出含有 phenol 結構的化合物，如 flavones, CAPE, 和 Curcumin 都有抑制 HIV-1 integrase 的能力<sup>63</sup>，而這些化合物的結構都具有兩個芳香環，中間有脂類連接和含有羥基，因此本論文設計新的合成方法解決這類化合物低產率的天然物萃取及其它低產率的合成方法。另外口腔癌的死亡率又佔男性十大癌症的第五名，因此將應用這些化合物在口腔癌方面，期能成為預防或治療口腔癌的新藥。

### (1) 愛滋病 (AIDS)

從 1910 年羅斯(Peyton Rous)第一次以實驗顯示病毒可以引發雞的肉瘤<sup>1</sup>以來，病毒在人類癌症中所扮演的角色一直被高度的懷疑及爭論著。直到 1960 年代，Epstein-Barr virus(EBV)被發現與 Burkitt 氏腫瘤有關<sup>2,3</sup>，病毒在人類癌症中的可能作用才又重新被重視。此種趨勢直到 1981 年左右，另一種人類癌症，即日本九州四國主要流行的成人 T 細胞白血病/淋巴瘤 adult T-cell/leukemia/lymphoma，ATL 被發現與人類 T 細胞白血病病毒第 1 型(human T-cell leukemia virus type 1, HTLV-1)有關後<sup>4,5</sup>，病毒在人類癌症中的角色才被逐漸肯定。至於人類病毒致癌的機轉，目前分子生物學界則正熱烈研究中，其可能機轉包括(1)介入性突變(insertional mutagenesis)，(2)病毒所攜帶致病基因(oncogene)或細胞致癌基因的活化，以及(3)病毒或其它內在及外在因素所引發的細胞生長因子如白血球間素 II 型(interleukin-II, IL-2)，及其受體(IL-2R)基因的表現等<sup>6</sup>。

在 1980 年代，幾種人類腫瘤如肝細胞癌及子宮頸瘤，也被發現分別與 B 型肝炎病毒(hepatitis B virus; HBV)<sup>7, 8</sup> 及人類乳頭瘤病毒(human papilloma virus; HPV)<sup>9</sup> 密切相關，另一種與人類免疫功能不全病毒(human immunodeficiency virus; HIV)有關而在全世界流行有「現代黑死病」之稱的愛滋病(acquired immunodeficiency syndrome; AIDS)則更受到高度的注意及研究。引起愛滋病的致病體，是一種能侵襲人體的反轉錄病毒(human retrovirus)，病毒首先由法國巴斯德研究中心(Pasteur institute) Montagnier 博士分離純化出來。他們命名為 LAV 病毒(lymphadenopathy associated virus)，幾個月後，在美國國家醫學研究院的 Robert 博士也在科學雜誌上發表，他們分離出了愛滋病毒，最初以為與引起人類 T 細胞的血癌病毒(human T-cell leukemia virus; HTLV-I)有關，因此命名為 HTLV-III virus，但是最後證明此病毒與白血病過多的血癌無關，因此再更正名為 human T-cell lymphotropic virus，縮寫仍為 HTLV。同時，在舊金山加大醫學院，Jay Levy 博士也由愛滋病人身上分離純化此種病毒，他命名為愛滋病有關的病毒 ARV(AIDS-associated retrovirus)。基本上到目前，公認 LAV, HTLV, ARV 都屬同類，基本結構相同的病毒。尤其 LAV/HTLV-III 幾乎分子結構上完全一樣<sup>10</sup>，1986 年愛滋病毒統一名稱，改為 HIV 病毒(human immunodeficiency virus)。

HIV 病毒感染的機制是利用其單股核糖核酸 (ssRNA) 被反轉錄酶(reverse transcriptase) 轉錄成為雙股去氧核糖核酸 (dsDNA) 基因之後，病毒的嵌合酶(integrase) 再將病毒基因嵌合進入寄主細胞的基因庫 (genome) 中。如此，病毒方能利用寄主細胞基因在複製(replication) 時替其複製基因，繼續其生活史 (life cycle)。愛滋病毒的分子結構，基本上兩端有終端重覆結構，縮寫為 LTR 結構(long terminal repeat structure)，接著有病毒核心結構(long open reading frames coding gag, viral core structure)，接下來是病毒酵素群結構 pol 區，這包括複製病毒的反轉錄酶(reverse transcriptase, RT)和嵌合酶(integrase, IN)，而嵌合酶的存在對於 HIV 的複製是必需的<sup>11, 12</sup>，此酵

素基於其功能可劃分為三個分開的構造單位，中間核心部分包含嵌合酶本身的催化區 (catalytic domain)，其中有三個amino residues D64 D116 E152是高度保留的。此區域相信是用來協調雙價陽離子而進行酵素催化功能。至於amino端則包含zinc finger domain而且有motif HHCC；而carboxyl端則含有非特異性DNA binding之活性用來連接宿主之DNA。嵌合酶的存在對於HIV的複製是必需的，而且此酵素之作用方式是先將病毒DNA 3'端移除一個dinucleotide unit (稱做3'-processing)，然後將3'-processed的一股從細胞質移到細胞核，在細胞核的宿主DNA對應股經過5-base pair offset切割後結合進去(稱為strand transfer)。目前已可利用in vitro assay來測試各種抑制物抑制3'-processing及strand transfer之效果。

由於對愛滋病的了解，所以在治療愛滋病方面，一般而言集中在四個方面。首先，也是最常見的治療方法，用藥物來防止因免疫系統失調後所引起的各種發炎感染。這種機會感染(opportunistic infections)是造成愛滋病人最後死亡的主因。第二類治療的努力方向是重建病人受損的免疫功能，這方面的實驗治療方法，包括病人接受骨髓移植，或用能刺激免疫功能的物質，來刺激免疫系統的功能(immunomodulating substances)，這類物質如人體干擾素interferon到化學刺激物藥物(isoprinosine)等，到目前為止，還沒有任何一種方法，使受破壞免疫系統復元。第三方面，是針對反病毒本身來治療(antiviraltherapy)，由於反轉錄病毒的致病機轉與其複製過程息息相關，因此抑制病毒的複製過程，使其在人體內消滅，是以抗病毒治療(antiviral therapy)之藥物的主要策略<sup>13</sup>。其中由於反轉錄作用(Reverse transcription)是反轉錄病毒的特性，因此大多數的研究在於開發新的反轉錄酵素抑制劑<sup>14</sup>來抑制此反轉錄作用。雖然HIV病毒的反轉錄酵素抑制劑已有許多報告，如HPA-23<sup>15</sup>，Suramin<sup>16</sup>，AZT<sup>17</sup>及2,3-dideoxy Cytosine<sup>18</sup>等，其中HPA-23、Suramin、AZT已應用於臨床的治療，在臨床上可減緩早期AIDS相關複合症(AIDS-Related Complex，簡稱ARC)病狀的進行，尤其對於AIDS早期症狀之病患尤

其療效，如中度 T 淋巴球數目減少和口腔感染。但此藥不能根治愛滋病，且副作用不小，包括嚴重的貧血，頭痛，嘔吐，疲勞暈沉等；另報告指出若長期使用會使 HIV 病毒減低對 AZT 的敏感性 (Sensitivity)<sup>19</sup>。最後一種療法，就是目前臨床上採用何大一博士發明的「雞尾酒療法」來治療愛滋病病人，針對以反轉錄酶及蛋白酶為主的其他抑制性藥物，但由於仍有少數病毒存有抗藥性之問題，因此開發新藥極為迫切。為了加強這些治療策略，針對其他病毒酵素的抑制物就具有發展的潛力。

## (2) 口腔癌

口腔癌發生於口腔顏面部，常造成病患飲食、語言困難及顏面畸形，嚴重的病例甚至導致家庭及社會的沈重負擔。目前癌症已躍居國人十大死因的第一位，而口腔癌發生率為十萬分之十五·二七，位居十大男性癌症發生率排行榜第五名，而從八十二至八十六年間，口腔癌的死亡率就已向上攀升了 50 %，所以口腔癌的盛行率亦有逐年上升的趨勢。口腔癌主要發生於約 50 歲至 60 歲的中年男性<sup>20-23</sup>。

根據行政院衛生署的統計，口腔癌的發生率和死亡率有逐年增加的趨勢。在民國八十三年癌症登記報告顯示，口腔癌的粗發生率為每十萬人 7.30，比鼻咽癌高，首次佔男性十大癌症發生率的第五位。死亡人數於八十五年度更高達 1042 人，其中男性 941 名，已超過鼻咽癌的死亡總人數 881。隨著檳榔的消耗量越來越多，估計每年新的口腔癌病患有一千五百人以上。民國八十八年癌症登記報告顯示，口腔癌仍佔男性十大癌症發生率的第五位。

根據 1988 年美國癌症聯合委員會 (AJCC)，國際抗癌聯合會 (UICC) 的分類，口腔包括唇、頰黏膜、下齒齦、上齒齦、白齒後三角區、口腔底、硬顎、舌前三分之二。口腔癌泛指口腔內構造組織引起的癌症，和吸煙、喝酒、吃檳榔有密切的關係。比較常見的是舌癌、臉頰癌、硬顎癌、軟顎癌、齒齦癌等。以舌癌(鱗狀上皮細胞癌)比例

最多，佔全部口腔癌 83.3%<sup>21</sup> 或 86.2%<sup>22</sup>。80-90% 頰黏膜癌病患有嚼檳榔嗜好，82.8% 舌癌病患及 87% 牙齦病患亦有嚼檳榔的習慣，和抽煙、飲酒習慣相較，顯示嚼檳榔在台灣口腔癌佔極關鍵地位。我國口腔癌的發生率要比不食檳榔的歐美國家高，但比嚼食檳榔—煙草混合物的國家，如印度、錫蘭低<sup>20, 24, 25</sup>。而口腔黏膜下纖維化症(Oral submucous fibrosis, OSF)為口腔黏膜下堆積大量膠原纖維，血管變少並伴有表皮萎縮之病變，屬於口腔癌前病變，OSF 的發生率在嚼檳榔者中比口腔癌更高，罹患此病 100% 皆有嚼檳榔的習慣。特性是(1) 一旦罹患之後，口腔黏膜之變化即為「非可逆性」的，永遠無法自然地回到正常時的情形。(2) 嚼檳榔量的多寡與期間之長短，與是否發生 OSF 並無正比之關係，因此吃得少或開始不久，並不一定保證不會發病。(3) OSF 的發生至今無有效之治療方法，因此以預防(拒嚼檳榔)最為重要。

口腔易於直接診視，口腔癌是可以早期診斷的，只要早期(第一、二期)接受正規適當的治療，3 年的存活率可達 72%，5 年的存活率可有 60%，若是晚期(第三、四期)，則存活率將分別降為 61% 及 30%。晚期口腔癌的復發大都發生在 3 年內，其中有 80% 出現於局部或頸部，20% 發生遠隔轉移。口腔癌診斷方法：目前全國各醫院診斷口腔癌仍以切片檢查為主<sup>26</sup>。另有輔助診斷的方法如細胞學檢查<sup>27</sup> 及用甲苯藍染口腔癌<sup>28</sup> 均極具臨床價值。口腔癌的治療方法有外科手術切除、放射線療法及制癌劑化學療法三種。主要為手術切除及放射線療法，化學療法為輔助性或引導性治療，可以幫助控制微小轉移(micrometastasis)，及手術便利性(resectability)。對頸部轉移的治療方法，在 No(尚未發現淋巴結轉移)時有功能性頸部清除術，診斷性上頸部清除術及預防性放射線治療。在頸部有淋巴結轉移時，則必須作頸部清除術。對重症病患則施予放射線療法及化學療法作為支持性治療(supportive treatment)。但是使用化學療法作為手術的前導療法時，則必須小心安全範圍(safety margin)。必須在化學療法後，儘快施行手術，依照原腫瘤大小的安全範圍作切除，以免留下具抗藥性的癌細胞



但對較嚴重的口腔癌，有時無法有效控制、治療。臺灣地區之口腔癌發生和嚼檳榔、抽煙、喝酒息息相關，可由口腔白斑或紅斑惡化成口腔癌，也可在口腔內的不同位置，出現多處癌瘤。癌症是一種多重因素的基因疾病，其中環境因素(外來的致癌物質)在口腔癌扮演非常重要的角色，因此更需要進行口腔癌的預防。

### (3)蜂膠類的化合物

為保護樹木幼芽，花苞，及修補樹幹在大自然中所受創傷，各類植物之樹皮，花苞及嫩芽內均自然產生特殊的樹指狀物質，蜜蜂採集了各種植物(如白楊木，七葉樹，柳樹，油加利樹，各種果樹等等)莖幹表皮或嫩芽內的樹指狀物質，混合蜜蜂本身的唾液酵素及腹部蠟線分泌出來的密蠟，經充分咀嚼，結合成一種具黏性的棕綠色芳香性膠狀物，我們稱之為【蜂膠】。

蜂膠的作用：蜜蜂在移植蜂箱之後，女王蜂進駐之前，族群中的公蜂即展開採集製作蜂膠的任務，並扛起建築蜂巢的艱鉅使命，牠們將蜂膠全面塗抹在蜂箱壁上，接著仔細填補四周空隙，直到屬於牠們的城堡滴水不漏，至此方算大功告成。蜂膠對於蜜蜂的功用可歸納為：增強蜂巢內部結構，抗冷，抗熱，全面防水。

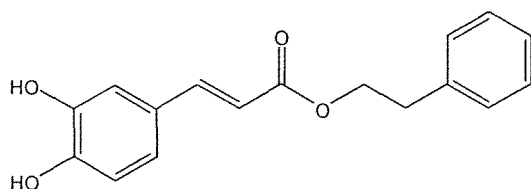
防止病毒、細菌、蟲蟻等外敵入侵。

有效隔離威脅蜜蜂族群生命的外物。

偶有異族蜜蜂或外界昆蟲侵入，將立刻螫死，並以蜂膠包裹蜜蜂如木乃伊，使其永不腐敗污染巢內。正因蜂膠具有如此超強的消毒，殺菌，排除黴菌功能，蜂巢內部得以永保無菌狀態。蜂膠就是蜜蜂維護巢內環境衛生，永保族群健康的捍衛使者。

蜂膠主要成分：英國劍橋大學研究發現，蜂膠含 129 種天然成分；1991 年世界蜂膠會議證實牠含有不下百種天然生藥成分；科學研究同時證實，生物生存所需的三十八種微量元素，蜂膠就含有三十四種之多。而其中最重要的成分特性就是富含豐富的類黃酮，類黃酮是現今醫學上所發現效果最優異的天然抗生物質，能淨化血液，強化細胞膜，促進細胞再生功能，並具有強力的抗菌，抑制細菌滋生特性。因為牠是天然物質，所以食用也完全無不良副作用之虞。

由於近年來對於蜂蜜的醫學性質很有興趣，且蜂蜜具有非常廣泛的活性，包括 antibacterial, antifungal, cytostatic, 以及 anti-inflammatory 的性質<sup>32-34</sup>。Gribel 和 pashinskii<sup>35</sup> 最近研究出蜂蜜在五種不同種類的 rat 和 mouse 具有中等的抗癌活性和明顯的抗腫瘤轉移作用。因此，蜂蜜很可能可以成為具有抗腫瘤的化療藥物像是 5 - fluorouracil 和 cyclophosphamid<sup>35</sup> 的抗腫瘤活性一樣。蜂蜜含有 caffeic acid, flavonoid glycones, 和蜂蠟(propolis)<sup>36</sup> 的許多化合物。蜂蠟的成分很多，首先被分離出來的有 caffeic acid, caffeic acid 本身則具有抗微生物及抗發炎的作用，而 Caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) 酯類的衍生物佔了蜂蜜的 20-25%；具有多方面的活性，其中可能有抑制腫瘤的作用<sup>36</sup>。Wattenburg 等人研究以餵食 hydroxycinnamates (蜂蜜的成份之一) 的方法顯示可以明顯抑制 benzo[a]pyrene 誘發小老鼠前胃的癌化<sup>38</sup>。蜂蠟即蜂膠之產物，一般民間用來治療許多慢性病，近年來的研究可知其具選擇性的抑制經由 viral-transformed 及 oncogene-transformed 的嚙齒類細胞和人類細胞，包括 glioblastoma multiforme (GBM-18)、colon adenocarcinoma (HT-29) 和 melanoma (HO-1) cells<sup>39-41</sup>，但不會抑制正常人類皮膚纖維細胞。Grunberger<sup>37</sup> 分離出 CAPE (Caffeic acid phenylethyl ester)，其研究顯示 CAPE 以 8 µg/ml 的濃度作用在 normal cell 時，有 75% 的 normal cell 並不會受影響。反之在 transformed cell (adenovirus serotype 5 transformed) 則有 90% 的 transformed cell 受到抑制。



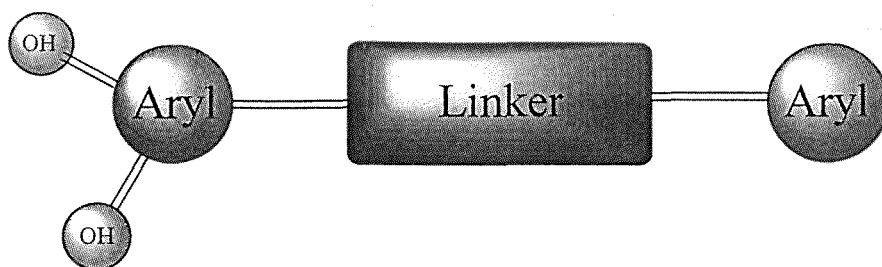
CAPE

因 caffeic acid ester 的衍生物可能也具有抑制腫瘤的作用，Rao 等人利用合成的方法合成出幾種 caffeic acid ester，如 MC、PEDMC，並研究其抗突變及抗腫瘤的活性<sup>41</sup>。結果發現 MC、CAPE、PEDMC 會抑制經由 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl 誘發 *Salmonella tryphimurium* strain TA 98 and TA 100 兩株細菌的突變 (mutagenicity)，在 colon adenocarcinoma HT-29 及 HCT-116 cell 兩種結腸腺癌細胞上則會抑制其生長。CAPE 及其他衍生物可抑制 azoxymethane 所導致的結腸癌前病灶、decarboxylase、tyrosine protein kinase 及 lipoxygenase 在結腸癌化時的活性<sup>241-43</sup>。CAPE 在低濃度 (0.1-6.5 nmol) 時可以抑制 tumor promoter (TPA) 所造成的癌化現象<sup>43</sup>，如多型核白血球的浸潤、 $H_2O_2$  的產生及表皮細胞的 DNA 有鹼基氧化的形成。若以較高劑量 (1-10 nmol) 的 CAPE 作用則會抑制 CD-1、SENCAR 兩種小老鼠的皮膚水腫及 ornithine decarboxylase 的活性。CAPE 會抑制人類白血病 HL-60 細胞的生長，並且抑制其 DNA、RNA 和 protein 的合成<sup>45</sup>。

CAPE 在抗氧化方面，除了可減少 TPA 導致細胞內  $H_2O_2$  的產生及 DNA 鹼基氧化之外<sup>42, 43</sup>，還會抑制 5-lipoxygenase 和 xanthine/xanthine oxidase 的活性<sup>45</sup>，其可能是由於減少氧化壓力而使得 CAPE 成為老鼠皮膚癌的一種化學預防藥物 (chemopreventive)。CAPE 對於一些 transformed cells 會產生細胞凋零 (apoptosis) 的現象，但在正常細胞上只會造成生長遲緩<sup>46</sup>。若以抗氧化劑 N-acetyl-L-cysteine 作用在癌細胞上可抑制 CAPE 誘發癌細胞進行 apoptosis，因此 CAPE 在氧化還原的機制上扮演一種前氧化劑 (pre-oxidant)。在短時間暴露 CAPE 會使癌細胞內的 GSH 下降，但不會影響正常細胞。另外 CAPE 也可抑制 NF- $\kappa$ B 對 DNA 的轉錄活性 (transcriptional

activation)，再由還原劑(DDT)回復此抑制的作用<sup>47</sup>。CAPE 能抑制 SV40 transformed keratinocyte (Z114)的增殖，有 dose- 及 time-dependent 之現象。此抑制在 0.5-5.0  $\mu\text{g/ml}$  48h 內處理時可得到此結果。而在 10  $\mu\text{g/ml}$  濃度時，藉由細胞形態及存活率之改變，可觀察到 CAPE 對於 SV40 transformed keratinocyte (Z114)具有細胞毒性。若 Z114 細胞前處理 CAPE 可有效防止 EGF(epidermal growth factor)誘發 ornithine decarboxylase(ODC)的活性<sup>48</sup>。在角質細胞(keratinocyte)上 CAPE 能阻止 UVB 抑制 Vit D receptor 基因的表現<sup>49</sup>。

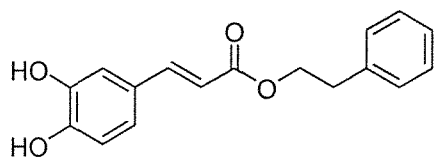
Fesen 等人在 1993 年為了探討可以抑制 human immunodeficiency virus integrase ( HIV integrase)的化學物質，以 *in vitro* integrase assay 研究了 33 種化合物，其中包括 topoisomerase inhibitors, antimalarial agents, DNA binders, naphthoquinone, flavone quercetin,和 CAPE，利用 *in vitro* assay 來測試各種抑制物抑制嵌合酶的嵌合作用(3'-processing 及 strand transfer)之效果，結果發現 CAPE 是唯一可以抑制嵌合酶的 integration step，而且抑制效果比抑制嵌合酶在 initial cleavage step 的酵素來的好。因此證實 CAPE 具有抑制 HIV integrase 的作用<sup>50</sup>。Fesen 等人並於 1994 年研究天然物 flavones、CAPE 和衍生物對 HIV-1 integrase 的作用，利用 *in vitro* assay 來測試天然物抑制嵌合酶的嵌合作用【1. 3'-processing cleavage、2. strand transfer 及 3. disintegration】之效果，結果顯示 flavones 和 CAPE 都可以抑制 HIV-1 integrase，但兩者抑制機轉不同，flavones 對於三種嵌合作用的反應具有抑制效果，而 CAPE 只抑制第二種嵌合作用。Fesen 等人推測可能與 structure-activity 有相關，flavones 具有抑制能力是其結構上至少有一個 *ortho*-位置的 phenolic hydroxyl groups 以及至少一個或兩個外加的 hydroxyl groups。若是改成 methoxy 或 glycosidic 的官能基時會減少或沒有抑制活性，因此官能基的種類極為重要<sup>51</sup>。



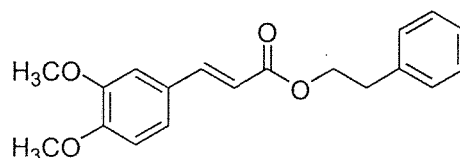
General structural features common to many HIV integrase inhibitors

Burke 等人認為 HIV-1 的有效複製需要將 viral genome 的 DNA integrate 到寄主細胞 (host cell) 的染色體上，經由病毒的嵌合酶(viral integrase)進行嵌合作用 (integration)。因此他們合成 30 種的嵌合酶抑制劑，其結構與 CAPE 相似，來探討 structure-activity 的相關性，結果發現與下面四點有關(1) ring substituents, (2) ester groups, (3) rotationally constrained variants, and (4) saturated amide analogues。CAPE 屬於這類化合物，其結構相似的衍生物必須具有至少一個 hydroxyl group 才會有抑制嵌合酶的活性<sup>52-54</sup>。

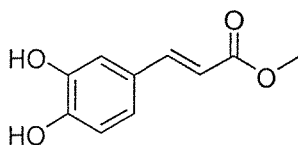
從上述觀點，我們設計了如上圖所示之一般特性之化合物，如 CAPE 與其他類似多苯環的類似物，有 MC (methyl caffeate)、EC (ethyl caffeate) 及 PEDMC (phenyl ethyl dimethyl caffeate) 等化合物。另外還有一些結構類似的衍生物，其結構式如下：



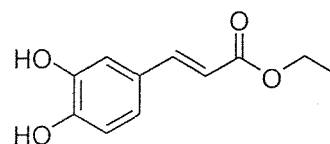
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester  
CAPE (1)



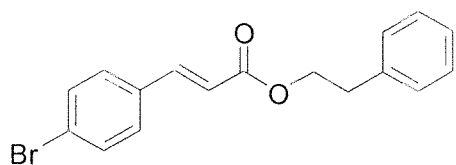
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester  
PEDMC (2)



3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylic acid methyl ester  
MC (3)

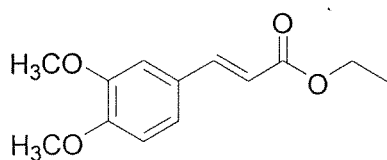


3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylic acid ethyl ester  
EC (4)



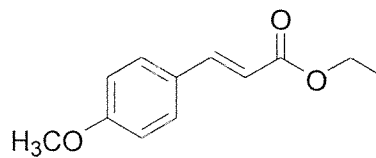
3-(4-Bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester

**(5)**



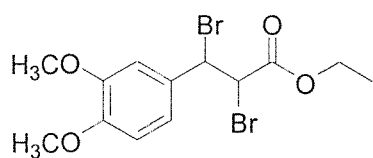
3,4-dimethoxy-trans-cinnamic acid ethyl ester

**(6)**



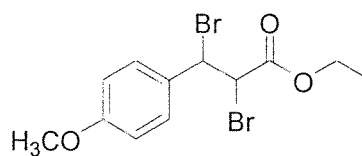
4-methoxy-trans-cinnamic acid ethyl ester

**(7)**



2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxy-phenyl)-propionic acid ethyl ester

**(8)**



2,3-dibromo-3-(4-methoxy-phenyl)-propionic acid ethyl ester

**(9)**

## 研究目的

本實驗針對蜂膠之主要活性物-CAPE 能抑制結腸癌細胞、白血病細胞、多種被病毒感染的細胞、皮膚癌細胞的生長。以化學療法的觀點，發展並研究出蜂膠的有效成份，以供臨床上抗發炎，抗過敏，抗突變及抗病毒之應用，在近年來受到廣泛注意。目前蜂膠中所含之多種天然物已被確認具抗發炎<sup>55-57</sup>，抗過敏<sup>58, 59</sup>，抗突變<sup>59</sup>及抗病毒<sup>60-65</sup>活性，而有關活性之有效成份，部份已被單離並經分析鑑定。其中抗病毒之一有效成份為類黃酮(flavonoid)，如 quercetin<sup>60</sup> 具抗單純皰疹病毒(herpes simplex virus type 1; HSV-1)，副流行感冒病毒(Parainfluenza virus type 3; Pf-3)及 sindbis virus 活性;如 morin<sup>61</sup> 具抗 herpesvirus 活性;如 dihydroquercetin 及 dihydrofisetin<sup>62</sup> 具抗 HSV-1, herpesvirus 活性;如 quercetin, morin, leteoli 具抗 HIV-1，脊髓灰質炎病毒(Poliovirus type I), Pf-3 及呼吸性融合細胞病毒(respiratory syncytial virus RSV)活性。蜂膠所含之抗病毒(包括 DNA 及 RNA 病毒)有效成份-CAPE 之作用機制，為有效地抑制病毒之感染活性或複製活性。目前，有關蜂膠抗 HIV 的研究尚在研究階段，Zhao, H. et al. 指出含有 phenol 結構的化合物，如 flavones, CAPE, 和 Curcumin 都有抑制 HIV-1 integrase 的能力<sup>63</sup>，而這些化合物的結構都具有兩個芳香環，中間有脂類連接和含有羥基，而這類化合物大都以天然物萃取取得或是低產率的合成方法，所以本實驗利用更簡便的合成方法來全合成這類的化合物，並探討這些化合物在口腔癌上的細胞毒性為何，期能成為預防或治療口腔癌的新藥。

# 材 料 與 方 法

## 一、實驗材料

### (一) 測試儀器

1. 核磁共振光譜儀 (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer 簡稱 NMR)

