

Eryxin通过抑制芳香化酶表达调控雌激素生物合成*

史楠^{1,4} 史小可^{1,4} Jovliqizi Azimova Bahtigul^{1,3} Abduvaliev Anvar²
Rakhmanov Alisher² 王飞^{1**}

¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041

²塔什干医科大学 塔什干 10012

³塔什干药物研究所 塔什干 10012

⁴中国科学院大学 北京 100049

摘要 雌激素水平与女性生理及心理健康密切相关,为探讨eryxin对雌激素生物合成的影响,采用Am-blue法检测eryxin对人卵巢颗粒细胞KGN细胞增殖的影响,磁微粒分离酶联免疫法检测雌二醇的合成,Western blotting检测KGN细胞芳香化酶蛋白表达水平,RT-qPCR检测KGN细胞芳香化酶基因及其启动子Promoter II表达水平.结果显示,在1-150 μg/mL范围内eryxin对细胞增殖没有影响,但是可以显著抑制KGN细胞中雌二醇的合成,且具有剂量依赖性;eryxin对芳香化酶过表达的HEK-293A细胞中雌二醇的合成没有影响;eryxin显著下调芳香化酶的mRNA和蛋白质表达水平,抑制芳香化酶启动子Promoter II表达;降低eryxin中蛋白质含量可显著削弱其抑制雌激素合成的活性.本研究表明eryxin抑制人卵巢颗粒细胞雌激素的合成是通过其抑制芳香化酶mRNA及蛋白表达来实现的,结果可为进一步发现新型抗雌激素生物合成药物治疗相关相关疾病奠定基础.(图6表1参21)

关键词 eryxin; 雌二醇; 芳香化酶; 卵巢颗粒细胞; 疾病

CLC R961

Eryxin inhibits estrogen biosynthesis by suppression of aromatase*

SHI Nan^{1,4}, SHI Xiaoke^{1,4}, Jovliqizi Azimova Bahtigul^{1,3}, Abduvaliev Anvar², Rakhmanov Alisher² & WANG Fei^{1**}

¹ Chengdu Institute of Biology, Chinese academy of Sciences, Chengdu 610041, China

² Tashkent Medical Academy, Tashkent 10012, Uzbekistan

³ Tashkent Pharmaceutical Institute, Tashkent 10012, Uzbekistan

⁴ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Estrogen levels are a major factor affecting the physiological and mental health of women. The effect of eryxin on estrogen biosynthesis was investigated. The Am-blue method was used to detect the effect of eryxin on the proliferation of human ovarian granulosa (KGN) cells. The effects of eryxin on estrogen biosynthesis in KGN cells and aromatase-overexpressing HEK-293A (HEK-293Aaro) cells were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of aromatase protein in KGN cells were detected by Western blotting. We also examined the expression of aromatase gene and Promoter II by RT-qPCR. The results showed that 1-150 μg/mL of eryxin had no effect on cell proliferation but it potently inhibited the biosynthesis of 17β-estradiol in KGN cells in a dose-dependent manner; it had no effect on the catalytic activity of aromatase in HEK-293Aaro cells. Eryxin significantly down-regulated the mRNA and protein expression of aromatase protein by decreasing the expression of aromatase Promoter II. Boiling and enzymolysis significantly attenuated the inhibitory effect of eryxin on estrogen biosynthesis in KGN cells. Eryxin suppressed estrogen biosynthesis in KGN cells by the inhibition of aromatase expression, and it warrants further investigation as a candidate for the treatment of estrogen-related diseases.

