

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 中藥抑制蛋白質降解酶體活性之研究-石榴皮及蘇木

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC 98-2320-B-041-004-MY2

執行期間： 98 年08 月01 日至100 年07 月31 日

執行單位： 嘉南藥理科技大學 化粧品科技研究所

計畫主持人： 丁秀玉

計畫參與人員： 張翠玲、林志青、劉逸馨、邱怜瑋、  
鄭雅今、江百印

報告類型： 完整報告

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中華民國 100 年 10 月 21 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 中藥抑制蛋白質降解酶活性之研究-石榴皮及蘇木

### Studies on inhibition 26S proteasome activity- *Punica granatum* and *Caesalpinia sappan*

計畫類別： 個別型計畫       整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-041-004-MY2

執行期間：98年08月01日至100年07月31日

計畫主持人：丁秀玉

共同主持人：張翠玲

計畫參與人員：林志青，劉逸馨，邱怜璋，鄭雅今，江百印

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學 化粧品科技研究所

中 華 民 國      100      年      10      月      21      日

## 中文摘要

本計畫以三十種中藥進行抽取，將抽取物進行 26S 蛋白質降解酶活性之測試，發現中藥石榴皮及蘇木有明顯的抑制的效果。將石榴皮及蘇木以 95 % 乙醇進行抽取得到抽取物為 PGEtOH 及 SCEtOH，此二抽取物分別再以不同的有機溶媒進行分配萃取分別得到 PGH、PGM、PGB、PGW、SCH、SCM、SCB 及 SCW 八個部分，將此八個萃取質進行 26S 蛋白質降解酶活性之測試，由實驗研究的結果發現 PHM、PGB、PGW、SCM 及 SCB 對 26S 蛋白質降解酶活性有明顯抑制作用。

從中藥石榴的皮中分離出 7 個化合物及中藥蘇木的根部中分離出 14 個化合物，經光譜方法分析及與文獻比對後鑑定其化學結構式。其中發現化合物 Brazilein (SCEP-2) 有抑制 26S 蛋白質降解酶活性之作用，化合物 Sappanone A、Protosappanin C 及 Ursolic acid 對人類皮膚基底細胞癌具有毒性，以及化合物 Brazilein、5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavone、Sappanone A、Protosappanin C 及 Ursolic acid 對人類頭頸部鄰狀細胞癌具有細胞毒之活性。

關鍵詞：石榴皮；蘇木；26S 蛋白質降解酶；人類皮膚基底細胞癌；人類頭頸部鄰狀細胞癌

## 英文摘要

We screen 30 kinds of Chinese herbal medicine, *Punia granarum* and *Caesalpinia sappan* showed a significant inhibition on 26 S proteasome. Their *P. granarum* and *C. sappan* were extracted with 95% ethanol obtained as PGEtOH and SCEtOH, then with different polarity of the solvent extraction layer to give PGH, PHM, PGB, PGW, SCH, SCM, SCB and SCW, successively. We test the different polarity extraction layer of material on the inhibitory of 26S proteasome, the results of the experiment found that PHM, PGB, PGW, SCM and SCB on the inhibitory effect of 26S proteasome.

Seven compounds were isolated peel of *P. granarum* and the roots of *C. sappan* isolated fourteen compounds. Their structures were determined by spectroscopic methods and comparison with literature. The ability of Brazilein (SCEP-2) to inhibit 26S proteasome was investigated. The compounds, Sappanone A, Protosappanin C, and Ursolic acid shown inhibition human skin basal cell carcinoma and Brazilein, 5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavone, Sappanone A, Protosappanin C, and Ursolic acid inhibition human head and neck squamous cell carcinoma 9 cytotoxic activities.

**keywords :** *Punia granarum*; *Caesalpinia sappan*; 26S proteasome; human skin basal cell carcinoma; human head and neck squamous cell carcinoma 9

# 目 錄

中文摘要·····	I
英文摘要·····	II
目錄·····	III
一、前言·····	1
二、研究目的·····	2
三、文獻探討·····	3
四、研究方法·····	4
五、結果與討論·····	6
六、計畫成果自評·····	10
七、參考文獻·····	11

# 一、前言

癌症已成為台灣十大死亡之首，癌症即是惡性腫瘤，癌細胞持續生長而不受外在訊息調控，可能是原本失去活性之原癌基因被激活，將細胞導入到癌突變狀態，但主要還是因為一些與控制細胞分裂有關的蛋白質出現異常。將一個正常細胞轉化成一個惡性腫瘤細胞需要許多突變發生，或是基因轉譯為蛋白質的過程受到干擾。各個年齡層的人都有可能產生癌症，年紀越大得到癌症的機會也隨之增加。美國每年逝世的5個人當中有一人是因癌症致死，故癌症在已開發國家中已成為主要死亡原因之一。各國傳統醫學所用之藥物多取材於自然界，科學之進步使許多藥效成分被純化出來。

癌症有許多類型，而病症的嚴重程度取決於癌細胞所在部位以及惡性生長的程度，以及是否發生遠端轉移。醫生可以根據受檢查者的活體組織切片或經手術取得的組織，甚至是生物標記的含量做出診斷。一旦診斷確定，癌症通常以結合手術、藥物化療和放射療法的方式進行治療。隨著科學研究的進步，開發出許多針對特定類型癌症的藥物，也增進治療上的效果。如果癌症未經治療，通常最終結果將導致死亡。