機型：MERCURY-400 型

所測之光譜皆以 TMS 作為內標準劑，化學位移以 ppm (parts per million,  $\delta$ ) 表示

s：單重峰 (singlet)

d：雙重峰 (doublet)

t：三重峰 (triplet)

q：四重峰 (quartet)

m：多重峰 (multiple)

2. 紫外線光譜儀 (Ultraviolet-Spectrometer 簡稱 UV)

機型：Shimadzu UV-260

3. 測熔點儀器 (Mel Temp II melting point apparatus)

4. Low-resolution mass spectra (MS) 和 high-resolution mass spectra (HRMS): JEOL JMX-SX/SX 102 A mass spectrometer (中興大學)

5. Elemental analyses: Heracus CHNOS Rapid spectrometer (中興大學)

6. 無菌操作台 (Lamina Flow)：廠牌 HIGH TEN

7. 細胞培養箱 (Incubator)：廠牌 NUAIR<sup>TM</sup> US AUTO FLOW

8. 離心機 (Centrifuge)：廠牌 KUBOTA KN-70

9. 倒立式顯微鏡：廠牌 NIKON

10. 光學顯微鏡：廠牌 NIKON

11. 恆溫水浴槽：廠牌 Kodman



12. 血球計數器：廠牌 Reichert-Jung

13. 螢光光譜儀：廠牌 HITACHI; F2000

(二) 有機合成試藥

名稱	廠牌
TLC 片	Merck
氮氣	吉源公司
silica gel 230-400 mesh	Merck
3,4-dihydroxycinnamic acid	Lancaster
3,4-dimethoxycinnamic acid	Aldrich
4-methoxycinnamic acid	Aldrich
phenylethyl alcohol	Aldrich
4-bromobenzaldehyde	Aldrich
malonic acid	Lancaster
pyridine	Acrose
piperidine	Acrose
TsOH	Aldrich
DCC	Aldrich
DMAP	Aldrich
Dichlorodiphenylmethane	Lancaster
Triethylamine	Lancaster
Bromine	Aldrich
Thionyl chloride	Acrose

### (三) 有機合成溶劑

名稱	廠牌
CHCl <sub>3</sub>	皓峰企業股份有限公司
CHCl <sub>2</sub>	皓峰企業股份有限公司
Ether	皓峰企業股份有限公司
Hexene	皓峰企業股份有限公司
Nitrobenzene	Lancaster
Methanol	聯工化學試藥
Ethanol	聯工化學試藥
Acetone	皓峰企業股份有限公司
THF	Lancaster
DMSO	Lancaster
Benzene	Lancaster

### (四) 反應用實驗儀器之前處理

所有反應的玻璃儀器均需在烘箱中 60°C 至少烘乾兩小時，取出後放入乾燥箱中冷卻至室溫，以真空幫浦抽氣使其乾燥，再通入氮氣進行反應。

### (五) 反應用溶劑之前處理

把蒸餾後的溶劑 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、CHCl<sub>3</sub> 加入 CaH<sub>2</sub>；ether 加入 Na 再行蒸餾) 通入含有分子篩 (分子篩必須在 150°C，4 小時烘乾) 的瓶子內，經由分子篩吸收 H<sub>2</sub>O、H<sub>2</sub>S、SO<sub>2</sub> 等小分子。

### (六) 生物活性之相關試劑

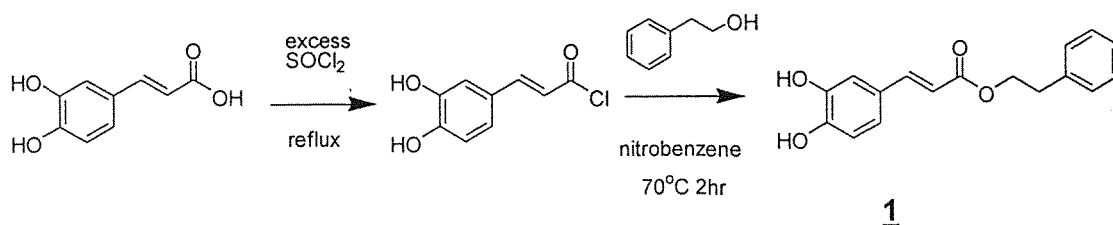
1. 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (CAPE)、3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid phenethyl ester (PEDMC)、3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid methyl ester (MC)、3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid ethyl ester (EC)、3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester (BrCAPE)、3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester、3-(4-methoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester、2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-

propionic acid ethyl ester、2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester 九種化合物來自有機合成。

2. DMEM、RPMI、Penicillin-Streptomycin、Trypsin-EDTA、Dulbeccos Phosphate Buffered Saline、MTT ( 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide )、DPPH ( 1,1-diphenyl-1,2-picrylhydrazyl radical ) 購自美國 sigma Ltd.

## 二、有機合成步驟與數據:

### 1. 由 3,4-Dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) 合成 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (CAPE) (1)



#### 方法一

將 caffeic acid (0.500 g, 2.77 mmol) 放入過量的  $\text{SOCl}_2$  (當溶劑用) 加熱至迴流 2 小時<sup>66</sup>, 以減壓濃縮機濃縮並移除  $\text{SOCl}_2$ 。濃縮後的 acyl chloride 在 10 ml 的 nitrobenzene 下緩緩加入 phenethyl alcohol (1.656 ml, 13.88 mmol) 在  $70^\circ\text{C}$  加熱 2 小時, 取反應液點 TLC 片 (展開液乙醚: 二氯甲烷: 己烷 = 2:2:1), 終止反應並經由矽膠管柱分離, 先以二氯甲烷當沖提液移除 nitrobenzene, 再以乙醚: 二氯甲烷: 己烷 = 2:2:1 的沖提液收集產物, 濃縮後得到白色固體, 經再結晶(二氯甲烷/己烷)得到 0.394 g, 產率 50%。

#### 方法二

將 caffeic acid (0.500 g, 2.77 mmol)、DCC (0.372 g, 3.00 mmol) 和 DMAP (0.459 g, 2.20 mmol) 放入 25 ml 的反應瓶內, 打入 10 ml  $\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) 的溶液, 再將 phenethyl alcohol (1 ml, 8.33 mmol) 緩慢加進反應瓶中, 反應在室溫下攪拌 2 天, 會有沉澱物產生, 過濾後取反應液點 TLC 片 (展開液乙醚: 己烷 = 2:1), 終止反應, 經由矽膠管柱分離, 以乙醚: 己烷 = 2:1 的沖提液收集產物, 濃縮後經再結晶得到白色固體 0.362 g, 產率 46%。

mp:  $127\text{-}128^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$  光譜 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

3.02 (2 H, t,  $J=7.2$  Hz), 4.42 (2 H, t,  $J=7.2$  Hz), 5.98 and 6.14 (2 H, brs), 6.25 (1 H, d,  $J=16.0$  Hz), 6.87 (1 H, d,  $J=8.0$  Hz), 6.99 (1 H, dd,  $J=8, 2.0$  Hz), 7.09 (1 H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.23-7.34 (5 H, m), 7.57 (1 H, d,  $J=16.0$  Hz)

$^{13}\text{C NMR}$  光譜 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

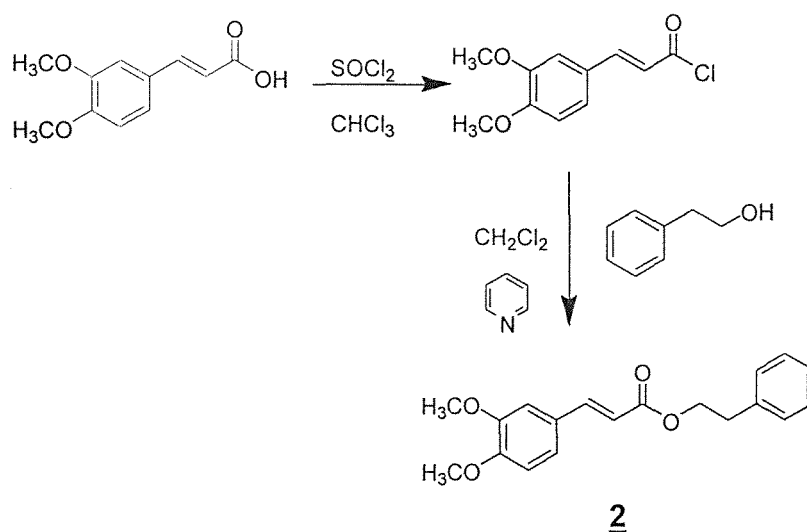
$\delta$  35.3, 65.2, 114.3, 115.2, 115.4, 122.4, 126.5, 127.3, 128.4, 128.8, 137.6, 143.7, 145.1, 146.3, 167.6.

EIMS  $m/z$  (rel. int): 284  $[\text{M}]^+$  (21), 180(100), 163(44).

HRMS: Calc. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$ : 284.1048. Found: 284.1047.

Anal. Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$ : C, 71.82; H, 5.67; O, 22.51. Found: C, 71.55; H, 5.60; O, 22.75.

## 2. 由 3,4-Dimethoxycinnamic acid 合成 3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid phenethyl ester (PEDMC) (2)



將 3,4-dimethoxycinnamic acid (0.500 g, 2.42 mmol) 放入過量的  $\text{SOCl}_2$  (當溶劑用) 加熱至迴流 2 小時<sup>67</sup>, 以減壓濃縮機濃縮並移除  $\text{SOCl}_2$ 。濃縮後的 acyl chloride 在二氯甲烷下緩緩加入

phenethyl alcohol(0.289 ml, 2.42 mmol)和 pyridine(0.191 ml, 2.42 mmol)在室溫下攪拌 2 小時，取反應液點 TLC 片(展開液乙醚：己烷=2：1)，終止反應，經由矽膠管柱分離，以乙醚：己烷(2：1)當沖提液收集產物，濃縮後可得白色固體 0.632 g，產率：92%。

mp: 97-98°C

<sup>1</sup>H-NMR 光譜 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 3.03 (2 H, t, J= 7.2 Hz), 3.92 (6 H, s), 4.43 (2 H, t, J= 7.2 Hz), 6.30 (1 H, d, J= 16.0 Hz), 6.87 (1 H, d, J= 8.4 Hz), 7.05 (1 H, d, J= 2.0 Hz), 7.10 (1 H, dd, J= 8.4, 2.0 Hz), 7.25-7.35 (5 H, m), 7.62 (1 H, d, J= 16.0 Hz).

<sup>13</sup>C NMR 光譜 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

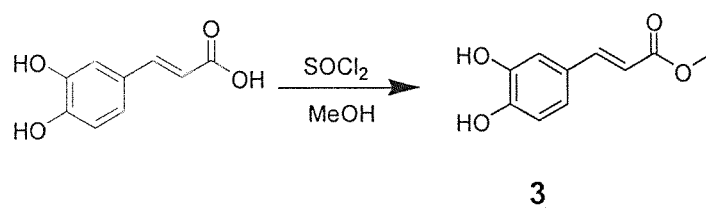
δ 35.3, 55.9, 56.0, 64.8, 109.5, 110.9, 115.6, 122.5, 126.4, 127.2, 128.3, 128.7, 137.7, 144.5, 149.0, 150.9, 166.8.

EIMS m/z (rel. int): 312 [M]<sup>+</sup> (73), 208(100), 191(76).

HRMS: Calc. for C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>: 312.1362. Found: 312.1358.

Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>: C, 73.06; H, 6.45; O, 20.49. Found: C, 73.06; H, 6.43; O, 20.59.

### 3. 由 3,4-Dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) 合成 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid methyl ester (MC) (3)



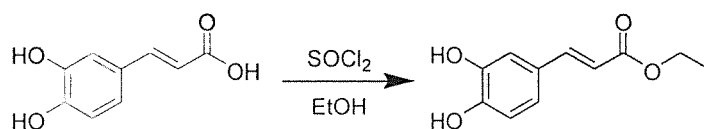
將 caffeic acid (1.000 g, 5.55 mmol) 放入過量的 methanol (當溶劑用), 加入 5 當量的  $\text{SOCl}_2$  加熱至迴流 2 小時, 以減壓濃縮機濃縮並移除過多的 methanol 和  $\text{SOCl}_2$ 。取反應液點 TLC 片(展開液乙醚:己烷=2:1), 終止反應, 經由矽膠管柱分離, 以乙醚:己烷=2:1 的沖提液收集產物, 濃縮後得到白色固體 1.023 g, 產率 95%。

mp: 158-159°C

$^1\text{H-NMR}$  光譜 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )

$\delta$  3.67(s, 3H), 6.20 and 7.50(2d,  $J=16.0$  Hz, olefinic protons), 6.70-7.06(3 aryl protons), 8.10(2 hydroxy protons)<sup>68</sup>

#### 4. 由 3,4-Dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) 合成 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid ethyl ester (EC) (4)



**4**

將 caffeic acid (1.000 g, 5.55 mmol) 放入過量的 ethanol (當溶劑用), 加入 5 當量的  $\text{SOCl}_2$  加熱至迴流 2 小時, 以減壓濃縮機濃縮並移除過多的 ethanol 和  $\text{SOCl}_2$ 。取反應液點 TLC 片(展開液乙醚:己烷=2:1), 終止反應, 經由矽膠管柱分離, 以乙醚:己烷=2:1 的沖提液收集產物, 濃縮後得到白色固體 1.132 g, 產率 98%。

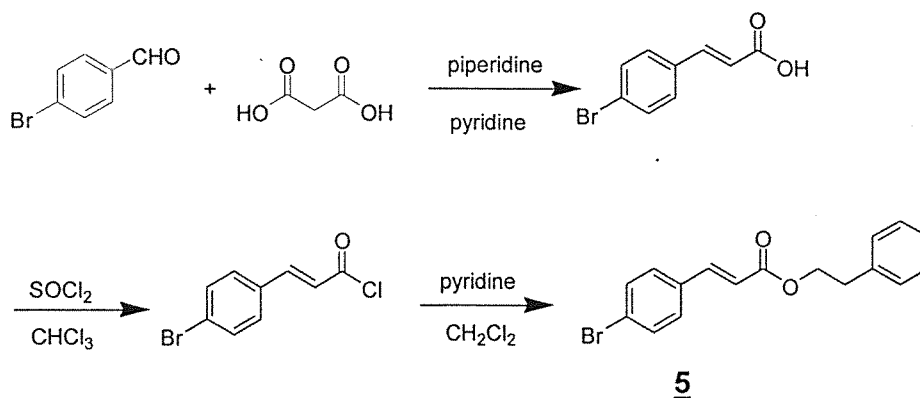
mp: 142-143°C

$^1\text{H-NMR}$  光譜 (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  1.30(3H, t,  $J=7.0$  Hz), 4.20(2H, q,  $J=7.0$  Hz), 7.12(1H, d,

J=16.0Hz), 6.65-7.10(3H, m), 7.50(1H, d, J=16.0 Hz), 8.70-8.75(2H, m).

### 5. 由 4-Bromobenzaldehyde 合成 3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester (BrCAPE) (5)



根據 Glover 等人<sup>69</sup>的合成方法取 4-bromobenzaldehyde (0.600 g, 3.2 mmol)和 malonic acid (0.670 g, 6.4 mmol)放入 4 ml 的 pyridine, 混合均勻後加入 piperidine (0.320 ml, 3.2 mmol), 將混合物加熱至 80°C 並維持 2 小時, 再將溫度上升到 115°C 持續 8 小時。冷卻後的混合液倒入 200 ml 的冰水中, 緩慢加入 10 ml 的濃鹽酸(35.5%)將混合液酸化, 會出現黃色固體, 將其過濾後以冰水沖洗 4 次, 再溶於氫氧化鈉溶液(1:20)並過濾以去除雜質, 重覆酸化的步驟, 最後用氯仿萃取以減壓濃縮機濃縮後得到 4-bromocinnamic acid (0.560 g), 產率 77%。

將 4-bromocinnamic acid (0.560 g, 2.5 mmol) 放入過量的  $\text{SOCl}_2$  (當溶劑用) 加熱至迴流 2 小時<sup>70</sup>, 以減壓濃縮機濃縮並移除  $\text{SOCl}_2$ 。濃縮後的 acid chloride 在二氯甲烷下緩緩加入 phenethyl alcohol (0.262 ml, 2 eq) 和 pyridine (0.348 ml, 2 eq) 在室溫下攪拌 1 小時, 取反應液點 TLC 片 (展開液乙醚: 己烷 = 2:1), 反應完成後, 經由矽膠管柱分離, 以乙醚: 己烷(2:1)當沖提液收集產物, 濃縮後可得白色固體 0.721 g, 產率: 89%。



mp: 81-82°C

<sup>1</sup>H-NMR 光譜 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 3.02 (2 H, t, J= 7.2 Hz), 4.23 (2 H, t, J= 7.2 Hz), 6.40 (1 H, d, J= 16 Hz), 7.25-7.32 (5 H, m), 7.37 (2 H, d, J= 2.0 Hz), 7.51 (2 H, d, J= 8.8 Hz), 7.59 (1 H, d, J= 16.0 Hz).

<sup>13</sup>C NMR 光譜 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

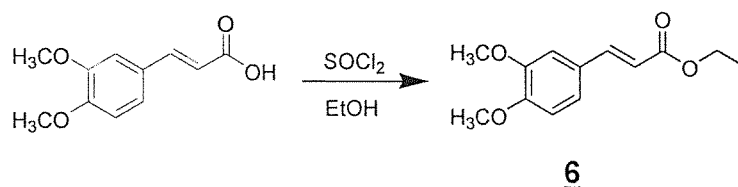
δ 35.3, 65.1, 118.7, 124.4, 126.5, 128.4, 128.8, 129.3, 132.0, 133.2, 137.6, 143.3, 166.4.

EIMS m/z (rel. int): 322 [M+2]<sup>+</sup> (5), 330 [M]<sup>+</sup> (5), 211(53), 209(53), 104(100), 102(79).

HRMS: Calc. for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>Br: 330.0256. Found: 330.0253.

Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>Br: C, 61.65; H, 4.56; O, 9.66. Found: C, 61.78; H, 4.67; O, 9.83.

## 6. 由 3,4-Dimethoxycinnamic acid 合成 3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester (**6**)



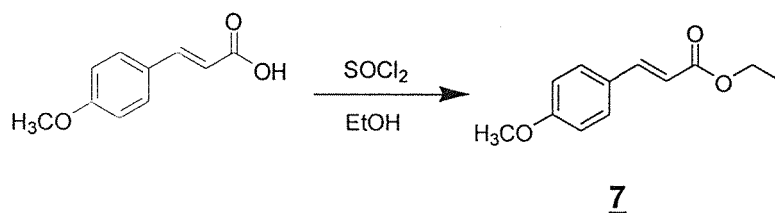
將 3,4-dimethoxycinnamic acid (2.000 g, 9.6 mmol) 放入過量的 ethanol (當溶劑用), 加入 5 當量的 SOCl<sub>2</sub> 加熱至迴流 2 小時, 以減壓濃縮機濃縮並移除過多的 ethanol 和 SOCl<sub>2</sub>。取反應液點 TLC 片 (展開液乙醚: 己烷=2:1), 反應完成後, 經由矽膠管柱分離, 以乙醚: 己烷=2:1 的沖提液收集產物, 濃縮後得到白色固體 2.01 g, 產率 97%。

m.p. 48-49°C

<sup>1</sup>H-NMR 光譜 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 1.32 (3 H, t, J= 7.0 Hz), 3.73 (6 H, s), 4.19 (2 H, q, J=7.0 Hz), 6.39 (1 H, d, J= 16.0 Hz), 6.61 (2 H, d, J= 9 Hz), 6.75 (2 H, d, J= 9.0 Hz), 7.64 (1 H, d, J= 16.0 Hz).

**7. 由 4-Methoxycinnamic acid 合成 3-(4-methoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester (7)**



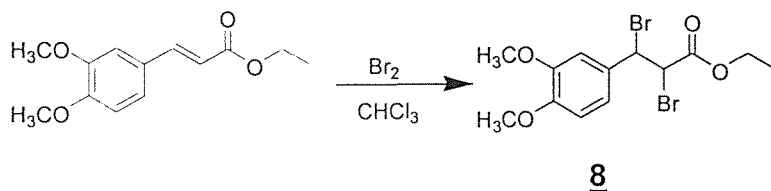
將 4-methoxycinnamic acid (2.000 g, 11.2 mmol) 放入過量的 ethanol (當溶劑用), 加入 5 當量的 SOCl<sub>2</sub> 加熱至迴流 2 小時, 以減壓濃縮機濃縮並移除過多的 ethanol 和 SOCl<sub>2</sub>。取反應液點 TLC 片 (展開液乙醚: 己烷=2:1), 反應完成後, 經由矽膠管柱分離, 以乙醚: 己烷=2:1 的沖提液收集產物, 濃縮後得到白色固體 2.29 g, 產率 99%。

m.p. 49-50°C

<sup>1</sup>H-NMR 光譜 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 1.32 (3 H, t, J= 7.0 Hz), 3.81 (3 H, s), 4.24 (2 H, q, J=7.0 Hz), 6.29 (1 H, d, J= 16.0 Hz), 6.88 (2 H, d, J= 9 Hz), 7.46 (2 H, d, J= 9.0 Hz), 7.63 (1 H, d, J= 16.0 Hz).

**8. 由 3-(3,4-Dimethoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester 合成 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester (8)**



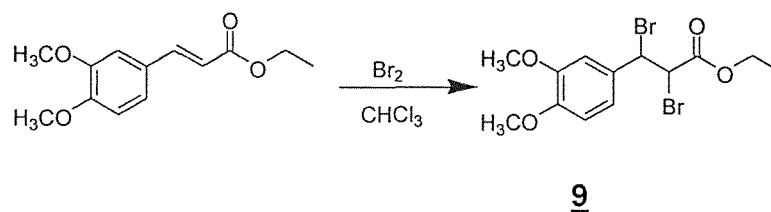
將 3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester (2.000 g, 8.4 mmol) 放入 30 ml 的氯仿中並置於冰浴上，以保持低溫狀態，緩慢滴入 Br<sub>2</sub> (0.431 ml, 8.4 mmol)，等 Br<sub>2</sub> 產生的棕色消失後再加下一滴，在室溫下攪拌 1 小時，取反應液點 TLC 片（展開液 乙醚：己烷=1：1），反應完成後，經由矽膠管柱分離，以乙醚：己烷=1：1 的沖提液收集產物，濃縮後得到白色固體 3.32 g，產率 99%。

m.p. 110-111°C

<sup>1</sup>H-NMR 光譜 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 1.30 (3 H, t, J= 7.0 Hz), 3.73 (6 H, s), 4.12 (2 H, q, J=7.0 Hz), 5.06 (1 H, d, J= 16.0 Hz), 5.76 (1 H, d, J= 9 Hz), 6.52 (1 H, d, J= 9.0 Hz), 6.61(1 H, d, J= 16.0 Hz).

### 9. 由 3-(4-Methoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester 合成 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester (9)



將 3-(4-methoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester (2.300 g, 11.1 mol) 放入 30 ml 的氯仿中並置於冰浴上，以保持低溫狀態，緩慢滴入 Br<sub>2</sub> (0.569 ml, 11.1 mol)，等 Br<sub>2</sub> 產生的棕色消失後再加下一滴，在室溫下攪拌 1 小時，取反應液點 TLC 片(展開液 乙醚：己烷=1：1)，反應完成後，經由矽膠管柱分離，以乙醚：己烷

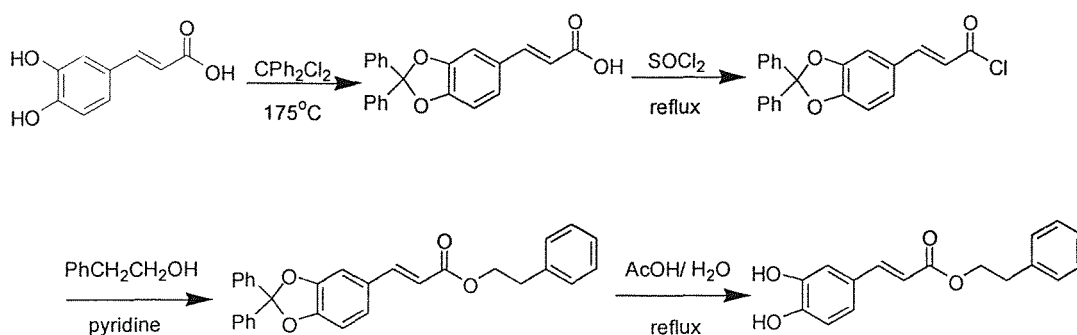
=1:1 的沖提液收集產物，濃縮後得到白色固體 4.04 g，產率 99%。

m.p. 112-113°C

<sup>1</sup>H-NMR 光譜 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 1.32 (3 H, t, J= 7.0 Hz), 3.73 (3 H, s), 4.12 (2 H, q, J=7.0 Hz), 5.06 (1 H, d, J= 16.0 Hz), 5.76 (1 H, d, J= 9 Hz), 6.72 (1 H, d, J= 9.0 Hz), 7.01 (1 H, d, J= 16.0 Hz).

### 10. 由 3,4-dihoxycinnamic acid 合成 3-(2, 2-Diphenylbenzo[1,3]dioxol-5-yl) acrylic acid phenethyl ester



將 caffeic acid (0.500 g, 2.8 mmol)和 dichlorodiphenylmethane (0.54 ml, 2.8 mmol, 1.0 eq)放入 25 ml 的圓瓶內，在油浴中將溫度加熱到 170-180°C 持續攪拌 15 分鐘<sup>71</sup>，冷卻至室溫並溶於二氯甲烷內，經由 3× 30 cm 的矽膠管柱分離，以乙醚：石油醚=1:1 的沖提液收集產物，再經環己烷作再結晶得到白色產物 (0.530 g, 55%)。將純化的酸放入過量的 SOCl<sub>2</sub> (當溶劑用) 加熱至迴流 2 小時，以減壓濃縮機濃縮並移除 SOCl<sub>2</sub>。濃縮後的 acid chloride 在二氯甲烷下緩緩加入 phenethyl alcohol (0.183 ml, 15.4 mmol) 和 pyridine (121 μl, 15.40 mmol) 在室溫下攪拌 2 小時，取反應液點 TLC 片 (展開液乙醚：己烷=2:1)，反應完成後，經由矽膠管柱分離，以乙醚：己烷(2:1)當沖提液收集產物，濃縮後可得白色固體 0.385 g，產率:31%。

mp: 110-112°C

<sup>1</sup>H-NMR 光譜 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 3.00 (2 H, t, J= 7.20 Hz), 4.40 (2 H, t, J= 7.20 Hz), 6.23 (1 H, d, J= 16.0 Hz), 6.86 (1 H, d, J= 8.0 Hz), 6.99 (1 H, dd, J= 8.0, 1.6 Hz), 7.08 (1 H, d, J= 1.6 Hz), 7.23-7.58 (16 H, m).

<sup>13</sup>C NMR 光譜 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 35.3, 64.9, 106.6, 108.6, 115.7, 117.6, 124.3, 126.1, 126.4, 126.6, 128.2, 128.3, 128.8, 129.1, 137.8, 139.6, 144.5, 147.7, 149.0, 166.8.

EIMS m/z (rel. int): 448 [M]<sup>+</sup> (100), 371(52), 267(61).

HRMS: Calc. for C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>: 448.1677. Found: 448.1673.

Anal. Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>: C, 80.34; H, 5.39; O, 14.27. Found: C, 80.09; H, 5.59; O, 14.26.