Keywords eryxin; 17β-estradiol; aromatase; ovarian granulosa cell; disease

收稿日期 Received: 2019-01-21 接受日期 Accepted: 2019-03-07

*国家自然科学基金项目(21372214)、中国科学院国际人才计划(2015PB061)和科技部中国-乌兹别克斯坦政府间合作委员会科技合作分委会第三次会议交流项目(S2016G0216)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (21372214), the CAS President's International Fellowship Initiative (2015PB061) and the Exchange Project of the Third Meeting of the Subcommittee on Scientific and Technological Cooperation of the China-Uzbekistan Intergovernmental Cooperation Committee of the Ministry of Science and Technology of China (S2016G0216)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wangfei@cib.ac.cn)

雌激素在人体生殖、骨骼、血管、中枢神经以及代谢等方面发挥着重要作用^[1-2]。近年来,乳腺癌、心血管疾病、卵巢癌、多囊卵巢综合症以及不孕等疾病的发病率逐年上升^[2-6],严重影响女性的生理和心理健康,这些疾病的发生发展和雌激素体内合成代谢紊乱密切相关。芳香化酶是哺乳动物体内催化雌激素生物合成的唯一限速酶^[3],已经成为治疗雌激素紊乱引起疾病以及辅助生殖中的重要靶点^[3-4, 7-8]。但是,临床药物,如来曲唑等都是直接作用于芳香化酶蛋白的催化活性,进而使整体雌激素水平受到抑制,而不能直接靶向病灶进行治疗。这种抑制作用会导致诸多的副作用,如骨质疏松以及心血管疾病等。由于在不同组织芳香化酶的合成由不同的组织特异性启动子所介导^[3],因此,为了更有效地治疗雌激素紊乱引起的相关疾病并减少副作用,有必要开发新的具有组织特异性的芳香化酶抑制剂。

几个世纪以来,乌兹别克斯坦传统医学经常使用蛇来治疗各种疾病。Eryxin是乌兹别克斯坦的一种传统医药,它是从沙蟒(*Eryx*)中制备出来的一种高度纯化、脱质子的水解产物^[9]。主要用于抗炎,肝脏保护和免疫调节药物,在风湿病、肺结核、布鲁氏菌病、急性梗阻、慢性支气管炎和皮肤硬化方面具有药效^[9-10]。它包含多种具有生物活性的低分子量物质。目前,通过气相色谱质谱联用发现eryxin含有超过37种物质。其主要成分为多肽,还包含氨基酸、微量的短链有机酸以及无机盐^[11]。有研究表明,eryxin对不孕不育具有明显治疗作用,但具体机制仍不清楚。由于调节雌激素在不孕不育相关治疗中起着非常重要的作用,因此本研究主要针对其对雌激素生物合成的影响方面开展试验,通过eryxin对雌激素生物合成影响的研究,从而探讨eryxin治疗不孕不育的可能机制,并为进一步发现新型抗雌激素生物合成药物奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验细胞

人卵巢颗粒样KGN细胞,由中国解放军总医院母义明教授惠赠;人胚肾细胞HEK-293A细胞,购于中国科学院上海生命科学细胞资源中心,HEK-293A芳香化酶过表达细胞由中国科学院成都生物所天然产物中心实验室构建。细胞均由中国科学院成都生物所研究天然产物中心液氮保存。

1.2 药品与试剂

4% eryxin (10 mg/mL, 乌兹别克斯坦科学院化学研究院惠赠); 睾酮, 来曲唑 (Sigma-Aldrich); 福斯克林 (Beyotime); DMSO (Solarbio); DMEM/F-12培养基, DMEM高糖培养基, 新生牛血清, 10%青链霉素液(成都哈里生物有限公司); 磁微粒分离化学发光法雌二醇定量测定试剂盒(江苏泽成生物技术有限公司); SunBio Am-Blue细胞增殖与活性检测试剂(上海生博医学生物工程科技有限公司); RIPA弱细胞裂解液, 特超敏ECL化学发光试剂盒, Aromatase Antibody Rabbit Polyclonal (Abcam); GAPDH Antibody Rabbit Polyclonal (Proteintech); M-MLV反转录酶 (Promega); TransStart Tip Green qPCR SuperMix (Transgene Biotech)。

1.3 主要仪器

酶标仪 (Thermo); 倒置显微镜 (上海光学仪器厂); 超净工作台 (苏州苏洁净化设备公司); CO₂细胞培养箱 (Thermo); 半自动化学发光免疫分析仪 (Bio-Ekon生物技术公司); 凝胶成像仪 (Quant LAS 500); 荧光定量PCR仪 (Thermo)。

