

# 黃鹼素對人類

## 雌性激素

### 生成的抑制作用

#### ***Inhibition of Human Estrogen Synthetase by Flavones***

林永仁譯

[摘要] 研究發現，有些天然的或合成的黃鹼素對Androstenedione和Testosterone轉換成雌性激素的過程發生抑制作用。催化這個過程的生成酶，存在於胎盤和卵巢的微粒體中。這些黃鹼素按其抑制能力由強到弱分別是：7,8-Benzoflavone, Chrysin, Apigenin, Flavone, Flavanone以及Quercetin而5,6-Benzoflavone並無抑制作用。7,8-Benzoflavone和Chrysin是頗具競爭性的抑制劑，能使Cytochrome P-450這種生成酶的光學結構發生改變。黃鹼素能抑制固醇類與單氧酶的彼此作用，因而改變固醇荷爾蒙的代謝。



[正文] 黃鹼素類是 2-phenyl-1,4-benzopyrone 的衍生物，在植物界裏普遍都可以找到。我們的食物中也有，它可以用來當藥或作為食品添加物。天然的黃鹼素類所扮演的生理角色尙未明瞭，不過有人宣稱它有抗氧化、抗菌、和抗病毒的效能。至於合成的黃鹼素類，例如 5,6-benzoflavone 和 7,8-benzoflavone 也相當引人感興趣。它們能改變多環的芳香化合物以及 Xenobiotics 的代謝，如此改變其毒性和致癌性。5,6-benzoflavone 間接誘導特定的 cytochrome P-450 異構 (Isozymes) 生成。7,8-benzoflavone 則直接影響肝中的 P-benzoflavone 的用量而改變。也隨所選動物的 enzyme 和 isozyme 而有不同試驗結果。有人改以天然的黃鹼素類作實驗，也得到類似現象。然而在體內所做的實驗，對於黃鹼素的活性，以及何以選擇性地作用於特定的異構上，還是不清楚。

最近我們選幾個黃鹼素類作實驗，研究對雌性激素生成的影響。在此我們指出，其中有幾種黃鹼素可以抑制 androstenedione 轉變成 estrone 轉换成 estradiol 雌性激素生成的活性，可以由卵巢或胎盤中的微粒體來測定。試樣可由胎衣或未停經女人的卵巢取得。我們可以從 [1,2-<sup>3</sup>H] androstenedione 或 [1,2-<sup>3</sup>H] testosterone 所釋放出來的來測定活性。的受質和抑制劑由 stock solution 加到酒精裏。控制反應的速率至少有八分鐘成直線，而且與所加的微粒體蛋白的量成正比。在有黃鹼素之類的抑制劑存在下，時間的作圖也是成一直線，這說明抑制劑在分析的時候沒有代謝成活性更大或更小的型態。

圖(一)顯示三種黃鹼素與胎盤的所作的劑量反應曲線。我們選用 40 nm 的 androstenedione 當的受質，發現三種黃鹼素的一半抑制量 [I<sub>50</sub>] 的濃度分別是：flavone 為 8 μm，7,8-benzoflavone 為 0.07 μm，而 5,6-benzoflavone 使用到 100 μm 也無作用。對 flavone 和 7,8-benzoflavone 來說，所做的數據很符合在可逆的、非協同鍵結所形成的抑制劑——錯合物的假設下所得的曲線。用同樣的這些黃鹼素衍生物對人卵巢的作實驗，也得到類似的結果，這說明了不單單只對胎盤的作用。

其他幾種黃鹼素也拿來與胎盤微粒體作分析，並測定 testosterone 和 androstendione 的轉化。在表(一)幾個與 flavone 相關的其他黃鹼素，其強度在 testosterone 其強度在 testosterone 與 androstendione 都很接近。沒有一種黃鹼素會促進的活性。顯然黃鹼素對雌性激素生成的影響遠不如對肝中單氧那樣複雜，後者是屬於促進與抑制混合的作用。

7,8-benzoflavone 是效果最大的抑制劑，差不多有 aminoglutethimide 十倍強之多。也是我們所知道的非固醇類中雌性激素生成抑制劑最強的。從 7,8-benzoflavone 對受質的 I<sub>50</sub> 來看，7,8-benzoflavone 與胎盤中的生成的結合具有對 androstenedione 的一半，僅僅比對 testosterone 略高。它結合的強度約可比兩種固醇類生成抑制劑：1,4,6-androstatriene-3,17-dione 和 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione 據我們分析這兩種固醇類的生成 I<sub>50</sub> 濃度分別為 0.08 和 0.05 μm。



Fig 1. 以人類胎盤的微粒體為材料，黃鹼素  
androstenedione 轉化的劑量反應曲線。1 毫  
克的反應混合物中含 0.04  $\mu\text{M}$  的 androstened-  
ione, 0.1 mg 的蛋白質, 2.5 mM 的 glucose -  
6-Phosphate 和 0.25 單位的 glucose - 6 -