化學合成新藥雖然主導了新藥研發數十年，但是新藥發現之靈感，仍常來自天然物成分之藥理研究。天然物中含有許多活性成分，能做為新藥研發之先導物，再經由化學、藥學與藥理之合作來開發新藥。

從中草藥石榴皮及蘇木發現有抗癌的作用，而石榴皮自古以來在古代臨床上之應用有治療急性細菌性痢疾、潰瘍性結腸炎、肛管直腸脫垂、燒傷、膿瘡、足癬感染、蟻蟲病及化膿性中耳炎等。現代石榴皮的藥理研究，石榴皮提取物具有抗菌、驅蟲、抗病毒、抗壓、抗氧化、抗癌、保肝、抗發炎及降低尿毒之作用等。目前石榴皮提取物或單一成分已用於治療高血糖、高血壓類病症及抗動脈粥樣硬化、抗癌、抗腫瘤等，也廣泛應用於抗氧化、抗衰老、改善更年期綜合症、皮膚美白等方面。現代蘇木之藥理研究，對心臟血管之作用、抑制中樞神經之作用、抗氧化作用、免疫作用、抗血小板作用、抗癌作用、抗黑色素瘤、治痛風、抗補體等。本研究希望對中草藥石榴皮及蘇木活性成分之結構、藥理、成分分類上，作詳盡之探討。

## 二、研究目的

蛋白酶體抑制劑能通過抑制蛋白酶體活性進而干擾和影響細胞原有的功能，尤其對腫瘤細胞生長有明顯的抑制作用。同時，利用蛋白酶體抑制劑改變蛋白酶體的酶切位點活性也成為免疫、炎症等研究的熱門重點。蛋白酶體的抑制劑可分為天然化合物和合成化合物兩類，合成化合物中以Bortezomib 和Ritonavir 是近年研究較多的一種蛋白酶體抑制劑。但在天然化合物之研究開發截至目前而言，可說少之又少。自然界中蘊含豐富中草藥之資源，是很值得被我們開發於蛋白酶體抑制劑對腫瘤治療具有良好的應用前景。我們從三十種中草藥的粗萃物中發現石榴皮及蘇木之實驗結果顯示出相當良好之效果，雖然上述石榴皮及蘇木之藥理作用之背景介紹中已有被學者研究有抗癌之作用，但目前尚未有針對抑制蛋白質降解酶體活性、人類皮膚基底細胞癌及人類頭頸部鱗狀細胞癌之研究，而且學者他們對這二種中藥在抗癌方面所得知結果大部分都是萃取物部分，並未研究到單一純的成分。故本計劃要進一步大量抽取及純化分離找出其真正的有效成分並鑑定其化學結構，之後將這些有效成分再進行作用機轉之探討，期望能從中開發出副作用低及強效治療癌症之藥物。

### 三、文獻探討

石榴皮的藥理研究，石榴皮提取物具有抗菌<sup>(1,2)</sup>、驅蟲<sup>(2)</sup>、抗病毒<sup>(3)</sup>、抗壓<sup>(4)</sup>、抗氧化<sup>(5-13)</sup>、抗癌<sup>(6,14-18)</sup>、保肝<sup>(19,20)</sup>、抗發炎<sup>(6,15,21)</sup>及降低尿毒<sup>(22)</sup>之作用等。目前石榴皮提取物或單一成分已用於治療高血糖、高血壓類病症及抗動脈粥樣硬化、抗癌、抗腫瘤等，也廣泛應用於抗氧化、抗衰老、改善更年期綜合症、皮膚美白等方面。石榴皮的化學成分之研究，石榴皮主要活性成分有鞣酸類、生物鹼類及黃酮類，鞣酸類最主要的為 Ellagic acid、Gallic acid、punicalagin、punicalin、granatin A、granatin B、gallaglydilactone、casuarinin、pedunculagin、tellimagrandin I、corilagin；生物鹼類有石榴鹼 (Pelletierine)、異石榴鹼 (Isopelletierine)、偽石榴鹼 (Pseudopelletierine)；黃酮類成分有 isoquercitrin、flavogallol、delphinidin-3,5-diglucoside、quercetin、kaempferol、luteolin、luteolin glycosides、naringenin。其他含 betulic acid、ursolic acid、Elaidic acid、mannitol、pectin、resins、wax 等。上述化合物分別被學者發表(ref.2, 20-13, 23-26)。

