

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

含鄰-及對-二氫氧苯基化合物的氧化還原角色

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC89 - 2113 - M - 038 - 002 -

執行期間：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳建志

共同主持人：鄧文炳

計畫參與人員：賴育任、李曉暉、劉嘉琪

執行單位：臺北醫學大學

中 華 民 國 89 年 10 月 1 日

前言

我們實驗室先前曾測試某些具有酚類結構(phenolic structure)的化合物，對氧化壓力的抗氧化及細胞保護的能力。例如，tannic acid 及它的代謝物表現出很好的抗 Xanthine / Xanthine oxidase 所滋生的自由基(Superoxide anion)。其中，Pyrogallol 是單寧酸的代謝物，具有自體氧化及氫氧自由基清除者等雙重能力。結構活性的研究指出 trihydroxyl benzene 可能是氧化還原反應所必須。以及抗腫瘤藥物 5-Fluorouracil 在氫氧自由基的環境下，可降低其所造成對 DNA 與脂質等大分子物質的傷害。而後，我們將探討構造限制在 ortho- 或 para-dihydroxybenzyl group 的氧化還原角色。因此本論文以 catechol- (ortho-) estrogen 為主，探討其結構在氧化壓力下的自由基產生或自由基清除活性。

Estrogen 及其代謝物 Catechol-estrogen

Estrogen 在人體的主要來源組織是葛式濾泡(grafiaa follicles)、黃體(corpus luteum)及胎盤(placenta)。在生理上的功能主要是調控生殖系統的進行及乳房的生長發育，並促進子宮內膜的增生及子宮平滑肌的收縮。除了內生性之外，含 estrogen 成分口服避孕藥(oral contraceptive drugs)或 estrogen replacement therapy 已被廣泛的使用。estrogen 的代謝包含 oxidative metabolism(hydroxylation 為主要)、glucuronidation、sulfonation 及 o-methylation，主要在肝臟的 cytochrome P450 催化下反應。2-hydroxyestrogen、4-hydroxyestrogen 是 estrogen 的 hydroxylation 主產物。

Estrogen 在導致癌症發生的角色上可藉由 receptor-mediated processes 去刺激增生，或產生 electrophilic species 與 DNA 共價鍵結起始 cancer(Nandi, S., 1995)(Liehr, J. G., 1990)(Dwivedy, I., 1992)。標的組織及細胞在延長暴露於高 estrogen 的情況下會提高 breast cancer 的發生率(Bernstein, L., 1993)，儘管

estrodial 可以刺激癌細胞的增生並提高基因的不穩定性，但是有些 estrodial 的代謝產物的效果更強(Preston, M. S., 1990)(Paquette, B., 1996)。例如 4-hydroxy-estrodial 在倉鼠腎臟腫瘤模型下是一個強的致癌活性物(Li, J. J.,1987) (Liehr, J. G.,1986)，但是 2-hydroxyestrodial 以及 2-hydroxy estrone 缺乏致癌活性，可能因為 4-hydroxyestrodial 比起來有更好的 O-methylation 的代謝速率(Li, S. A., 1989) (Roy. D., 1990)，而 4-hydroxyestrodial 介於 hydroquinone 及 quinone 之間的氧化還原循環產生自由基，並直接或間接造成 DNA 損傷(Liehr, J. G., 1999)。

Estrogen 在更年期後婦女的給予上有明顯的心血管保護效果，流行病學上的證據強烈指出使用 Estrogen 後對心血管疾病死亡率的減少，在更年期後婦女的 estrogen 使用對缺血性心臟病及冠狀動脈疾病的死亡，顯現出有 50 % 的減少。縱然 estrogen 對於心血管保護的實際機制並不清楚，但 estrogen 對脂蛋白的改變和抗氧化活性等機轉在最近被指出並探討。Estrogen 於停經後婦女使用上被發現可降低 LDL 的值並升高 HDL 的濃度，而根據許多研究顯示，氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 的累積在粥狀動脈硬化的成因扮演重要角色，LDL 的氧化主要發生於表面磷脂質及脂蛋白核心的膽固醇之脂質過氧化反應，被氧化的 LDL，因為 Apo-B 中的離胺酸(Lysine)及組氨酸(Histidine)等正電荷胺基酸被氧化而導致正電荷減少，被氧化的 LDL 不在為 LDL 受體(Receptor) 辨認而被視為外來物，因此容易被巨噬細胞(Macrophage)吞噬，以致形成泡沫細胞(Foam cell)，最後因細胞死亡釋放大量脂質及 ox- LDL，行成脂肪斑(Fatty streak)，為早期粥狀動脈硬化之現象。但研究指出對於冠狀動脈疾病的影響僅能減少 25 % 至 50 %。而 Estrogen 在化學結構上(酚類結構 phenolic structure)可和金屬反應，捐贈一個 H⁺ 原子形成酚類自由基，因此 estrogen 的自由機清除能力的影響可能由調控過氧化進行的早期。有研究指出 estrodial 在 LDL 過氧化和 α -tocopherol、 β -carotene 比較，有更好的抗氧化能力(Stacey, A., 1996, 1998)。這或許可以解釋停經後婦女 Estrogen 的給予對心血管的保護效果，但 Estrogen 對於自由基清除和抗氧化能力的機制還不清楚，而且需要謹慎的去研究探討，因為

Estrogen 雖然可以降低心血管疾病但也會提高乳癌發生的危險。

自由基定義與生物傷害

自由基(free radical)是指任何在電子軌域上具有不成對電子的分子或原子。因其半衰期非常短，約在 10^{-2} ~ 10^{-9} 秒之間，其極不穩定 (Karnovsky, 1994)。在需氧細胞中，主要的自由基種類為活性氧分子 (Reactive oxygen species; ROS)，即泛指以氧為中心的自由基與代謝產物，其包括：過氧化氫(H_2O_2)、超氧自由基 (O_2^-)、氫氧自由基 (OH) (Punchard and Kelly, 1996)。活性氧分子具有高度反應能力，可攻擊生物體內巨分子物質，如 DNA、RNA、蛋白質、脂質、醣類與酵素等，造成細胞或組織的傷害，而若無法透過修復或重新合成來恢復此傷害，將引發老化、疾病、癌症等發生 (Fig. 1) (Poli et al., 1993)。

