

E-screen assay 및 상경적 결합반응을 이용한 phthalate esters의 내분비계 장애 작용 연구

한순영* · 한상국 · 문현주 · 김형식 · 이동하 · 김소희 · 김태성 · 박귀례
식품의약품안전청 국립독성연구소

Study on Estrogenic Activities of Phthalate Esters Using E-screen Assay and Competitive Binding Assay

Soon Young Han*, Sang Kook Han, Hyun Ju Moon, Hyung Sik Kim, Dong Ha Lee,
So Hee Kim, Tae Sung Kim and Kui Lea Park

National Institute of Toxicological Research, Korea Food & Drug Administration,
5 Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea
(Received April 21, 2000)
(Accepted May 3, 2000)

ABSTRACT : Phthalate esters are used extensively as a plasticizer in the manufacture of plastic products such as PVC bags and medical devices. Recently, phthalate esters have been shown to induce endocrine system mediated responses. However, only a few studies have been conducted for estrogenic activity of phthalate esters. In this study estrogenic activities of seven phthalate esters, butyl benzyl phthalate (BBP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-n-butylphthalate (DBP), diethylphthalate (DEP), di-n-pentylphthalate (DPP), di-n-propylphthalate (DPrP) and dicyclohexylphthalate (DCHP), were examined in vitro using E-screen assay and competitive binding assay. From the E-screen assay, BBP, DEHP, DBP and DEP showed weak estrogenic activity at the concentration of 5 μ M. The relative proliferative effect (RPE) and the relative proliferative potency (RPP) were 50~70% and 0.01%, respectively, when compared with 500 pM of 17 β -estradiol (E2). In competitive binding assay with the rat uterine estrogen receptor (ER), BBP and DEP showed weak binding potency [(1/10⁴~1/10⁵ of E2)] while DEHP and DBP scarcely bound to ER. These results suggest that some phthalate esters have weak estrogenic activities in vitro.

Key Words : Phthalate esters, Estrogenic activity, Estrogen receptor (ER), E-screen assay, Competitive binding assay

I. 서 론

프탈레이트류는 1930년대 이후 플라스틱 가소제로서 사용되어왔고, 총 생산량 중 25%를 di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)가 차지하며(Kirk-Othmer's Encyclopaedia) 플라스틱 제품이나 합판, 포장지에 사용되는 잉크의 재료나 첨가제로 사용된다(MAFF, 1995). 1993년 "Total Diet Survey"에서 지방함유 식품에서의 프탈레이트량 조사 결과에 의하면, 성인의 경우 평균 0.8 mg/사람/일(0.013 mg/kg체중/일) 내지 1.6 mg/사람/일(0.027 mg/kg체중/일)을 섭취한다고 보고된 바 있다(MAFF, 1996).

프탈레이트류는 랫드(Ema 등, 1992, 1993, 1995; Field 등, 1989)와 마우스(Price 등, 1990)에서 배자 흡수, 두정골 및 흉골 이상과 구개열 등의 기형 및 발생 독성을 일으키는 것으로 보고되어 있으며, 주로 남성의 생식·발생에 미치는 영향에 대하여 많은 독성연구가 이루어져 왔다. Di-n-butylphthalate(DBP)에 대하여 랫드의 다세대 독성시험을 실시한 결과, 요도하열, 전립선 및 부고환 발육부전 등이 F₀에서는 나타나지 않고 F₁에서만 나타나는 것으로 보고되었다(Foster 등, 2000). Mylchreest 등(1999)의 연구에서도 이러한 효과는 성분화 기간(임신 12~21일) 동안의 짧은 투여에 의해서 수컷 자손에 제한되어 나타났으며, 안드로겐 수용체를 매개하지 않고 항안드로겐성 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. DEHP는 미성숙 랫드에 2 g/kg/