### 三、活性測定方法

#### 1. 口腔細胞之培養

BF、OSF、TSCCa 三株細胞培養於 DMEM medium，GNM 細胞培養於 RPMI medium。在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。本實驗採用口腔內正常細胞 (BF)、癌前細胞 (OSF)、癌細胞 (GNM、TSCCa) 等四株細胞，細胞株來源：中山醫學院張育超醫師提供。其細胞特性如下：

##### a. 舌癌細胞(Tongue Sq. cell carcinoma)，簡稱 TSCCa

多發生中、老年男性，舌頭側緣。臨床上大多是無痛腫塊或潰瘍，邊緣微隆起，或深入浸潤舌頭深部組織，而固著，使舌部運動困難，吞嚥及飲食不便。舌癌因舌部組織特性，常浸潤較深層組織，且較早發生轉移，預後較差<sup>72</sup>。

細胞生物學特性：活細胞觀察為扁平的多角上皮層細胞，細胞生長情況以第 2 天起細胞數上升迅速，第 6 天細胞數基本不變，第 7 天開始下降。對數增殖期內群體倍增時間為 34 小時。細胞分裂指數：第 4 天細胞分裂象最高，為 82%。細胞貼壁率：2、4、8、24 小時貼壁率分別為 86%、93%、96%、100%。

##### b. 齒齦癌細胞(Neck metastasis of Gingiva carcinoma)，簡稱 GNM 細胞

約 10% 的惡性口腫瘤發生於齒齦，多發生中年男性。開始時為潰瘍或外生性突起於固著性牙齦。侵入顎骨造成齒槽骨破壞，牙齒鬆動。嚴重時造成下顎骨病理性骨折。

生物學特性：活細胞觀察時細胞形態為扁平的多角上皮層細胞，胞

漿透亮，胞質的近中央處有圓形的細胞核，核漿比例大，核仁較多。細胞生長情況在接種後第 1 天細胞數基本不變，第 2 天增長緩慢，以第 3 天起細胞增長迅速，一直維持到第 7 天，以第 8 天起開始下降，對數增殖期內群體倍增時間為 31 小時。其細胞分裂指數：第 4 天細胞分裂高峰期，達到 86%。細胞貼壁率：2 小時為 85%，4 小時為 92%，8 小時為 95%，24 小時為 99%。

### c. 口腔黏膜下纖維化細胞(oral submucosus fibroblast)，簡稱 OSF

口腔任何部位的黏膜(甚至咽喉)發生潛藏的、慢性的纖維化轉變，堆積大量膠原纖維，血管變少並伴有表皮萎縮之病變。患處處於近上皮層呈現發炎反應，伴有結締組織本體層彈力纖維組織改變及上皮萎縮等現象<sup>73</sup>。黏膜因失去彈性而壓迫牙齒，導致慢性潰瘍和繼發性感染<sup>74</sup>。若 OSF 持續惡化，極有可能轉變成口腔癌，所以 OSF 可能為一種癌前病灶<sup>75</sup>，在癌症發展上具有相當高的危險性<sup>76</sup>。

### d. BF(buccal mucosal fibroblast) 人類頰部纖維母細胞

正常的口腔頰部纖維細胞<sup>76,77</sup>

## 2. Microculture tetrazolium assay (MTT)之細胞活性分析

細胞活性分析係根據 Alley 等之方法<sup>64</sup>，其原理為存活的口腔細胞能將 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (tetrazolium salt)經由粒線體中 dehydrogenase 作用代謝還原成 formazan crystal，以 isopropanol 溶解之，於 550 nm 的波長測 OD 值，由 OD 值得大小可知活細胞的多寡，可知藥物對口腔癌細胞及正常細胞之生長抑制效果。

首先觀察細胞生長情形，將細胞稀釋成  $2 \times 10^4$  cells/ml，用 micropipet 取 100  $\mu$ l 置於 96 well 培養皿中，培養 37°C 一天，再加入合成藥物 100  $\mu$ l/well (預先配製在 medium 中)，培養 48 小時後，吸去上清

液（勿觸底層），加入 90  $\mu\text{l}$ /well medium 及 10  $\mu\text{l}$ /well MTT 試液，培養 4 小時後吸去上清液，加入 100  $\mu\text{l}$  DMSO 將每個 well 混合均勻，以 550 nm 波長測吸光值。

$$\text{Relative cell survival (\%)} = (\text{不同濃度對細胞之吸光值} / \text{控制組細胞之吸光值}) \times 100 \%$$

### 3. 自由基捕捉之測定

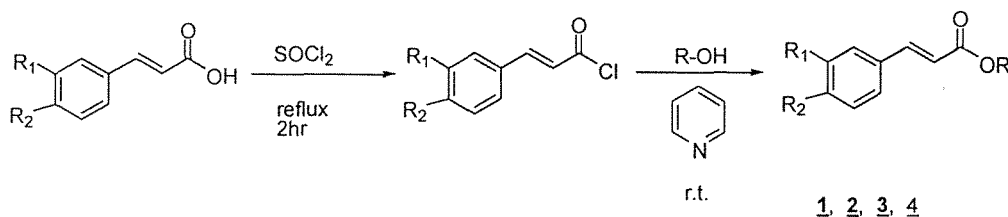
本實驗使用 DPPH（溶於 DMSO，避光）（1,1-diphenyl-1,2-picrylhydrazyl）自由基<sup>79</sup>，因其在結構上可以產生穩定的共振，可在適當的狀態下長時間保存，且其在 571 nm 的波長下有獨特的吸光值，當 DPPH 的濃度降低，其吸光值亦隨之降低。測定係將不同濃度的 CAPE 溶於 DMSO 中以及以 DMSO 為控制組均取 100  $\mu\text{l}$  加入含有 2.87 ml methanol 和 30  $\mu\text{l}$  10 mM DPPH 的 reaction mixture，於室溫中反應 30 mins，再加入 1 ml redistilled water 與 3 ml 的 toluene 充分混合，之後以 3000 rpm 離心 10 mins，取上清液並以 spectrophotometer 於 571 nm 波長下測其吸光值。



# 結果

## 一、合成:

Scheme 1



1 R1=R2=OH, R=PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
2 R1=R2=OMe, R=PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
3 R1=R2=OH, R=Me
4 R1=R2=OH, R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

### 1. 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (CAPE) (1)

caffiec acid 在  $\text{SOCl}_2$  當溶劑的條件下得到 acid chloride，以 nitrobenzene 溶解後加入 phenylethyl alc.反應，可以得到白色產物 1。

### 2. 3-(3,4-Dimethoxyphenyl) acrylic acid phenethyl ester (PEDMC) (2)

取 3,4dimethoxycinnamic acid 在氯仿的溶劑下加入  $\text{SOCl}_2$  得到 acid chloride，將預先處理的 phenylethyl alcohol 和 pyridine 混合液一滴滴加入 acid chloride，此時會形成 pyridine hydrochloride 的沉澱物，經由過濾及通過矽膠管柱得到白色產物 2。

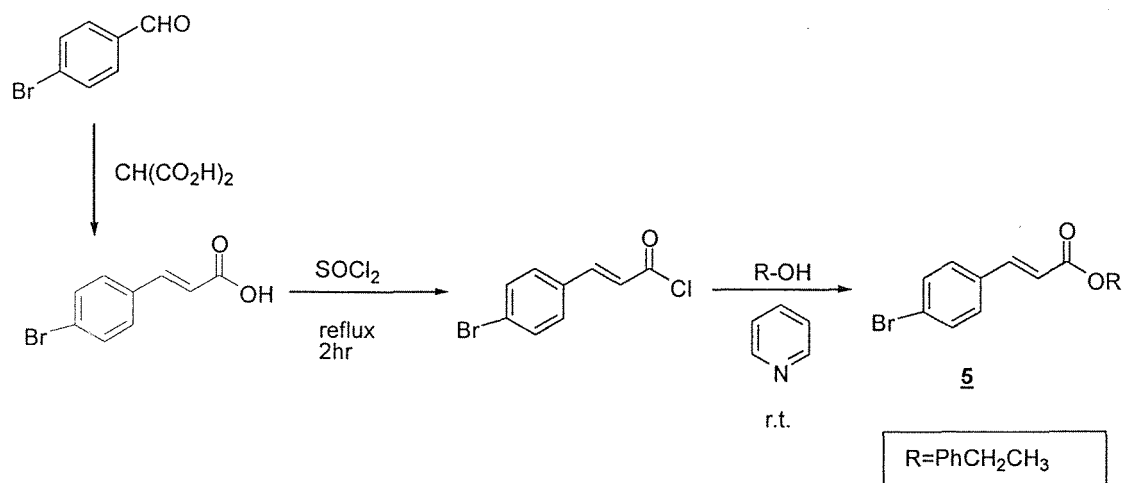
### 3. 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylic acid methyl ester (Methyl Caffeate- MC) (3)

將 caffeic acid 加入過量的甲醇中（當溶劑）並加 5 當量  $\text{SOCl}_2$  的條件下反應，純化得到白色產物 3。

### 1. 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylic acid ethyl ester (Ethyl Caffeate- EC) (4)

依據產生化合物 3 的方法，將 caffeic acid 加入過量的乙醇中（當溶劑）並加入 5 當量  $\text{SOCl}_2$  的條件下反應，得到黃色產物 4。

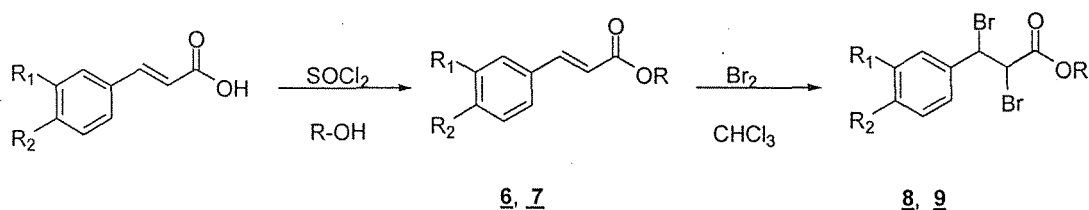
Scheme 2



## 2. 3-(4-Bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester (BrCAPE) (5)

取 4-bromobenzaldehyde 和 malonic acid 在 pyridine 和 piperidine 的作用下得到 4-bromocinnamic acid 的鹽類，經由酸化，萃取得到純的 4-bromocinnamic acid。4-bromocinnamic acid 經  $\text{SOCl}_2$  形成 acid chloride，將預先處理 phenylethyl alcohol 和 pyridine 混合液一滴滴加入 acid chloride，此時會形成 pyridine hydrochloride 的沉澱物，純化後得到白色產物 5。

Scheme 3



1 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OMe, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 2 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OMe, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

3. 從 scheme 3 可以很容易產生化合物 6、7、8、9

將 3,4dimethoxycinnamic acid 和 4-methoxycinnamic acid 分別加入過量的乙醇中（當溶劑）並加入 5 當量  $\text{SOCl}_2$  反應，得到白色產物 **6** 和 **7**。

將 **6** 和 **7** 分別放入過量的氯仿在冰浴的條件下，緩慢加入 1 當量的溴水，升溫到室溫反應 2 小時後，便可得到高產率的白色產物 **8** 和 **9**。

## 二、 CAPE 對於自由基捕捉能力的測試

Table. 2 表示在 *in vitro* 的實驗下 CAPE 的捕捉自由基的能力，CAPE 在 0.02 mM 捕捉自由基的能力為 44.8 %，在 0.2 mM 捕捉自由基的能力為 72.4 %，在 2 mM 捕捉自由基的能力為 93.4%，其捕捉自由基的能力會隨濃度的增加而增加。

## 三、 CAPE, MC 與 PEDMC 之抑制 HIV 複製之作用

(HIV 的實驗部分是由中山醫學院醫技系楊繼江老師於美國 Aaron Diamond AIDS Research Center, Rockefeller University 何大一博士實驗室所測試的部分結果)

### 1. CAPE, MC 與 PEDMC 在 PBMC 細胞之細胞毒性

為測試 CAPE, MC 與 PEDMC 之細胞毒性，於美國 Aaron Diamond AIDS Research Center, Rockefeller University 何大一教授之實驗室進行了部份實驗，首先是針對人類正常之 PBMC，加入 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  及 400  $\mu\text{M}$  等之不同濃度，處理 48 h 後，以 0.25% Trypan blue 測試細胞之存活率，發現 PBMC 在即使高達 400  $\mu\text{M}$  之高濃度 CAPE, MC 或 PEDMC 處理下，存活率仍沒有明顯差異(如 Table 1)。

### 2. CAPE, MC 與 PEDMC 在 PBMC 細胞之抑制 HIV 複製之作用

對人類正常之 PBMC，加入 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  及 400  $\mu\text{M}$  等之不同濃度，並同時感染 M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3) 或 Dual tropic (89.6) 之 HIV-1 isolates 感染後，第二天將加入之化合物於 Washing 後移除

或維持同等濃度，分為兩組於感染後第三天及第七天收集其培養基上之清液，使用 Abbott 公司之 p24 定量 EIA 試劑組，與未加化合物之對照濃度比較(Fig. 1-3，(+)表示於感染完成 Washing 後維持原加入之濃度之化合物。(-)則表示 Washing 後移除了)。結果顯示，除 PEDMC 外其餘兩者對於 HIV 之複製有明顯抑制作用，於濃度 10  $\mu\text{M}$  至 100  $\mu\text{M}$  之間尤其明顯，可看出其變化。

#### 四、口腔細胞活性測定之結果

##### 1. 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester 對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

以不同濃度之 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester (50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$ )處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現 (Fig. 4)，對於 BF cells、GNM cells、TSCCa cells 在最高濃度時的細胞活性仍有 88 %、87 % 和 78 % (Table 3)。對於 OSF cells 在 50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  的細胞活性是 98 %和 80 %，在 200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$  時的細胞活性則降低為 59 %和 51 % (Table 3)。4-dimethoxy- $\alpha$ ， $\beta$ -dibromophenyl-propionate 對於 OSF cells 的抑制作用較其他 3 株細胞明顯。

##### 2. 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester 對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

以不同濃度之 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester (50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$ )處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現(Fig. 5)，對於 GNM cells、

TSCCa cells 在最高濃度時的細胞活性仍有 91 %和 72 % (Table 4)。對 BF cells 在 50  $\mu$ M、100 $\mu$ M、200  $\mu$ M 的濃度時仍有 96 %、85 %和 74 %的細胞活性，400  $\mu$ M 的細胞活性降低到 47 % (Table 4)。對於 OSF cells 在 100  $\mu$ M 的細胞活性是 65 %，200  $\mu$ M、400  $\mu$ M 的細胞活性為 54 %和 38 % (Table 4)。

### 3. 3-(4-methoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester 對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

以不同濃度之 3-(4-methoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester (50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、200  $\mu$ M、400  $\mu$ M)處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現 (Fig. 6)，對於 BF cells、OSF cells 在最高濃度時的細胞活性仍有 80 %和 90 % (Table 5)。對於 GNM cells 和 TSCCa cells 其細胞活性會隨著濃度的增加而依序降低，最高濃度時的細胞活性有 48 %和 50 % (Table 5)。4-dimethoxycinnamic ethyl ester 對於 GNM cells 和 TSCCa cells 的抑制作用較其他 2 株細胞明顯。

### 4. 3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester 對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

以不同濃度之 3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylic acid ethyl ester (50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、200  $\mu$ M、400  $\mu$ M)處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現 (Fig. 7)，對於 BF、OSF、GNM、TSCCa 這 4 株細胞在 50  $\mu$ M、100  $\mu$ M 都有 80 %以上的細胞活性。對於 BF cells 的細胞活性在 200  $\mu$ M 有 92 %，400  $\mu$ M 時為 69 % (Table 6)。對於 OSF cells 的細胞活性 200  $\mu$ M 有 87 %，400  $\mu$ M 時也

降低到 67 % (Table 6)。對於 GNM cells 的細胞活性到最高濃度仍有 73 % (Table 6)。對於 TSCCa cells 的細胞活性在 200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$  分別為 72 %和 58 % (Table 6)。

### 5. 3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester (BrCAPE)對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

以不同濃度之 BrCAPE (50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$ )處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現 (Fig. 8)，BrCAPE 對於 BF cells 和 OSF cells 在最高濃度 400  $\mu\text{M}$  的細胞活性仍有 90 % (Table 7)，對於 TSCCa cells 在最高濃度 400  $\mu\text{M}$  的細胞活性也有 75 % (Table 7)。對於 GNM cells 在 100  $\mu\text{M}$  的細胞活性是 44 %，200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$  的細胞活性分別為 38 %、35 % (Table 7)。可知 BrCAPE 對於 GNM cells 的抑制作用較其他 3 株細胞明顯。

### 6. PEDMC 對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

以不同濃度之 PEDMC (25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ )處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現 (Fig. 9)，PEDMC 對 BF cells 在 200  $\mu\text{M}$  的濃度時仍有 72 %的細胞活性 (Table 8)。對於 OSF、GNM cells 在 100  $\mu\text{M}$  的濃度有 62 %的細胞活性，200  $\mu\text{M}$  的濃度時 OSF cells 的細胞活性有 48 %，GNM cells 的細胞活性只有 28 % (Table 8)。PEDMC 對於 TSCCa cells 的細胞活性分析在 100  $\mu\text{M}$  有 87 %，200  $\mu\text{M}$  的濃度有 66 %的細胞活性 (Table 8)。

### 7. MC 對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

以不同濃度之 MC (25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ )處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現 (Fig. 10)，MC 對於 BF

cells 在最高濃度 200  $\mu\text{M}$  的細胞活性仍有 65 % (Table 9)。在 50  $\mu\text{M}$  時 OSF cells、GNM cells、TSCCa cells 的細胞活性分別為 65 %、51 %、81 %，100  $\mu\text{M}$  時 OSF cells、GNM cells、TSCCa cells 的細胞活性為 49 %、27 %、57 %，在 200  $\mu\text{M}$  時 OSF cells、GNM cells、TSCCa cells 的細胞活性只有 22 %、13 %、17 %。

## 8. EC 對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

以不同濃度之 EC (50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$ ) 處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現 (Fig. 11)，EC 對於 BF cells 在最高濃度 400  $\mu\text{M}$  的細胞活性仍有 88 % (Table 10)，對於 OSF cells 在 100  $\mu\text{M}$  的細胞活性是 42 %，200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$  時的細胞活性只有 17 % 和 11 %。對於 GNM cells 在 100  $\mu\text{M}$  的細胞活性降低至 27 %，200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$  的細胞活性只有 13 %。對於 TSCCa cells 在 100  $\mu\text{M}$  的細胞活性是 46 %，200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$  時的細胞活性只有 17 % 和 16 %。可知 MC 和 EC 對於口腔癌的細胞尤其是 GNM cells 在 100  $\mu\text{M}$  時可抑制到 50 % 以上的細胞活性。

## 9. CAPE 對口腔癌細胞及正常細胞活性之影響

本實驗利用 MTT 方法來測試細胞活性，以不同濃度之 CAPE (25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ ) 處理口腔癌細胞和正常細胞經過 48 小時後發現 (Fig. 12)，CAPE 對正常細胞 (BF cell) 在 25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  的濃度有 80 % 以上的細胞活性，在 200  $\mu\text{M}$  的濃度也有 67 % 的細胞活性 (Table 11)。CAPE 對於癌前細胞 (OSF cell) 和癌細胞 (GNM cell) 在 50  $\mu\text{M}$  的濃度時有 69 % 的細胞活性，在 100  $\mu\text{M}$  的細胞活性降低到 50 % 以下，200  $\mu\text{M}$  的細胞活性只有 15 %。CAPE 對於舌鱗狀上皮癌細胞 (TSCCa cell)



在 50  $\mu\text{M}$  的細胞活性有 79 %，在 100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$  的細胞活性分別為 55 %、18 %。

## 討論

### 1. 合成方法

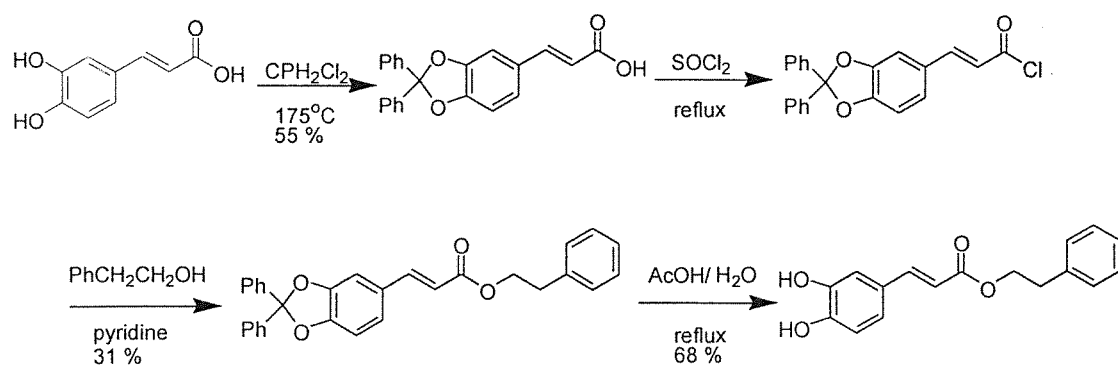
CAPE 除了直接從天然物-蜂膠中萃取，Grunberger et al. 研究利用  $\rho$ -toluenesulfonic acid 當作催化劑，將 caffeic acid 和 phenethyl alcohol 放入 benzene 加熱迴流 4 天得到 40 % 的產率<sup>37</sup>。Rao 等人根據 Grunberger<sup>38</sup> 和 Helferich<sup>80</sup> 提出的方法，以 hexamethylphosphoric triamide (HMPA) 當溶劑、25 % 的 NaOH 當催化劑、用 (2-bromoethyl) benzene 取代 phenethyl alcohol 室溫反應 2 天合成出 CAPE<sup>41</sup>。另外以 dicyclohexyl carbodiimide (DCC) 當作催化劑室溫反應 2 天合成 38 % 的 CAPE<sup>44</sup>。

由於 Puskas 和 Fields<sup>81</sup> 利用 pyridine 和 acryl chloride 的方式將酸和醇類在短時間內高產率進行酯化反應，因此我們設計以 acryl chlorides 和 pyridine-catalyzed esterification 合成蜂膠類的化合物。首先要合成出具反應性的 acid chloride 以及找出適當的鹼性催化劑 (base catalysts)，我們將 cinnamic acid 加入過量的 thionyl chloride 加熱反應得到 acryl chloride，再將混合均勻的 phenethyl alcohol 和 pyridine 混合液加入，可得到 97 % 的產物。反應過程要避水，尤其是 acryl chloride，因為 acryl chloride 一遇水會還原成酸，無法進行下一步反應。其他如 3,4-dimethoxycinnamic acid、4-bromocinnamic acid 依此實驗模式而得到高產率的產物。

但 3,4-dihydroxycinnamic acid 在合成 acryl chloride 首先就遇上溶解度的問題，我們利用 acetone、acetonitrile、methylene chloride、chloroform、benzene、THF、DMF、DMSO 這幾種溶劑在進行 acid chloride 的時候會和 caffeic acid 反應形成未知的產物或是仍為起始物 (acid)。因此完全以  $\text{SOCl}_2$  當溶劑形成 acid chloride，acryl chloride 反應完之後需要適當的 base catalyst，因此選用  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、triethylamine、

pyridine，但發現反應無法成功，可能原因是(1) 溶劑的種類；(2)caffeic acid 的苯環上有 2 個-OH 基。因此採取 2 種方式解決，第一：將-OH 基進行保護，改成溶解度高，易於進行反應(如 scheme 4)，先將 caffeic acid 用 diphenyl-dichloromethane 保護-OH 基，其親脂性增加，溶解度也增加。具有保護基的酸進行酯化反應得到具有保護基的 CAPE，再用 acetic acid 去保護，可得到 CAPE。但此反應步驟繁雜，反應完成產率也無法提升。

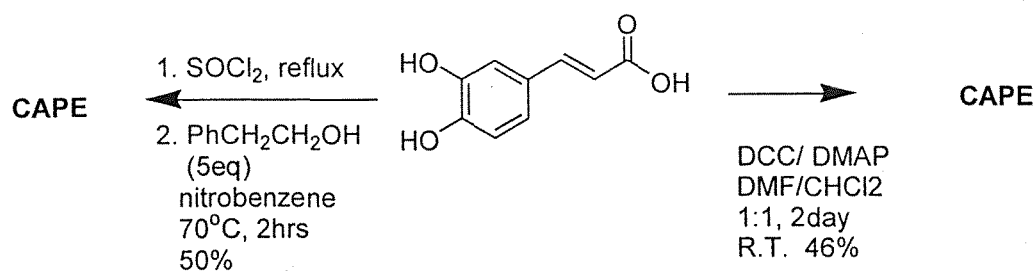
Scheme 4



；第二：測試其他反應方法（如 scheme 5）。(a) 採用 DCC/DMAP 酯化反應，反應時間需要 2 天，產率是 46%。(b) 選擇 nitrobenzene 當酯化反應的溶劑，將 acid chloride 和 5 當量的 phenethyl alcohol 在 nitrobenzene 的溶劑下加熱至 70°C 反應 2 小時，可得到產率 50%。明顯提高產率及縮短反應時間。

其他化合物如 ethyl caffeate，Sugiura 等人將 caffeic acid 加入乙醇和氣態的鹽酸加熱至 90-100°C 反應，產率 43%。在我們的實驗模式利用 SOCl<sub>2</sub> 反應可以得到 98% 的產率。其他的化合物也都有 85% 以上的產率。

## Scheme 5



## 2. CAPE 捕捉自由基的能力

氧是細胞生存不可或缺的物質，但是細胞在發生不正常代謝時，反而會造成細胞死亡，而許多毒性物質(toxic agents)在進入細胞中可能會造成過量的活性氧系(reactive oxygen species; ROS)的產生，若 ROS 的產生量超過細胞本身抗氧化能力(cellular antioxidant capacity)時，可能會導致細胞脂質過氧化，以及蛋白質、RNA、DNA 的損傷或突變，進一步造成癌化。CAPE 在 *in vitro* 的實驗(DPPH)中，對自由基的捕捉能力很強，推測 CAPE 為強抗氧化劑，有助於減少癌化的可能。

## 3. 抗 HIV-1 的活性

以 0.25% Trypan blue 測試細胞之存活率，發覺 PBMC 在即使高達 400uM 之高濃度 CAPE, MC 或 PEDMC 處理下，存活率仍沒有明顯差異，顯示對 PBMC 並無明顯細胞毒性。CAPE 和 MC 對於 HIV 之複製有明顯抑制作用，於濃度 10  $\mu\text{M}$  至 100  $\mu\text{M}$  之間尤其明顯，而且此作用並不因不同 isolate 的 HIV (M-tropic, T-tropic 或 Dual tropic) 而有所差異，顯示其抑制作用的發生，似乎並不是在 attachment 步驟，而是在後續 Penetration 之後發生。這初步結果顯示 CAPE 類的化合物可能有抑制 HIV 複製之作用。因此值得在後續部份針對其衍化物進行類似測試。

#### 4. 口腔癌細胞的生物活性

對於口腔癌部分，CAPE 和 EC 在 100  $\mu\text{M}$  能抑制約 50 % OSF cells、GNM cells、TSCCa cells 的生長，到 200  $\mu\text{M}$  時會使這些癌前細胞或癌細胞的生長降低到 20% 以下，對正常細胞無抑制生長的作用。Rao 等人研究證實 CAPE、MC、PEDMC 明顯抑制 human colon HT-29 cell line 的生長及 DNA 的合成，具有抗增生(antiproliferation)及抗腫瘤(antitumorigenic)的特性。在本實驗中我們也證實 CAPE 及 EC 具有抗腫瘤生長的特性，而 PEDMC 對於口腔正常或癌前、癌細胞並無抑制生長的作用，MC 在高濃度時會降低正常 BF cell 的活性，但對於癌前及癌細胞有抑制生長的作用。Grunberger 等人也證實 CAPE 對於 Fischer rat embryo fibroblast (CREF)、human breast carcinoma (MCF-7) 及 melanoma (SK-MEL-28 和 SK-MEL-170) 這些細胞有明顯抑制生長的作用。因此 CAPE、MC、EC 初步對於口腔癌有細胞毒性，但仍需要再進一步探討及研究。