活性氧分子攻擊 DNA，可能造成對嘌呤 (purine) 及嘧啶(pyrimidine) 鹼基做化學修飾 (Dizaroglu, 1991; Shigenaga, & Ames, 1991)，DNA 單股或雙股斷裂、DNA 與 DNA 相互連接、以及 DNA 與鄰近的蛋白質分子相互連接。例如：鳥糞嘌呤 (guanine)受到 OH 攻擊，會形成 8-hydroxyguanine (8-OHdG)，進而影響 DNA 複製中，G T 錯誤配對 (Cheng et al., 1992)。DNA 結構的改變，造成突變 (Kunchino, Y., 1987; Shibutani, S., 1991) (Cheng, K.C, 1992)，甚而造成細胞凋亡 (apoptosis) (Buttke, 1994)、或癌化等 (Satoh, 1998; Peterhans, 1997; Umezawa, 1997)。

活性氧分子也會損害蛋白質，藉由胺基酸側鏈的氧化修飾作用、活性氧造成 peptide 斷裂、或與脂質及碳水化合物氧化產物反應等，造成蛋白質氧化及羰基化 (carbonylation); 因而使蛋白質相互聯結 (cross linkage) 分解 變性 (denature) 而失去活性 (Buttke, 1994)。細胞膜的組成與生理狀態非常重要，關係著細胞膜相關酵素與細胞表面受體 (receptor) 的形成，參與二級訊息與細胞傳導系統。而活性氧分子會和細胞膜上的多元不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid;

PUFA) 反應產生脂質過氧化 (lipid peroxidation), 而形成脂質自由基, 脂質自由基與氧反應生成過氧化自由基 (peroxyl radicals; ROO[•]) 與過氧化氫 (hydrogen peroxide); 而過氧化自由基可以再去攻擊多元不飽和脂肪酸(PUFA), 而造成連鎖反應, 此反應最終的產物為丙二醛(malonyldialdehyde; MDA) 等脂質過氧產物其有害的醛類, 進而導致細胞膜通透性改變或細胞表面受體與細胞膜結合降低, 而損害細胞膜(Barber and Bernheim, 1967)。脂質過氧化物也會與體內的蛋白質、酵素、核酸作用, 造成細胞變性, 甚而造成細胞死亡(Shimasaki et al., 1995)。

研究中證實氧自由基可致細胞損傷 (cell injury) 與細胞死亡 (cell death)之調節者, 其不僅與老化過程(aging process)有關, 並直接或間接地與許多疾病相關 (Fig 2), 包含缺血後灌流(ischemia reperfusion)、癌症(Knight, 1995)、類風濕性關節炎(Chapman, M. L., 1989) 阿滋海默症(Smith, C. D., 1991) (Gladstone, I. M., 1994)、帕森氏症(Yoritaka, A., 1996)、動脈粥狀硬化(Uchida, K., 1994)。

氫氧自由基

活性氧分子(ROS)中, 以氫氧自由基具有較其他活性氧分子高的反應性, 並為內生性氧化壓力的主要來源 (Jean. C., 1999)。在需氧細胞的代謝過程中, 超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 與過氧化氫 (H_2O_2) 生成; 過多的生成會導致有機體內單股及雙股 DNA 斷裂或修飾 DNA 鹼基, 進而造成 DNA 損傷。超氧自由基與過氧化氫皆可能導致有機體突變或癌化。在有機體內, 超氧自由基與過氧化氫的毒性來自於其經由鐵離子的催化變成高度反應性氫氧自由基(Miral, 1991)。

鐵是存於人體內各種過渡金屬元素中最的一個, 成年人身體中鐵的平均含量為 4-5 克 (Wriggleworth, 1980)。在 1894 年, Fenton 等人提出鐵離子與過氧化氫反應後會產生自由基, 引出鐵離子的氧化還原能力與各種活性氧分子產生有非常密切的關係 (Fenton, 1894)。而後發現氫氧自由基 ($\cdot OH$) 為此反應中具強

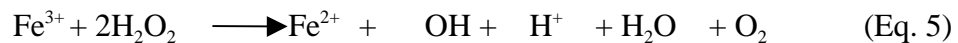
氧化能力的物質 (Haber, 1934) , 因而導出 Fenton reaction (Eq. 1)。



Gutteridge 與 Bannister 發現 Fe^{3+} -EDTA 與 H_2O_2 作用, 會產生氫氧自由基 (OH \cdot)。 (Eq 2, 3, 4, 5) (Okezie I. Aruoma, , 1989)。



總反應式為



過去的研究中, 此種過渡金屬元素與氧暴露在光照下, 亦可產生含氧自由基, 造成去氧核糖核酸的斷裂 (Ehrenfled, 1987; Tan, 1992; Stubb, 1987)。然而, 超氧自由基 (O_2^-) 會催化 O_2 產生 OH^- , 促使脂質過氧化 (lipid peroxidation) (Floyd, 1990)。

肆、 研究目的與方針

氫氧自由基具有高度反應能力, 可攻擊生物體內物質, 造成細胞或組織的傷害中。故氫氧自由基的產生及存在, 使環境變得不安定, 而生物環境中的大小分子都可能成為自由基攻擊的目標。大分子如蛋白質、脂質、醣類、核酸都因而變性或突變, 小分子結構則會受到修飾。因此本篇論文探討氫氧自由基導致 Estrogen 的結構改變之生化分析及不同 Estrogen 在結構上的不同其氧化還原角色上清除自由基能力的差異性。

材料與方法

藥品

Estrone (E1)、 \hat{A} -estradiol(E2)、2-hydroxyestrodinol(2oh-E2)、4-hydroxyestrodinol (4oh- E2)、4-hydroxyestrone(4oh-E1)、Ferrous Sulfate、linoleic acid、Trizma-HCl、potassium chloride、sarkosyl、thiobarbituric acid、butanol、Ampicillin、phenol/CHCl₃、Isopopanor 購買自 Sigma 公司；Hydrogen Peroxide 購買自島丸 (Shimakyu) 公司；pBR322 質體經由 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 純化而得。

壹、去氧核醣核酸的傷害

pBR322 的質體轉型

取 5 μ l plasmid DNA 與 100 μ l competent cell 混合後於冰上靜置 30 分鐘，再移至 37 $^{\circ}$ C 振盪 2 分鐘。然後於冰上靜置 5 分鐘。取此菌液塗抹於含 Ampicillin 的培養基上，於 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養後，觀察有無轉型菌株生成 (Sambrook, 1989)。