*To whom correspondence should be addressed

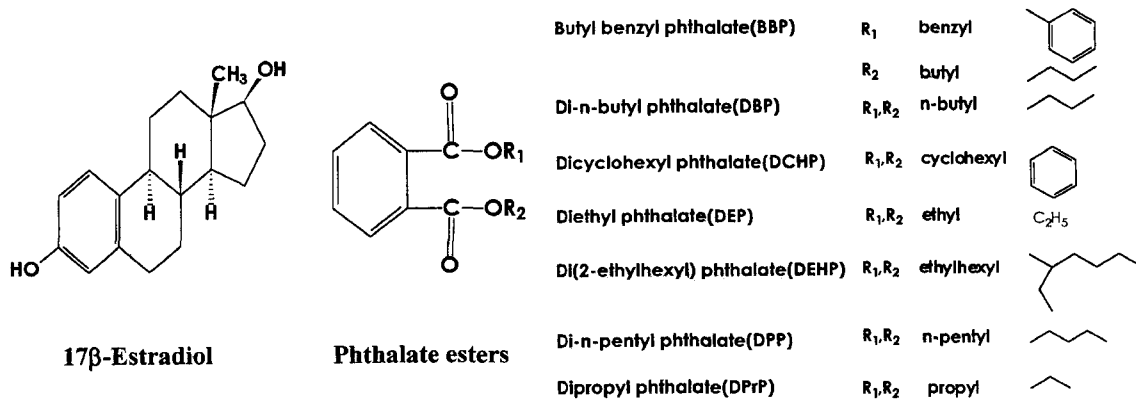


Fig. 1. Chemical structures of 17β-estradiol and phthalate esters.

day 투여시 심각한 정소 위축 및 아연 농도를 감소시켜 정소독성을 일으켰으며(Gray 등 1986; Oishi, 1986), 마우스에서도 생식독성이 관찰되었고, butyl benzyl phthalate (BBP)가 항안드로겐성 작용을 나타낼 가능성은 사람의 안드로겐 수용체를 transfection시킨 yeast를 이용한 검색시험에서 dihydrotestosterone의 작용이 억제되었다는 사실에서도 이미 시사된 바 있다(Peters 등, 1997; Sohoni 등, 1988).

이상과 같이 프탈레이트류가 남성에 미치는 영향에 대해서는 어느 정도 보고되어 있으나 에스트로겐성 영향에 대해서는 많이 보고되어 있지 않으므로, 현재 세계적으로 내분비계 장애작용에 대하여 논란이 되고 있는 프탈레이트류 화합물(Fig. 1)을 시험물질로 선정하여 *in vitro* E-screen assay법(Soto 등, 1995)과 ligand competitive binding assay법(Shelby 등, 1996)을 이용하여 에스트로겐성 효과를 조사하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

Phthalate류 화합물 중, di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP), di-n-butylphthalate(DBP), di-ethylphthalate(DEP)는 Junsei Chemical사(일본)에서, di-n-pentylphthalate(DPP), di-n-propylphthalate(DPrP)는 Kanto Chemical사(일본)에서, dicyclohexylphthalate(DCHP)는 Wako Chemical사에서 구입하였다. Butyl benzyl phthalate(BBP), corn oil, 17β-estradiol(E2), sodium bicarbonate, hydroxyapatite, Tris-HCl, dimethylsulfide(DMSO) 등은 Sigma Chemical사(MO, USA)에서, [³H]-estradiol([³H]-E2)는 Amersham Pharmacia Biotech(UK)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육조건

실험동물은 식품의약품안전청 국립독성연구소의 barrier 시설 내에서 생산·사육된 특정 병원체 부재(Specific Pathogen Free, SPF) Sprague-Dawley계 암컷 랫드를 순화시킨 후 사용하였다. 사육실은 온도 23±1°C, 습도 55±5%, 명암주기 12시간으로 유지하였고, 순화기간 및 실험기간 동안 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3. 에스트로겐 고유활성 검색(E-screen assay)

1) 세포 및 배지

MCF-7 세포(BUS cell)는 E-screen assay를 확립 개발한 Soto 연구실에서 직접 분양받아 5% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건하에서 배양하였다.

2) 시험방법

시험 하루 전 시험에 사용될 세포의 배지를 교환하고, 시험 당일 배지가 들어 있는 25 cm² 플라스크의 배지를 흡인 제거한 다음, phosphate buffered saline(PBS) 완충액으로 1회 세정하였다. 0.25% 트립신 용액을 플라스크당 500 μl 첨가하여 MCF-7 세포가 플라스크 바닥에서 분리되면 (1~2분 정도) 배지 5 ml를 넣어서 피펫팅하였다. 배지를 15 ml 원심분리관(FALCON #352097)으로 옮겨 원심분리시켜(295 × g, 5분) 상정액을 흡인 제거한 다음, 세포가 남아 있는 원심분리관에 배지를 넣고 피펫팅하여 세포를 단일화시켜 세포수를 측정하였다. 5×10³ cells/well로 96 well 배양판(Falcon #353072, Non-pyrogenic)에 분주한 후(well 당 배지량 100 μl) 배양판을 천천히 흔들어 세포가 균일하게 분산되도록 하고 5% CO₂, 37°C로 조절된 배양기에서 24시간 배양시킨 후, well에 들어 있는 배지를 흡인·제거하였다. 혈청에 함유된 세포증식인자를 제거한 Charcoal-dextran처리 FBS(CDFBS)를 5% 함유한 DMEM 배지