Katz 等人研究將 3-bromoacetylamino benzoylurea (3-BAABU) 之 chloride 取代為 bromine (3-CAABU)，對正常細胞不具 mitotic blocking activity 而且對癌細胞  $\text{ID}_{50}$  之活性是 3-BAABU 的 40 倍<sup>82</sup>，可能是 bromine 的官能基所致，在本實驗中含溴的化合物除了 BrCAPE 只對 GNM 癌細胞有明顯抑制生長的作用，其他含溴的官能基之化合物對口腔細胞的細胞毒性並不明顯。

## 結 論

CAPE 是蜂膠的成份之一，若直接由天然物萃取步驟繁雜且產率不高，因此天然物合成將可以縮短反應時間及增加反應產率。本實驗以合成 acryl chloride 的中間產物後進行酯化反應的模式縮短反應時間及增加反應產率，在合成蜂膠類的化合物時另外也合成出結構相似的化合物。

口腔癌的治療方法有外科手術切除、放射線療法及制癌劑化學療法三種，主要為手術切除及放射線療法，化學療法為輔助性治療。本實驗結果顯示在口腔癌方面，以 CAPE、MC 和 EC 對 OSF(癌前細胞)、GNM (齒齦癌細胞) 和 TSCCa(舌癌細胞) 有明顯細胞毒性，其毒性隨濃度增加而增加，但 MC 對於正常 BF 細胞有少許細胞毒性；含 Br-基的化合物，除 BrCAPE 對 GNM (齒齦癌細胞) 有明顯細胞毒性外，2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester 和 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)-propionic acid ethyl ester 並無法有效抑制癌細胞生長，故可推知化合物的結構具有兩個芳香環或中間有脂類連接和含有羥基，在治療口腔癌部分有明顯效果，因此可深入探討作用機制，預期成為一治療口腔癌的新藥。

現今全世界流行有「現代黑死病」之稱的愛滋病(acquired immunodeficiency syndrome; AIDS)則更受到高度的注意及研究。HIV 病毒感染的機制是利用其單股核糖核酸 (ssRNA) 被反轉錄酶 (reverse transcribed) 轉錄成為雙股去氧核糖核酸 (dsDNA) 基因之後，病毒的嵌合酶(integrase) 再將病毒基因嵌合進入寄主細胞的基因庫 (genome) 中。嵌合酶的存在對於HIV的複製是必需的<sup>11,12</sup>，目前已可利用 in vitro assay 來測試各種抑制物抑制 3'-processing 及 strand transfer之效果。

在治療愛滋病方面，病患因免疫系統失調後所引起的各種發炎感染，這種機會感染(opportunistic infections)是造成愛滋病人最後死亡的

主因。而針對以反轉錄酶及蛋白酶為主的其他抑制性藥物，由於仍有少數病毒存有抗藥性之問題，因此開發新藥極為迫切。為了加強這些治療策略，針對其他病毒酵素的抑制物就具有發展的潛力。

首先證實 CAPE 和 MC 對 HIV 之複製有明顯抑制作用，於濃度 10uM 至 100 uM 之間尤其明顯，可看出其變化，而且此作用並不因不同 isolate 的 HIV (M-tropic, T-tropic 或 Dual tropic) 而有所差異，顯示其抑制作用的發生，似乎並不是在 attachment 步驟，而是在後續 Penetration 之後發生。這初步結果顯示 CAPE 類的化合物可能有抑制 HIV 複製之作用。因此值得在後續部份針對其衍化物進行類似測試。

因此，未來的研究方向將以 CAPE 類的結構設計為基礎，合成不同官能基的相關類似物以及改進多種繁瑣的合成步驟，配合生物活性試驗，加以研發藥物的功效，期能增加藥物活性，降低對正常細胞的細胞毒性。並針對動物實驗及多種 *in vivo* 試驗藥物的活性，為臨床應用的良好發展基礎。

## 參考文獻

1. Rous, P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cell. *J. Exp.*, **13**: 397-411, 1911.
2. Burkitt, D., O'Connor, G. Malignant lymphoma in African children. I. Clinical syndrome. *Cancer*, **14**: 258-269, 1961.
3. Epstein, M., Achong, B., Barr, Y. Virus particle in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet.*, **1**: 702-702, 1964.
4. Gallo, R., Kalyanaraman, V., Sarngadharan, M. Association of the human type C retrovirus with a subset of adult T-cell cancer. *Cancer Res.*, **43**: 3892-4899, 1983.
5. Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M. Adult T-cell leukemia antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6476-6480, 1982.
6. Bishop, J. The molecular genetics of cancer. *Leukemia*, **2**: 199-208, 1988.
7. Beasley, R. Hepatitis B virus-the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **61**: 1942-1956, 1988.
8. London, T., Blumberg, B. A cellular model for the role of hepatitis B virus in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2**: 10-14, 1982.
9. Zur, H. Papillomavirus in human cancer. *Cancer*, **59**: 1692-1696, 1987.
10. Lasky, L., Groopman, J., Fennine, C. Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science*, **33**: 209-212, 1986.
11. Kensler, T. W., and Taffe, B. G. Free radicals in tumor promotion. *Adv. Free Radical Biol. Med.*, **2**: 347-387, 1986.
12. Harris, M., Patenaude, P., Cooperberg, P., Fillipenko, D., Thorne, A., Raboud, J., Rae, S., Dailey, P., Chernoff, D., Todd, J., Conway, B., Julio, S., Montaner, G., and the INCAS Study Group. Correlation of virus load in plasma and lymph node tissue in human immunodeficiency virus infection. *J. I. D.*, **176**: 1388-1392, 1997.
13. Mitsuya, H., Border, S.: Strategies for antiviral therapy in AIDS. *Nature*, **325**: 773-778, 1987.



14. Yarchoan, R., Broder, S. Anti-retroviral therapy of AIDS and related disorders: General principles and specific development of dideoxynucleosides. *Pharmaco. Ther.*, **40**: 329-348, 1989.
15. Roxenbaum, W., Dormnt, D. Antimonitunsstate (HPA 23) treatment of three patient with AIDS and one with prodrome. *Lancet i.*, 450-451, 1985.
16. Mitsuya, H., Popvic, M. Suramin protection of T cell in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. *Science*, **266**: 172-174, 1984.
17. Richman, D., Fischl, M. The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patient with AIDS and AIDS-related complex. *N. Eng. J. Med.*, **317**: 192-197, 1987.
18. Mitsuya, D., Jarrett, R. Long-term ingibition of human T-lymphotropic virus type III/ lymphadenopathy-associated virus (human immunodeficiency virus) DNA synthesis and RNA expression in T cells protected by 2', 3'-dideoxynucleosides in vitro. *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA.*, **84**: 2033-2037, 1987.
19. Lader, B., Darby, G. HIV wuth reduced senitivity to Zidovudine (AZT) isolated during prolong therapy. *Science*, **231**: 1731-1734, 1989.
20. 蔡崇弘, 邱清華: 臺灣地區口腔癌發生率研究. *中華牙誌* **9**: 104-115, 1990.
21. Chen CH: An epidemiological study of oral squamous cell carcinoma in southern Taiwan. *J. Formosan Dent. Assoc.*, **10**: 268-274, 1987.
22. Kwan HW: A statistical study on oral carcinomas in Taiwan with emphasis on the relationship with betel nut chewing: A preliminary report. *J. Formosan Med. Assoc.*, **75**: 497-505, 1976.
23. 關學婉, 蕭裕源: 台灣口腔癌之流行病學研究. *科學發展月刊*. **4**: 25-29, 1979.
24. 黃穰基, 張哲壽, 周明哲, 藍中孚: 國人頰部口腔癌與嚼檳榔關係. *中華民國口腔顎面外科學會雜誌*. **3**: 23, 1991.
25. 黃湧澧, 林立民, 葛應欽: 檳榔塊與口腔癌. *公共衛生雜誌*. **19**: 371-383, 1993.
26. Cancer registry annual report in Taiwan area, 1982-1986.

- 27.賴德榮, 陳鴻榮: 細胞學在口腔癌之診斷價值..高雄醫學科學雜誌. 2: 122-130, 1986.
- 28.邱顯斌, 謝地: 用甲苯氨藍染口腔的病變. 中華民國耳鼻喉科醫學會雜誌. 20: 168-173, 1985.
- 29.Liu, B.U., Chiang, C. P., Yao, Y. T. How SW: Histological observation on oral cancer lesions after adjuvant chemotherapy. *J. Formosan Med. Assoc.*, 87: 164-171, 1988.
- 30.謝地: 頭頸部癌之 Bleomycin 治療效果臨床及病理組織學研究. 中華民國耳鼻喉科醫學會雜誌. 5: 87-107, 1970.
- 31.林宗洲: 頭頸部癌症之全身性合用化學藥物治療法. 中華民國耳鼻喉科醫學會雜誌. 11: 29-33, 1976.
- 32.Jeddar, A., Khasany, A., Ramsaroop, V. G., Bhamjei, A., Haffejce, I. E., and Moosa, A. The antibacterial action of honey: an *in vitro* study. *S. Afr. Med. J.*, 67: 257-258, 1985.
- 33.Hladon, B., Bylka, W., Wojtaszek, M. E., Skyzypczale, L., Szafarele, P., Chodera, A., and Kowalewski, Z. *In vitro* studies on the cytostatic activity of propolis extracts. *Arzneim.-Forsh. Drug Res.*, 30: 1847-1848, 1980.
- 34.Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S. L., Lao, A., Fujimoto, Y., and Tarsuno, T. Caffeic acid is selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 792: 92-97, 1984.
- 35.Gribel, N. V., and Pashinskii, V. G. Antitumor properties of honey. *Vopr. Onkol.*, 36: 704-709, 1990.
- 36.Greenaway, W., Scaysbrook, T., and Whatley, F. R.. The analysis of bud exudate of *Populus×euramericana* and of propolis by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc. R. Soc. Lnd. B. Biol. Sci.*, 232: 249-272, 1987.
- 37.Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E., Efors, L, Caldwell, M., Estevez, V., and Nakanishi, K. Perferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 44: 230-232, 1988.
- 38.Wattenberg, L. W., Coccia, J. B., and Lans, L. K. Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. *Cancer*

- Res.*, **40**: 2820-2823, 1980.
39. Su, Z-z., Grunberger, D., and Fisher, P. Suppression of adenovirus type 5 E1A-mediated transformation and expression of the transformed phenotype by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Mol. Carcinog.*, **4**: 231-242, 1991.
40. Guarini, L., Su, Z-z., Zucker, S., Lin, J., Grunberger, D., and Fisher, P. Growth inhibition and modulation of antigenic phenotype in human melanoma and glioblastoma multiforme cells by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Cell. Mol. Biol.*, **38**: 513-527, 1992.
41. Rao, C., Desai, D., Kaul, B., Amin, S., and Reddy, R. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem. Biol. Interact.*, **84**: 277-290, 1992.
42. Rao, C. V., Desai, D., Simi, B., Kulkarni, N., Amin, S., and Reddy, B. S. Inhibitory effects of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.*, **53**: 4182-4188, 1993.
43. Frankel, K., Wei, H., Bhimani, R., Zadunaisky, J. A., Ferraro, T., Huang, M. T., Conney, A. H., and Grunberger, D. inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res.*, **53**: 1255-1261, 1993.
44. Chen, J. H., Shao, Y., Huang, M. T., Chin, C. K., and Ho, C. T. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett.*, **108**: 211-214, 1996.
45. Sud'ina, G., Mirzoeva, O., Puskareva, M., Korshunova, G., Sumbatyan, N., and Varfolomeev, S. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.*, **329**: 21-24, 1993.
46. Chiao, C., Carothers, A., Gruberger, D., Solomon, G., Preston, G., and Barrett, J. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res.*, **55**: 3576-3583, 1995.
47. Natarajan, K., Singh, S., Burke, T., Grunberger, D., and Aggarwal, B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor, NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, **93**: 9090-9095, 1996.
48. Zheng, Z. S., Xue, G. Z., Grunberger, D., and Prystowsky, J. H. Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation of human keratinocytes and interferes with the EGF regulation of ornithine decarboxylase. *Oncology Res.*, **7(9)**: 445-452, 1995.
49. Courtois, S. J., Segaert, S., Degreef, H., Bouillon, R., and Garmyn, M. Ultraviolet B suppresses vitamin D receptor gene expression in keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **246(1)**: 64-69, 1998.
50. Fesen, M. R., Kohn, K. W., Leteurtre, F., and Pommier, Y. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 2399-2403, 1993.
51. Fesen, M. R., Pommier, Y., Leteurtre, F., Hiroguchi, S., Yung, J., and Kohn, K. W. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem. Pharm.*, **48(3)**: 595-608, 1994.
52. Burke, T. R., Fesen, M. R., Mazumder, A., Wang, J., Carothers, A. M., Grunberger, D., Driscoll, J., Kohn, K., and Pommier, Y. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J. Med. Chem.*, **38(21)**: 4171-4178, 1995.
53. Mazumder, A., Wang, S., Neamati, N., Nicklaus, M., Sunder, S., Chen, J., Milne, G. W., Rice, W. G., Burke, T. R., and Pommier, Y. Antiretroviral agents as inhibitors of both human immunodeficiency virus type 1 integrase and protease. *J. Med. Chem.*, **39(13)**: 2472-2481, 1996.
54. Nicklaus, M. C., Neamati, N., Hong, H., Mazumder, A., Sunder, S., Chen, J., Milne, G. W., and Pommier, Y. HIV-1 integrase pharmacophore: discovery of inhibitors through three-dimensional database searching. *J. Med. Chem.*, **40(6)**: 920-929, 1997.
55. Bohm, K. The flavonoids. Editio Cantor, Aulendar Wurt. 1968.
56. Gabor, M. The anti-inflammatory action of flavonoids. Budapest: Akadcmiai Kiado. 1972.
57. Gabor, M. Anti-inflammatory substances of plant origin. In Vane JR, Ferreira SH(eds): "Handbook of experimental pharmacology: Anti-inflammatory drugs." New York: Springer Verlag 1979, 698-739.

58. Middieton, E., Drzewiccki, G. Effects of flavonoids and transtional metal cations on antigen induced histamine release from human basophils. *Biochem Pharmaco*, **31**: 1449-1453, 1982.
59. Pamukcu, A., Yalciner, S., Hatcher, J., Bryan, G. Quercetin, a rat intestinal bladder carcinogen present in bracken fern. *Cancer Res.*, **40**: 3468-3472, 1980.
60. Hardigree, A., Epler, J. Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial system. *Mutation Res.*, **58**: 231-239, 1978.
61. Macgregor, J., Jurd, L. Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requiremets for mutagenic activity in Salmonella typhimurium. *Mutation Res.*, **54**: 297-309, 1978.
62. Puszta, R., Beladi, I., Bakai, M., Musi, I., Kukan, E. Study on the effect of flavooids and related substances. I. The effect of quercetin on different viruses. *Acta. Microbiologica. Academiae Scientiarum Hungaricac.* **13**: 113-118, 1968.
63. Zhao, H., Neamati, N., Mazumder, A., Sunder, S., Pommier, Y., Burke, T. R. Jr. *J. Med. Chem.* **40**: 1186, 1997.
64. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., and Boyd, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, **48(3)**: 589-601, 1988.
65. Berger, M. L., and Sozeri, T. Rapid halogenated hycrocarbon toxicity in isolated hepatocytes is mediated by direct solvent effect. *Toxicology*, **45**: 319-330, 1987.
66. Kamchonwongpaisan, S., Paitayatat, S., Thebtaranonth, Y., Wilairat, P., and Yuthavong, Y. Mechanism-based development of new antimalarials: synthesis of derivatives of artemisinin attached to iron chelators. *J. Med. Chem.*, **38**: 2311-2316, 1995.
67. Tanaka, K., Matsuo, K., Nakanishi, A., Hatano, T., Izeki, H., Ishida, Y., and Mori, W. Synthesis and anti-inflammatory and aalgescic activities of hydroxamic acids and acid hydrazides, *Chem. Pharm. Bull.*, **31(8)**: 2810-2819, 1983.
68. Tschesche, R., Diederich, A., and Jha, H. C., Caffeic acid 4-

- Rutirioside from *Leonurus Cardiaca*. *Phytochemistry*, **19**: 2783, 1980.
69. Glover, S. A., Rowbottom, A., Scott, A. P., and Schoonraad, J. L. Alkoxynitrenium ion cyclisations: evidence for different mechanisms in the formation of benzoxazines and benzoxazepines. *Tetrahedron*, **46**: 7247-7262, 1990.
70. Sekiya, T., Hiranuma, H., Hata, S., Mizogami, S., Hanazuka, M., and Yamada, S. I. Pyrimidine derivatives. 4. Synthesis and antihypertensive activity of 4-amino-2-(4-cinnamoylpiperazino)-6, 7-dimethoxyquinazoline derivatives. *J. Med. Chem.*, **26**: 411-416, 1983.
71. Fukuoka, M. Chemical and toxicological studies on Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. VI. Isolation of 5-O-Caffeoylshikimic acid as an antithiamine factor. *Chem. Pharm. Bull.*, **30(9)**: 3219-3224, 1982.
72. 莊壽洺: 舌癌之病理學研究. 台灣醫學會雜誌. 80: 479-492, 1981.
73. Pindborg, J. J., and Sirsat, S. M. Oral submucous fibrosis. *Oral Surg.*, **2**: 764, 1966.
74. Pillai, R., Balaram, P. and Reddiar, K. S. Pathogenesis of oral submucous fibrosis. *Cancer*, **69 (8)**: 2011-2020, 1992.
75. Pindborg, J. J. Oral cancer and precancer. Bristol: John Wright. 107-113, 1980.
76. Meghij, S., Scutt, A., Harvey, W., Canniff, J. P. An in vitro comparison of human fibroblasts from normal and oral submucous fibrosis tissue. *Archs. Oral Biol.*, **32**: 213-215, 1987.
77. Meghji, S., Scutt, A., Harvey, W., Canniff, J. P. An in vitro comparison of human fibroblasts from normal and oral submucous fibrosis tissue. *Archs. Oral Biol.*, **32**: 213-215, 1987.
78. Schneider, E. L., Mitsui, Y. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**: 3584-3588, 1976.
79. Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., and Pifferi, G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biol. Med.*, **16**: 547-553, 1994.
80. Helferich, B., and Vorsatz, J. Esters of caffeic acid, *J. Prakt. Chem.*,

142: 191-192, 1935.

81. Puskas, I., Fields, E. K. 4-Esters of trimellitic anhydride. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.*, **9**: 403-407, 1970.
82. Jiang JD; Wang Y; Roboz J; Strauchen J; Holland JF; Bekesi JG. Inhibition of microtubule assembly in tumor cells by 3-bromoacetylamino benzoylurea, a new cancericidal compound. *Cancer Res* **58**: 2126-2133, 1998.

Table 1. Cytotoxicity of CAPE, MC, and PEDMC on PBMC

**Cytotoxicity of CAPE, MC, and PEDMC on  
PBMC**

(Number of died cells in 400 cells' count, control = 9 cells)

Conc.( $\mu$ M)	CAPE	MC	PEDMC
400	8	7	6
200	7	8	7
100	11	7	10
50	12	11	10
25	5	11	8
10	10	7	9
5	10	9	11
1	7	12	7
0.5	9	7	10
0.1	11	9	11



Table 2. Quenching effect of CAPE on DPPH

Treatment	Absorbance	% of DPPH bleaching <sup>a, *</sup>
Control (DMSO)	1.51±0.02	0.0
0.02 mM CAPE	0.83±0.02	44.8
0.2 mM CAPE	0.42±0.02	72.4
2 mM CAPE	0.10±0.02	93.4

a. % of DPPH bleaching = [ ( absorbance of DMSO control - absorbance of CAPE test sample ) × 100 ] / absorbance of DMSO control. \* p < 0.05, compared with control.

Table 3. Cytotoxicity of 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)propionic acid ethyl ester in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay.

cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.737±0.006	100	1.428±0.027	100	0.436±0.011	100	0.525±0.007	100
50 μM	0.757±0.045	102	1.449±0.019	101	0.429±0.019	98.3	0.514±0.020	97.9
100 μM	0.685±0.012	92.9	1.389±0.027	97.2	0.350±0.023	80.2	0.519±0.035	98.8
200 μM	0.642±0.016	87.2	1.343±0.017	94.1	0.260±0.021	59.6	0.416±0.029	79.2
400 μM	0.655±0.036	88.9	1.310±0.019	91.8	0.223±0.019	51.1	0.384±0.028	72.3

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.

Table 4. Cytotoxicity of 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propionic acid ethyl ester in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay

cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.163±0.011	100	1.428±0.027	100	0.436±0.011	100	0.525±0.007	100
50 μM	0.158±0.006	96.9	1.449±0.019	101	0.414±0.028	94.9	0.514±0.020	97.9
100 μM	0.140±0.012	85.8	1.389±0.027	97.2	0.285±0.012	65.3	0.519±0.035	98.8
200 μM	0.121±0.002	74.2	1.343±0.017	94.1	0.239±0.027	54.8	0.416±0.029	79.2
400 μM	0.077±0.003	47.2	1.310±0.019	91.8	0.168±0.022	38.5	0.384±0.028	72.3

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.

Table 5 Cytotoxicity of 3-(4-methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay

Cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.889±0.022	100	0.832±0.004	100	0.203±0.006	100	0.736±0.027	100
50 μM	0.890±0.015	100	0.741±0.008	89.0	0.218±0.010	107	0.603±0.027	81.9
100 μM	0.787±0.015	88.5	0.705±0.006	84.7	0.174±0.004	85.7	0.554±0.023	75.2
200 μM	0.783±0.019	88.0	0.633±0.024	76.0	0.185±0.011	91.1	0.509±0.004	69.1
400 μM	0.720±0.023	80.9	0.407±0.027	48.9	0.183±0.015	90.1	0.372±0.024	50.5

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.

Table 6 Cytotoxicity of 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester in BF · GNM · OSF · TSCCa cells evaluated by MTT assay

cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.889±0.022	100	0.832±0.004	100	0.590±0.006	100	0.736±0.027	100
50 μM	0.892±0.013	100	0.745±0.010	89.5	0.575±0.030	97.4	0.720±0.015	97.8
100 μM	0.831±0.009	93.4	0.742±0.008	89.1	0.475±0.132	80.5	0.638±0.014	86.6
200 μM	0.820±0.009	92.2	0.693±0.045	83.2	0.519±0.081	87.9	0.531±0.020	72.1
400 μM	0.622±0.009	69.9	0.612±0.035	73.5	0.398±0.031	67.4	0.429±0.017	58.2

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.

Table 7 Cytotoxicity of 3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester (**BrCAPE**) in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay

Cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.889±0.022	100	0.832±0.004	100	0.588±0.011	100	0.596±0.008	100
50 μM	0.809±0.007	91.0	0.556±0.043	66.8	0.658±0.041	111	0.567±0.007	95.1
100 μM	0.805±0.003	90.5	0.372±0.035	44.7	0.624±0.018	106	0.474±0.017	79.5
200 μM	0.805±0.001	90.5	0.318±0.014	38.2	0.631±0.009	107	0.451±0.018	75.6
400 μM	0.802±0.001	90.2	0.294±0.011	35.3	0.587±0.014	99.8	0.455±0.020	76.3

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.

Table 8 Cytotoxicity of 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (**PEDMC**) in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay

cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.224±0.022	100	0.430±0.021	100	0.588±0.011	100	0.525±0.007	100
25 μM	0.239±0.002	106	0.376±0.009	87.4	0.521±0.003	88.6	0.480±0.013	91.4
50 μM	0.196±0.004	87.5	0.363±0.013	84.4	0.431±0.010	73.2	0.455±0.045	86.6
100 μM	0.196±0.016	87.5	0.269±0.009	62.5	0.383±0.013	65.1	0.461±0.042	87.8
200 μM	0.163±0.017	72.7	0.122±0.007	28.3	0.286±0.031	48.6	0.349±0.026	66.4

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.

Table 9 Cytotoxicity of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic methyl ester (MC) in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay

cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.163±0.011	100	0.430±0.021	100	0.588±0.011	100	0.424±0.030	100
25 μM	0.154±0.005	94.4	0.356±0.019	82.7	0.435±0.035	73.9	0.445±0.011	104
50 μM	0.138±0.012	84.6	0.223±0.016	51.8	0.386±0.011	65.6	0.347±0.022	81.8
100 μM	0.117±0.011	71.7	0.117±0.004	27.2	0.291±0.013	49.4	0.242±0.015	57.0
200 μM	0.106±0.007	65.0	0.058±0.001	13.4	0.131±0.012	22.2	0.073±0.005	17.2

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.



Table 10 Cytotoxicity of 3-(3,4-dihydroxyphenyl) acrylic acid ethyl ester (EC) in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay

cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.163±0.011	100	0.430±0.021	100	0.588±0.011	100	0.424±0.030	100
50 μM	0.164±0.008	100	0.258±0.019	60.0	0.310±0.048	52.7	0.390±0.011	91.9
100 μM	0.167±0.012	102	0.118±0.020	27.4	0.252±0.010	42.8	0.197±0.010	46.4
200 μM	0.165±0.007	101	0.060±0.004	27.4	0.103±0.010	17.5	0.076±0.002	17.9
400 μM	0.145±0.013	88.9	0.060±0.005	13.9	0.069±0.003	11.7	0.070±0.003	16.5

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.

Table 11 Cytotoxicity of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (CAPE) in BF、GNM、OSF、TSCCa cells evaluated by MTT assay

cell Conc.	BF		GNM		OSF		TSCCa	
	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %	Absorbance	Survival %
control	0.889±0.022	100	0.415±0.007	100	0.588±0.011	100	0.424±0.030	100
25 μM	0.794±0.017	89.3	0.294±0.009	70.8	0.397±0.031	67.5	0.393±0.012	92.6
50 μM	0.758±0.017	85.2	0.289±0.016	69.6	0.384±0.015	65.3	0.339±0.010	79.9
100 μM	0.732±0.011	82.3	0.184±0.010	44.3	0.211±0.014	35.8	0.234±0.030	55.1
200 μM	0.604±0.010	67.9	0.069±0.005	16.6	0.082±0.001	13.9	0.077±0.004	18.1

Survival % = (The absorbance of treatment of sample) / (the absorbance of DMSO control) × 100.