質體 DNA 的微量製備

挑取 Ampicillin plate 上之單一菌落 (pBR322 transfected cell)，於 3 ml LB medium (含 40 μ g/ml Ampicillin) 中，隔夜培養後，置於 15 ml 離心管中，離心 3,000 rpm 10 分鐘，去上清液，將沉澱物分裝 1.5 ml 微量離心管中，每管加入冰的 100 μ l solution I，200 μ l solution II，搖晃混合均勻後，加入冰的 150 μ l solution III，輕微振搖使溶液中和後，置於冰上 10 分鐘，4 $^{\circ}$ C 離心 12,000 rpm 10 分鐘，將上清液吸至 1.5 ml 微量離心管中，加入 2 倍體積 -20 $^{\circ}$ C 絕對酒精，-70 $^{\circ}$ C 中沉澱 15 分鐘，4 $^{\circ}$ C 離心 12,000 rpm 10 分鐘，去上清液後，將 DNA 風乾，以 100 μ l 離子水將 DNA 溶出，加入等體積的 phenol/CHCl₃ (1:1)，激烈震盪混合 5 分鐘，室溫離心 12,000 rpm 10 分鐘，取上清液，在加入等體積的 phenol/CHCl₃

(1:1), 激烈震盪混合 5 分鐘, 室溫離心 12,000 rpm 10 分鐘, 取上清液, 在加入 2 倍體積 -20 絕對酒精, -20 中沉澱隔夜, 再 離心 12,000 rpm 10 分鐘, 去上清液後, 將 DNA 風乾, 以 100 μ l TE buffer pH 8.0 溶之, 放置-20 冰箱保存備用。

質體 DNA 的大量製備

挑取 Ampicillin plate 上之單一菌落 (pBR322 transfected cell), 於 5 ml LB medium (含 40 μ g/ml Ampicillin) 中, 隔夜培養後, 取 100 μ l 至 250ml LB medium (含 40 μ g/ml Ampicillin), 37 培養 12 小時後, 4 離心 3,000rpm 15 分鐘 取其細菌沈澱物加上 10ml Buffer P1, 加入 10ml Buffer P2, 且搖晃 5 次後放置室溫 5 分鐘, 加入 10ml Buffer P3, 搖晃 5 次放冰上 20 分鐘。離心 12,000 rpm 4 30 分鐘, 取上清液, 再次離心 12,000 rpm 4 15 分鐘。QIAGEN-tip 先以 Buffer QBT 平衡後, 加入含質體 DNA 的 上清液, 以 Buffer QC 30ml 沖洗 QIAGEN-tip 兩次, 再以 15ml Buffer QF 沖洗出質體 DNA。此溶液加上 10.5ml Isopropanol 混合均勻後, 離心 12,000 rpm 4 30 分鐘, 去上清液後, 將 DNA 風乾, 以 1.5ml TE buffer pH 8.0 溶之, 放置-20 冰箱保存備用。

去氧核糖核酸的傷害

取 2 μ l 純化過的超螺旋型 pBR322 DNA, 分別以不同濃度的樣品與鐵金屬離子與 H₂O₂, 並在 37 incubator 反應 30 分鐘後, 取 20 μ l 加入 2 μ l 的電泳指示劑, 以 1% 的瓊脂凝膠分析 pBR322 DNA (100ng) 的轉換型式 (Fig. 7)。

貳、抗氧化活性測試

根據 1991 年 Tamura 等人的方法，利用 Fenton reaction ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) 氧化 linoleic acid。以不同濃度的測定樣品加入 linoleic acid (1.5mg/L)、50mM Trizma-HCl/150 mM potassium chloride buffer (pH 7.4)、0.2% sarkosyl、200 μM Ferrous sulfate、100 μM hydrogen peroxide 以及去離子水共 40 μl 的溶液。此混合物放置於 37 的烘箱內 16 小時。為了分析氧化的程度，故根據 1979 年 Ohkawa 等人所創，利用 thiobarbituric acid (TBA) 分析方法 將此待測混合溶液(40 μl)混合 40 μl 8% sarkosyl、300 μl 1M acetate buffer (pH 5.0)以及 300 μl 0.67% TBA，在將其放置於 90 60 分鐘 在溶液溫度降至室溫後，加入 1ml 飽和液狀 butanol 溶液混合後，離心 3000 轉 10 分鐘，取 butanol 上層以予分光光度計波長 532nm 測吸光值 (Toshihiko O, 1992)。

結果

一、去氧核醣核酸斷裂的分析

(一) Fenton Reaction 所引導去氧核醣核酸結構型式的改變

觀察 Fenton Reaction 對所去氧核醣核酸造成之傷害，Fenton Reaction 的反應可以產生氫氧自由基，而氫氧自由基會攻擊超螺旋質體 DNA，當超螺旋質體 DNA 受到傷害時，去氧核醣核酸型式分布會由超螺旋型(super coiled)，轉變成開放形環狀(open circular)、直鏈型(linear)、甚至於片段化 (fragmentation)。未經由任何處理去氧核醣核酸顯示出其具有主要的環帶 (band)為螺旋型 (super coiled) (from I)，次要的環帶為具有單股缺口 (nick) 的開放形環狀(nicked open circular) (from II)，沒有直鏈型(linear) DNA (from III)。我們選用質體 pBR322 (100ng) 加上 0.35 % H_2O_2 以及不同濃度的鐵離子並在 37 反應 30 分鐘後，觀察其去氧核醣核酸型式分布；發現隨著鐵離子的濃度增加，去氧核醣核酸的型式分布會由超螺旋型，轉變成開放形環狀、直鏈型，甚至在亞鐵離子濃度

為 40 μ M 時，去氧核醣核酸皆片段化。為了能使其後的實驗可清楚觀察到超螺旋質體 DNA 在 Fenton Reaction 的反應下，去氧核醣核酸型式轉變的分布情形；故我們選取 Fenton Reaction 的反應狀況為 0.35% H₂O₂ 與 40 μ M 的亞鐵離子濃度；在此反應狀態下，可觀察到超螺旋型去氧核醣核酸，轉變成開放形環狀 直鏈型 甚至於片段化 (fragmentation) (Fig. 1)。

(二) 鐵離子對去氧核醣核酸造成結構型式之改變

過去研究中表示鐵離子單獨存在可產生少量的自由基，故鐵離子本身的存 在亦會造成去氧核醣核酸型式的轉變，隨著亞鐵離子濃度的上升，在反應 37 /30 分鐘後，去氧核醣核酸的型式分布，自超螺旋型轉變成開放形環狀 (Fig. 2)。