蘇木之藥理研究，對心臟血管之作用<sup>(27)</sup>、抑制中樞神經之作用<sup>(28)</sup>、抗氧化作用<sup>(29-32)</sup>、免疫作用<sup>(33)</sup>、抗血小板作用<sup>(34)</sup>、抗癌作用<sup>(35,36)</sup>、抗黑色素瘤<sup>(37)</sup>、治痛風<sup>(38)</sup>、抗補體<sup>(39)</sup>等。蘇木之化學成分之研究，心材含 brazilin、brazilein、sappanin、tetraacetyl brazilin、protosappanin A、4-O-methylsappanol、neosappanone A、4-O-methylepisappanol、sappanone B、3-deoxysappanone B、3'-deoxysappanone B、protosappanin B、protosappanin E、3'-O-methylsappanol、3'-O-methylepisappanol、3'-O-methylbrazilin、caesalpin J、sappanchalcone、7,30,40-trihydroxy-3-benzyl-2H-chromene、30-deoxy-4-methylsappanol、intracatinol、haematein、haematoxylin、a-l-phellandrene、1',4'-dihydro-spiro[benzofuran-3(2H),3'-[3H-2]benzopyran]-1',6',6',7'-tetrol、3[[4,5-dihydroxy-2(hydroxymethyl)phenyl]-methyl]-2,3-dihydro-3,6-benzofurandiol、ocimene、tannin 等。上述化合物分別被學者發表(ref. 29, 32, 34, 38-48)。

蛋白酶體的標記和抑制作用也被用於在實驗室中針對細胞中蛋白酶體活性所進行的“體內”(in vitro)和“體外”(in vivo)研究。實驗室中最常用的抑制劑為乳胞素(lactacystin)，一種由鏈黴菌合成的天然產物<sup>(49)</sup>。Eponemycin能以共價鍵方式結合到20S CP的 $\beta 5$ 、 $\beta 5i$ 和 $\beta 1i$ 亞單位，選擇性抑制蛋白水解酶活性，進而抑制ChTL活性。當Eponemycin濃度上升到50 nmol/L，也不抑制其他蛋白酶(caspain、組織蛋白酶B、木瓜蛋白酶、胰島素、糜蛋白酶)的活性<sup>(50)</sup>。最近我們從中草藥防風草之成分5,6,3',4'-tetrahydroxy-7-methoxyflavone及人參之成分ginsenoside Rd發現有明顯對蛋白酶體之抑制作用<sup>(51,52)</sup>。然而，天然中草藥針對蛋白酶體抑制劑之研究截至目前還是非常的少，相信全世界蘊藏豐富中草藥之資源是很值得開發的好前景。



## 四、研究方法

利用 26S 蛋白質降解體與癌症細胞之產生有關，若能抑制 26S 蛋白質降解體之作用則相對可抑制癌細胞之生長。另外，本計畫也對人類皮膚基底細胞癌(BCC)及人類頭頸部鄰狀細胞癌(SCC9)的細胞毒活性進行測試。而從我們三十種中草藥中篩選之石榴皮及蘇木發現有明顯的抑制 26S 蛋白質降解體之作用。中草藥石榴皮及蘇木活性成分之研究，乃依其生物活性為導向進行分離及純化。先以乙醇抽取，將抽取物用不同極性之溶媒多次分配萃取，並進行測試其細胞毒性作純化分離有效成分之方向。

### 5.1 中草藥石榴皮及蘇木之抽取

從中藥店購買石榴皮及蘇木各65斤，將此藥材才磨成粉末，再用95 %乙醇浸泡抽取(反覆5次)，經減壓濃縮去除所有抽取物中的95 %乙醇溶媒，之後取此抽取物(PGEtOH及SCEtOH)以不同有機溶媒進行分配萃取共得到PGH、PHM、PGB、PGW、SCH、SCM、SCB及SCW八個萃取層，進一步將此八個萃取物進行26S蛋白質降解酶活性之測試。

### 5.2 石榴皮及蘇木之分配萃取物及純化合物抑制26S 蛋白質降解酶體之測試

將上述各層之萃取物進一步進行抑制26S 蛋白質降解酶體之作用試驗。26S 蛋白質降解酶體測量：使用人工合成的胜肽鏈連接fluorometric reporter aminomethylcoumarin (AMC)來測量蛋白質降解體的活性。測量豬的26S 蛋白質降解體的3 種不同螢光胜肽的活性藉由1 $\mu$ l中藥或MG132 在30 mM Tris-HCl (pH 8)，5 mM MgCl<sub>2</sub>，1 mM ATP，0.5 mM DTT 和50  $\mu$ M Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC(似胰凝乳蛋白酶)，浸泡37 $^{\circ}$ C水浴15 分鐘。此次試驗的26S 蛋白質降解體的濃度是385 $\mu$ g/ml(或分子量2.4MDa 有160nM)。設定Bio Tek FL800 plate reader 吸光值360nm、透光值460nm、37 $^{\circ}$ C、15 分鐘，測量被胜肽水解出的AMC 的含量。蛋白質的濃度及活性表現的百分比由26S 蛋白質降解體加入1 $\mu$ l的DMSO 當對照標準。由實驗研究的結果發現PGM、PGB、PGW、SCM及SCB對26S蛋白質降解酶有抑制作用。

