

피레스로이드계 살충제의 MCF7-BUS 세포에 대한 에스트로겐 및 항에스트로겐 효과

오승민 · 정규혁[#]

성균관대학교 약학부

(Received August 23, 2001; Revised September 25, 2001)

Estrogenic and Antiestrogenic Effects of Pyrethroid Insecticides in MCF7-BUS Cell Line

Seung-Min Oh and Kyu-Hyuck Chung[#]

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract — Synthetic pyrethroids are analogs of a natural chemical moiety, pyrethrin, derived from the pyrethrum plant *Chrysanthemum*. The natural pyrethrin structure has been modified to be highly lipophilic and photostable, creating an effective pesticide and resulting in an increased presence in the environment. Worldwide, they are commonly used insecticides against ticks, mites, mosquitoes, and as treatment for human head lice and scabies. Therefore, human exposure to their compounds is extensive. Several studies on the effects of pyrethroids on thyroid hormone regulation, estrogen and androgen function have been reported and yet little has been done to assess their potential hormonal activities. Among humans, a pyrethroid compound was suggested to be the causal agent for gynecomastia in a group of Haitian men. The reports suggest that some pyrethroid compounds are capable of disrupting endocrine function. Therefore, we examined estrogenic/antiestrogenic potential of three pyrethroid insecticides, that is permethrin, allethrin and fenvalerate in human breast cancer cell and action mechanism mediated by the estrogen receptor. Fenvalerate showed weak estrogenic activity, but allethrin and permethrin showed no effect. In combination with high levels (10^{-10} M, 10^{-11} M) of 17β -estradiol and three synthetic pyrethroids inhibited cell proliferations in MCF7-BUS cell by 17β -estradiol. Whereas, fenvalerate increased cell proliferative activity at lower level of estradiol (10^{-12} M, 10^{-13} M). The relative affinities to the estrogen receptor were observed by allethrin and permethrin treatment, but not by fenvalerate. These results indicated that some of pyrethroid insecticides may modulate estrogen functions in human breast cancer cell. The action mechanisms of estrogen receptor mediated antiestrogenicity by allethrin and permethrin were postulated.

Keywords □ Pyrethroid insecticides, MCF7-BUS cell, E-screen assay, competitive binding assay

합성 피레스로이드(synthetic pyrethroid)는 곤충에 비해 인체 및 생태에 상대적 독성이 적은 살충제로서 그간 많은 합성물질이 개발되었다. Pyrethrum 식물인 *Chrysanthemum cinerariaefolium*으로부터 유래된 합성 피레스로이드로서 1947년 최초로 allethrin이 개발된 이후 permethrin, cypermethrin, deltamethrin

과 fenvalerate 등이 개발되어 현재까지 많이 이용되고 있으며 국내에서도 그 사용량이 날로 늘어나고 있는 실정이다. 우리나라에서 현재 많이 사용되고 있는 합성 피레스로이드계통으로는 모기, 파리, 바퀴, 벼룩 및 빈대 등과 같은 해충을 없애기 위한 목적으로 사용되는 di(cis-trans)allethrin, dichlorpyrifos, phthathrin 및 permethrin 등이 있으며, 시판 직전의 야채류에 살포되는 fenvalerate 등이 있다. 이러한 피레스로이드계 살충제의 인체노출은 잔류되어 있는 음식을 통한

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 031-290-7714 (팩스) 031-292-8800

경구노출, 살포에 의하거나 카페트 등에 잔류되어 있는 성분들의 흡입 및 피부 접촉 노출 등 폭넓게 이루어진다.

피레스로이드는 대체적으로 곤충에 비해 인체를 비롯한 포유류에는 상대적 독성이 적다고 알려져 있으나 다양한 역학조사에 따르면 인체 및 포유동물에 급성적으로는 면역, 신경독성을 유발할 수 있으며 만성적으로는 생식 및 발생독성을 유발할 수 있다는 결과가 속속 발표되고 있다. 또한 조류의 경우에는 genital tract에 teratogenic이 유발됨이 발견되어 생식 및 내분비계의 교란이 유발될 가능성이 제시되었다.¹⁾

현재까지 합성 피레스로이드계 살충제의 내분비계 독성에 관한 연구로는, thyroid hormone 조절 및 안드로젠 기능에 영향을 미치는 것으로 보고되어지고 있으며 1981년 역학조사 결과 Haitian의 남성에 있어 gynecomastia를 유발한 원인물질로 보고된 바 있다.²⁾ 또한 Eil와 Nisula³⁾의 연구에 의하면 몇몇 피레스로이드계 살충제가 테스토스테론의 안드로젠 수용체에 대한 결합을 억제하는 것으로 밝혀졌으며 Garey과 Wolff⁴⁾의 연구에서는 T47D human breast cancer cell line 및 Ishikawa Var-1 human endometrial adenocarcinoma cell line을 이용하여 에스트로겐 및 항프로게스테론(antiprogestosterone) 반응이 있음을 밝힌 바 있다. 가장 최근의 연구로는 Go 등⁵⁾이 MCF-7 cell에서 어느 정도 에스트로겐 효과가 나타남이 밝혀졌다. 이와 같이 일상생활에서 인체에 가장 노출되기 쉬운 살충제인 합성 피레스로이드계 살충제의 내분비계 장애물질로서의 작용성에 관한 연구는 그다지 많이 되어 있지는 않다.

이에 본 연구에서는 인체에 노출될 가능성이 많으며 WWF(World Wildlife Fund) 및 일본후생성에서 내분비장애 의심물질로 분류되어 있는 allethrin, permethrin 및 fenvalerate의 에스트로겐 작용을 평가하였다.