(三) Estrone 與 $\hat{\alpha}$ -estradiol 在氫氧自由基的環境下，可降低氫氧自由基對去氧核醣核酸的斷裂

在過去的研究指出，Estrone 與 $\hat{\alpha}$ -estradiol 在低密度脂蛋白(LDL) 過氧化實驗中比 α -tocopherol 去抑制脂質過氧化有更好的效果。故分別觀察在不同濃度的 Estrone 與 $\hat{\alpha}$ -estradiol，與 0.35% H₂O₂ 及 40 μ M 的亞鐵離子濃度反應 37 /30 分鐘狀態下，可觀察到去氧核醣核酸受傷害的情形趨於緩和。去氧核醣核酸的型式分布，片段化漸減少，開放形環狀與直鏈型增多，在 Estrone 與 $\hat{\alpha}$ -estradiol 為 0.5 μ M 以後隨著濃度的增加，超螺旋型被保留而沒有被 Fenton reaction 所產生的氫氧自由基攻擊 (Fig.3~6)。其結果顯示 Estrone 與 $\hat{\alpha}$ -estradiol 具有保護去氧核醣核酸，免於受到氫氧自由基的攻擊的能力。

(四) Catecholestrogen 抑制 Fenton Reaction 所引起的去氧核醣核酸斷裂

探討 Catecholestrogen 是否亦具有保護去氧核醣核酸，免於受到氫氧自由基的攻擊的能力。我們以不同濃度的 Catecholestrogen：2-hydroxyestradiol、4-hydroxyestradiol、4-hydroxyestrone 與 0.35 % H₂O₂ 及 40μM 的鐵離子濃度反應 37 /30 分鐘狀態下，去氧核醣核酸的型式分布狀況為片段化減少甚而沒有，開放形環狀也逐漸減少，但是超螺旋型逐漸增加而被存留下來(Fig.7~12)。

比較 Estrone (E1)、 $\hat{\alpha}$ -estradiol(E2)、2-hydroxyestradiol(2oh-E2)、4-hydroxyestradiol (4oh- E2)、4-hydroxyestrone(4oh-E1)與 Fenton reaction 反應 37 /30 分鐘後的超螺旋型質體 DNA。結果顯示 3.0 μ M $\hat{\alpha}$ -estradiol(E2)與 Fenton reaction 反應後，超螺旋型質體 DNA 有 100 % 的存留。Estrone (E1)於 3.0 μ M 濃度下與 Fenton reaction 反應後，三次結果僅有 50~60 % 的超螺旋型質體 DNA 存留。Catecholestrogen 的 2-hydroxyestradiol (2oh-E2)、4-hydroxyestradiol (4oh- E2)、4-hydroxyestrone(4oh-E1) 於 3.0 μ M 濃度下與 Fenton reaction 反應後，60~70 % 超螺旋型質體 DNA 存留。故 Estrone (E1)、 $\hat{\alpha}$ -estradiol(E2)、catecholestrogen 比較發現， $\hat{\alpha}$ -estradiol(E2)抑制 Fenton reaction 所產生的氫氧自由基所引起的去氧核醣核酸斷裂效果最好，catecholestrogen 次之，Estrone (E1)的效果再次之。但 Estrone (E1)隨著濃度的增加，抑制效果趨緩。而 catecholestrogen 中的 4-hydroxyestrone(4oh-E1)也會隨著濃度的增加，抑制效果趨緩。

Reference

Ayres, S., Tang, M. and Subbiah, M. T. R. 17 $\hat{\alpha}$ -Estradiol as an antioxidant; some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. J. Lab. Clin. Med. 1996; 128:367-375

Ayres, S., Abplanalp, W., Liu, J. H. and Subbiah, M. T. R. Mechanisms involved in the protective effect of 17 $\hat{\alpha}$ -Estradiol on lipid peroxidation and DNA damage.

American Physiological Society, 26 Feb. 1998, E1002-E1008

Bao, T. Z. and Conney, A. H. Functional role of estrogen metabolism in target cells :
review and perspectives. *Carcinogenesis*. Vol.19 no.1 pp.1-27, 1998

Bradlow, H. L., Telang, N. T., Sepkovic, D. W. and Osborne, M. P. 2-Hydroxyestrone :
the “good” estrogen. *J. Endocrinology* (1996) 150, S259-S265

Constantine, S. A. M., Deodutta, R. and Joachim, G. L. Concentration dependence of
prooxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. *Archives of biochemistry
and Biophysics*. Vol. 360, No. 1 , December 1, pp. 105-112, 1998

Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Jackson, E. K., Keller, P. J. 17 β -Estradiol, its
metabolites, and Progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension*.
1998;31(part2):522-528

Feigelson, H. S. and Henderson, B. E. Estrogen and breast cancer. *Carcinogenesis*
vol.17 no.11 pp.2279-2284, 1996

Keaney, J. F., Shwarery, G. T., Nicolosi, R. J., Loscalzo, J., Foxall, T. L. and Vita, J. A.
Lipids:17 β -estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low density
lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine

Liehr, J. G. 4-Hydroxylation of oestrogens as a marker for mammary tumours.
Biochemical Society Transactions. vol. 27, 318-323, 1999

Mobley, J. A., Bhat, A. S. and Brueggemeier, R. W. Measurement of oxidative DNA
damage by catecholestrogens and analogues in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 1999, 12,
270-277

Shwarery, G. T., Vita, J. A. and Keaney, J. F. Antioxidant protection of LDL by
physiological concentrations of 17 β -estradiol:Requirement for Estradiol Modification.
Circulation. Vol.95(6), pp.1378-1385, 18 Mar,1997

Stack, D. W., Byun, J., Gross, M. L., Rogan, E. G. and Cavalieri, E. L. Molecular
characteristics of catechol Estrogen Quinones in Reactions with
Deoxyribonucleosides. *Chem. Res. Toxicol.* 1996,9, 851-859

Thibodeau, P. A. and Paquette, B. DNA damage induced by catecholestrogens in the presence of copper (II): generation of reactive oxygen species and enhancement by NADH. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 27, Nos. 11/12, pp. 1367-1377, 1999

Toshihiko, O., Hirotsuka, K., Yoshihide, H., Hideaki, H. and Takayuki, S. A novel antioxidant isolated from Young green barley leaves. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 1135-1138

Wiseman, H. Importance of estrogen xenoestrogen and phytoestrogen metabolism in breast cancer risk. *Biochemical Society Transactions*. vol.27, 299-304, 1999

Yumiko, Y. and Hiroshi, O. Synergistic induction of DNA strand breakage by catechol-estrogen and nitric oxide: implications for hormonal carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 24, No. 2, pp. 341-348, 1998

Figure 1.