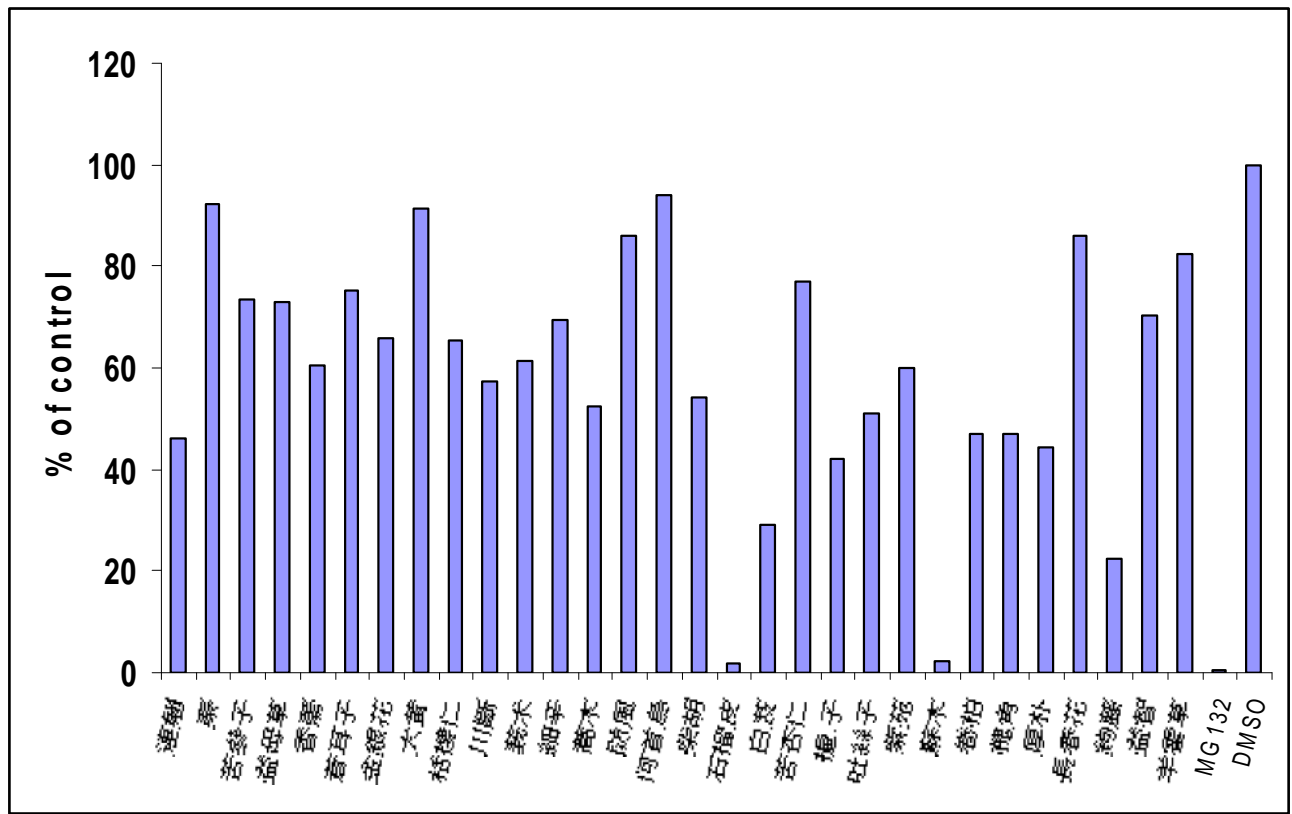
### 5.3 石榴皮及蘇木之純化合物對人類皮膚基底細胞癌(BCC)及人類頭頸部鄰狀細胞癌(SCC9)細胞毒性分析法

使用MTT 3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)試驗，檢測細胞毒性。MTT為黃色水溶液，活細胞內粒線體中琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase)可將MTT(tetrazolium)還原成不溶於水的紫色結晶(formazan)堆積於細胞中，再以DMSO將其完全溶解成紫色溶液，在570 nm下測其吸光值，顏色越深，細胞存活度越高。將 $1 \times 10^4$ /100  $\mu$ l之細胞數培養於96-well盤，置於37°C及5% CO<sub>2</sub>培養箱中培養24小時，加入欲檢測之各濃度的樣品，於37°C、5% CO<sub>2</sub>培養箱中分別反應72小時。達反應時間，移除培養液，PBS清洗後，更換新的培養液，加入10  $\mu$ l的MTT溶液反應後，於波長570 nm下測其吸光值(BioTek, Synergy™2, USA)。