1.4 细胞培养

KGN细胞培养在含有10%的新生牛血清, 100 U/mL青霉素, 0.1 mg/mL链霉素的DMEM/F-12培养基中, 芳香化酶过表达的HEK-293A细胞 (HEK-293A aro) 培养在含有10%的新生牛血清, 200 μg/mL G418, 100 U/mL青霉素, 0.1 mg/mL链霉素的DMEM-高糖的培养基中, 均于37 °C, 5% CO₂的培养箱中培养。

1.5 Eryxin对KGN细胞增殖及活性的影响

取对数生长期的KGN细胞接种于96孔板 (5 × 10³ 个/孔), 每孔100 μL培养基。孵育24 h后, 换新鲜培养基100 μL, 分别加入不同浓度的eryxin (浓度分别为1、5、10、50、100、150、200 μg/mL) 以及DMSO作为对照。每组设置3个复孔, 继续培养24 h后每孔加入10 μL Am-Blue试剂, 于细胞培养箱中继续孵育2-4 h, 待变色时用酶标仪检测。

1.6 Eryxin对雌二醇合成的影响

取对数生长期的细胞接种于24孔板中, 培养过夜后, 将细胞培养基换为无血清培养基, 并分别加入不同浓度的eryxin以及DMSO, 10 nmol/L的来曲唑 (Let) 作为对照, 每组设置3个复孔。继续培养24 h后, 每孔分别加入终浓度为10 nmol/L的睾酮作为底物。于细胞培养箱中继续培养24 h后收集上清以及细胞裂解液, 于-20 °C保存。使用江苏泽成磁微粒分离化学发光法雌二醇定量测定试剂盒测定上清中雌二醇的含量, 利用BCA对细胞裂解液进行蛋白定量, 所得结果用于定量上清中的雌二醇含量。

1.7 Western blotting检测芳香化酶蛋白的表达

将对数生长期的KGN细胞接种于6孔板, 培养过夜, 更换新鲜培养基, 然后加入不同浓度的eryxin (10、50、100 μg/mL) 以及DMSO作为对照, 继续培养24 h后, 加入RIPA细胞裂解液以及10%的PMSF裂解细胞, 收集细胞裂解液, BCA定量蛋白浓度。使用10% SDS-PAGE凝胶进行电泳, 每孔40 μg蛋白, 以Blue plus II (BP II) 作为蛋白marker。电泳结束后, 将蛋白转印到硝酸纤维素薄膜上。5%小牛血清蛋白封闭液封闭90 min后, 于4 °C加入一抗孵育过夜, 取出孵育过夜的硝酸纤维素膜, 用TBST洗膜, 洗3次每次10 min, 之后于室温加入二抗摇床震荡90 min, 洗膜后在膜表面覆盖特超敏ECL化学发光试剂, 使用凝胶成像仪成像。随后使用Quantity One对灰度值进行定量。

1.8 RT-qPCR检测芳香化酶基因表达水平

将对数生长期的KGN细胞接种于6孔板, 培养过夜后, 更换新鲜培养基, 然后加入不同浓度的eryxin (10、50、100 μg/mL) 以及DMSO, 10 μmol/L的福斯克林 (FSK) 作为对照, 继续培养24 h后, 采用TRIzol法提取细胞总RNA。取2 μg总RNA以oligo (dT) 18作为引物, 用M-MLV逆转录酶进行cDNA的合成。然后使用SYBR Green I, 进行Real time PCR。反应程序: 95 °C 15 s; 95 °C 5 s, 55 °C 15 s, 40个循环; 72 °C 15 s。

每个样品分别使用GAPDH作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析芳香化酶基因以及启动子Promoter II表达水平的变化.检测中使用的引物序列见表1.

1.9 Eryxin中多肽的去除

取eryxin,分别使用100℃煮沸及酶解处理不同的时间以去除其中的多肽,所得产物使用10% SDS-PAGE凝胶进行电泳,以Blue plus II (BP II)作为蛋白marker.电泳结束后,SDS-PAGE凝胶使用固定液(无水乙醇:冰醋酸:去离子水=5:1:4)固定30 min,倒掉固定液并用去离子水洗3次,考马斯亮蓝染色液染色3 h后,经漂洗后于凝胶成像仪成像.