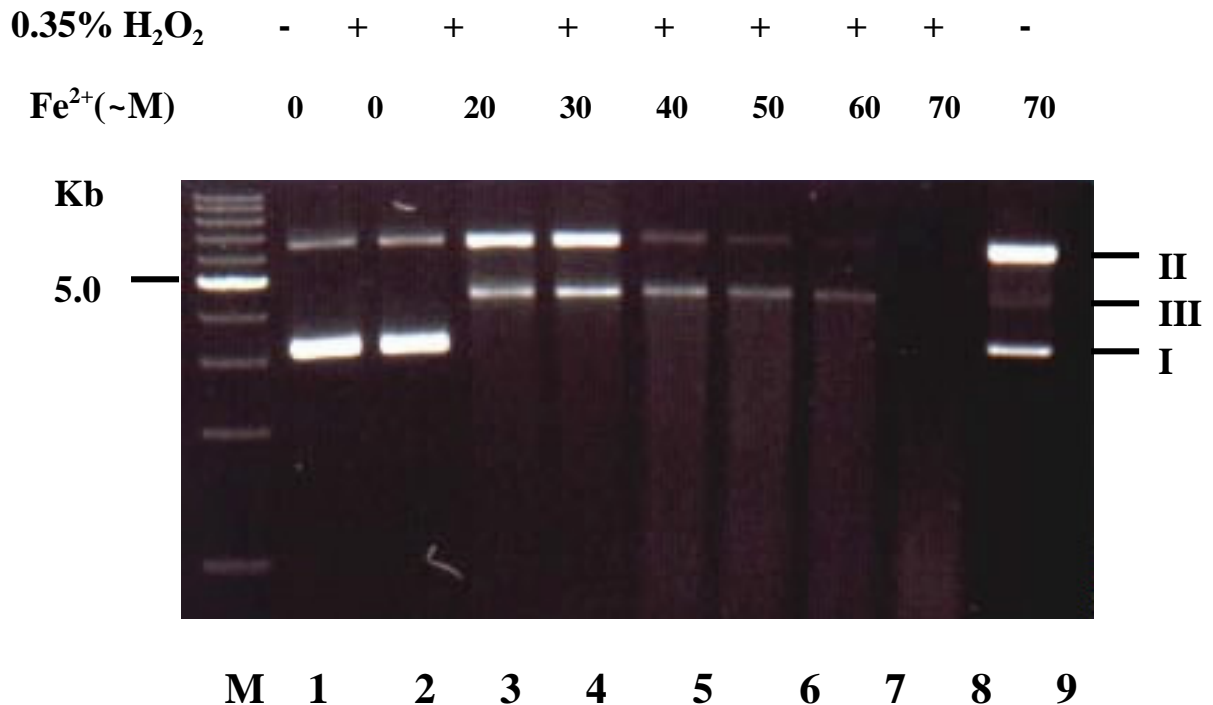
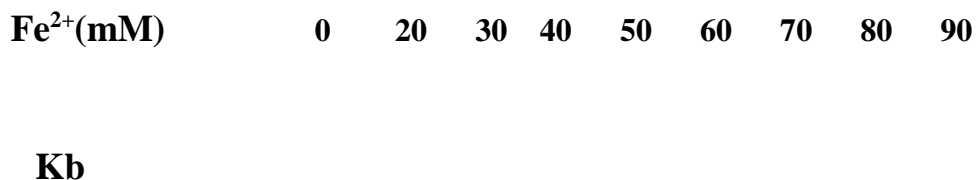


Figure 2.



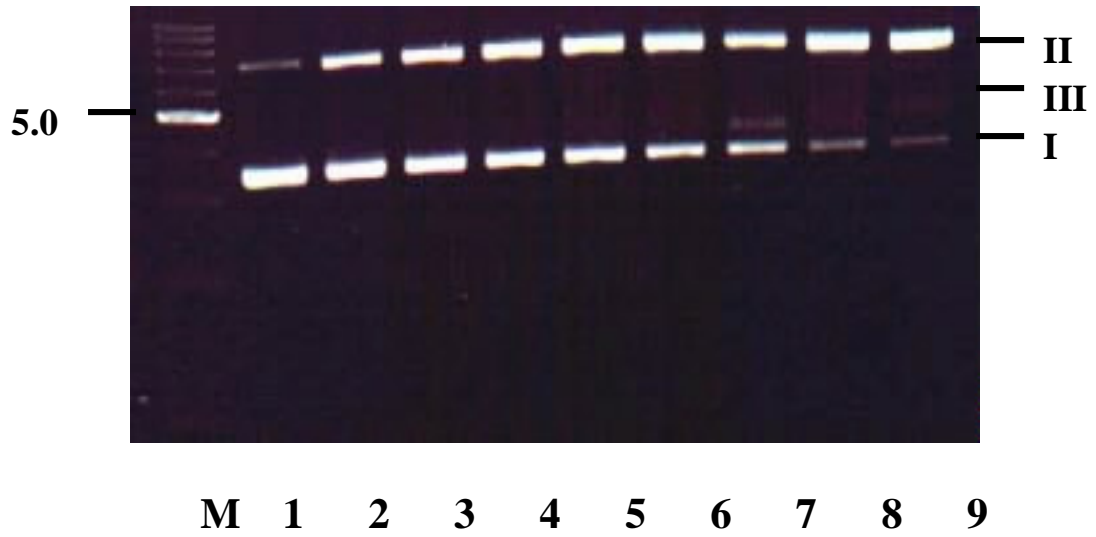


Figure 3.

0.35% H₂O₂	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40~M Fe²⁺	-	+	+	+	+	+	-	+	-
E1 (̂ M)	0	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0