90 μ l을 well에 넣고 시험 물질의 농도를 5 nM부터 최고 50 μ M까지 조절하여 각 농도별로 10 μ l씩 well에 가하였다. 이때, 용매로 사용한 DMSO의 최종 농도는 0.5%가 되도록 조절하였다. 시료가 첨가된 96 well plate를 5% CO₂, 37°C로 조절된 배양기에서 6일간(144시간) 배양한 후, sulforhodamine-B(SRB) assay로 세포 수를 측정하였다.

3) Sulforhodamine-B(SRB) assay

MCF-7 cell의 증식 정도를 측정하기 위하여 세포 단백질의 음이온과 SRB의 양이온이 결합하여 발색하는 원리를 이용한 SRB assay를 사용하였다(Villalobos 등, 1995). 6일간 배양후 96well 배양판의 배지를 흡인·제거하고 4°C에 보관된 10% Trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100 μ l씩 첨가하고 4°C에서 1시간 정지하여 세포를 고정하였다. 고정액을 제거하고 수세한 후 종이 타월로 물기를 완전히 흡수시켜 상온에서 건조시켰다. 건조된 배양판에 0.4% SRB(1% acetic acid에 용해)를 well당 50 μ l씩 가하여 상온에서 30분정도 염색한 후, 100 μ l의 1% acetic acid로 4회 세척하고 상온에서 건조시켜 10 mM Tris-buffer(pH 10.5)를 well당 100 μ l씩 분주한 다음 550 nM에서 흡광도를 측정하여 세포수를 측정하고 따로 세포 검량선을 작성하였다.

4. 에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합시험

1) Uterine cytosol (에스트로겐 수용체) 분리

성숙한(7주령) 비임신 Sprague-Dawley 랫드의 난소를 제거하고 10일 후 자궁을 적출하였다. 지방조직을 제거하고 무게를 측정한 후 ice-cold TEDG buffer(10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, 10% glycerol, pH 7.4)를 1 g/10 ml의 용량으로 가하여 Polytron homogenizer로 4°C에서 5초간 균질화시킨 다음 초원심분리기를 이용하여 4°C에서 105,000 \times g로 60분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 에스트로겐 수용체를 함유한 상정액을 15 ml의 conical tube에 취하여 단백질 농도를 측정하고 2 mg/ml로 조정하여 사용 전까지 -70°C에서 보관하였다.

2) 프탈레이트류의 자궁 내 에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합시험

E-screen assay에서 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)와의 작용이 일차 스크리닝된 일부 프탈레이트 화합물에 대하여 ER에 대한 E2와의 상경적 결합 정도를 비교하였다. 본 실험은 Shelby 등(1996)의 방법을 변형하여 실시하였다. 자궁에서 에스트로겐 수용체를 분리한 후, [³H]-E2(1 \times 10⁻⁹ M)와 순차적으로 희석한 여러 농도의 competitor(시험물질)를 첨가하고 일정시간 배양하여 competitor

에 의하여 ER과 [³H]-E2의 결합이 상경적으로 저해되는 정도를 측정하였다.

본 실험에서는 [³H]-E2(10 μ l, 1 \times 10⁻⁹ M)의 농도를 일정하게 하고 여러 종류의 competitor인 E2(10⁻⁵~10⁻¹¹ M) 또는 10⁻⁸~10⁻³ M 프탈레이트류(DEHP, BBP, DEP 및 DBP) 10 μ l와 100 μ l의 자궁 cytosol(200 μ g)을 시험관에 가하고, 50 mM Tris buffer(pH 7.4)를 가하여 최종 용량을 300 μ l로 하여 혼합한 후 roller drum을 이용하여 4°C에서 20시간동안 반응시켰다. 그 후 free ligand로부터 ER과 결합한 ligand를 분리하기 위하여 750 μ l의 60% hydroxylapatite (HAP) slurry(50 mM Tris buffer로 활성화)를 가하였다. 시험관을 ice-cold water bath에서 20분간 방치하면서 5분간격으로 vortex한 후, 600 \times g로 4°C에서 원심분리하여 상정액은 버리고 2 ml의 50 mM Tris buffer를 가하여 3회 세척하였다. 최종 세척한 후 에탄올 2 ml를 가하여 HAP로부터 결합한 receptor-ligand complex를 추출하고, 일정량의 에탄올 상정액을 10 ml의 scintillation cocktail이 든 vial에 가하여 radioactivity를 측정하였다.