1.10 数据分析

用Graphpad Prism6.0软件进行统计学分析,结果用平均值±标准差的形式表示,用非配对t检验及one-way ANOVA进行数据处理,与对照相比,当P值小于0.05时认为具有显著性差异.

2 结果与分析

2.1 Eryxin对细胞增殖的影响

使用不同浓度的eryxin分别处理KGN细胞24和48 h后,使用Am-blue法检测eryxin对细胞增殖的影响.如图1所示,在150-200 μg/mL范围内,eryxin作用KGN细胞48 h后,对KGN细胞增殖具有明显抑制作用($P < 0.001$),而在1-150 μg/mL范围内eryxin对细胞增殖没有明显影响.

2.2 Eryxin抑制雌激素的合成

为了检测eryxin对雌激素生物合成的影响,使用不同浓度的eryxin处理KGN细胞,eryxin作用24 h后加入睾酮继续处理24 h,采用磁微粒分离化学发光法检测培养基中的雌二醇含量.如图2所示,随着eryxin浓度的增高,雌二醇的生物合成量显著降低($IC_{50} = 71.21 \mu\text{g/mL}$).又由于在1-150 μg/mL范围内eryxin对细胞增殖没有明显影响,说明eryxin对雌激素

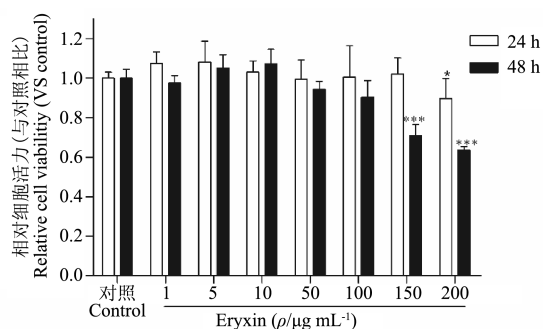


图1 Eryxin对细胞增殖的影响.与Control组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.0001$. $N = 3$.

Fig. 1 Effects of eryxin on KGN cells viability. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.0001$, compared with control. $N = 3$.

合成的抑制作用不是由于细胞毒引起的.

2.3 Eryxin对芳香化酶表达的影响

用不同浓度的eryxin处理KGN细胞,通过Western blotting法检测eryxin对芳香化酶蛋白的影响.结果如图3所示,与Control相比,eryxin显著抑制芳香化酶蛋白的合成($P < 0.05$).芳香化酶是雌激素合成的限速酶,说明eryxin是通过抑制芳香化酶蛋白来调控雌激素的生物合成.此外,用不同浓度的eryxin处理KGN细胞,提取总RNA后,通过RT-qPCR检测芳香化酶基因及其启动子Promoter II的表达情况.与对照相比,随着eryxin浓度的增高,芳香化酶基因及其启动子Promoter II明显下调(图4).以上结果表明,在KGN细胞中,eryxin通过抑制芳香化酶基因启动子Promoter II下调芳香化酶基因的表达,从而抑制其蛋白的合成,最终抑制雌激素的合成.

2.4 Eryxin对芳香化酶蛋白催化活性的影响

为了检测eryxin对芳香化酶的催化活性的影响,使用不同浓度的eryxin处理HEK-293A aro细胞并检测其雌二醇的合

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	正向 Sense	反向 Anti-sense
GAPDH	5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'	5'-GGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGA-3'
Aromatase	5'-ATCCTCAATACCAGGTCTGGC-3'	5'-AGAGATCCAGACTCGCATGAATTCT-3'
Promoter II	5'-CCCTTTGATTTCCACAGGAC-3'	5'-CCCATGCGTAGCCAGGAC-3'