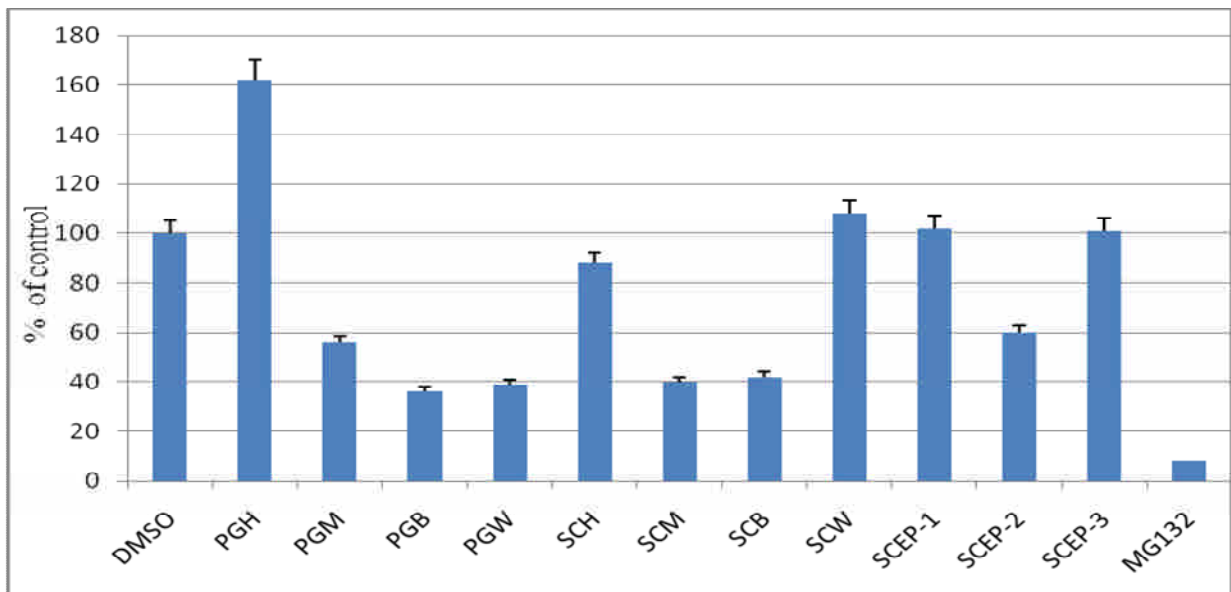
## 四、結果與討論

實驗證實惡性增殖細胞對蛋白酶體阻斷的敏感性比非腫瘤細胞更為強烈，如乳胞素(Lactacystin)對正常的淋巴細胞無明顯的作用。而蛋白酶體活性狀態對細胞執行不同的功能是非常重要的，因此蛋白酶體將成為影響細胞功能的重要藥物靶標，而其抑制劑有可能成為抗腫瘤的先導藥物。本計畫從三十種中草藥進行抽取，將抽取物進行 26S 蛋白質降解酶活性之測試，發現中藥石榴皮及蘇木有明顯的抑制的效果(如圖一所示)，將此二種藥材進行抽取及純化分離。將石榴皮及蘇木以 95 % 乙醇抽得 PGEtOH 及 SCEtOH，此二抽取物分別再以不同的有機溶媒進行粗分分別得到 PGH、PGM、PGB、PGW、SCH、SCM、SCB 及 SCW 八個部分，將此八個粗分物質進行 26S 蛋白質降解酶活性之測試，由實驗研究的結果發現 PGM、PGB、PGW、SCM 及 SCB 對 26S 蛋白質降解酶有抑制作用(如圖一所示)，其中 SCM 在進行有效成分之純化分離目前已發現 Brazilein (SCEP-2)有抑制蛋白質降解酶活性(如圖二所示)。若以此化合物 Brazilein 再進一步進行作用機制的探討，以期能成為蛋白質降解酶之抑制劑，繼續發展為抗腫瘤的先導藥物。

基底細胞癌 是皮膚癌最常見類型之一，又稱基底細胞上皮瘤、基底樣細胞瘤侵蝕性潰瘍等，是源於表皮基底細胞或毛囊外根鞘的上皮性低度惡性腫瘤。基底細胞癌是皮膚癌中的一種為人類最常見的惡性腫瘤，國外基底細胞癌占皮膚癌的50%~65%，中國皮膚癌中以鱗癌多見，與基底細胞癌的比例為5：1~10：1，從1971~1977年發病率增高18%每年有15萬~93萬新增病例。而鱗狀細胞癌主要是集中在鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、下咽癌及喉癌頭頸癌，主要是由上消化呼吸道的黏膜所長出來的癌症，因為覆蓋在這裡的上皮都是屬於鱗狀上皮，所以這裡所長出來的癌症，95%都源自鱗狀細胞上皮，其中疣狀癌（verrucous carcinoma）約佔7%，鱗狀細胞癌（squamous cell carcinoma）約佔93%。疣狀癌不會轉移至其他部位，治療上只要乾淨的切除腫瘤即可，但鱗狀細胞癌則會轉移至頸部淋巴結及遠隔轉移至肺、骨頭、頭頸部之外的皮膚、肝等。我們從石榴皮及蘇木二中藥中共分離出21個化合物，再進行對人類皮膚基底細胞癌(BCC)及人類頭頸部鄰狀細胞癌(SCC9)的細胞毒活性之測試，其結果我們發現Sappanone A、Protosappanin C及Ursolic acid 對人類皮膚基底細胞癌及人類頭頸部鄰狀細胞癌都有很好的毒性表現(如表一)，另外Brazilein及5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavone對人類頭頸部鄰狀細胞癌也具有明顯之毒性作用(如表一)。雖然在2005韓國的學者曾發表一篇蘇木在氣防萃取層可以抑制頭頸癌細胞之作用，但真正的化合物並沒有被知道，我們在本計畫中找到二個化合物Brazilein及5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavone對人類頭頸部鄰狀細胞癌都具有明顯的抑制作用。



圖一. 比較不同 10 mg/ml 的中藥及 100 $\mu$ M MG 132 在 26S 蛋白質降解體似胰凝乳蛋白酶的比例(26S 蛋白質降解體於 DMSO=100%)。



圖二、比較不同 1 mg/ml 的石榴皮及蘇木的萃取物和單一成分及 100 uM MG 132 在 26S 蛋白質降解體以胰凝乳蛋白酶的百分比 (26S 蛋白質降解體於 DMSO=100 %)