CAPE

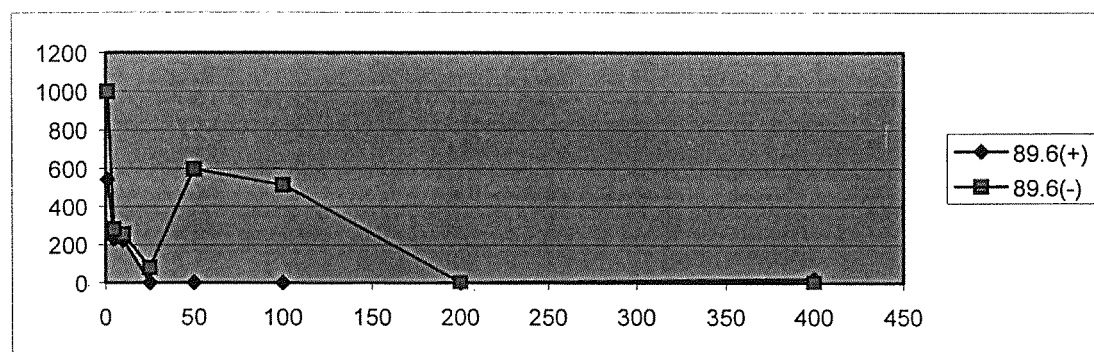
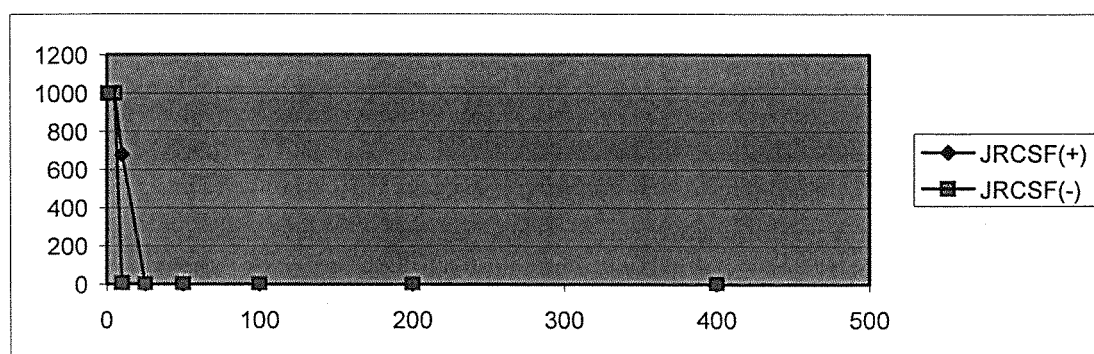
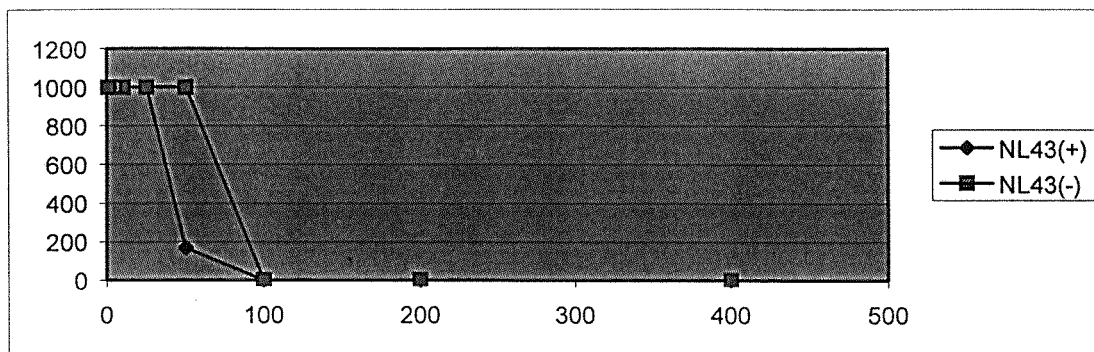


Fig 1. CAPE 在 PBMC 感染 M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3) 或 Dual tropic (89.6) 之 HIV-1 isolates 的作用

PEDMC

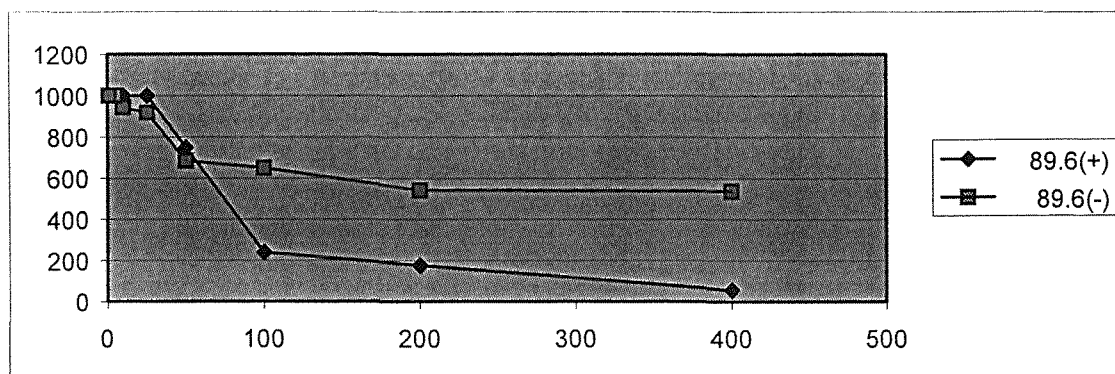
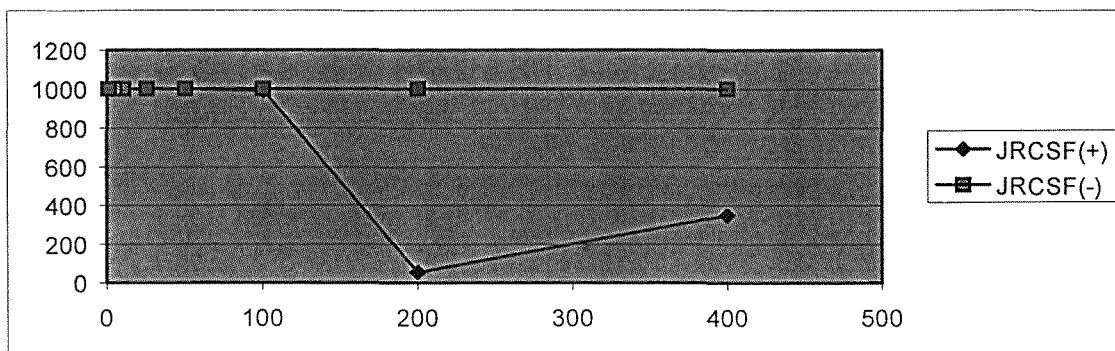
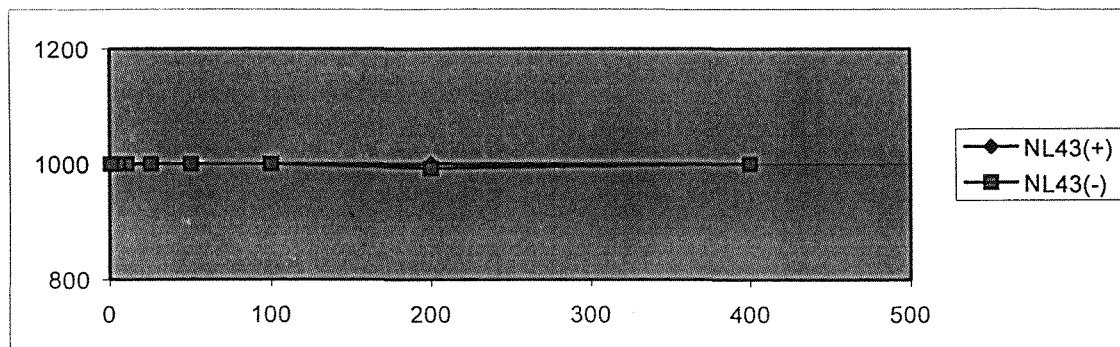


Fig 2. PEDMC 在 PBMC 感染 M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3) 或 Dual tropic (89.6) 之 HIV-1 isolates 的作用

MC

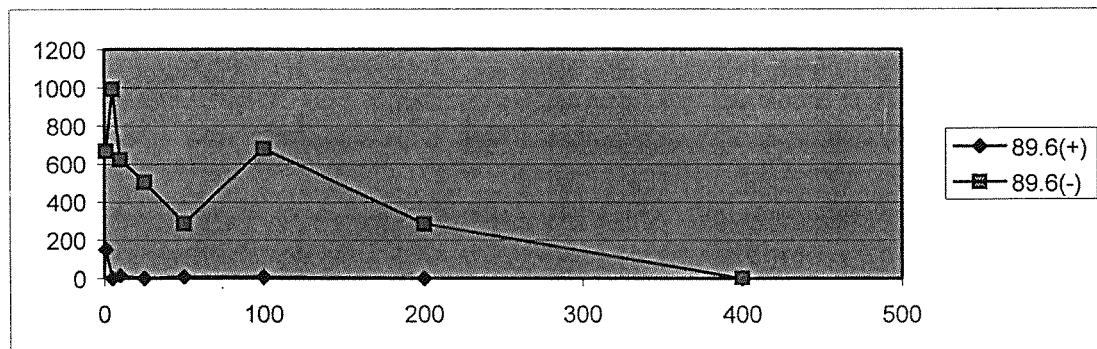
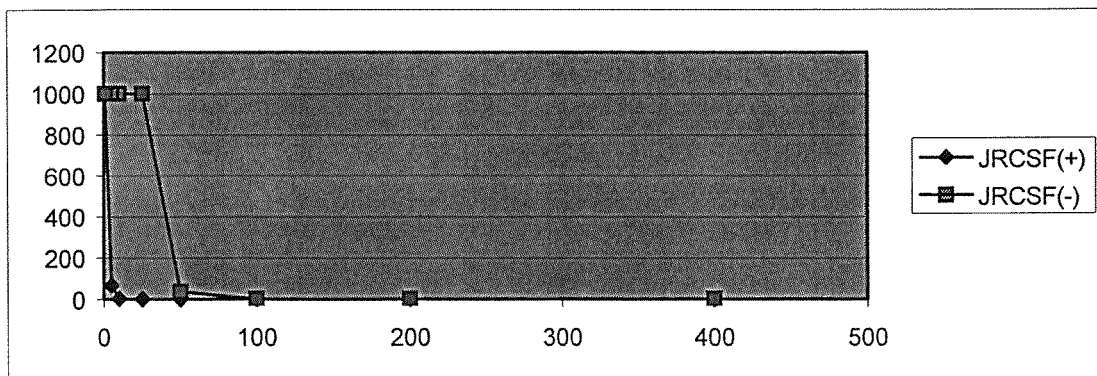
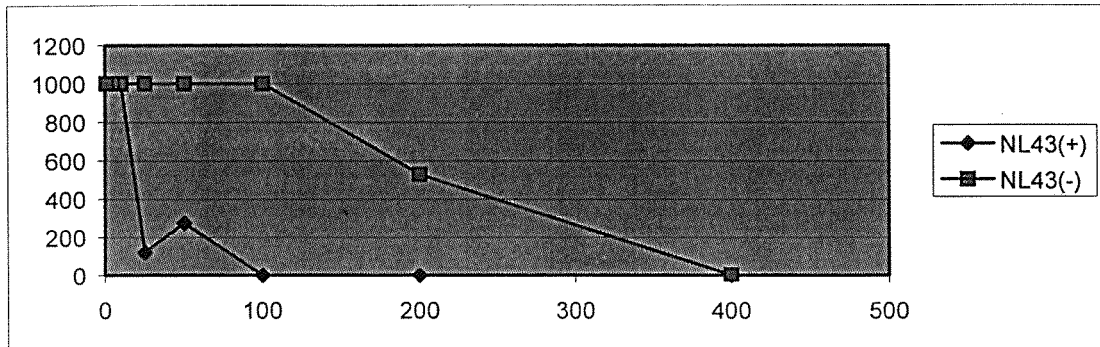


Fig 3. MC 在 PBMC 感染 M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-4-3) 或 Dual tropic (89.6) 之 HIV-1 isolates 的作用

2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl)propionic acid ethyl ester

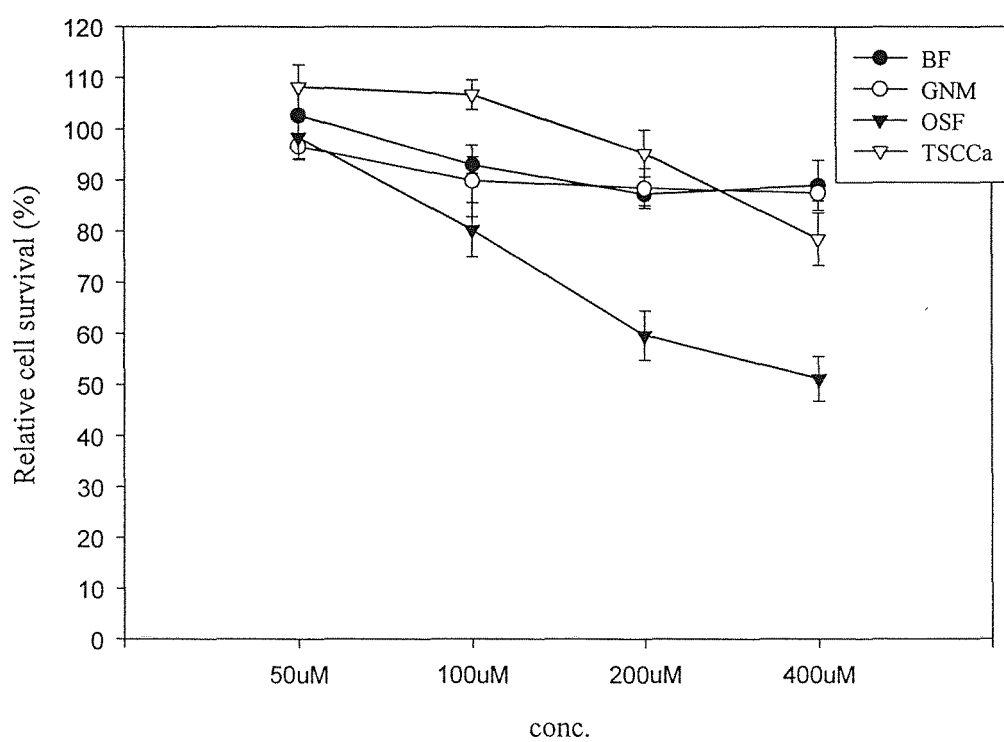


Fig. 4 MTT assay of 2,3-dibromo-3-(4-methoxyphenyl) propionic acid ethyl ester in BF, OSF, GNM, TSCCa cells.

2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propionic acid ethyl ester

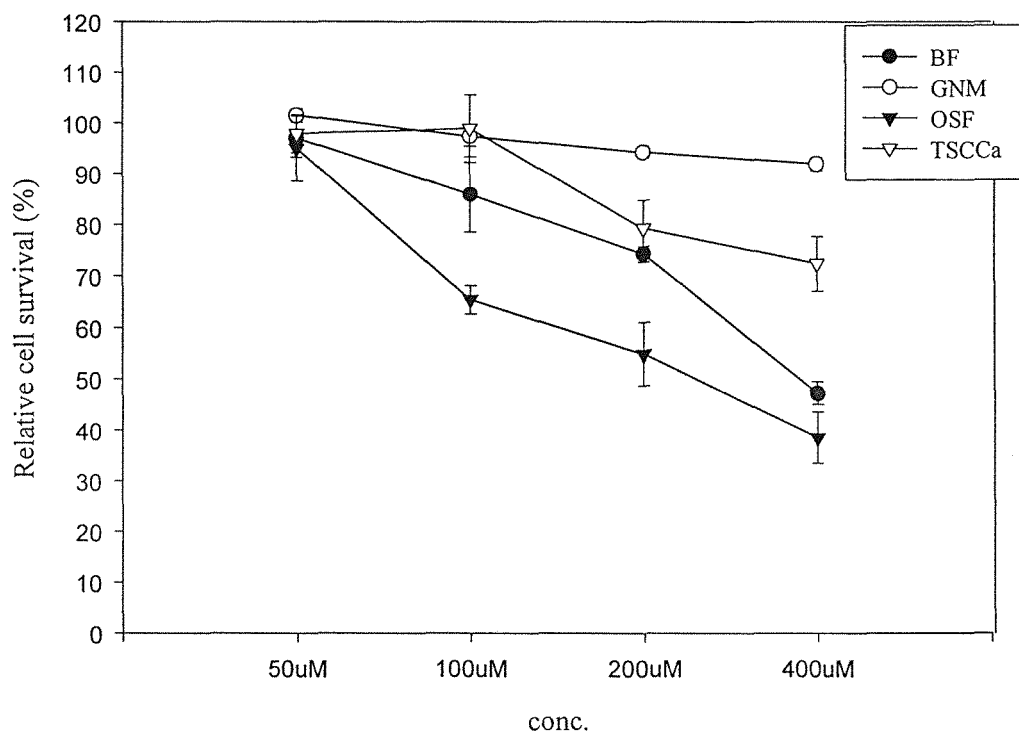


Fig. 5 MTT assay of 2,3-dibromo-3-(3,4-dimethoxyphenyl) propionic acid penthyl ester in BF, OSF, GNM, TSCCa cells

3-(4-methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester

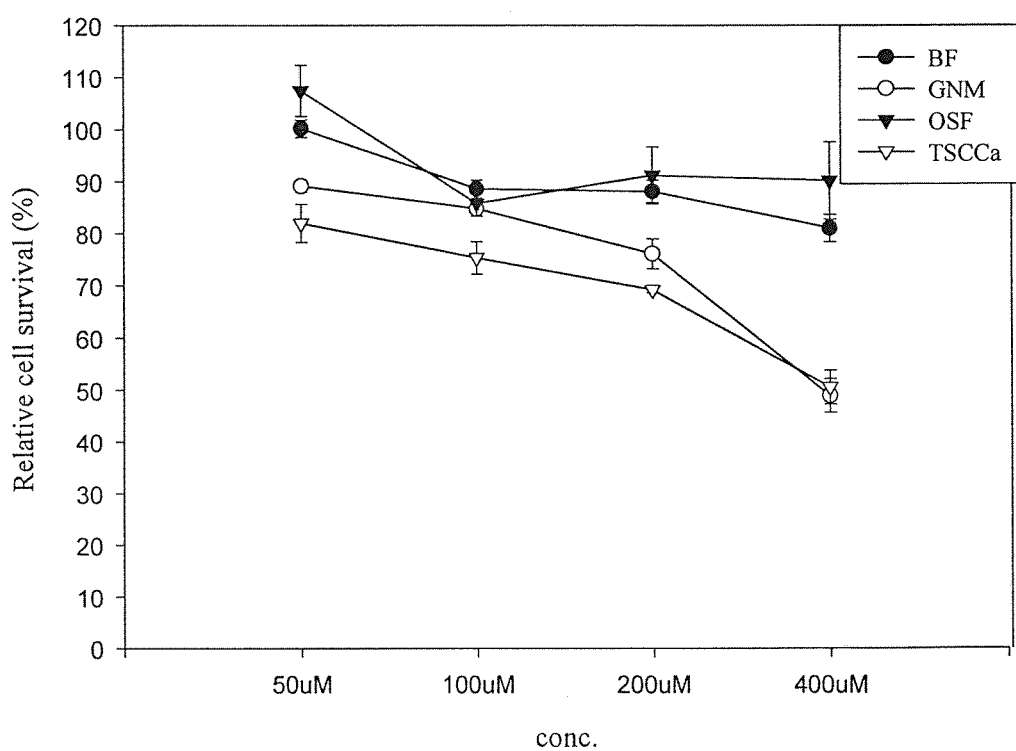


Fig. 6 MTT assay of 3-(4-methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester in BF, OSF, GNM, TSCCa cells



3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester

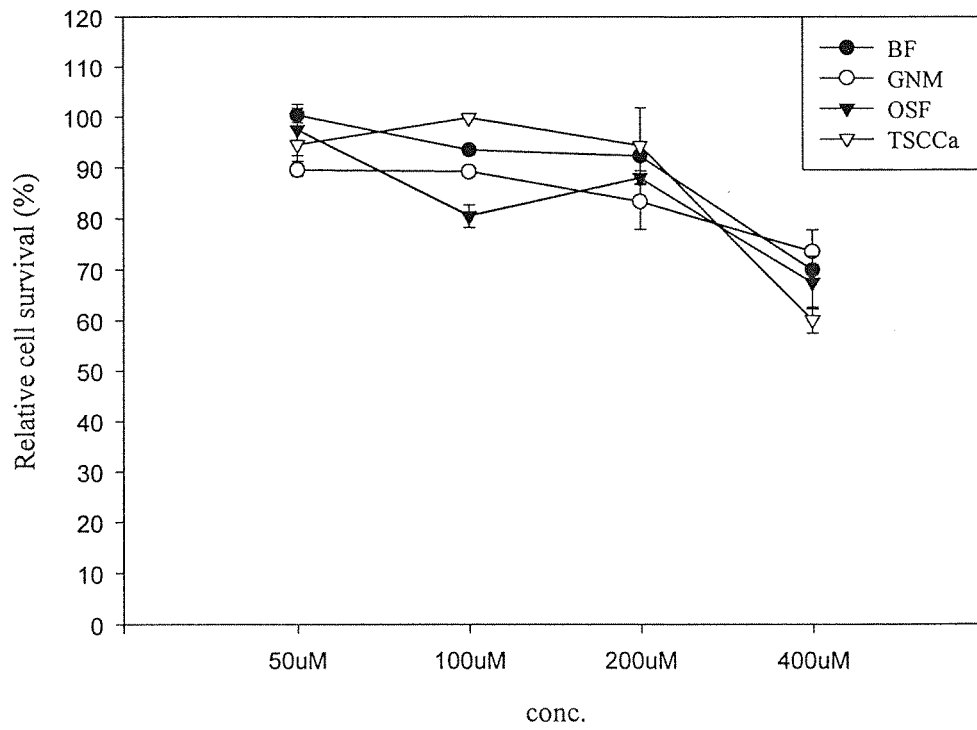


Fig. 7 MTT assay of 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester in BF, OSF, GNM, TSCCa cells

3-(4-bromophenyl)acrylic acid phenethyl ester  
(BrCAPE)

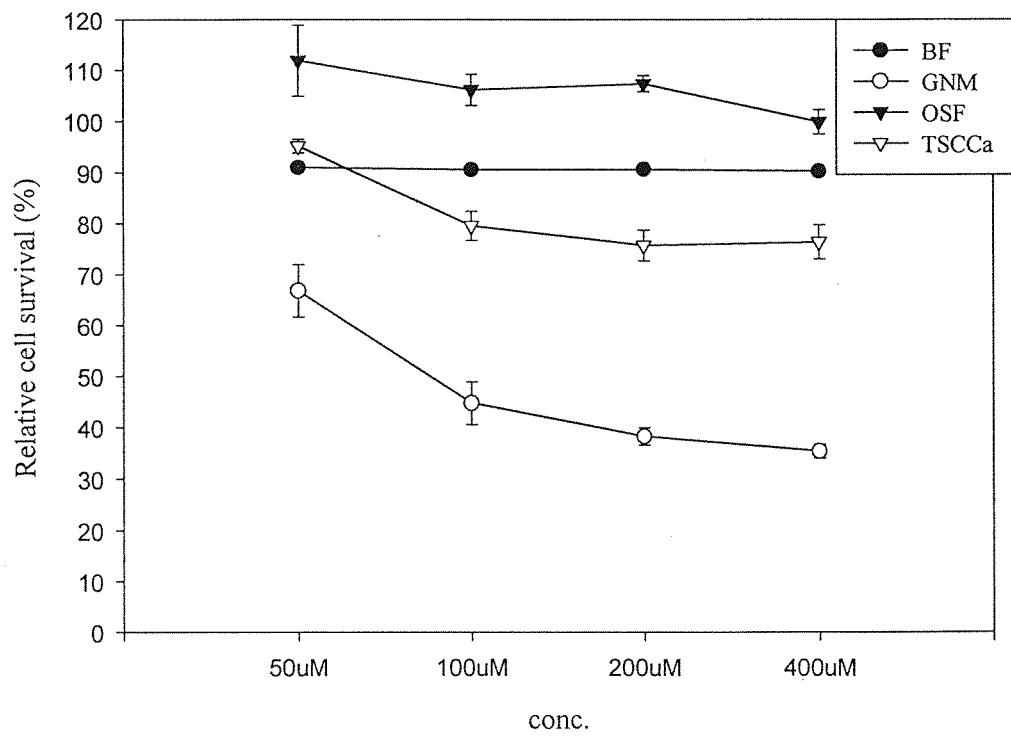


Fig. 8 MTT assay of BrCAPE at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells

3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester  
(PEDMC)

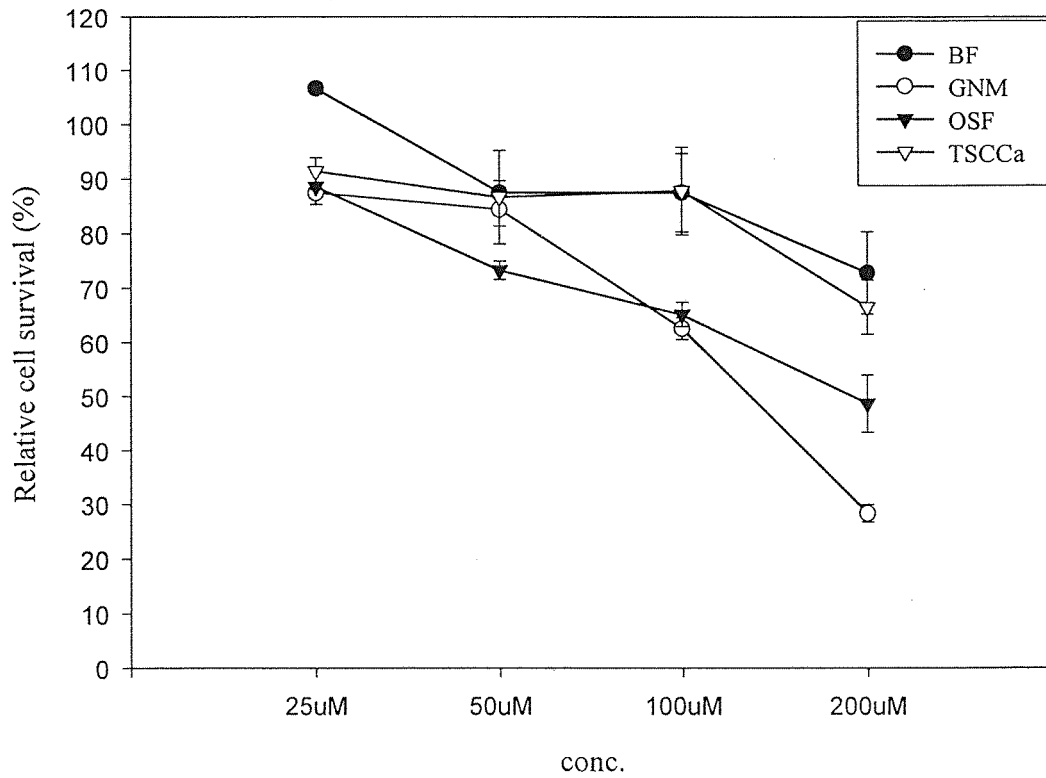


Fig. 9 MTT assay of PEDMC at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells

3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid methyl ester

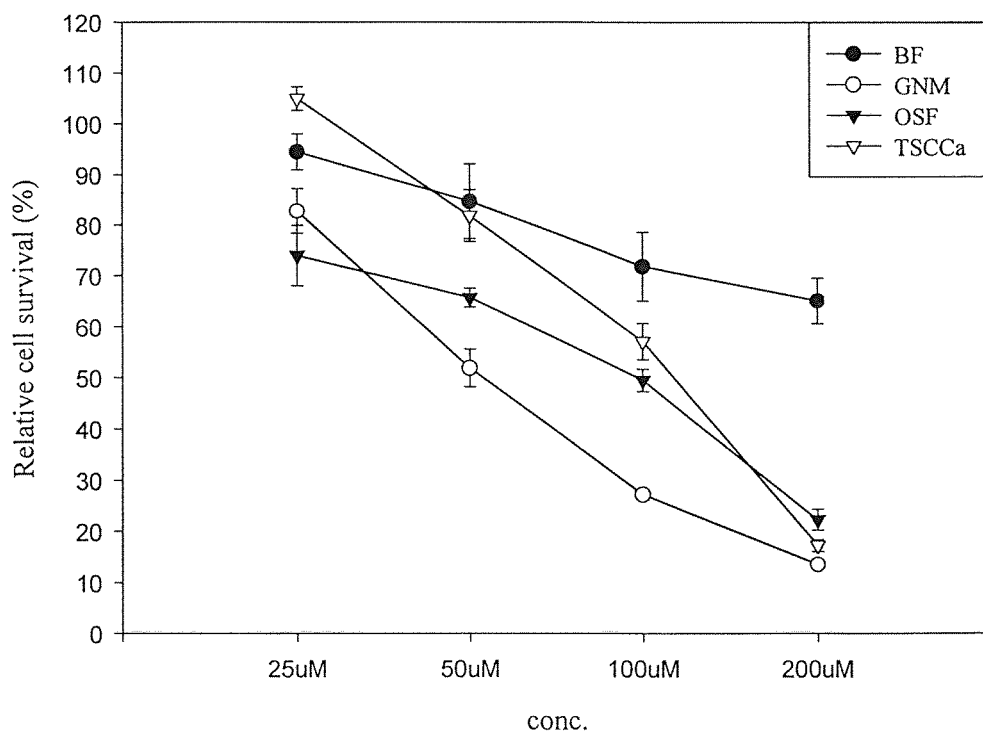


Fig. 10 MTT assay of MC at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells