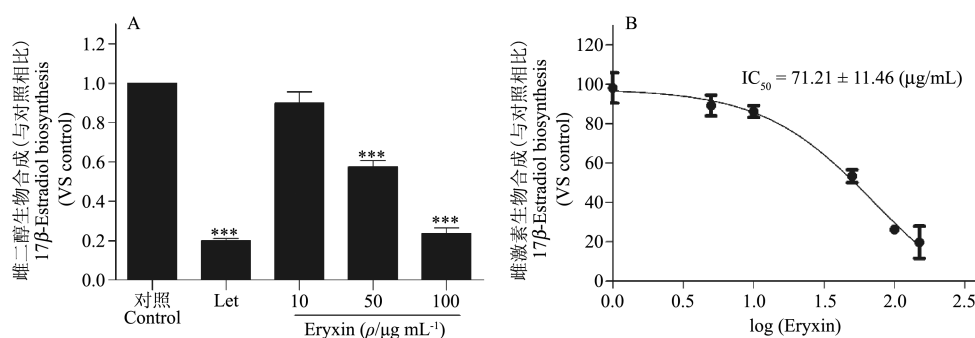


图2 KGN细胞中eryxin对雌激素生物合成的影响(A)和KGN细胞中抑制雌激素生物合成的浓度响应曲线(IC_{50})(B).与Control组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.0001$. $N = 3$.

Fig. 2 Effects of eryxin on 17β -Estradiol Biosynthesis in KGN cells (A), and the concentration-response curve of eryxin for inhibition of 17β -Estradiol Biosynthesis in KGN cells (IC_{50}) (B) ($N = 3$). * $P < 0.05$ and *** $P < 0.0001$, compared with control. $N = 3$.

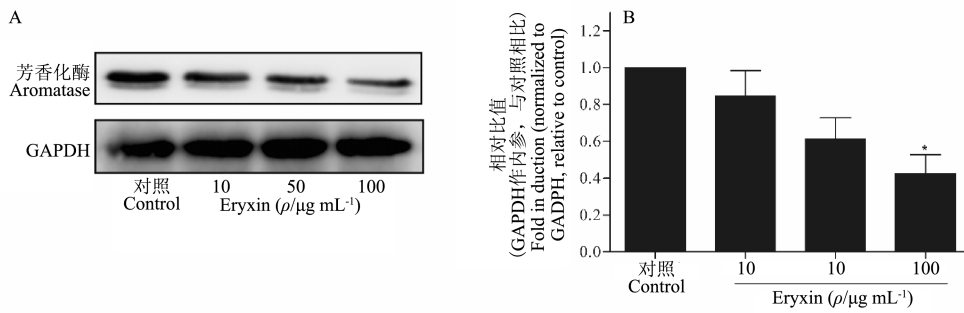


图3 Western blotting检测KGN细胞中芳香化酶蛋白表达 (A) 和Western blotting定量结果 (B). 与Control组比较, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.0001$. $N = 3$.

Fig. 3 Expression of aromatase protein in KGN cells detected by Western blotting (A), and the quantitative results of Western blotting (B). $^*P < 0.05$ and $^{***}P < 0.0001$, compared with control. $N = 3$.

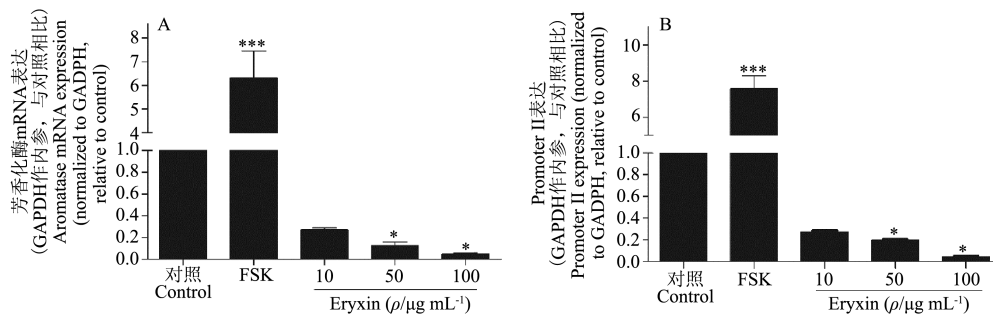


图4 KGN细胞中eryxin对芳香化酶基因表达的影响 (A) 和KGN细胞中eryxin对芳香化酶启动子Promoter II表达的影响 (B). 与Control组比较, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.0001$. $N = 3$.