III. 결 과

1. 에스트로겐 고유활성(E-screen assay)

7종의 프탈레이트류 화합물 (DEHP, BBP, DBP, DPP, DPrP, DCHP 및 DEP)에 대한 E-screen assay 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 내인성 여성 호르몬 물질로 잘 알려진 E2(5 \times 10⁻¹⁰ M)를 양성대조물질로 하여 에스트로겐 활성도 [relative proliferative effect(RPE)와 relative proliferative potency(RPP)]를 비교한 결과, 프탈레이트류는 전반적으로 약한 에스트로겐 활성을 나타내었다.

양성대조물질(E2)에 대한 에스트로겐 활성도는 5 \times 10⁻⁶

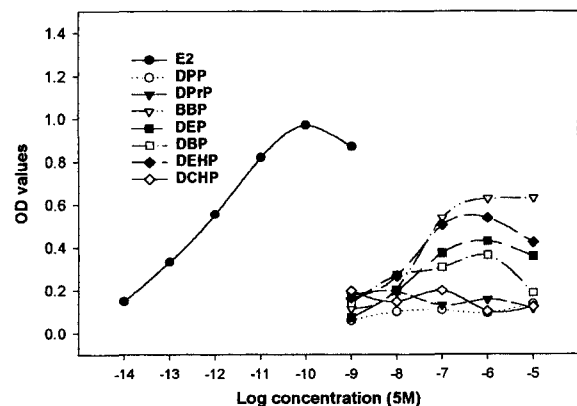


Fig. 2. Effects of phthalate esters on proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. Cells were exposed for 144 hrs to phthalate esters or E2 in DMEM medium supplemented with 5% charcoal dextran-treated FBS serum. Cell proliferation was determined by SRB assay.

Table 1. Estrogenic activity of phthalate esters measured by the E-screen assay

Compound	Concentration ^a	RPE(%) ^b	RPP(%) ^c
E2	500 pM	100	100
BBP	5 μM	70	0.01
DEHP	5 μM	60	0.01
DBP	5 μM	50	0.01
DEP	5 μM	50	0.01

^aIndicates the lowest concentration required for maximal cell yield.

^bRelative proliferative effect (RPE); 100× the ratio between the highest cell yield obtained with the chemical and with E2.

^cRelative proliferative potency (RPP); 100× the ratio between the minimal concentration of E2 required for maximal cell yield at day 6 and the minimal dose of the test compound required to achieve a similar effect.

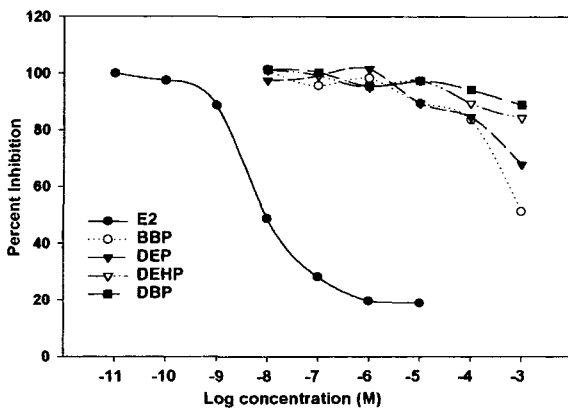


Fig. 3. Competitive inhibition of [³H]-E2 binding to rat uterine cytosol. Cytosol were incubated with 2 nM [³H]-E2 and increasing concentrations of test compounds as described in "Materials and Methods". The results were expressed as the percentage of the inhibition of [³H]-E2 binding to ER in the presence of test compound.

M에서 BBP(RPE=70%, RPP=0.01)가 가장 높은 활성을 나타내었으며, 다음은 DEHP(RPE=60%, RPP=0.01), DBP, DEP(RPE=50%, RPP=0.01) 순이었고(Table 1), 그 외의 프탈레이트류는 MCF-7 세포의 증식에 영향을 미치지 않았다.