表一、石榴皮及蘇木之純化合物對人類皮膚基底細胞癌(BCC)及人類頭頸部鄰狀細胞癌(SCC9)的細胞毒活性之作用

Drug	Concentration	Cell viability (BCC)	Cell viability (SCC9)
Control		100.0 ± 6.5	100.0 ± 0.5
DMSO		100.0 ± 0.3	100.0 ± 1.2
Brazilein	10 µg/ml	91.6 ± 4.2	5.4 ± 0.5
	20 µg/ml	89.6 ± 1.2	4.9 ± 0.2
5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavone	10 µg/ml	89.1 ± 4.2	21.6 ± 0.3
	20 µg/ml	80.5 ± 4.4	14.9 ± 1.5
Sappanone A	10 µg/ml	18.1 ± 0.2	2.1 ± 0.0
	20 µg/ml	8.8 ± 1.0	3.6 ± 0.6
Protosappanin C	10 µg/ml	65.2 ± 0.1	3.4 ± 0.4
	20 µg/ml	27.2 ± 3.7	6.0 ± 0.3
Ursolic acid	10 µg/ml	67.9 ± 1.1	2.7 ± 0.1
	20 µg/ml	54.2 ± 7.2	3.4 ± 0.2

## 五、計畫成果自評

本計畫從三十種中藥中發現石榴皮及蘇木之抽取物對26S蛋白質降解酶活性有很好的抑制作用，進一步將此抽取物利用溶媒之極性大小分配萃取，發現有四個特別有效的部分為PGB、PGW、SCM及SCB以作為植物抽取新藥來開發。另外也要了解其真正有效結構為何？因此進行有效成分之純化分離為單一成分，其結果我們發現SCM部分的Brazilein (SCEP-2)單一成分有抑制26S蛋白質降解酶之作用，亦發現Sappanone A、Protosappanin C及Ursolic acid對人類皮膚基底細胞癌具有毒性，以及化合物Brazilein、5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavone、Sappanone A、Protosappanin C及Ursolic acid對人類頭頸部鄰狀細胞癌也具有明顯之毒性作用，更證明中草藥石榴皮及蘇木其深具開發潛力，以作為藥用資源開拓與新藥開發的參考。

## 六、參考文獻

1. Yang, L.; Zhou, B. Antibacterial activity of the tannin and flavonoid in *Punica granatum* L., *Shizhen Guoyi Guoyao*, **18**, 2335-2336, 2007.
2. Reddy, M. K.; Gupta, S. K.; Jacob, M. R.; Khan, S. I.; Ferreira, D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L., *Planta Medica*, **73**, 461-467, 2007.
3. Zhang, J.; Zhan, B.; Yao, X.; Gao, Y.; Shong, J. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital herpes virus in vitro., *China Journal of Chinese Materia Medica*, **20**, 556-558, 1995.
4. Corao, G. M.; Cova, J. A.; Perez, J. Antistress effect of the pericarp extract from *Punica granatum* L. in human peripheral blood mononuclear cells., *Ciencia*, **12**, 276-282, 2004.
5. Nishibaki, I.; Rajendran, P.; Venugopal, R.; Ekambaram, G.; Sakthisekaran, D.; Nishigaki, Y. Effect of extract of pomegranate (*Punica granatum* L.) on glycated protein-iron chelate-induced toxicity: an in vitro study on human umbilical-vein endothelial cells., *Journal of Health Science*, **54**, 441-449, 2008.
6. Pacheca, P.; Lisbeth, A.; Noratto, G.; Hingorani, L.; Talcott, S.; Stephen T.; Mertens, T.; Susanne, U. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 8434-8441, 2008.
7. Zhang, L. H.; Ling, L. L.; Yang X.; Zhang, Y. H. In vitro antioxidant activities of fruits and leaves of pomegranate., *Acta Horticulturae*, 31-34, 2008.
8. Sarkhosh, A.; Zamani, Z.; Fatahi, R.; Ghorbani, H.; Hadian, J. A review on medicinal characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.), *Faslnamah-i Giyahan-i Daruyi*, **6**, 13-24, 2007.
9. Sestili, P.; Martinelli, C.; Ricci, D.; Fraternali, D.; Bucchini, A.; Giamperi, L.; Curcio, R.; Piccoli, G.; Stocchi, V. Cytoprotective effect of preparations from various parts of *Punica granatum* L. fruits in oxidatively injured mammalian cells in comparison with their antioxidant capacity in cell free systems., *Pharmacological Research*, **56**, 18-26, 2007.
10. Cerda, B.; Llorach, R.; Ceron, J. J.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice., *Eur. J. Nutr.*, **42**, 18-28, 2003.
11. Seeram, N. P.; Adams, L. S.; Henning, S. M.; Niu, Y.; Zhang, Y.; Nair, M. G.; Heber, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice., *J. Nutr. Biochem.*, **16**, 360-367, 2005.
12. Aviram, M.; Rosenblatt, M.; Gaitani, D.; Nitecki, S.; Hoffman, A.; Dornfield, L.; Volkova, N.; Presser, D.; Attias, J.; Liker, H.; et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis (CAS) reduces common carotid intima-media thickness (IMT), blood pressure and LDL oxidation., *Clin. Nutr.*, **23**, 423-433, 2004.