Fig. 4 Effects of eryxin on aromatase gene expression in KGN cells (A), and effects of eryxin on aromatase Promoter II expression in KGN cells (B). $^*P < 0.05$ and $^{***}P < 0.0001$, compared with control. $N = 3$.

成情况. 由图5可知, eryxin对HEK-293Aaro细胞中雌二醇生物合成的影响不具备显著性差异. 以上结果表明eryxin不影响芳香化酶的催化活性.

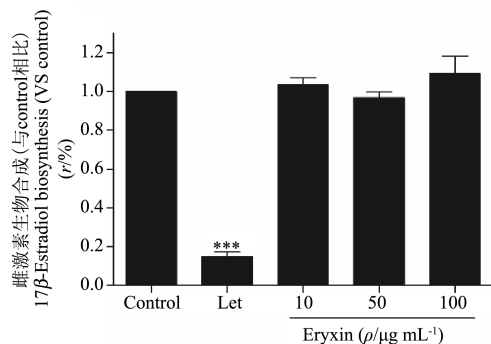


图5 eryxin对芳香化酶蛋白催化活性的影响. 与Control组比较, $^*P < 0.05$; $^{***}P < 0.0001$. $N = 3$.

Fig. 5 Effects of eryxin on aromatase catalytic activity. $^*P < 0.05$; $^{***}P < 0.0001$, compared with control. $N = 3$.

2.5 Eryxin中多肽在抑制雌激素生物合成中的作用

为了验证eryxin抑制雌激素生物合成的主要成分, 利用100 °C水煮不同时间及结合胰酶消化以去除eryxin中的多肽. 结果如图6A所示, 处理过后的样品中多肽明显减少. 选取水煮及胰酶消化两小时的产物即De-eryxin处理KGN细胞. 如图6B所示, 在10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, De-eryxin对雌激素生物合成的抑制作用明显减弱. 表明eryxin中的多肽在抑

制雌激素的生物合成中起到非常重要的作用.

3 讨论与结论

近年来, 由于环境中内分泌干扰物的影响, 雌激素紊乱相关疾病的发病率逐年上升^[12-13]. 目前, 雌激素受体及芳香化酶抑制剂是治疗雌激素相关疾病的主要靶点. 研究表明, 与雌激素受体拮抗剂相比, 在激素依赖性乳腺癌的治疗中, 芳香化酶抑制剂能显著改善患者的预后^[14]. 目前, 用于临床的芳香化酶抑制剂包括I型芳香化酶抑制剂和II型芳香化酶抑制剂^[15], 但这些抑制剂都是直接作用于芳香化酶蛋白, 从而使整体雌激素水平受到抑制. 这种抑制作用会导致诸多的副作用, 如骨质疏松及心血管疾病等. 因此, 为了更有效地治疗雌激素紊乱引起的相关疾病并减少副作用, 开发在转录水平影响雌激素生物合成的组织特异性芳香化酶抑制剂是目前亟待解决的问题.

经前人体内外研究发现, 以黄酮类化合物为主的300多种天然产物可以通过芳香化酶来调节雌激素的生物合成^[16], 但机制各不相同. 这表明, 天然产物对于开发芳香化酶调节剂并进一步治疗雌激素相关疾病是有价值的. 但是目前植物来源的天然产物对雌激素生物合成影响的报道较多^[16-19], 却较少见动物来源的天然产物的报道. Eryxin是从沙蟪中制备出来的一种高度纯化、脱质子的水解产物, 不具备抗原性并且可以静脉注射, 具有多种药理作用. 前人研究表明, eryxin对于治疗不孕不育具有良好疗效, 但相关机制并不清楚. 根