2. 에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합

프탈레이트류 화합물이 랫드 자궁의 cytosol에 존재하는 ER에 대한 [³H]-E2와의 상경적 결합 반응을 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 본 시험에 사용된 시험물질의 estrogenic potency를 비교하기 위해 E2를 양성대조물질로 선정하여 10⁻¹¹~10⁻³ M까지 가하여 시험한 결과, 프탈레이트는 [³H]-E2의 에스트로겐 수용체에 대한 결합에 영향을 거의 없거나 아주 약한 결합을 보였다. 그 중 BBP와 DEP는 10⁻³ M 정도에서부터 에스트로겐 수용체에

대한 E2의 결합을 억제시켰다. 이는 양성대조 물질인 E2의 억제능(10⁻⁸ M)과 비교할 때 1/10,000~1/100,000에 해당하는 결합정도이다.

IV. 고 찰

프탈레이트류의 내분비계에 대한 영향이 에스트로겐 수용체를 매개하여 유도되는지를 조사하기 위하여 *in vitro* assay battery를 이용하여 시험하였다. 이들 assay battery들은 각 실험실의 시험방법의 차이와 시험재료들의 상이성에 의하여 에스트로겐 활성화에 현저한 차이를 가져올 수 있다는 지적들도 있어 E-screen assay법은 Soto 등(1995)의 방법을, competitive ligand-binding assay법은 Shelby (1996) 등의 방법을 참고하여 에스트로겐 활성을 조사하였다.

E-screen assay법은 사람의 유방암 세포주인 MCF-7 cell이 에스트로겐성 물질에 의하여 증식하는 성질을 이용한 검색법으로서 에스트로겐성 물질로 의심되는 여러 물질을 동시에 비교적 손쉽게 검색할 수 있는 장점이 있으므로 양성대조물질인 E2와 비교하여 프탈레이트류의 에스트로겐 활성화[relative proliferative effect(RPE), relative proliferative potency(RPP)]를 측정하는데 적합한 시험법이다.

양성대조물질인 E2의 활성과 비교시 BBP, DEHP, DBP 및 DEP는 모두 5 μM에서 약한 에스트로겐 활성을 나타내었다(Table 1). 본 실험을 통하여 얻어진 BBP의 결과는 Soto 등의 실험결과(Soto 등, 1995)와 일치하였으며 DEHP는 Blom 등의 결과(1998)와 유사하게 나타났다. 그리고 본 연구에서 처음으로 DBP와 DEP의 약한 에스트로겐 활성의 가능성이 E-screen assay에서 인지된 것은 주시할 만하다.

Zacharewski 등(1998)은 mammalian cell line(MCF-7 cell 및 HeLa cell)과 yeast를 이용한 ER gene expression assay에서 BBP, DBP 및 DHP(di-hexylphthalate)가 10 μM에서 약한 에스트로겐 활성이 있다고 하였으며, recombinant yeast screen을 이용하여 프탈레이트류 및 그 대사물의 에스트로겐 활성을 조사한 Harris 등(1997)은 BBP, DBP, DEP, DiBP(diisobutyl phthalate), DiNP(diisononyl phthalate)가 약한 에스트로겐 활성을 가진다고 보고하였다. 한편, Fig. 2에서 DEHP, DEP 및 DBP의 세포증식이 50 μM에서 감소한 것은 고농도에서 세포독성에 의하여 세포성장이 억제되었기 때문으로 생각된다.

BBP, DEHP, DBP, DEP 등의 일부 프탈레이트류가 *in vitro*에서 에스트로겐 수용체와의 상호작용의 가능성이 E-screen assay에서 제시되었으므로 이들 프탈레이트에 대하여 ER에 대한 E2와의 상경적 결합시험을 조사한 결과,

BBP와 DEP가 E2 보다 $10^4 \sim 10^5$ 배정도 높은 농도에서 에스트로겐 수용체에 대한 E2의 결합을 억제시켰지만 DBP는 ER과 거의 결합하지 않았다. 이는 DBP가 상경적 결합반응에서 약한 에스트로겐 활성을 나타내었다는 Zacharewski 등(1998)의 결과와는 일치되지 않아 앞으로 다른 연구진의 결과와 더 비교해 보아야 할 것으로 생각된다.