Phosphate 去氫 以及 100  $\mu\text{M}$  的 NADPH 在 0.05  
M 的 酸鈉中。在 37° C 下保溫 6 分鐘。控制活性  
在每分每毫克蛋白質下有 16 Pmol。這是我們設定  
 $I_{50}$  為 0.07, 8 和 500  $\mu\text{M}$  所得的曲線。

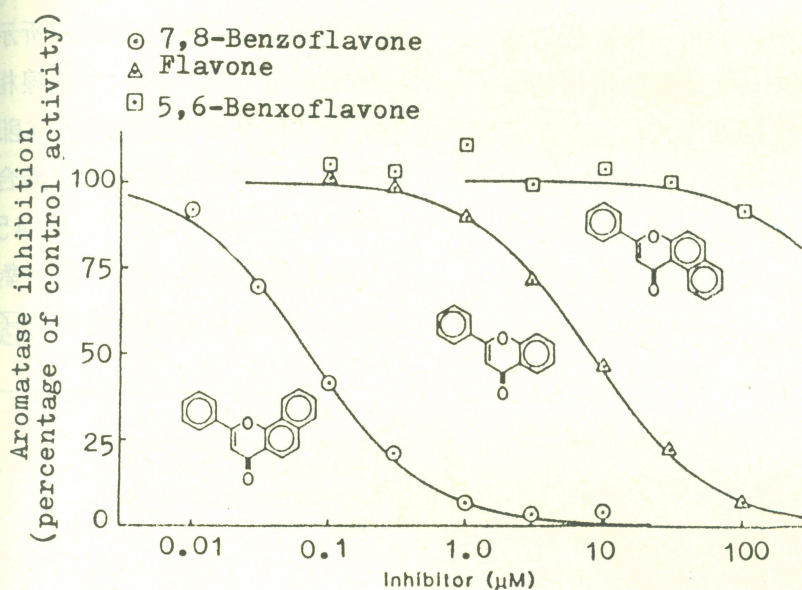


Table 1. Inhibition of human placental aromatase by flavones.

Compound	Substrate			
	Androstenedione (40 nM)		Testosterone (80 nM)	
	$I_{50}$	Relative potency	$I_{50}$	Relative potency
7,8-Benzoflavone	0.07	114	0.06	83
Chrysin	0.5	16	0.4	13
Apigenin	1.2	6.7	1	5
Flavone	8	1	5	1
Flavanone	8	1	5	1
Quercetin	12	0.67	10	0.5
5,6-Benzoflavone	>200	<0.04	>200	<0.04



我們可由各種不同濃度的受質和抑制劑的動力分析來研究抑制作用的機轉。圖(2)顯示 7,8-benzoflavone 是 androstenedione 的競爭性抑制劑，其抑制常數  $K_2$  約為 androstenedione 的  $K_m$  值的兩倍。在另一個對 testosterone 所做的實驗，我們得到值為 23 nM 而 testosterone 的  $K_m$  值為 80 nM。黃鹼素抑制劑中第二個較強的為 chrysin，它對 androstenedione 作實驗所得的  $K_2$  值為 0.26  $\mu\text{M}$  也是屬於競爭性抑制劑。

動力分析暗示黃鹼素抑制 androstenedione 和 testosterone 的轉化的方法可能是與受質部位結合。為研究這個可能性，我們監視黃鹼素對影響的吸收光譜。先前研究 7,8-benzoflavone

對肝微粒體 Lytochrome P 450 的影響顯示導「第一型」異型光譜，其特徵是 heme-iron 低旋狀態變成高旋狀態。當 7,8-benzoflavone 加到胎盤的微粒體中或生成的製備溶液，結果並無光學變化。然而，要是試樣先與 androstenedione 平衡，加入 7,8-benzoflavone 就會有異光譜出現，如圖三所示。這些曲線與所造成的「第一型」的曲線相反，heme-iron 由高旋狀態變成低旋狀態，亦即 androstenedione 發生取代。會有低旋狀態的錯合物產生，表示 7,8-benzoflavone 與生成 P-450 的作用不同於肝中微粒體細胞色素的作用。對生成的低旋狀態而言，可能表示有垂直的配位子接在 heme-