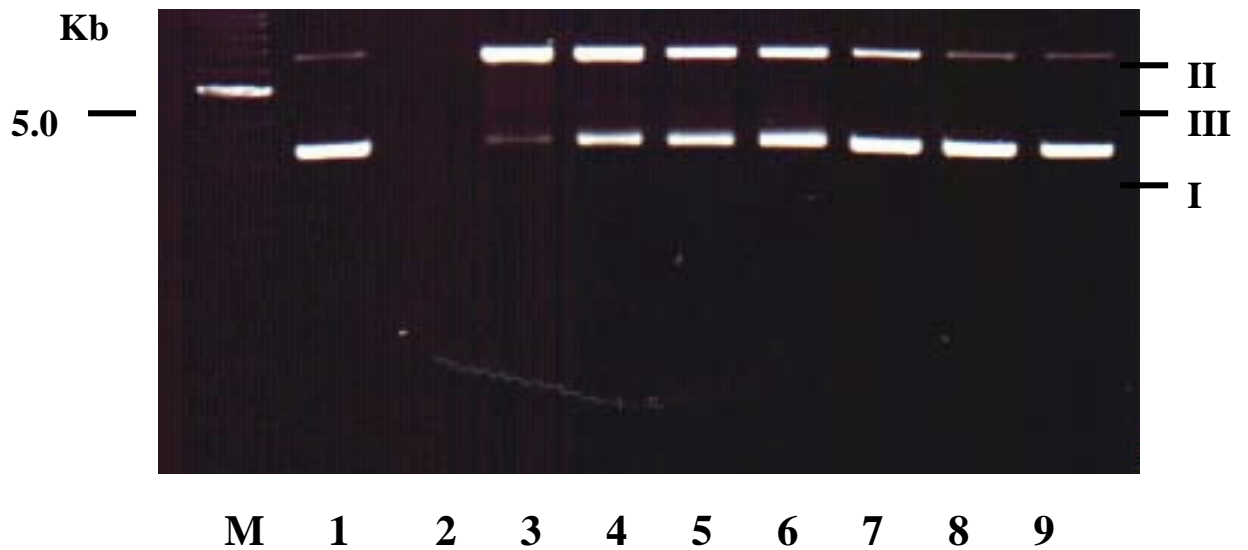
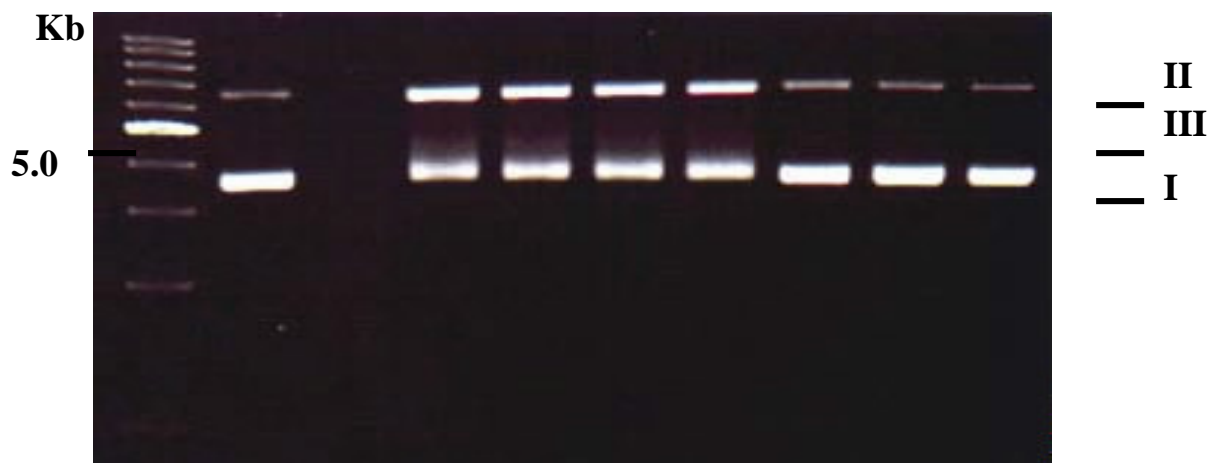


Figure 4

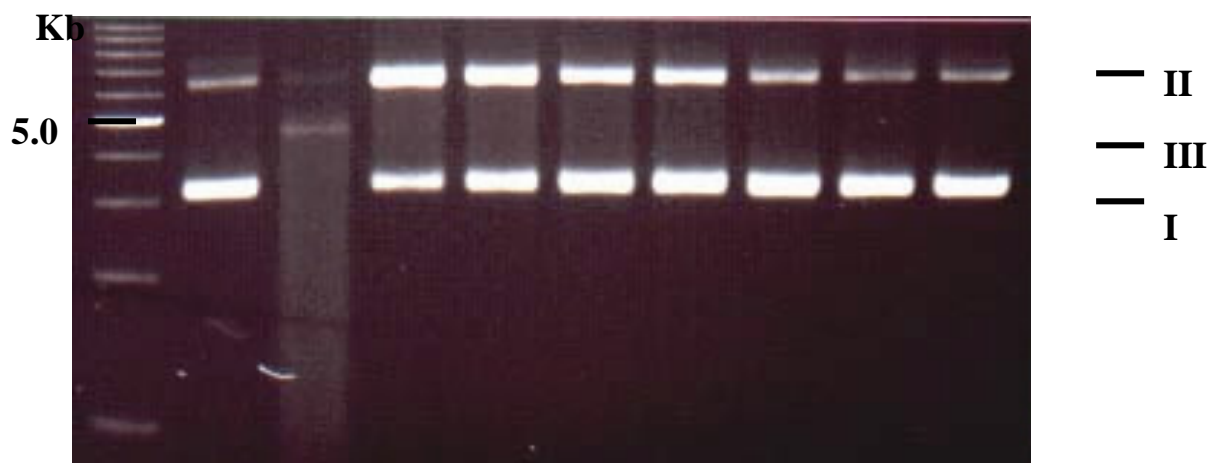
0.35% H₂O₂	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40~M Fe²⁺	-	+	+	+	+	+	-	+	-

E1 (̂ M) 0 0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.0 4.0 4.0



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figure 5.
 0.35% H₂O₂ - + + + + + + - -
 40~M Fe²⁺ - + + + + + - + -
 E2 (̂ M) 0 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.0 2.0 2.0



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figure 6.
 0.35% H₂O₂ - + + + + + + - -
 40~M Fe²⁺ - + + + + + - + -