3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid ethyl ester  
(EC)

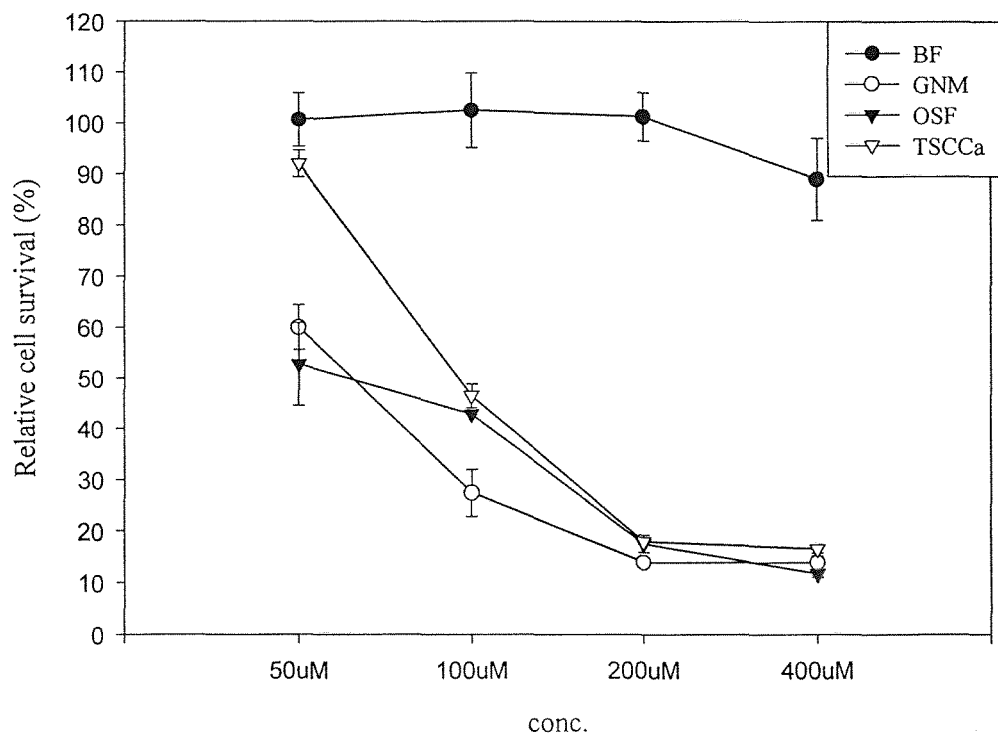


Fig. 11 MTT assay of EC at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells

3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester  
(CAPE)

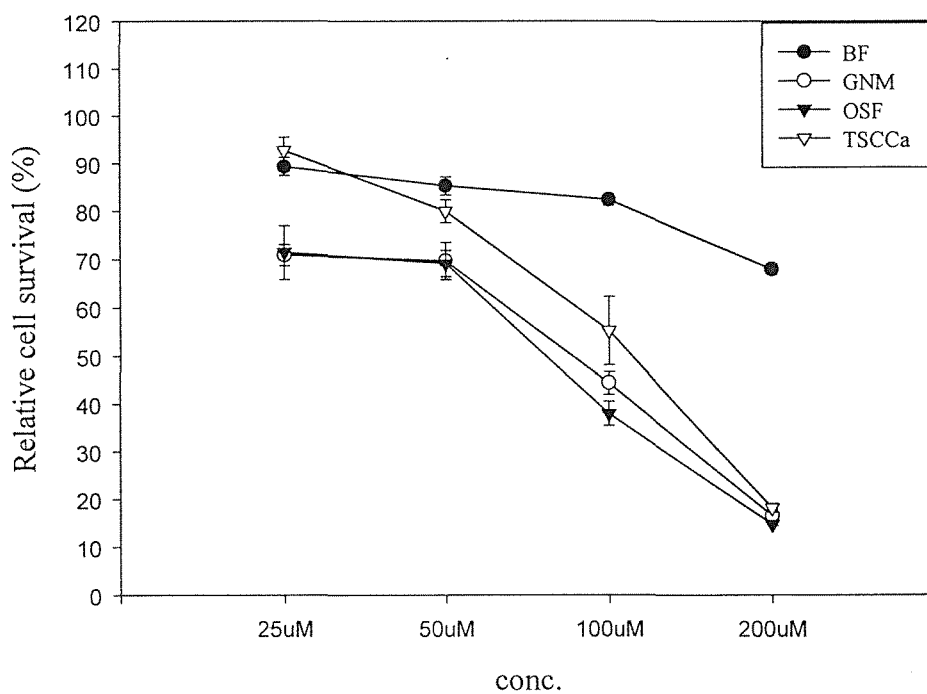
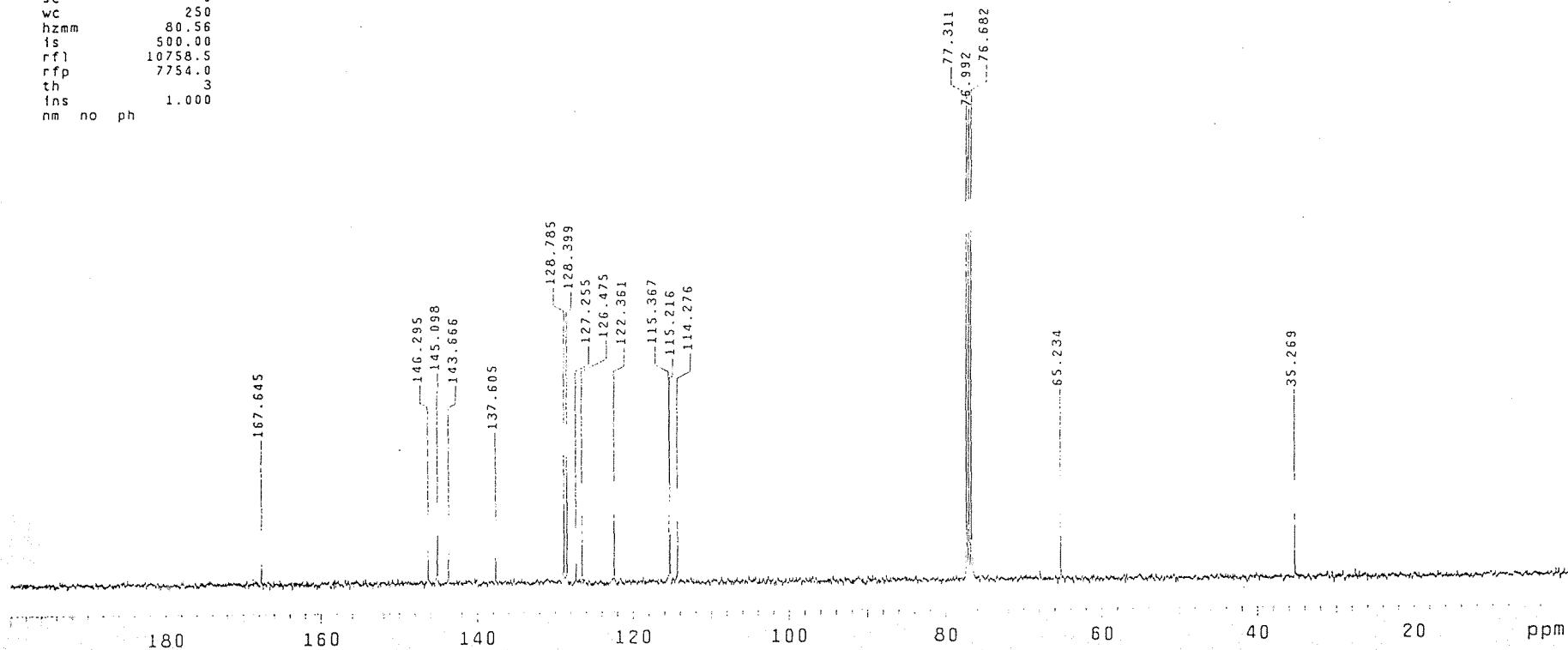
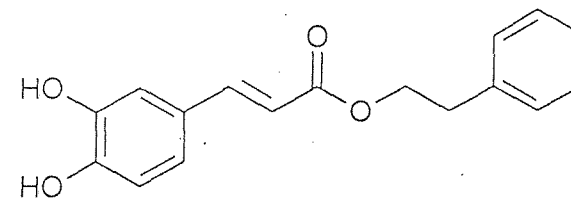


Fig. 12 MTT assay of CAPE at various concentration in BF, OSF, GNM, TSCCa cells

4-16-98C13COC13CAPE

expl 10100

```
SAMPLE DEC. & VT
date Apr 15 1998 dfrq 400.452
solvent COC13 dn H1
file exp dpwr 39
ACQUISITION dof 0
sfrq 100.703 dm vvy
tn C13 dmm w
at 1.199 dmf 10700
np 59968 PROCESSING
sw 25000.0 lb 3.00
fb 13800 wtfile
bs 16 proc ft
tpwr 55 fn not used
pw 8.7
dl 2.000 werr
tof 0 wexp
nt 1024 wbs wft
ct 512 wnt
alock n
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp -0.0
wp 20139.9
vs 56
sc 0
wc 250
hzmm 80.56
ls 500.00
rfl 10758.5
rfp 7754.0
th 3
ins 1.000
nm no ph
```



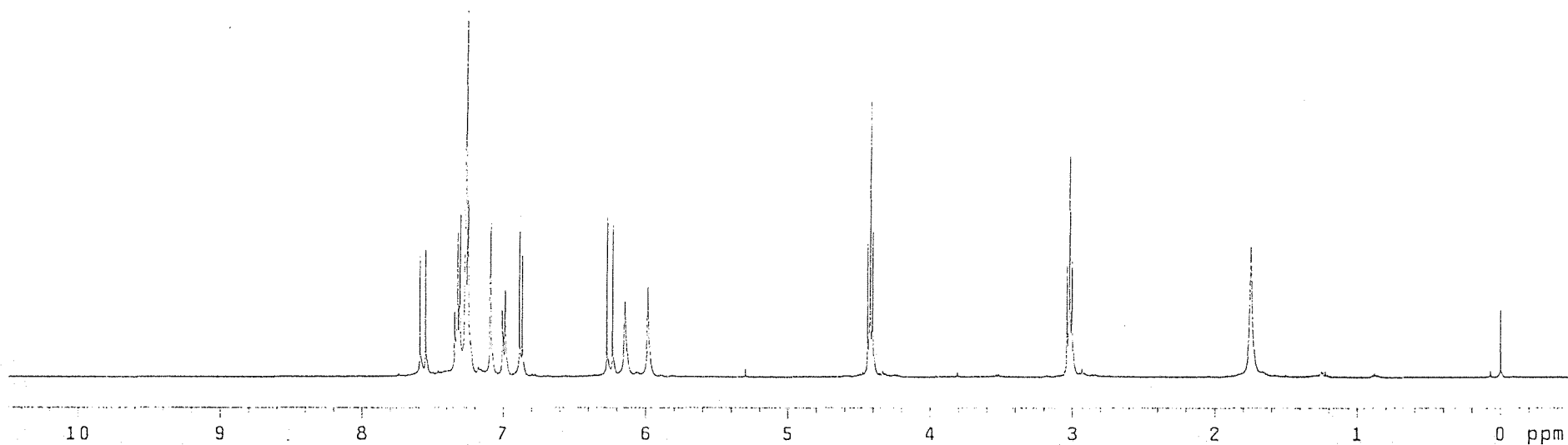
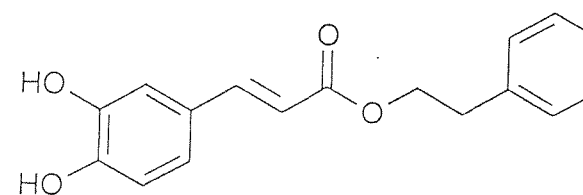
CAPEH1C0C13

exp2 std1h

```
SAMPLE          DEC. & VT
date Apr 30 1998 dfrq      400.452
solvent COC13      dn      H1
file exp dpwr      30
ACQUISITION     dof      0
sfrq 400.452     dm      nnn
tn H1            dmm      c
at 3.702         dmf     200
np 44416         wtfile
sw 5998.8        proc      ft
fb 3400          fn      not used
bs 8
tpwr 55
pw 7.0          werr
d1 1.000        wexp      wft
tof 0           wbs      wft
nt 512         wnt
ct 96
alock n
gain 10

FLAGS
il n
in n
dp y

DISPLAY
sp -200.3
wp 4405.0
vs 64
sc 0
wc 250
hzmm 17.62
fs 37600.22
rfl 1014.6
rfp 0
th 10
ins 1.000
nm cdc ph
```

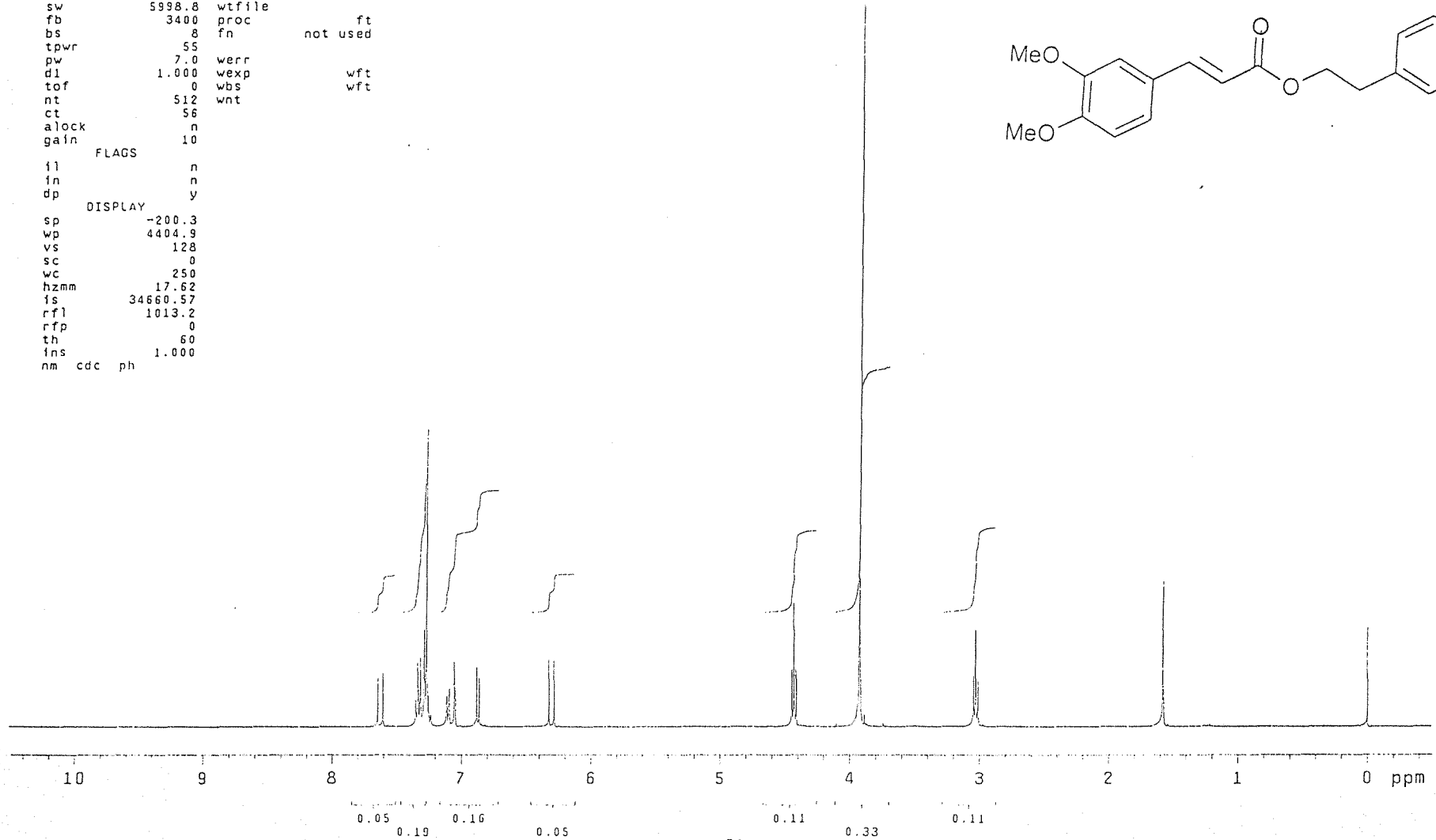
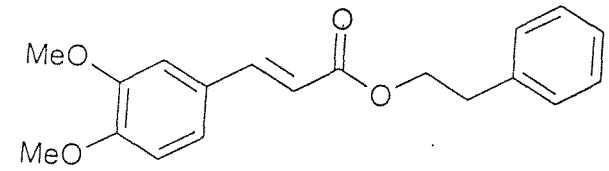




protectMe-CAPE

exp2 std1h

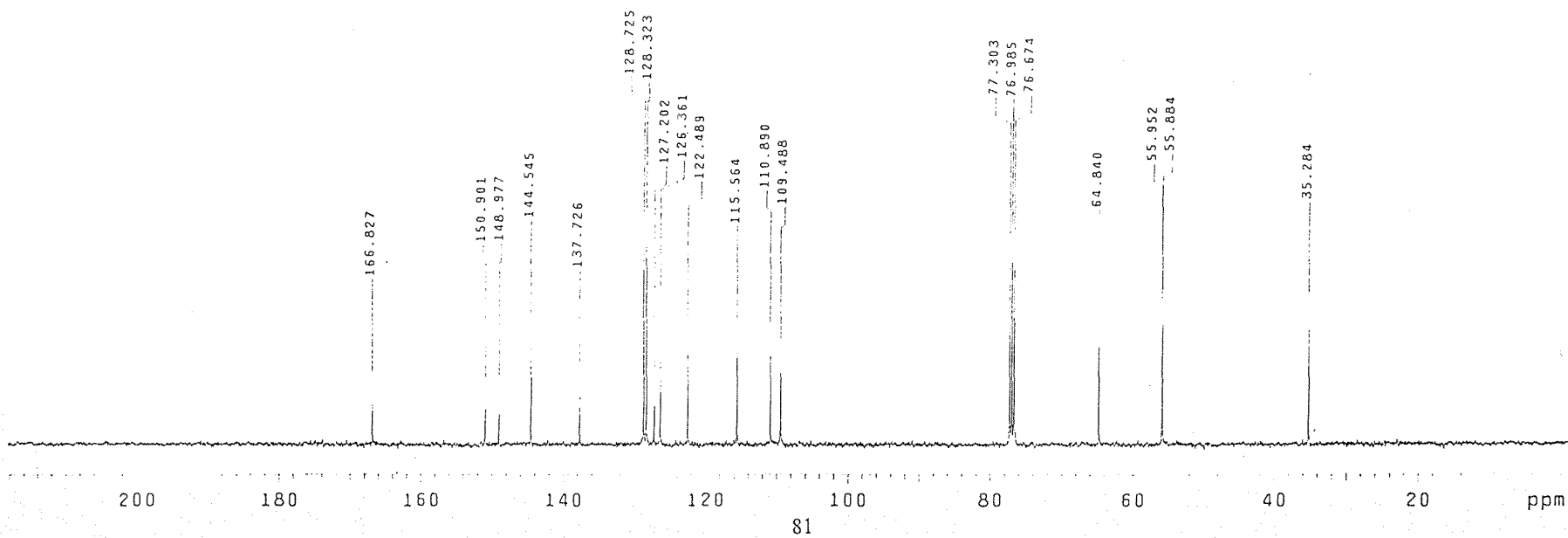
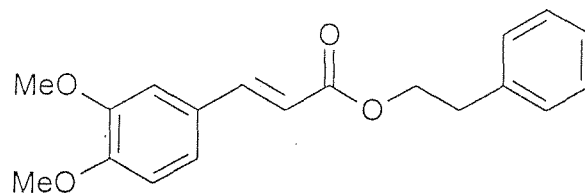
```
SAMPLE          DEC. & VT
date Mar 12 1998 dfrq 400.452
solvent CDCl3   dn      H1
file exp       dpwr   30
ACQUISITION    dof     0
sfrq 400.452   dm      nnn
tn      H1     dmm     c
at      2.000  dmf     200
np      24000
sw      5998.8 wtfile
fb      3400   proc
bs      8      fn      not used
tpwr    55
pw      7.0   werr
dl      1.000 wexp
tof     0     wbs      wft
nt      512   wnt
ct      56
alock   n
gain    10
FLAGS
fl      n
fn      n
dp      y
DISPLAY
sp      -200.3
wp      4404.9
vs      128
sc      0
wc      250
hzmm    17.62
fs      34660.57
rfl     1013.2
rfp     0
th      60
fns     1.000
nm cdc ph
```



6-24-99MeOCAPEFC13COC13

expl std13c

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Jun 23 1998	dfrq	400.452
solvent	COC13	dn	H1
file	exp	dpwr	39
ACQUISITION		dof	0
sfrq	100.703	dm	yyy
tn	C13	dmm	w
at	1.199	dmf	10700
np	59968	PROCESSING	
sw	25000.0	lb	3.00
fb	13800	wtfile	
bs	16	proc	
tpwr	55	fn	not used
pw	8.7		
d1	2.500	werr	
tof	0	wexp	wft
nt	1024	wbs	wft
ct	224	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
fl	n		
fn	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-163.3		
wp	22154.2		
vs	32		
sc	0		
wc	250		
hzmm	88.62		
is	500.00		
rfl	10763.1		
rfp	7754.0		
th	4		
ins	1.000		
nm	no	ph	



4-13-99ET3, 4OHCINNAMATE



PPM

LINE 1H. 0499  
DATE 9-9-93

SF 200.133  
SY 200.0  
O1 4291.209  
SI 16384  
TD 16384  
SW 2403.846  
HZ/PT .293

PW 1.0  
RD 1.000  
AQ 3.408  
RG 8  
NS 25  
TE 300

FW 3100  
O2 2500.000  
DP OL P0

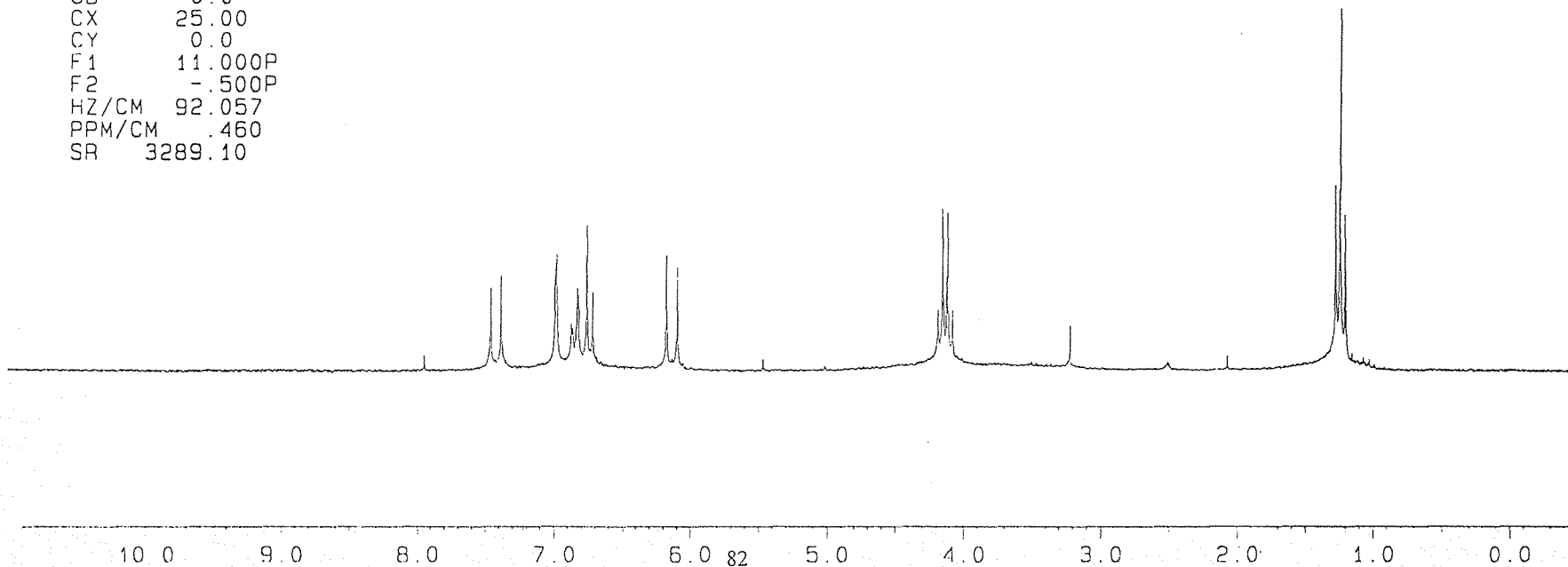
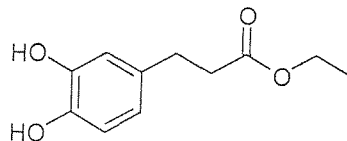
LB 0.0  
GB 0.0  
CX 25.00  
CY 0.0  
F1 11.000P  
F2 -.500P  
HZ/CM 92.057  
PPM/CM .460  
SR 3289.10

7.45345  
7.37394  
6.97848  
6.96915  
6.86317  
6.85355  
6.82205  
6.81259  
6.74870  
6.70807  
6.64806  
6.08543

4.17741  
4.14198  
4.10640  
4.07087

3.21401

1.27134  
1.23598  
1.20037

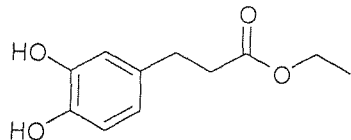


4-13-99ET3, 4OHCINNAMATEDMSO



LINE1H.0499  
DATE 23-3-0

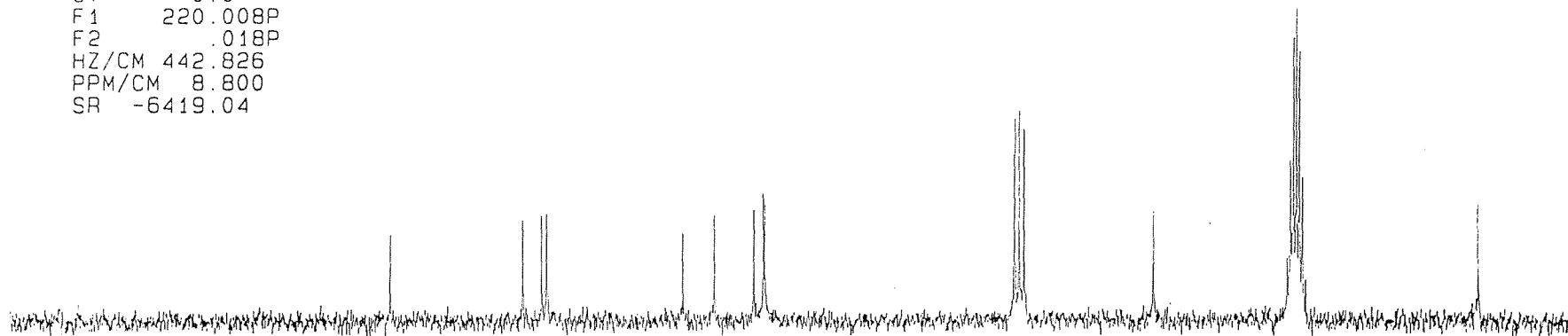
SF 50.324  
SY 50.0  
O1 -383.668  
SI 32768  
TD 32768  
SW 13157.895  
HZ/PT .803