13. Gil, G. I.; Tomas-Barberan, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A.; Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4581-4589, 2000.
14. Sartippour, M. R.; Seeram, N. P.; Rao, J. Y. U.; Moro, A.; Harris, D. M.; Henning, S. M.; Firouzi, A.; Rettig, M. B.; Aronson, W. J.; Pantuck, A. J.; Heber, David. Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer I vitro and in vivo., *International Journal of Oncology*, **32**, 475-480, 2008.
15. Abu, Z. M.; Afaq, F.; Syed, D. N.; Dreher, M.; Mukhtar, H. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract PoMx., *Photochemistry and Photobiology*, **83**, 882-888, 2007.
16. Song, B. H.; Tran, H. N. A.; Bae, S. Y. Pomegranate (*Punica granatum* L.) as resources of phytoestrogen and anticancer substances., *Hanguk Misaegmul-Saengmyongkong Hakhoechi*, **35**, 81-97, 2007.
17. Kim, N. D.; Mehta, R.; Yu, W.; Neeman, I.; Livney, T.; Amichay, A.; Poirier, D.; Nicholls, P.; Kirby, A.; Jiang, W.; Mansel, R. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum* ) for human breast cancer., *Breast Cancer Research and Treatment*, **71**, 203-217, 2002.
18. Adams, L. S.; Seeram, N. P.; Aggarwal, B. B.; Takada, Y.; Sand D.; Heber, D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 980-985, 2006.
19. Toklu, H. Z.; Dumlu, M. U.; Sehirli, O.; Ercan, F.; Gedik, N.; Gokmen, V.; Sener, G. Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **59**, 1287-1295, 2007.
20. Zhou, B. H.; Liu, C.; Wu, Y. Wu, Z. H.; Li, X. J.; Zhang, J. Protection of rat liver microsomal against lipid peroxidation by *Punica granatum* L. Extract., *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, **41**, 1864-1865, 2006.
21. Ahmed, S.; Wang, N.; Bin, H. B.; Cheruvu, V. K.; Haqqi, T. M. *Punica granatum* L. extract inhibits IL-1 $\beta$ -induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- $\kappa$  B in human chondrocytes in vitro., *Journal of Nutrition*, **135**, 2096-2102, 2005.
22. Yang, L.; Zhou, B.; Feng, Q.; Wang, H. Lowering uremic toxin level with tannin in *Punica granatum* L., *Zhongguo Yaofang*, **18**, 2345-2347, 2007.
23. Stomi, H.; Umemura, K.; Ueno, A.; Hatano, T.; Okuda, T.; Noro, T. Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L., *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **16**, 787-790, 1993.
24. Ben, N. N.; Ayed, M. Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel., *Z Lebensm Unters Forsch*, **203**, 374-378, 1996.
25. Cerda, B.; Ceron, J. J.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C. Repeated oral administration of high doses of pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3493-3501, 2003.

26. Chiangsu New Medical College, *Dictionary of Chinese Materia Medica*, Shanghai Scientific and Technological Publishing Co., pp 2782-2783, 1977.
27. Hu, C. M.; Kang, J. J.; Lee, C. C.; Li, C. H.; Liao, J. W.; Cheng, Y. W. Induction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin., *European Journal of Pharmacology*, **468**, 37-45, 2003.
28. Baek, N. I.; Jeon, S. G.; Ahn, E. M.; Hahn, J. T.; Bahn, J. H.; Jang, J. S.; Cho, S. W.; Park, J. K.; Choi, S. Y. Anticonvulsant compounds from the wood of *Caesalpinia sappan* L., *Archives of Pharmacol Research*, **23**, 344-348, 2000.
29. Hu, J.; Yan, X.; Wang, W.; Wu, H.; Hua, L.; Du, L. Antioxidant activity in vitro fo three constituents from *Caesalpinia sappan* L., *Tsinghua Science and Technology*, **13**, 474-479, 2008.
30. Choi, B. M.; Lee, J. A.; Gao, Shang S.; Eun, S.; Sang, Y.; Kim, Y. S.; Ryu, S. Y.; Choi, Y. H.; Park, R.; Kwon, D. Y.; Kim, B. R. Brazilin and the extract from *Caesalpinia sappan* L. protect oxidative injury through the expression of heme oxygenase-1., *BioFactors*, **30**, 149-157, 2007.
31. Kwon, H. J.; Jung, U.; Park, H. R.; Shin, D. H.; Jo, S. K. Effects of gamma irradiation on color chandes and antioxidative activities of *Caesalpinia sappan* L., *Han'guk Sikip'um Yongyang Kwahak Hoechi*, **36**, 1055-1061, 2007.
32. Safitri, R.; Tarigan, P.; Freisleben, H. J.; Rumampuk, R. J.; Murakami, A. Antioxidant activity in vitro of two aromatic compounds from *Caesalpinia sappan* L., *BioFactors*, **19**, 71-77, 2003.
33. Ye, M.; Xie, W. D.; Lei, F.; Meng, Z.; Zhao, Y. N.; Su, H.; Du, L. J. Brazilein, an important immunosuppressive component from *Caesalpinia sappan* L., *International Immunopharmacology*, **6**, 426-432, 2006.
34. Lee, G. C.; Chang, T. S.; Lee, K. S.; Khil, L. Y.; Kim, D.; Chung, J. H.; Kim, Y. C.; Lee, B. H.; Moon, C. H.; Moon, C. K. Antiplatelet activity of BRX-018, (6a*S*, *cis*)-malonic acid 3-acetoxy-6a9-bis-(2-methoxycarbonyl-acetoxy)-6, 6a, 7, 11b-tetrahydro-inden0[2,1-c]chromen-10-yl ester methylester., *Thrombosis Research*, **115**, 309-318, 2005.
35. Mar, W.; Lee, H. T.; Je, K. H.; Choi, H. Y.; Seo, E. K. A DNA strand-nicking principle of a higher plant, *Caesalpinia sappan*., *Archives of Pharmacol Reseaarch*, **26**, 147-150, 2003.
36. Kim, E. C.; Hwang, Y. S.; Lee, H. J.; Lee, S. K.; Park, M. H.; Jeon, B. H.; Jeon, C. D.; Lee, S. K.; Yu, H. H.; You, Y. O. *Caesalpinia sappan* induces cell death by increasing the expression of p53 and p21 WAF1/CIP1 in head and neck cancer cells., *The American journal of Chinese medicine*, **33**, 405-414, 2005.
37. Chun, H. J.; Hwang, S. G.; Jeong, D. H.; Baek, S. H.; Jeon, B. H.; Woo, W. H. Butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. redulated melanogenesis in B16/F10 melanoma cells., *Yakhak Hoechi*, **46**, 137-142, 2002.
38. Nguyen, M. T. T.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Tran, Q. L.; Kadota, S. Neosappanone A, a xanthine oxidase (XO) inhibitory dimeric methanodibenzoxocinone with a new carbon skeleton from *Caesalpinia sappan*., *Tetrahedron Letters*, **45**, 8519-8522, 2004.