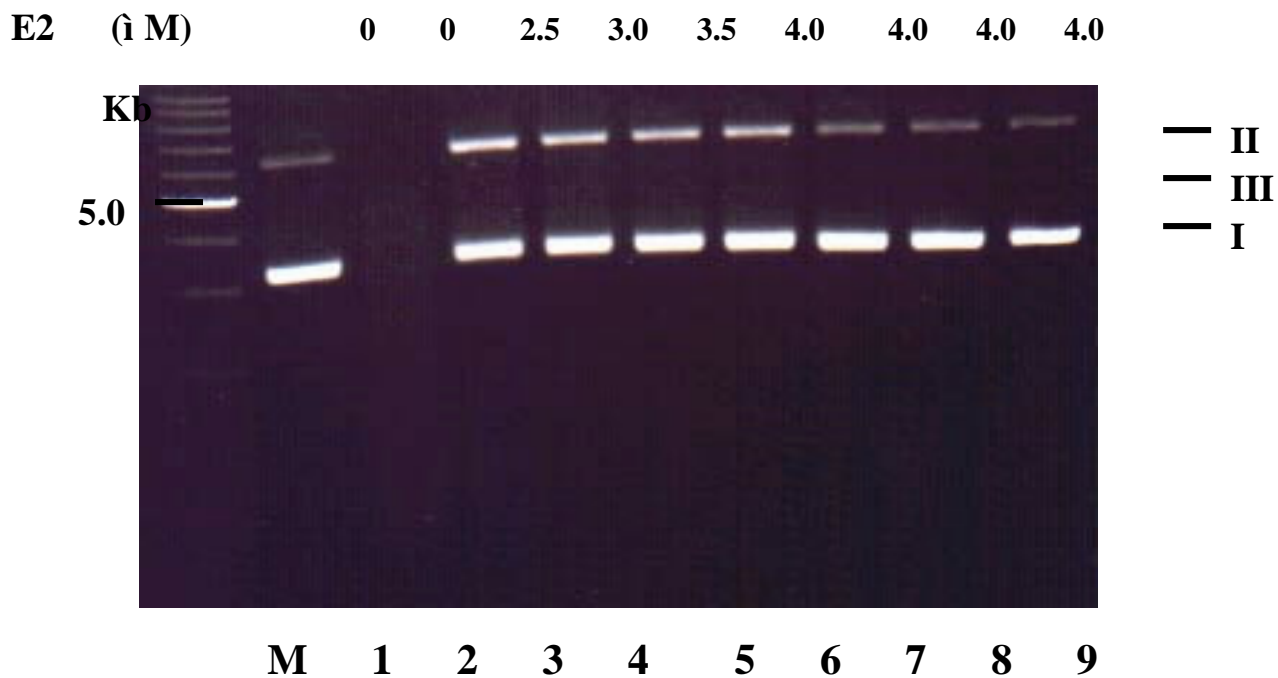


Figure 7.

0.35% H ₂ O ₂	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
40~M Fe ²⁺	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2ohE2 (̂ M)	0	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

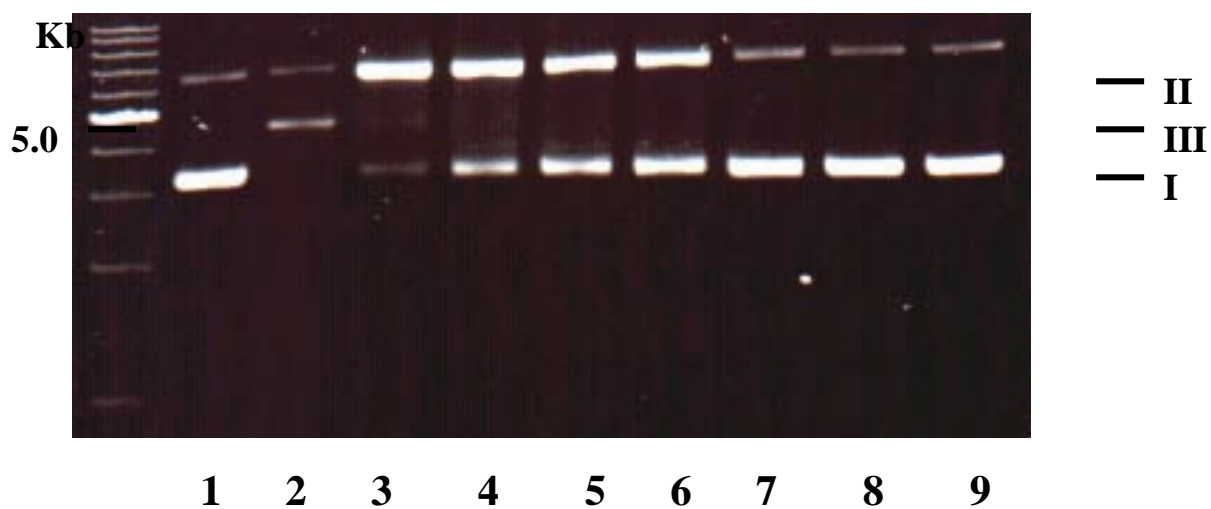


Figure 8

0.35% H ₂ O ₂	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
40~M Fe ²⁺	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-

2ohE2 (̂ M) 0 0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.0 4.0 4.0

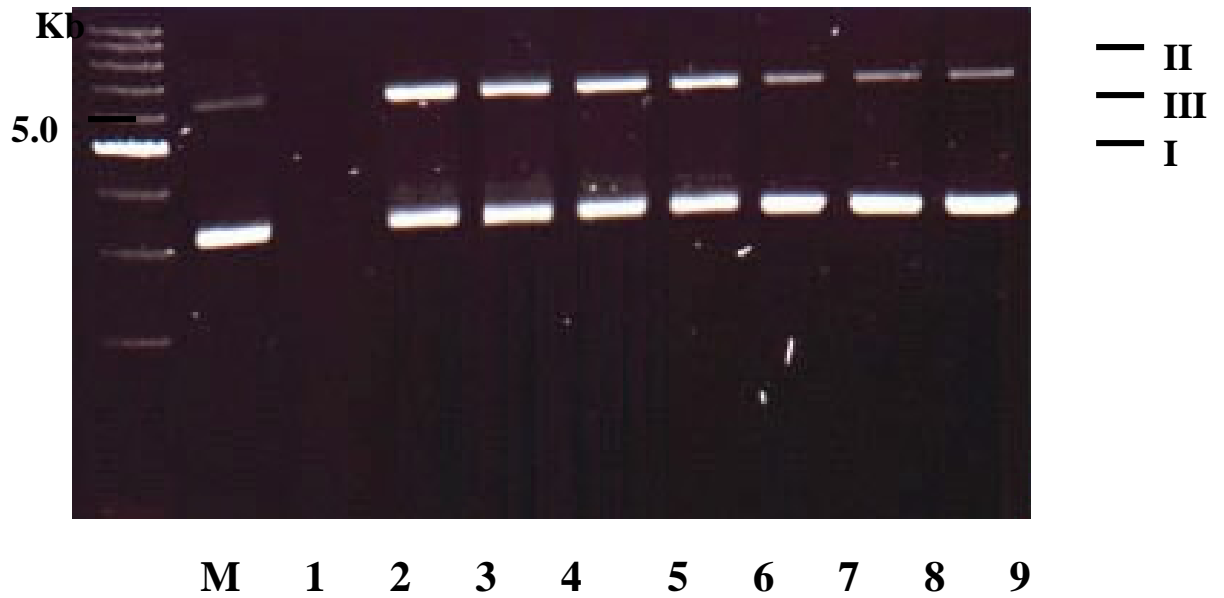


Figure 9.