본 연구결과 일부 프탈레이트류가 *in vitro*에서 에스트로젠성을 나타내기는 하나 양성대조물질로 사용한 내인성 에스트로겐 물질인 E2와 비교할 때 그 작용농도가 매우 높으며 반면 그 작용은 미약하므로 일상 생활로부터의 노출에 의한 에스트로젠성 작용의 가능성은 미미할 것으로 추정된다.

이상과 같이 본 연구에서 프탈레이트류에 대한 *in vitro* 시험 결과는 다른 연구진의 결과와 크게 상이하지 않으면서 DBP 및 DEP의 약한 에스트로겐 활성 가능성을 새롭게 제시하고 있다. 그러나 이들 물질의 에스트로젠성에 대한 결론을 내리기 위해서는 보다 충분한 여러 종류의 *in vitro* 시험 data 및 *in vivo* 시험 data가 더 보충되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Blom, A., Ekman, E., Johannisson, A., Norrgren, L. and Pesonen, M. (1998): Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7), *Arch. Environ. Contam. Toxicology*, **34**, 306-310.
- Ema, M., Itami T. and Kawasaki, H. (1992): Effect of period of exposure on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **12**, 57-61.
- Ema, M., Itami, T. and Kawasaki, H. (1993): Teratogenic phase specificity of butyl benzyl phthalate in rats. *Toxicology*, **79**, 11-19.
- Ema, M., Kurosaka, R., Amano, H. and Ogawa, Y. (1995): Comparative developmental toxicity of n-butyl benzyl phthalate and di-n-butyl phthalate in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 223-228.
- Field, E.A., Sleet R.B., Price J., Marr, M.C., Myers, C.B., Morrissey, R.E. and Schwets, B.A. (1989): Developmental toxicity evaluation of butyl benzyl phthalate (CAS No. 85-68-7) administered in feed to CD-rats on gestation days 6-15. Final Study Report NTP/NIEHS Contract No. **NO1-ES-95255**.
- Foster, P.M., Cattley, R.C. and Mylchreest, E. (2000): Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.*, **38**, Suppl. 1(2-3), S97-S99.
- Gray, T.J.B. and Gangoli, S.D. (1986): Aspect of testicular toxicity of phthalate esters, *Environ. Health Persp.*, **65**, 229-235.
- Harris, C.A., Henttu P., Parker M.G. and Sumpter J.P. (1997): The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*, *Environ. Health Persp.* **105**, 802-811.
- Kirk-Othmer's Encyclopaedia of Chemical Technology, 3rd. Vol. 18.
- MAFF (1995): Food surveillance information sheet number 60: Phthalates in paper and board packaging, UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- MAFF (1996): Food surveillance information sheet number 82: Phthalates in food, UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Milligan S.R. Balasubramanian A.V. and Kalita J.C. (1998): Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute *in vivo* mammalian assay, *Environ Health Persp.*, **106**, 23-26.
- Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R.C. and Foster, P.M. (1999): Disruption of androgen-related male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 81-95.
- Oishi, S. (1986): Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate: changes in histology, cell-specific enzyme activities and zinc concentration, *Arch. Toxicol.*, **59**, 290-295.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (1996): Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, *Environ. Health Persp.*, **104**, 298-305.
- Peters, J.M., Taubeneck, M.W., Keen, C.L. and Gonzalez, F.J. (1997): Di(2-ethylhexyl)phthalate induces a functional zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, *Teratology*, **56**, 311-316.
- Price, C.J., Field, E.A., Marr, M.C., Myers, C.B. and Morrissey R.E. (1990): Final Report on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in CD-1-Swiss mice, *NTP Report*, 90-114.
- Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K. and Davis, V.L. (1996): Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays, *Environ. Health Persp.*, **104**, 1296-1300.
- Sohoni, P. and Sumpter, J.P. (1988): Several environmental estrogens are also anti-androgens, *Journal of Endocrinology*, **158**, 327-339.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. and Serrano, F.O. (1995): The E-screen assay as a tool to identify estrogen, An update on

- estrogenic environmental pollutants, *Environ. Health Persp.*, **103**, 113-122.
- Villalobos M, Olea N, Brotons J.A, Olea-Serrano, M.F, Ruiz de Almodovar, J.M. and Pedraza, V. (1995): The E-screen assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks, *Environ Health Persp.*, **103**, 844-850.
- Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu Z.F., Fielden, M.R. and Matthews, J.B. (1998). Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters, *Toxicological Sciences* **46**, 282-293.