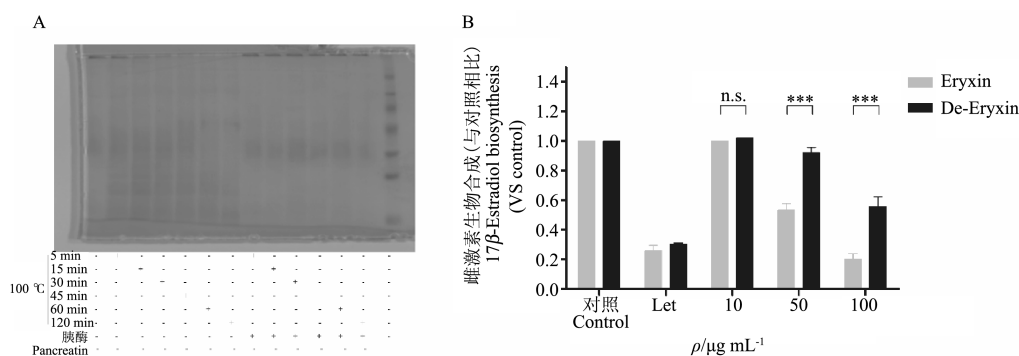


图6 煮沸或胰酶消化以去除eryxin中的多肽 (A) 以及KGN细胞中De-Eryxin对雌激素生物合成的影响 (B)。与Control组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$, $N = 3$ 。

Fig. 6 Boiling or enzymolysis to removed peptide in eryxin (A), and effects of De-Eryxin on 17β-Estradiol biosynthesis in KGN cells (B). * $P < 0.05$ and *** $P < 0.0001$, compared with control. $N = 3$.

据本实验室建立的雌激素有效筛选模型^[20], 我们通过使用不同浓度的eryxin处理人卵巢颗粒细胞KGN细胞并检测细胞中雌二醇表达量的变化, 发现, 随着eryxin浓度的增加, 雌二醇的表达量明显减少. 并进一步发现eryxin对芳香化酶的催化活性没有影响. 此外通过Western blotting发现其可以下调芳香化酶的表达. 说明eryxin对不孕不育的良好疗效可能是通过芳香化酶下调雌激素生物合成来实现的.

芳香化酶是细胞色素P450超家族的19家族的唯一成员^[7,21]. 芳香化酶包含10个外显子, 其中II-X位于编码区, 位于非编码区的外显子I包含有决定芳香化酶组织特异性表达的一系列启动子. 在绝经前女性体内雌激素主要在卵巢合成, Promoter II是卵巢中芳香化酶表达的主要启动子. 此外, 乳腺中主要的芳香化酶启动子Promoter I.4转变为Promoter II是乳腺癌发生发展的主要诱因. 启动子的转变使芳香化酶表达上调, 进而使雌激素的生物合成增加并促进了乳腺癌细胞的增殖. 我们的研究发现eryxin可以下调芳香化酶mRNA及其特异性启动子Promoter II的表达, 而芳香化酶是雌激素合成过程中的限速酶. 通过Promoter II抑制芳香化酶的合成从而使雌激素的生物合成减少, 因此, eryxin可能可以在转录水平调节卵巢以及乳腺癌组织中雌激素的生物合成, 并治疗相关疾病.

综上所述, 在卵巢颗粒细胞中, eryxin抑制雌激素的合成是通过转录水平抑制芳香化酶的表达来实现的. 此外, 通过水煮和酶解去除eryxin中的多肽成分, 发现eryxin对雌激素生物合成的抑制作用显著降低, 说明eryxin中的多肽在抑制雌激素生物合成中起到非常重要的作用. 目前发现的芳香化酶调节剂多为化学小分子, 还未见相关报道. 我们的研究结果解释了eryxin治疗不孕不育的潜在作用机制, 并为进一步发现新的芳香化酶抑制剂提供了新的方向. 但由于eryxin是混合物, 组分较复杂, 具体起作用的物质还需要进一步研究.