0.35% H₂O₂	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40~M Fe²⁺	-	+	+	+	+	+	-	+	-
4ohE2 (̂ M)	0	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0

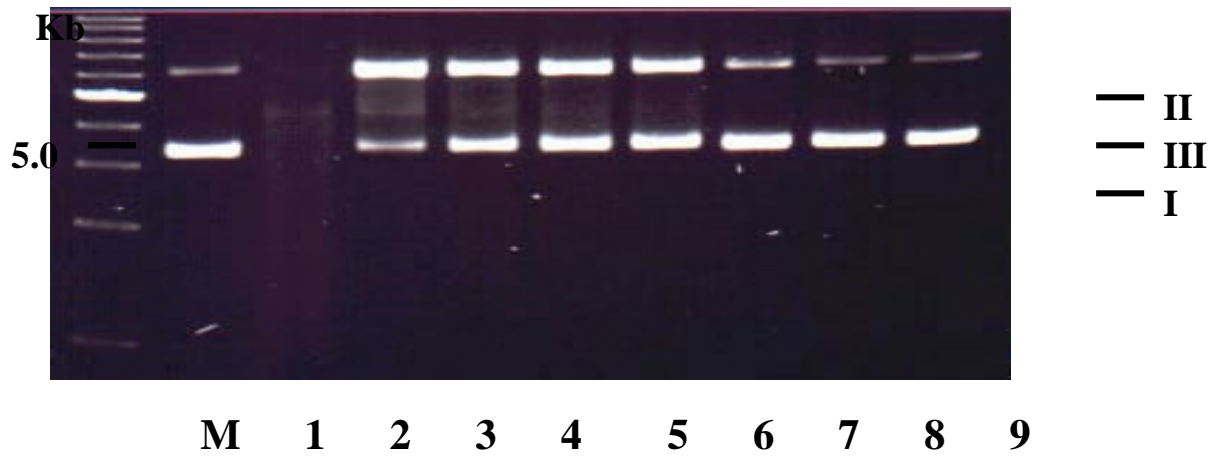


Figure 10

0.35% H₂O₂	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40~M Fe²⁺	-	+	+	+	+	+	-	+	-
4ohE2 (î M)	0	0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.0	4.0	4.0

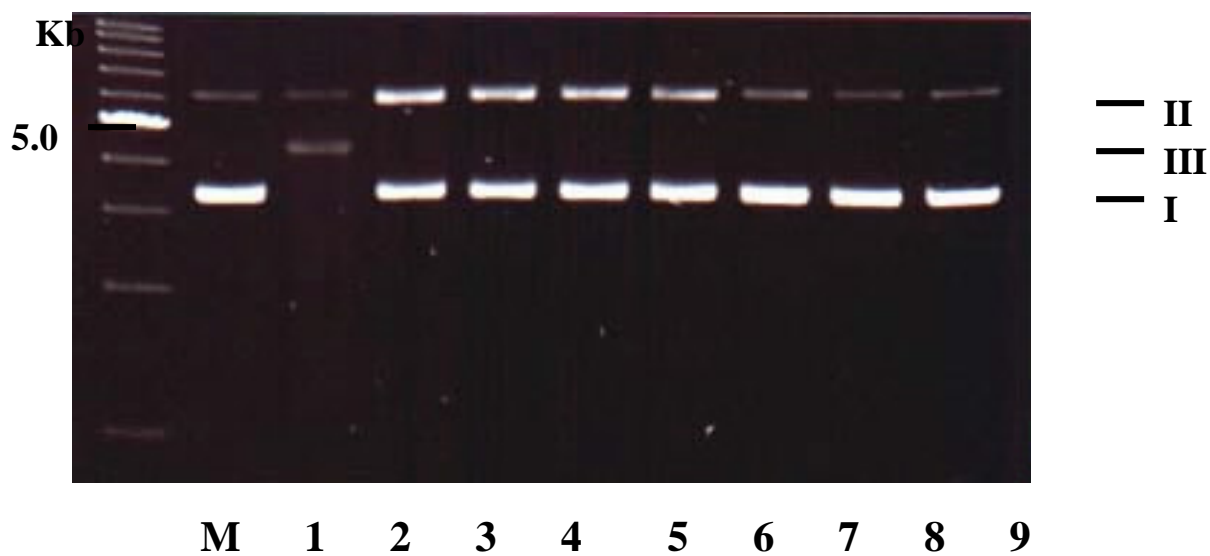


Figure 11

0.35% H₂O₂	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40~M Fe²⁺	-	+	+	+	+	+	-	+	-
4ohE1 (î M)	0	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0

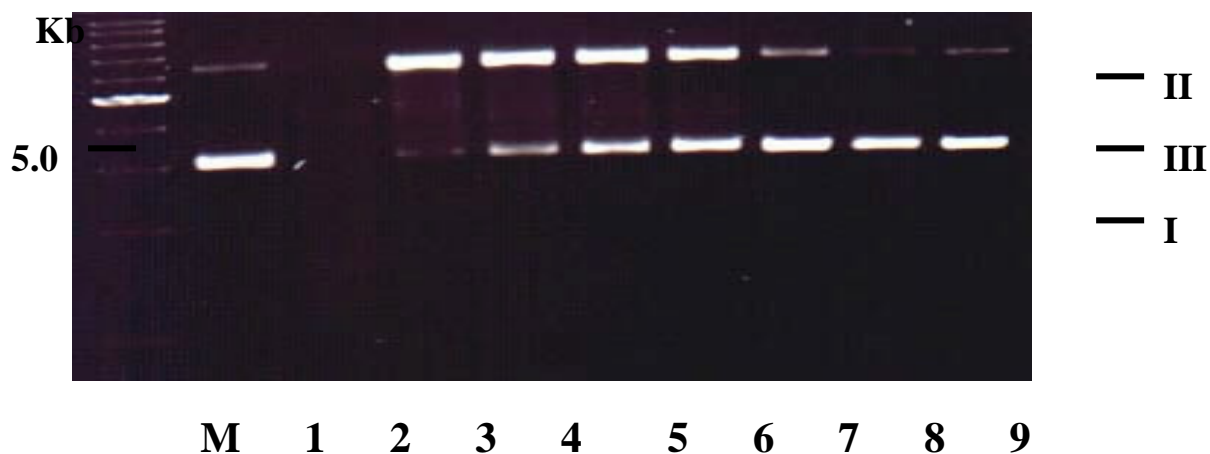


Figure 12

0.35% H₂O₂	-	+	+	+	+	+	+	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---

-

40~M Fe²⁺	-	+	+	+	+	+	-	+	-
4ohE1 (μM)	0	0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.0	4.0	4.0