PW 2.0  
RD 3.000  
AQ 1.245  
RG 400  
NS 409  
TE 297

FW 16500  
O2 3645.000  
DP 20H CPD

LB 2.000  
GB 0.0  
CX 25.00  
CY 0.0  
F1 220.008P  
F2 .018P  
HZ/CM 442.826  
PPM/CM 8.800  
SR -6419.04



200 180 160 140 120 83 100 80 60 40 20

7-24-98HIBI-CAPL

exp2 stdih

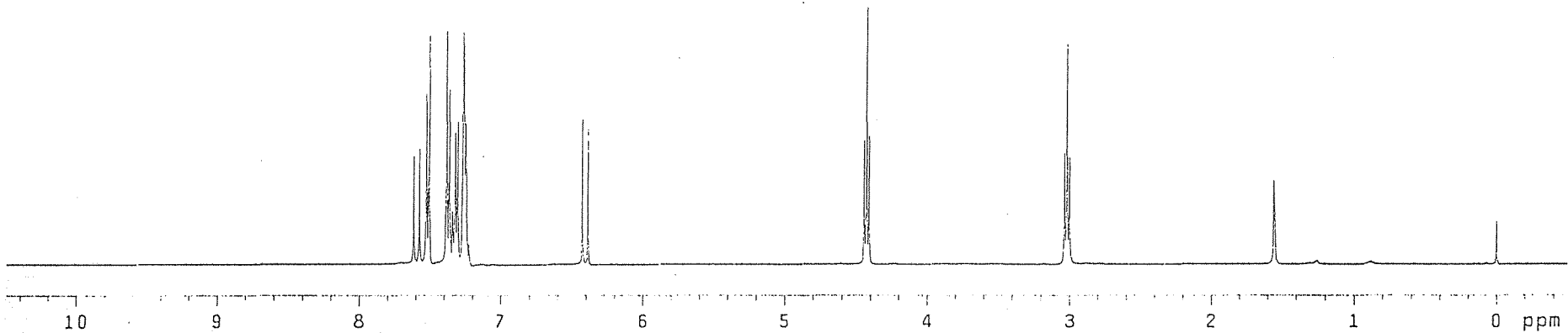
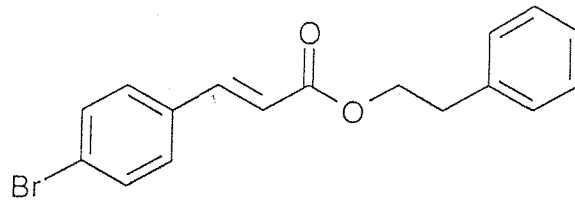
```

SAMPLE      DEC. & VT
date Jul 23 1998  dfrq      400.452
solvent CDCl3      dn        H1
file      exp      dpwr      30
ACQUISITION  dof        0
sfrq      400.452  dm        nnn
tn        H1      dmm        c
at        3.702   dmf        200
np        44416   PROCESsing
sw        5998.8  wtfile
fb        3400   proc        ft
bs        8      fn        not used
tpwr      55
pw        7.0   verr
d1        1.000 wexp        wft
tof        0    wbs        wft
nt        512   wnt
ct        64
alock     n
gain      10

FLAGS
il        n
in        n
dp        y

DISPLAY
sp        -200.3
wp        4405.0
vs        41
sc        0
wc        250
hzmm      17.62
is        10450.42
rfl       1016.8
rfl       0
th        10
fns       1.000
nm cdc ph

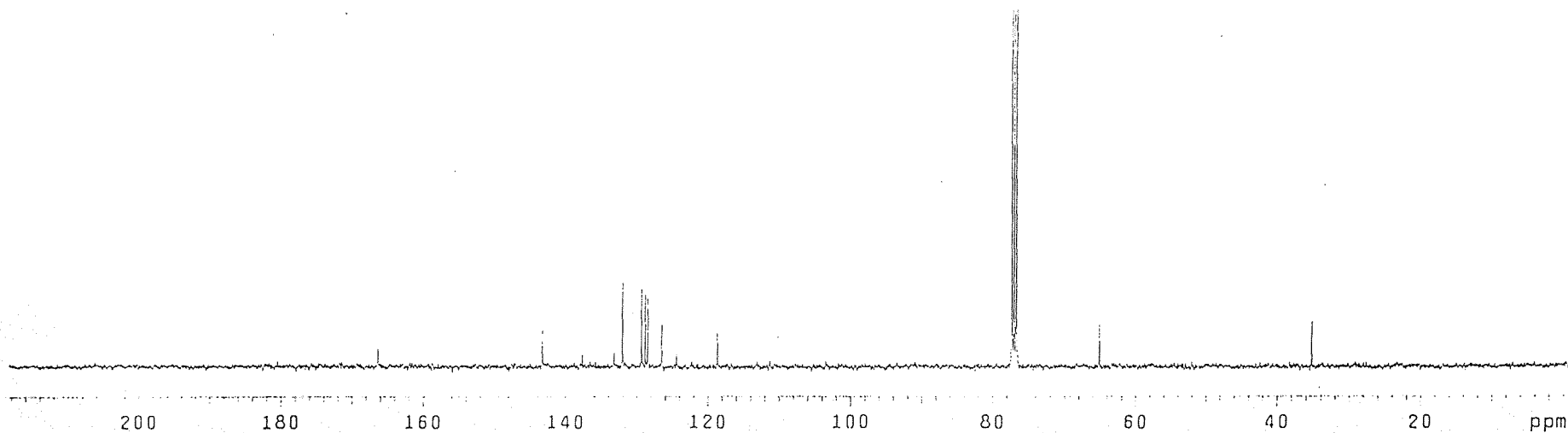
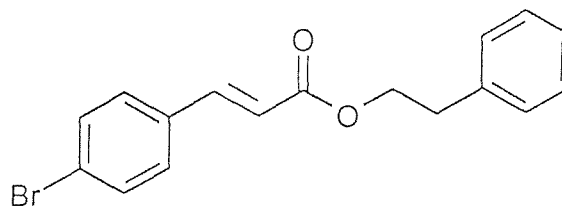
```



7-24-98BrCAPEC13

exp2 std13c

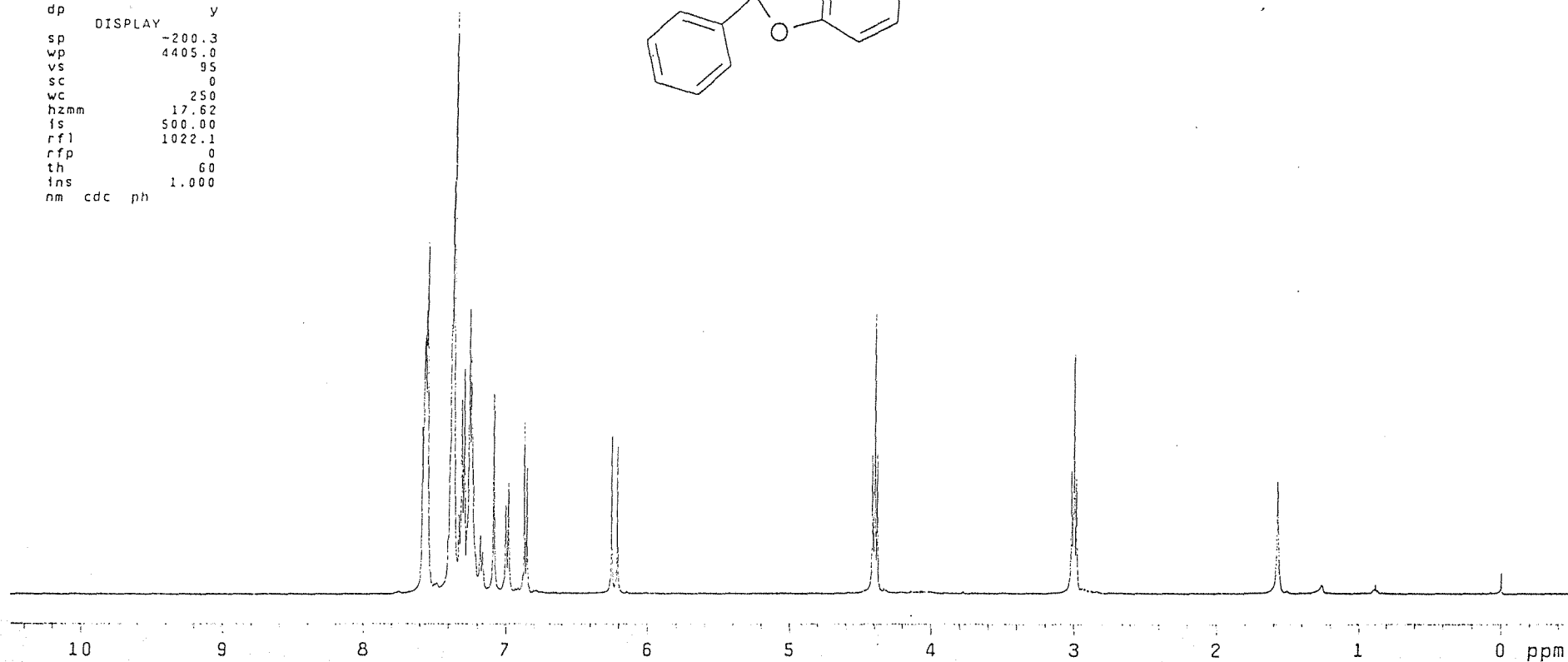
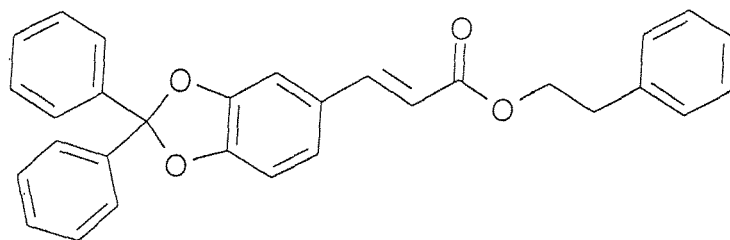
```
SAMPLE DEC. & VT
date Jul 23 1998 dfrq 400.452
solvent COC13 dn H1
file exp dpwr 39
ACQUISITION dof 0
sfrq 100.703 dm yyy
tn C13 dmm w
at 1.199 dmf 10700
np 59968 PROCESSING
sw 25000.0 lb 3.00
fb 13800 wfile
bs 16 proc ft
tpwr 55 fn not used
pw 8.7
d1 2.500 werr
tof 0 wexp wft
nt 1024 wbs wft
ct 336 wnt
alock n
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp -157.9
wp 22154.2
vs 57
sc 0
vc 250
hzmm 88.62
fs 500.00
rfl 10757.8
rfp 7754.0
th 3
ins 1.000
nm no ph
```



diphCAPECO13H1

exp2 std1h

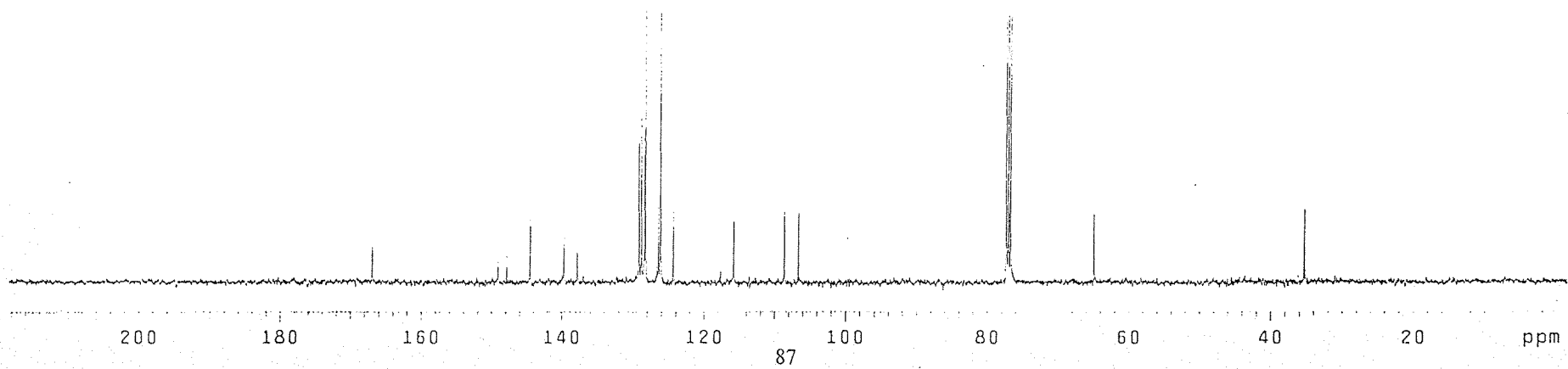
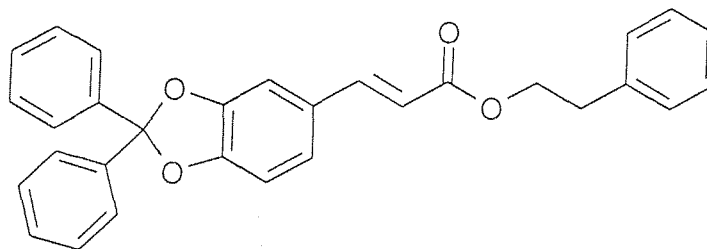
SAMPLE		DEC. & VT	
date	Jul 31 1998	dfrq	400.452
solvent	COCl3	dn	H1
file	exp	dpwr	30
ACQUISITION			
sfrq	400.452	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	3.702	dmf	200
np	44416	PROCESSING	
sw	5998.8	wtfile	ft
fb	3400	proc	fn
bs	8	not used	
tpwr	55		
pw	7.0	werr	
d1	1.000	wexp	wft
tof	0	wbs	wft
nt	512	wnt	
ct	16		
alock	n		
gain	10		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-200.3		
wp	4405.0		
vs	95		
sc	0		
wc	250		
hzmm	17.62		
is	500.00		
rfl	1022.1		
rfp	0		
th	60		
ins	1.000		
nm	cdc ph		



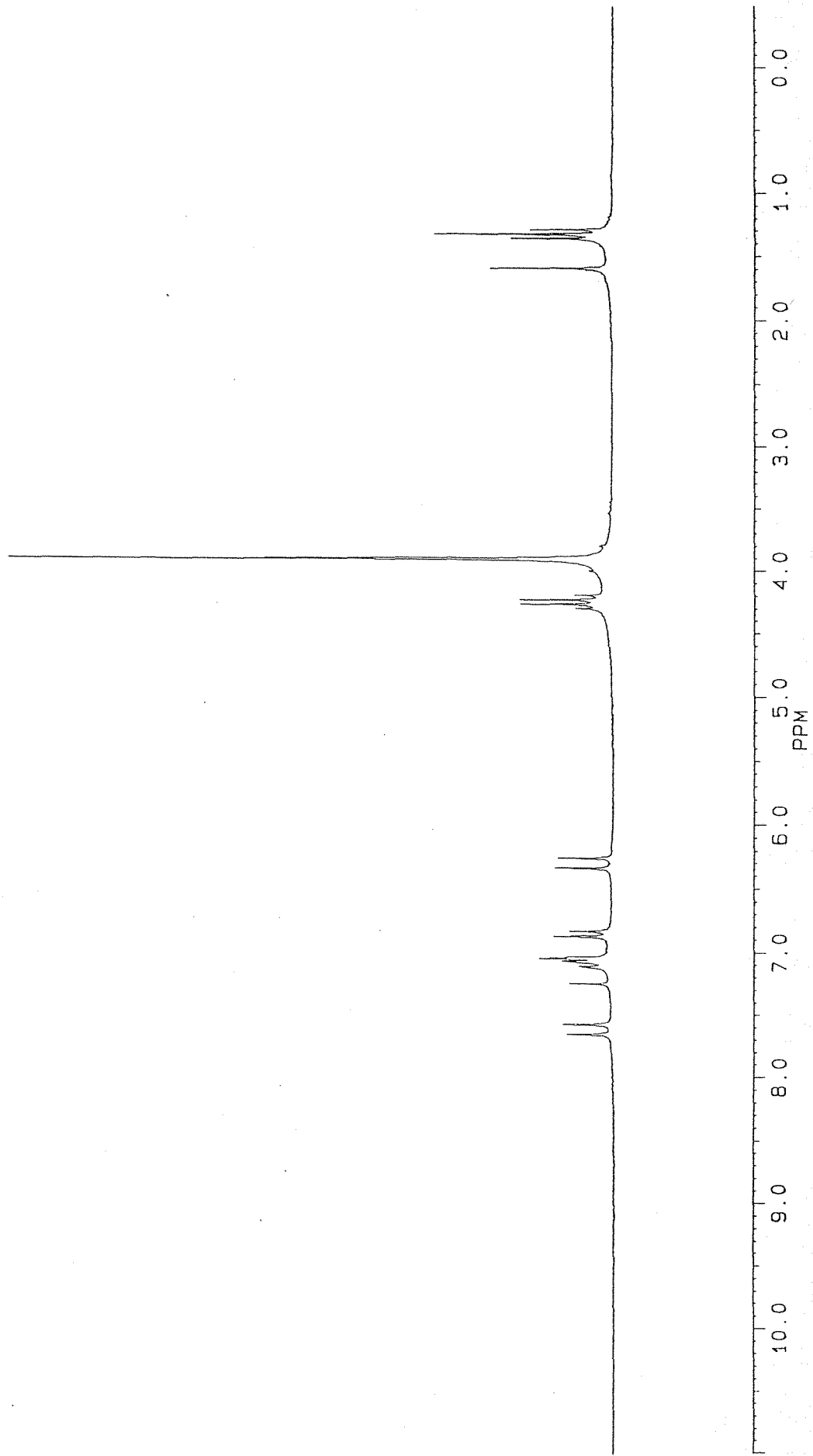
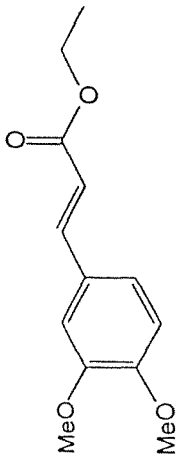
D:\PHCAP\LC13\DC13

exp2 std13c

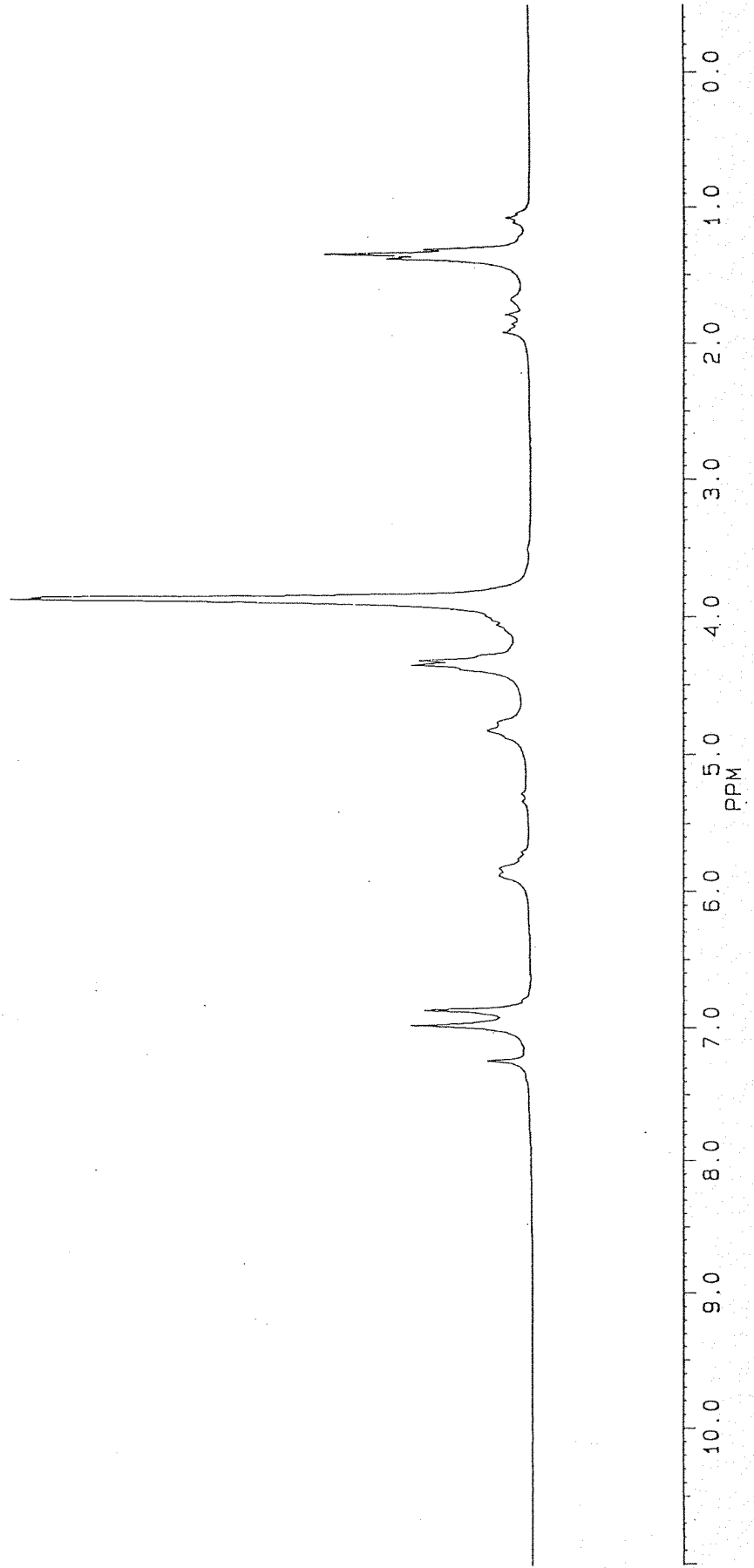
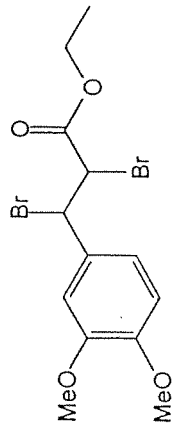
SAMPLE		DEC. & VT	
date	Jul 31 1998	dfrq	400.452
solvent	COC13	dn	H1
file	exp	dpwr	39
ACQUISITION			
sfrq	100.703	dof	0
tn	C13	dm	yyy
at	1.199	dmm	w
np	59968	dmf	10700
sw	25000.0	PROCESSING	
fb	13800	lb	3.00
bs	16	wtfile	
tpwr	55	proc	ft
pw	8.7	fn	not used
d1	2.500	werr	
tof	0	wexp	wft
nt	1024	wbs	wft
ct	368	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
fl	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-160.2		
wp	22154.2		
vs	45		
sc	0		
wc	250		
hzmm	88.62		
fs	500.00		
rfl	10760.1		
rfp	7754.0		
th	2		
ins	1.000		
nm	no	ph	







3-24-99BHZE IJINNAMA I E

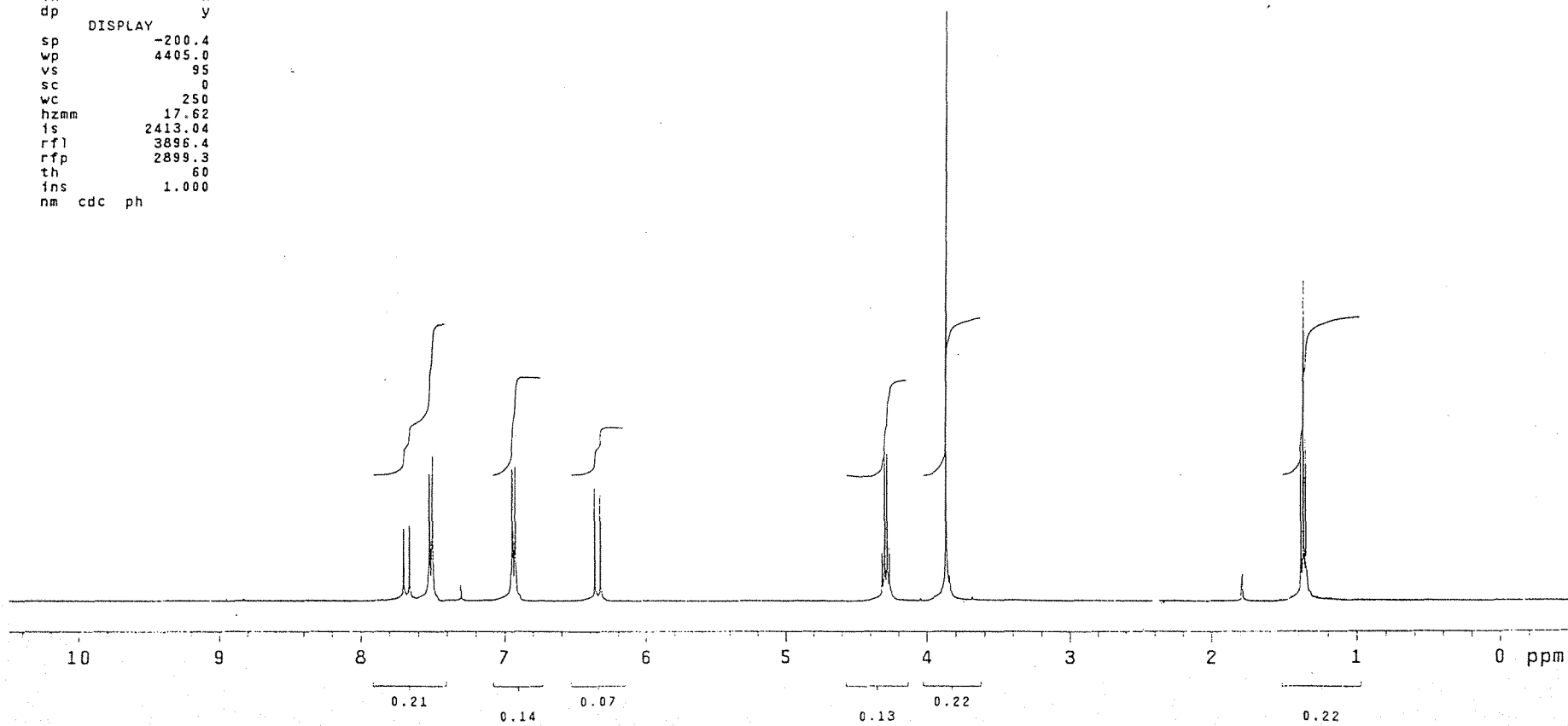
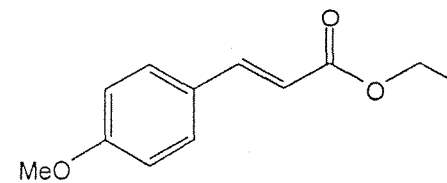


3-31-99#1

exp4 std1h

```

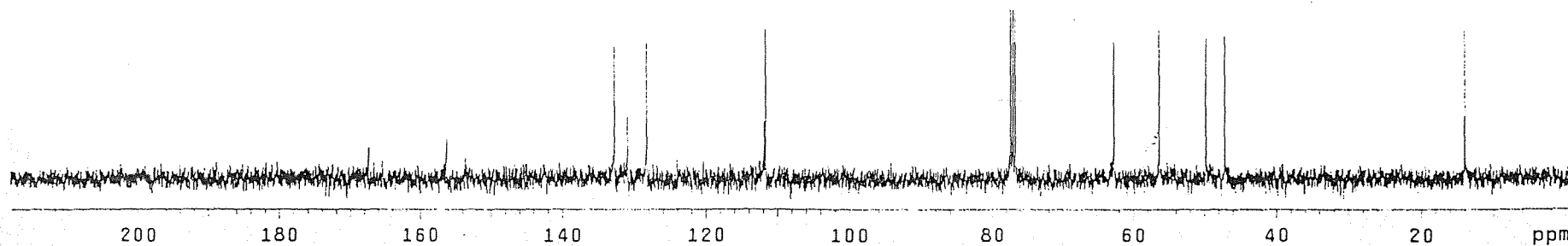
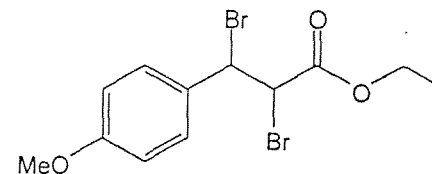
SAMPLE
date   Mar 30 1999  dfrq  400.452
solvent CDC13      dn     H1
file   exp         dpwr   30
.ACQUISITION      dof     0
sfrq   400.452    dm      nnn
tn     H1         dmm     c
at     3.702     dmf     200
np     44416     PROCESSING
sw     5998.8    wtfile
fb     3400     proc     ft
bs     8         fn      not used
tpwr   55
pw     7.0     werr
di     1.000   wexp     wft
tof    0       wbs     wft
nt     512    wnt
ct     24
alock  n
gain   10
  FLAGS
  il   n
  in   n
  dp   y
  DISPLAY
  sp   -200.4
  wp   4405.0
  vs   95
  sc   0
  wc   250
  hzmm 17.62
  is   2413.04
  rfl  3896.4
  rfp  2899.3
  th   60
  ins  1.000
nm cdc ph
```