参考文献 [References]

1 Brown KA, Simpson ER. Estrogens, obesity, inflammation, and breast cancer—what is the link? [C]//Semi Reprod Med. New York: Thieme Medical Publishers, 2015, 33 (3): 208-212

2 Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon W. Estrogen—the good, the bad, and the unexpected [J]. *Endor Rev*, 2005, 26 (3): 322-330

3 Wang XY, Simpson ER, Brown KA. Aromatase overexpression in dysfunctional adipose tissue links obesity to postmenopausal breast cancer [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 153: 35-44

4 Misso ML, Wong JLA, Teede HJ, Hart R, Rombauts L, Melder AM, Norman RJ, Costello MF. Aromatase inhibitors for PCOS: a systematic review and meta-analysis [J]. *Hum Reprod Update*, 2012, 18 (3): 301-312

5 Patwardhan S, Nawathe A, Yates D, Harrison GR, Khan KS. Systematic review of the effects of aromatase inhibitors on pain associated with endometriosis [J]. *BJOG*, 2008, 115 (7): 818-822

6 Palomba S. Aromatase inhibitors for ovulation induction [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100 (5): 1742-1747

7 Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance [J]. *Endokrynol Pol*, 2010, 61 (1): 126-134

8 Gérard C, Brown KA. Obesity and breast cancer—role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 466: 15-30

9 Asatova SS, Komarin AS, Karimov MS, Akbarov SV. Hepatoprotector properties of eryxin in animals with acute drug-induced hepatitis model [J]. *Pharm Chem J*, 2003, 37 (2): 63-66

10 Akbarov U, Shikov A, Laakso I, Pozharitskaya O, Makarov V, Vuorela H. Fingerprint profiling of traditional Uzbekistan medicine eryxin by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *PMIO*, 2017, 4 (S1): Mo-PO-158

11 Akbarov U, Shikov A, Pozharitskaya O, Demchenko D, Makarov V. Anti-hyaluronidase activity of traditional Uzbekistan medicine eryxin [J]. *PMIO*, 2017, 4 (S1): Tu-PO-213

12 Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H. A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN) [J]. *Endocrinology*, 2004, 145 (4): 1860-1869

13 Zhong SY, Liu SC, Chen SH, Lin HJ, Wang WM, Qin XM. Zeranone stimulates proliferation and aromatase activation in human breast preadipocytes [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (1): 1014-1018

14 Cushman M, Costantino JP, Bovill EG, Wickerham DL, Buckley L, Roberts JD, Krag DN. Effect of tamoxifen on venous thrombosis risk

- factors in women without cancer: the breast cancer prevention trial [J]. *Br J Haematol*, 2003, **120** (1): 109-116
- 15 Johnston SR, Dowsett M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**: 821-831
- 16 Balunas MJ, Kinghorn AD. Natural product compounds with aromatase inhibitory activity: an update [J]. *Plant Med*, 2010, **76** (11): 1087-1093
- 17 Guo JJ, Yuan Y, Lu DF, Du BW, Xiong L, Shi JG, Yang LJ, Liu WL, Yuan XH, Zhang GL, Wang Fei. Two natural products, trans-phytol and (22E)-ergosta-6, 9, 22-triene-3 β , 5 α , 8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, **279** (1): 23-32
- 18 Yang CY, Li F, Du BW, Chen B, Wang F, Wang MK. Isolation and characterization of new phenolic compounds with estrogen biosynthesis-inhibiting and antioxidation activities from *Broussonetia papyrifera* leaves [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (4): e94198
- 19 Fu J, Shen ZH, Cheng FX, Liu GX, Li WH, Tang Y. Progress in study of the structure, catalytic mechanism and inhibitors of aromatase [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2012, **47** (1): 18-28
- 20 鲁丹枫, Jovliqizi AB, 张国林, 王飞. 采用磁微粒分离酶联免疫法构建基于KGN细胞的雌激素生物合成筛选模型[J]. 天然产物研究与开发, 2013, **25** (1): 27-30 [Lu DF, Jovliqizi AB, Zhang GL, Wang F. Establishment of a cell-based screen for estrogen biosynthesis using magnetic particle-based enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2013, **25** (1): 27-30]
- 21 Blakemore J, Naftolin F. Aromatase: contributions to physiology and disease in women and men [J]. *Physiology*, 2016, **31** (4): 258-269