39. Oh, S. R.; Kim, D. S.; Lee, I. S.; Jung K. J.; Lee, J. J.; Lee, H. K.; Anticomplementary activity of constituents from heartwood of *Caesalpinia sappan*. *Planta Medica*, **64**, 456-458, 1998.
40. Zhao, H.; Bai, H.; Wang, Y.; Li, W.; Koike, K. A new homoisoflavan from *Caesalpinia sappan*., *Journal of Natural Medicines*, **62**, 325-327, 2008.
41. Miyagaki, T.; Yamauchi, S.; Koga, N.; Shirane, F. Color reactions between an extracted solution of *Caesalpinia sappan* L. and various metal ions., *Kagaku to Kyoiku*, **51**, 122-125, 2003.
42. Xu, H.; Zhou, Z.; Yang, J. Chemical constituents of *Caesalpinia sappan* L., *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **19**, 485-486, 1994.
43. Namikoshi, M.; Saitoh, T. Homoisoflavonoids and related compounds. IV. Absolute configurations of homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* L., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **35**, 3597-3602, 1987.
44. Namikoshi, M.; Nakata, H.; Saitoh, T. Homoisoflavonoids and related compounds. V. A novel dibenzoxocin derivative from *Caesalpinia sappan* L., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **35**, 3615-3619, 1987.
45. Namikoshi, M.; Nakata, H.; Yamada, H.; Nagai, M.; Saitoh, T. Homoisoflavonoids and related compounds. II. Isolation and absolute configurations of 3,4-dihydroxylated homoisoflavans and brazilins from *Caesalpinia sappan* L., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **35**, 2761-2773, 1987.
46. Miyahana, K.; Kawasaki, T.; Kinjo, J.; Shimokawa, T.; Yamahara, J.; Yamasaki, M.; Harano, K.; Nohara, T. The x-ray analysis of caesalpin J from *sappan* lignum., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **34**, 4166-4169, 1986.
47. Nagai, M.; Nagumo, S.; Eguchi, I.; Lee, S. M.; Suzuki, T. Sappanchalone from *Caesalpinia sappan* L., the proposed biosynthetic precursor of brazilin., *Yakugaku Zasshi*, **104**, 935-938, 1984.
48. Xu, H.; Zhou, Z. H.; Yang, J. S. Compounds from *Caesalpinia sappan* L., *China Journal of Chinese Materia Medica*, **19**, 485-486, 1994.
49. Skata, N. ; Dixon, J. L. Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of apolipoprotein B100 in vitro [J]., *Biochem Biophys Acta*, **1437**, 71-79, 1999.
50. Julian, A. The proteasome: A suitable antineoplastic target., *Cancer*, **24**, 349-360, 2004.
51. Chang, T.L.; Ding, H. Y.; Teng K. N.; Fang Y. C. 5,6,3',4'-Tetrahydroxy-7-methoxyflavone as a novel potential proteasome inhibitor., *Planta Med.*, **76**, 1-8, 2010.
52. Chang, T.L.; Ding, H. Y.; Kao, Y.W. Role of ginsenoside Rd in inhibiting 26S proteasome activity., *J Agric Food Chem.*, **56**, 12011-12015, 2008.