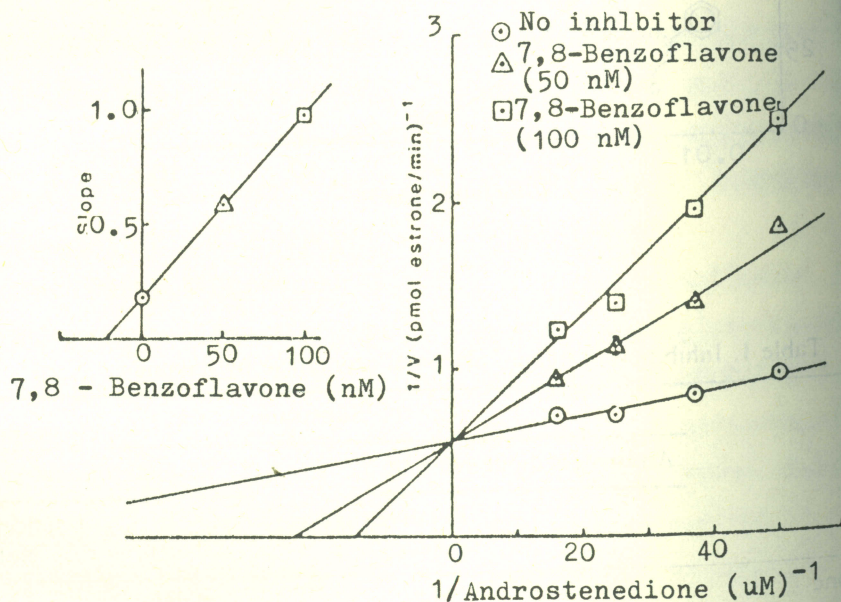


Fig 2. 為 7,8-benzoflavone 對生成抑制機轉的動力分析圖。右圖為濃度倒數對速率  $V$  倒數的作圖。左圖為斜率對濃度的作圖，根據 Fig. 1 而來。



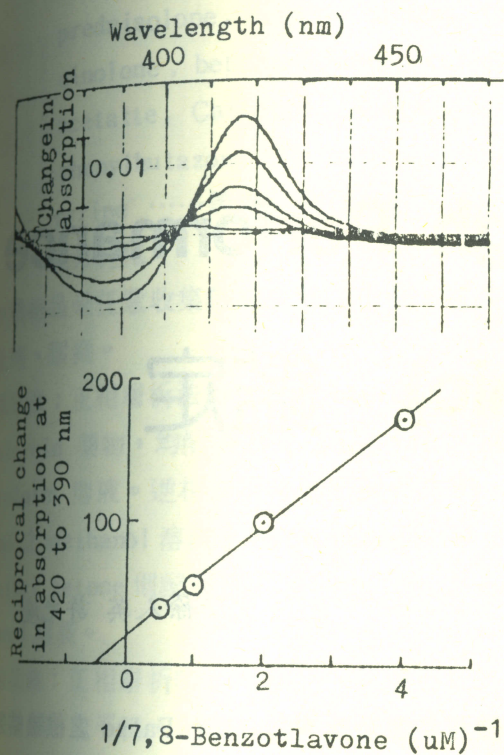


Fig. 3 為 7,8 - benzoflavone 與生成 結合所產生的不同的吸收光譜。連續加入 0.25, 0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{M}$  的 7,8 - benzoflavone 後的效應也表明出來。我們用 Sodium cholate 來抽取胎盤中的微粒體抽取量為每毫克蛋白質含 1.0 毫克。在  $10^{-6}\text{M}$  的 androstenedione 存在的情況下。用 60% 的飽和硫酸胺鹽析收集 並對 0.05 M 的 酸鈉作分析。用來作基線光譜的試樣內含 0.05  $\mu\text{M}$  的對照成份，和 3- $\mu\text{l}$  份的 7,8 - benzoflavone 蛋白質的濃度為 0.6  $\mu\text{M}$ 。cytochrome P-450 的濃度為 0.6  $\mu\text{M}$ 。

上。配位子可能為胺基酸或者是 7,8 - benzoflavone 的醚或 的氧原子。

滴定曲線顯示只有一種的鍵結部位，其鍵結常數為 2.0  $\mu\text{M}$ 。這個光解常數比 7,8 - benzoflavone 本身的分解常數還大，原因是 7,8 - benzoflavone 與 androstenedione 一起競爭生成。我們將反轉型的「第一型」的光譜變化視為（生成 - 7,8 - benzoflavone）錯合物存在的證據。可能就是形成這種錯合物，才引發 的抑制作用。假如試樣改成先以 testosterone 平衡或 7,8 - benzoflavone 換為 Chrysin 也會得到類似異光譜。

黃鹼素與生成 的二種型態的交互作用會導致與 androgen 受質的競爭性結合。黃鹼素可能單純地直接競爭生成 的受質部位，雖然其結構不同於固醇類會表現出雌性激素接受器相結合的結果。也有可能生成 遠端的部位可以跟黃鹼素嵌合。嵌合會改變生成 的 conformation 因而降低 與受質的結合能力。在學理上這種調節性部位的作用，也可能是增加 的活性，譬如由肝中的單氧 所觀察到的。目前我們還不太可能區別這些機轉。有賴於結構活性的進一步研究。

雌性激素對於生殖、發育、和行為有深遠的影響。在我們的食物中和治療藥品裏以及對動物作試驗的效應等都有人做過實驗。目前我們身體裏面到底有何影響，這需要進一步探討。