13C OBSERVE

exp4 std13c

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Mar 30 1999	dfrq	400.452
solvent	CDCl3	dn	H1
file	exp	dpwr	39
ACQUISITION		dof	0
sfrq	100.703	dm	yyy
tn	C13	dmm	w
at	1.199	dmt	10700
np	59968	PROCESSING	
sw	25000.0	lb	2.00
fb	13800	wtfile	
bs	16	proc	ft
tpwr	56	fn	not used
pw	8.7	werr	
d1	3.000	wexp	wft
tof	0	wbs	wft
nt	1024	wnt	
ct	32		
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-164.0		
wp	22154.2		
vs	27		
sc	0		
wc	250		
hzmm	88.62		
is	500.00		
rfl	10763.9		
rfp	7754.0		
th	20		
ins	1.000		
nm	no	ph	



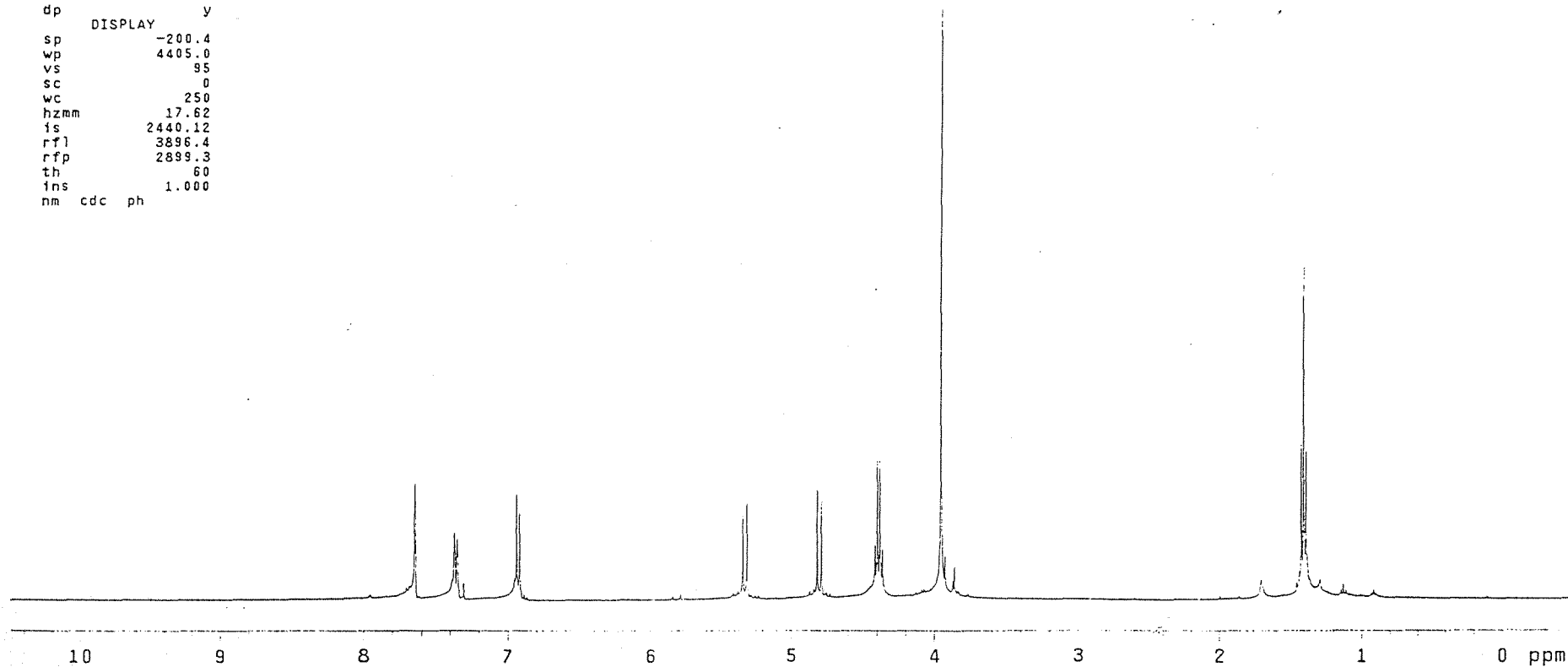
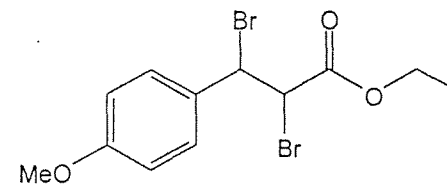
3-31-99#6

exp4 std1h

```
SAMPLE          DEC. & VT
date   Mar 30 1999   dfrq   400.452
solvent CDC13      dn      H1
file    exp        dpwr   30
          ACQUISITION   dof    0
sfrq    400.452    dm     nnn
tn      H1        dmm     c
at      3.702     dmf    200
np      44416
sw      5998.8    wtfile
fb      3400     proc   ft
bs      8        fn     not used
tpwr    55
pw      7.0     werr
d1      1.000   wexp   wft
tof     0       wbs   wft
nt      512    wnt
ct      24
alock   n
gain    10

  FLAGS
il      n
in      n
dp      y

  DISPLAY
sp      -200.4
wp      4405.0
vs      95
sc      0
wc      250
hzmm    17.62
is      2440.12
rfl     3896.4
rfp     2899.3
th      60
ins     1.000
nm cdc  ph
```



## Synthesis of Caffeic Acid Esters as Antioxidants by Esterification via Acyl Chlorides

Wen-Kang Chen<sup>a,c</sup> ( ), Chia-Fong Tsai<sup>b</sup> ( ),  
Pel-Hu Liao<sup>b</sup> ( ), Sheng-Chu Kuo<sup>c</sup> ( )  
and Yean-Jang Lee<sup>d\*</sup> ( )

<sup>a</sup>*Department of Biochemistry, Chung Shan Medical and Dental College, Taichung, Taiwan, R.O.C.*

<sup>b</sup>*Institute of Toxicology, Chung Shan Medical and Dental College, Taichung, Taiwan, R.O.C.*

<sup>c</sup>*Institute of Pharmaceutical Chemistry, China Medical College, Taichung, Taiwan, R.O.C.*

<sup>d</sup>*Department of Chemistry, National Changhua University of Education, Changhua, Taiwan, R.O.C.*

(Received March 9, 1999; Accepted June 6, 1999)

### ABSTRACT

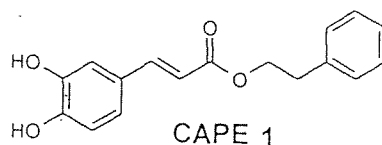
As part of our search for new compounds with improved antibiotic, antiviral, anti-inflammatory and tumor growth inhibition activities, we prepared some caffeic acid esters from commercially available caffeic acid. The rapid total synthesis of caffeic acid esters is described. Highlights of the synthesis include esterification with pyridine catalyst and thermal esterification of acyl chlorides and alcohols in nitrobenzene. Several strategies to accomplish this goal are provided. Finally, CAPE (caffeic acid phenylethyl ester) quenched the free radicals as a phenolic antioxidant.

**Key words:** Caffeic acid phenethyl ester; Antioxidant; Esterification.

### INTRODUCTION

According to the reports of Grunberger et al. (1988) and Pommier et al. (1994), caffeic acid phenylethyl ester (CAPE) and its analogues exhibited preferential cytotoxicity toward tumor cells<sup>1</sup> and inhibited HIV-1 integrase.<sup>2</sup> Many of the tumor-growth inhibitors contained polyhydroxylated aromatic rings. Moreover, Burke et al.<sup>3</sup> claimed that some HIV-1 integrase inhibitors consist of two aryl units separated by a central linker, and significant inhibitory potency was exhibited when at least one aryl ring possessed *o*-dihydroxyl functionality. Furthermore, the constituents of natural honey-propolis, which is a folk medicine employed for treating various ailments, contain a variety of compounds including caffeic acid

esters.<sup>4</sup> CAPE 1 was isolated from the propolis of hives collected in Carmel Mountains by Nakanishi *et al.* in 1988.<sup>1</sup> Since the biological properties of propolis and its constituent compounds have become a point of particular interest and extraction of these compounds required large quantities of propolis, and we undertook the synthesis of several caffeic acid esters.



The commercial availability of caffeic acid prompted us to prepare some caffeic acid esters from this compound. However, selective esterification of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxyl group presents a problem because of the solubility of caffeic acid. Although CAPE 1 has been synthesized by several groups,<sup>5</sup> only poor yields of the target compound were achieved with very time consuming and complicated synthetic approaches. To overcome these technical difficulties, we report our studies on the synthesis of caffeic acid esters.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. Solvents (E. Merck Co., Darmstadt, Germany), caffeic acid, 4-bromobenzaldehyde, and malonic acid (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, USA), and other reagents were obtained from the indicated suppliers.

### Synthesis and Identification of CAPE-like Analogues (1-5)

Melting points were determined on a Mel Temp II melting point apparatus and are uncorrected. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were obtained using a Varian MERCURY-400 spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million ( $\delta$ , ppm) using CHCl<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  7.26) as an internal standard. Low-resolution mass spectra (MS) and high-resolution mass spectra (HRMS) were determined on a JEOL JMX-SX/SX 102 A mass spectrometer from National Chung-Hsing University, Taichung. Elemental analyses were performed on a Heracus CHN-OS Rapid spectrometer in the Taichung Instrumentation Center, National Science Council. Solvents were freshly distilled prior to use from phosphorus pentoxide or CaH<sub>2</sub>. THF was from sodium diphenyl ketyl. All reactions were carried out under nitrogen atmosphere unless otherwise stated. Silica gel (silica gel 60, 230-400 mesh, Merck) was

used for chromatography. Organic extracts were dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ .

### General Procedure for Esters from Acyl Chloride with Pyridine

The acid in excess  $\text{SOCl}_2$  (solvent) was refluxed for 2 h and  $\text{SOCl}_2$  was removed *in vacuo*. A solution of alcohol and pyridine in an inert solvent (benzene,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) was added dropwise to the solid at room temp and the solution was stirred for 1 h under ambient conditions. The pyridine hydrochloride was easily separated by filtration and the filtrate was subjected to column chromatography (Silica gel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :hexane 1:1) to yield the corresponding ester.

### 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)acrylic Acid Phenethyl Ester (3)

According to the procedure described for preparation of esters, compound 3 (1.38 g, 92 %) was obtained from 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylic acid (1.00 g, 4.8 mmol). 3: mp 97-98 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.03 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 3.92 (6H, s), 4.43 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 6.30 (1H, d,  $J = 16$  Hz), 6.87 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.05 (1H, d,  $J = 2$  Hz), 7.10 (1H, dd,  $J = 8.4, 2$  Hz), 7.25-7.35 (5H, m), 7.62 (1H, d,  $J = 16$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  35.3, 55.9, 56.0, 64.8, 109.5, 110.9, 115.6, 122.5, 126.4, 127.2, 128.3, 128.7, 137.7, 144.5, 149.0, 150.9, 166.8; EIMS  $m/z$  (rel. int): 312 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> (73), 208 (100), 191 (76); HRMS: Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_4$ : 312.1362. Found: 312.1358; Anal. Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_4$ : C, 73.06; H, 6.45; O, 20.49. Found: C, 73.06; H, 6.43; O, 20.59.

### 3-(4-Bromophenyl)acrylic Acid Phenethyl Ester (5)

Piperidine (0.32 mL, 3.2 mmol) was added dropwise at room temp to a solution of 4-bromobenzenaldehyde (0.60 g, 3.2 mmol) and malonic acid (0.67 g, 6.4 mmol) in 4 mL of pyridine. The mixture was heated to 80 °C for 2 h, and then heated to 115 °C for 8 h. After cooling, the solution was poured into 250 mL of cold water. The solution was acidified by slowly adding with stirring 10 mL of HCl (35.5 %), and the white precipitate was separated by filtration and washed 4 times with cold water. The crude acid was dissolved in a solution of aqueous NaOH (1:20). The solution was filtered and diluted with a 10 mL of cold water. The basic solution was neutralized with HCl (1:1) and the solid was filtered and washed with 20 mL of cold water and extracted with chloroform to provide bromocinnamic acid (0.56 g, 77 %). Following the procedure for the preparation of esters, the 4-bromoester 5 (0.73 g, 88 %) was prepared from the acid (0.56 g, 2.5 mmol). 5: mp 81-82 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.02 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 4.23 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 6.40 (1H, d,  $J = 16$  Hz), 7.25-7.32 (5H, m), 7.37 (2H, d,  $J = 8.8, 2$  Hz), 7.51 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.59 (1H, d,  $J = 16$  Hz),  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  35.3, 65.1, 118.7, 124.4, 126.5, 128.4, 128.8,



129.3, 132.0, 133.2, 137.6, 143.3, 166.4; EIMS  $m/z$  (rel. int): 332  $[M+2]^+$  (5), 330  $[M]^+$  (5), 211 (53), 209 (53), 104 (100), 102 (79); HRMS: Calc. for  $C_{17}H_{15}O_2Br$ : 330.0256. Found: 330.0253. Anal. Calcd for  $C_{17}H_{15}O_2Br$ : C, 61.65; H, 4.56; O, 9.66. Found: C, 61.78; H, 4.67; O, 9.83.

### 3-(2,2-Diphenylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)acrylic Acid Phenethyl Ester (10)

3,4-Dihydroxy cinnamic acid (0.50 g, 2.8 mmol) was placed together with dichlorodiphenylmethane (0.54 mL, 2.8 mmol, 1.0 equiv.) into a 25 mL, two-necked, round-bottomed flask under a nitrogen atmosphere. The mixture was then heated to 170-180 °C (oil bath temperature) with stirring under nitrogen flux and maintained at that temperature for 15 min. The flask was removed from the oil bath and allowed to cool to ambient temperature. The dark brown residue was dissolved in dichloromethane, applied to a 3 × 30 cm  $SiO_2$  column, and eluted with diethyl ether/petroleum ether. The crude product was recrystallized from cyclohexane as a white solid (0.53 g, 55 %), which was of sufficient purity to be used directly in the next reaction. According to the procedure described for the preparation of esters, **10** (0.21 g, 31 %) was afforded from protected cinnamic acid (0.53 g, 1.5 mmol). **10**: mp 110-112 °C;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.00 (2H, *t*,  $J = 7.2$  Hz), 4.40 (2H, *t*,  $J = 7.2$  Hz), 6.23 (1H, *d*,  $J = 16$  Hz), 6.86 (1H, *d*,  $J = 8$  Hz), 6.99 (1H, *dd*,  $J = 8, 1.6$  Hz), 7.08 (1H, *d*,  $J = 1.6$  Hz), 7.23-7.58 (16H, *m*);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  35.3, 64.9, 106.6, 108.6, 115.7, 117.6, 124.3, 126.1, 126.4, 126.6, 128.2, 128.3, 128.8, 129.1, 137.8, 139.6, 144.5, 147.7, 149.0, 166.8; EIMS  $m/z$  (rel. int): 448  $[M]^+$  (100), 371 (52), 267 (61); HRMS: Calc. for  $C_{30}H_{24}O_4$ : 448.1677. Found: 448.1673. Anal. Calcd for  $C_{30}H_{24}O_4$ : C, 80.34; H, 5.39; O, 14.27. Found: C, 80.09; H, 5.59; O, 14.26.

### 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylic Acid Phenethyl Ester (CAPE 1)

A solution of caffeic acid (0.54 g, 2.8 mmol) in 5 mL of  $SOCl_2$  was refluxed for 4 h. The resulting solution was concentrated *in vacuo*, and 20 mL of dry nitrobenzene was added. The dissolved solution was mixed with phenyl ethyl alcohol (1.67 mL, 14.0 mmol) at room temperature, heated to 70 °C for 2 h, and subjected to column chromatography (Silica, ether:hexane 1:1) to give the desired ester **1** (0.40 g, 50 %). **1**: mp 127-128 °C;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.02 (2H, *t*,  $J = 7.2$  Hz), 4.42 (2H, *t*,  $J = 7.2$  Hz), 5.98 and 6.14 (2H, *brs*), 6.25 (1H, *d*,  $J = 16$  Hz), 6.87 (1H, *d*,  $J = 8$  Hz), 6.99 (1H, *dd*,  $J = 8, 2$  Hz), 7.09 (1H, *d*,  $J = 2$  Hz), 7.23-7.34 (5H, *m*), 7.57 (1H, *d*,  $J = 16$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  35.3, 65.2, 114.3, 115.2, 115.4, 122.4, 126.5, 127.3, 128.4, 128.8, 137.6, 143.7, 145.1, 146.3, 167.6; EIMS  $m/z$  (rel. int): 284  $[M]^+$  (21), 180 (100), 163 (44); HRMS: Calc. for  $C_{17}H_{16}O_4$ : 284.1048. Found: 284.1047. Anal. Calcd for  $C_{17}H_{16}O_4$ : C, 71.82; H, 5.67; O, 22.51. Found: C, 71.55; H, 5.60; O, 22.75.

### Determination of Free Radical-quenching Capacity

The free radical-quenching capacity of CAPE was tested by bleaching (at 517 nm) stable DPPH radical.<sup>6</sup> The reaction mixture contained in methanol (3 mL), DPPH (10 mM, 30  $\mu$ L) and CAPE (0.02-2 mM, 100  $\mu$ L) in DMSO. After 30 min at room temperature, distilled water (1 mL) and toluene (3 mL) were added and centrifuged. The absorbance of the upper phase was read at 517 nm against a blank without CAPE. The fraction of DPPH bleaching was calculated with the absorbance of DPPH solution containing only DMSO (100  $\mu$ L) as 0 %.

### Statistical Analysis

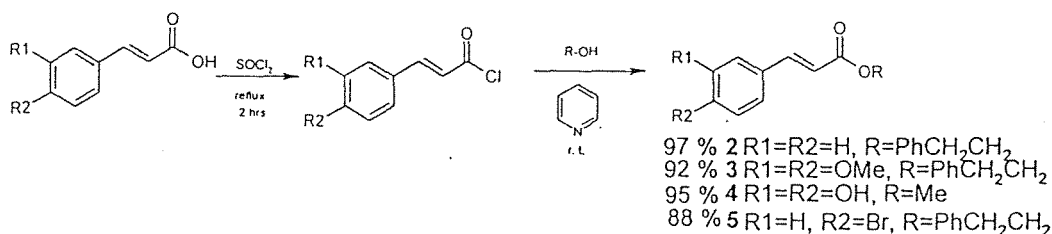
The results are reported as means  $\pm$  standard deviations. Statistical differences were analyzed according to Student's t-test; significant differences were established at  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

We chose pyridine-catalyzed esterification via acyl chlorides to afford the desired esters. In an earlier study of 4-esters of trimellitic anhydride reported by Puskas and Fields,<sup>7</sup> pyridine and acyl chloride were assembled as an intermediate adduct to accelerate the rate and yield of the reaction of alcohol with acid chloride. We describe the preparation of CAPE 1 and its derivatives by a practical route. In addition, biological tests indicate that CAPE 1 is a phenolic antioxidant.

At the outset of the project we examined the reactivity of acid chlorides with base catalysts. First, cinnamic acid was heated with excess thionyl chloride at reflux to afford the corresponding acid chloride, which upon reaction with a variety of alcohols in the presence of pyridine at room temperature provided the ester derivatives in high yield (Scheme 1).

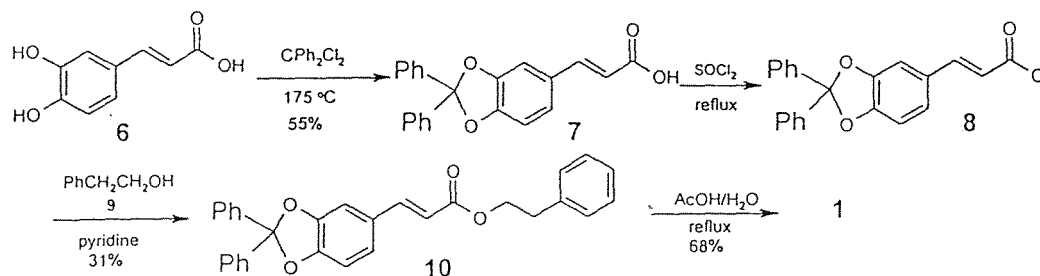
Scheme 1



We then sought to apply this strategy to the synthesis of CAPE 1. Caffeic acid was heated with excess thionyl chloride at 70 °C to afford the acid chloride. Unfortunately, the acid chloride was not transformed in pyridine catalyzed to CAPE 1. Different solvents such

as acetone, acetonitrile, methylene chloride, chloroform, benzene, THF, DMF, DMSO, and nitrobenzene were examined to find the optimum reaction conditions for this esterification. Examination of alternative base (triethyl amine and  $K_2CO_3$ ) catalysts, under most reaction conditions, resulted in acid chloride hydrolysis with recovery of caffeic acid in addition to other by-products upon work up. According to Puskas and Field's study,<sup>7</sup> phenolic groups in the presence of pyridine can react with the acyl chloride to produce an undesired self-esterification by-product. In addition, the free hydroxy groups of caffeic acid make this compound more hydrophilic than cinnamic acid and its bromo or methoxy substituted analogues. With the aim of developing a successful route to CAPE 1, an alternative method was examined (Scheme 2). The *o*-dihydroxy groups were first protected with diphenyldichloromethane to provide the more lipophilic acid 7. Subsequent treatment with thionyl chloride gave the acid chloride 8. The protected acid chloride 8 was directly reacted with alcohol 9 to produce the protected CAPE 10, which was then deprotected by heating under reflux in aqueous acetic acid to achieve the target, CAPE 1.

Scheme 2



At this point, other possibilities for preparing CAPE 1 were examined, such as sulphuric acid mediated esterification or DCC/DMAP esterification (Scheme 3). Under acid conditions, caffeic acid 6 and alcohol 9 were subjected to thermal esterification to obtain a trace amount of the desired ester 1. The esterification of caffeic acid with alcohol 9 in DCC/DMAP method provided the ester 1 in 46 % yield. Moreover, to our delight caffeic acid chloride and five equivalents of alcohol 9 in nitrobenzene at  $70^\circ C$  reacted smoothly over 2 hours to give the desired ester product in 50 % yield from the acid 6.  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra of the synthetic product were in agreement with those reported for the naturally derived material.<sup>1</sup>

It is worth noting that although the reactions described above can be regarded as straightforward, manipulations were sometimes difficult due to the reaction of dihydroxycinnamic acid chloride with atmospheric moisture. Also, excess phenethyl alcohol 9 increased the solubility of the acid chloride and provided more CAPE 1. The advantage of

Scheme 3

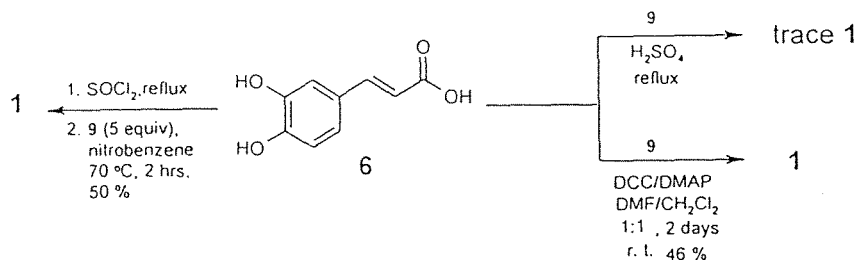


Table 1. Quenching Effect of CAPE on DPPH

Treatment <sup>a</sup>	Absorbance	% of DPPH bleaching <sup>b</sup>
Control (DMSO)	$1.51 \pm 0.02$	0.0
0.02 mM CAPE	$0.83 \pm 0.02$	44.8
0.2 mM CAPE	$0.42 \pm 0.02$	72.4
2 mM CAPE	$0.10 \pm 0.02$	93.4

<sup>a</sup> See reference 7.

<sup>b</sup> % of DPPH bleaching = [(absorbance of DMSO control - absorbance of CAPE test sample)  $\times$  100]/absorbance of DMSO control.

this esterification method is that the reaction can be accomplished in a relatively short time and afford only the desired product.

To investigate the antioxidant activity of CAPE, we employed the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) test. A decrease in absorbance indicates reduction of DPPH free radical concentration. This assay indicates that CAPE functions as a radical inhibitor, bleaching 93.4 % of DPPH at 2 mM (Table 1).

In conclusion, the structures of caffeic acid esters have been confirmed by total synthesis. A rapid route to CAPE 1 and its derivatives has been achieved. Furthermore, several strategies to accomplish this goal are provided. The esterification of phenolic acid described above serves as a cautionary lesson on the perils of esterification reactions. Finally, the DPPH test demonstrates that CAPE can quench the free radicals. Further biological assays are currently underway to evaluate the efficacy of these compounds as chemopreventive agents against HIV integrase.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

For financial support, we thank the National Science Council of the Republic of China

(Research Grant NSC 87-2113-M-040-001) and Chung Shan Medical and Dental College (CSMC 86-OM-A-014). We are grateful to Dr. Richard J. Mears for proof reading the manuscript.

## REFERENCES

1. Grunberger, D.; Banejee, R.; Eisinger, K.; Oltz, E. M.; Efros, L.; Caldwell, M.; Estevez, V.; Nakanishi, K. Preferential Cytotoxicity on Tumor Cells by Caffeic Acid Phenethyl Ester Isolated from Propolis. *Experientia* **1988**, *44*, 230-232.
2. Fesen, M. R.; Pommier, Y.; Leteurtre, F.; Hiroguchi, S.; Yung, J.; Kohn, K. Inhibition of HIV-1 Integrase by Flavones, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) and Related Compounds. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 595-608.
3. Rao, C.; Desai, D.; Kaul, B.; Amin, S.; Reddy, B. S. Effect of Caffeic Acid Esters on Carcinogen-induced Mutagenicity and Human Colon Adenocarcinoma Cell Growth. *Chem-Biol. Interactions* **1992**, *84*, 277-290.
4. Zhao, H.; Neamati, N.; Mazumder, A.; Sunder, S.; Pommier, Y.; Burke, T. R. Jr. Arylamide Inhibitors of HIV-1 Integrase. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1186-1194.
5. (a) Mirzoeva, O. K.; Sud'ina, G. F.; Pushkareva, M. A.; Korshunova, G. A.; Sumbatyan, N. V.; Varfolomeev, S. D. Lipophilic Derivatives of Caffeic Acid as Lipoxygenase Inhibitors with Antioxidant Properties. *Russ. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)* **1995**, *21*, 124-131. (b) Burke, T. R.; Fesen, M. R.; Mazumder, A.; Wang, J.; Carothers, A. M. Hydroxylated Aromatic Inhibitors of HIV-1 Integrase. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4171-4178. (c) Chen, J.-H.; Shao, Y.; Huang, M.-T.; Chin, C.-K.; Ho, C.-T. Inhibitory Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Human Leukemia HL-60 Cells. *Cancer Letters* **1996**, *108*, 211-214.
6. Ursini, F.; Maiorino, M.; Morazzoni, P.; Roveri, A.; Pifferi, G. A Novel Antioxidant Flavonoid (IdB 1031) Affecting Molecular Mechanisms of Cellular Activation. *Free Radical Biol. Med.* **1994**, *16*, 547-553.
7. Puskas, I.; Fields, E. K. 4-Esters of Trimellitic Anhydride. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.* **1970**, *9*, 403-407.