실험방법

세포 및 배양액 - E-SCREEN assay는 미국 Tufts 대학의 Dr. Soto에게서 분양 받은 에스트로겐에 의해 민감한 MCF7-BUS cell(Human breast cancer estrogen-sensitive MCF-7 cell)을 사용하였다. 배양은 5% fetal bovine serum(FBS) (Hyclone, Logan, UT) 이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM, Gibco)으로 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기(Forma scientific, U.S.A.)에서 배양하였다.

시험물질의 조제 - 17 β -estradiol(E₂)은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며 allethrin, permethrin 및 fenvalerate는 Wako에서, γ -BHC, endosulfan 및 methoxychlor는 Polyscience에서 구입하였다. 모든 시험물질은 에탄올에 녹여 -20°C에서 저장 후 사용하기 직전에 배양액에 희석하여 사용하였다. 배양액에 처리되는 에탄올의 농도는 0.1%를 넘지 않게 하였다.

CDFBS조제 - 에스트로겐 효과를 최대화하기 위해 시험에 쓰이는 FBS는 charcoal-dextran(5%~0.5%)으로 처리하여 steroid를 제거하여 사용하였다.⁶⁾ 먼저 charcoal(Acid washed; Sigma)을 차가운 멸균 증류수로 활성화시킨 후 dextran(Pharmacia)을 첨가하여 5% charcoal-0.5% dextran T70 현탁액을 만들었다. 이 현탁액에 동일량의 Fetal Bovine Serum(Hyclone)을 넣어 37°C에서 1시간 정도 6 cycles/min으로 회전하여 반응시켰다. 이 현탁액의 반응이 끝난 후 2,000 g로 20분간 원심분리하여 그 상층액을 분리시켜 0.45 μ m와 0.20 μ m syringe filter(Axygen)로 여과하여 사용할 때까지 -20°C에 보관한다.

E-SCREEN assay - MCF7-BUS cell을 이용한 E-SCREEN assay는 Pilar Perez 등⁷⁾의 논문에 의해 실험하였다. 계대중인 세포를 0.05% 트립신 -0.53 mM EDTA · 4Na용액(Gibco.)으로 기기부착면으로부터 탈리시킨 후에 5% FBS가 함유되어 있는 DMEM으로 현탁시켜 24-well plate에 각 well 당 세포수가 10,000 cell이 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하여 바닥에 부착시켰다. 24시간 정도 세포를 부착시킨 후 배양액은 phenol-red가 없는 DMEM으로 2번 씻은 후 10% CDFBS를 함유한 phenol red가 없는 DMEM으로 교체시켜 시험용액을 처리하였다. 144시간동안 시험물질에 노출시킨 후 SRB방법에 의해 세포성장을 측정하였다. 먼저 배양액을 제거하고, PBS로 2번 씻은 후 10% trichloroacetic acid(TCA)를 500 μ l씩 가하여 4°C에서 30분간 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다. 세포고정이 끝난 후에 plate를 증류수로 5~6회 세척하여 남아 있는 TCA용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well 당 300 μ l의 1% 초산용액에 0.4% SRB용액을 녹인 염색액을 가하여 15분간 세포를 염색한 후, 다시 1%

초산으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과량의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조한 후, well당 1 ml의 10 mM trisma base(pH 10.5)용액을 가하여 염색액을 용출시켜 microplate reader (Multiscan MCC/340 Pversion 2.3, LabSystems, Finland)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

E-SCREEN assay에 의한 에스트로겐 효과를 정량적으로 평가하기 위해 양성대조군인 17 β -estradiol과 상대비교를 하였다. 이 방법은 17 β -estradiol에 의해 최대 세포증식을 나타내는 최소 농도를 기준으로 하여 시험물질에 의해 최대 세포증식을 나타내는 최소 농도와의 상대 비교를 백분율 환산한 세포증식 효력 상대비(relative proliferative potency, RPP)와 17 β -estradiol에 의한 최대 세포증식상태의 세포수에 대한 시험물질에 의한 최대 세포증식상태의 세포수를 백분율로 환산한 세포증식 효과 상대비(relative proliferative effect, RPE)를 구하여 비교하는 방법이다.

이 data는 17 β -estradiol에 대한 RPE값과의 student t-test결과 $p < 0.05$ 이하의 유의적인 차이가 보이는 부분을 기준으로 partial과 full agonist로 구분하였으며 RPE값 8이하를 no effect level로 정하였다.⁸⁾

Competitive estrogen-receptor binding assay - Competitive ER binding assay는 Soto 등⁹⁾의 방법에 의해 실험하였다. MCF7-BUS 세포를 5% FBS가 포함된 DMEM에 키운 후 estrogen receptor를 분리하기 24시간 전에 3% CDFBS-DMEM으로 전배양하였다. 세포는 배양액을 제거후 차가운 PBS로 2번 씻고, 2×10^6 cell당 lysis buffer(500 mM KCl, 1.5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, at 4°C) 1 ml로 현탁시킨 후, sonication하여 lysis시켰다. 이 용액을 100,000 \times g에서 40분간 원심분리하여 상층액의 estrogen receptor를 분리하였다. 분리된 estrogen receptor에 1 nM의 [2,4,6,7-³H]E₂와 시험물질을 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 5% charcoal-0.5% dextran suspension(CD slurry)으로 receptor와 결합되지 않은 E₂와 결합된 E₂를 분리하여 liquid scintillation counter로 측정하였다.

Whole-cell competitive estrogen-receptor binding assay - MCF7-BUS cell 및 MCF-7 cell을 이용한 competitive binding assay는 Gierthy 등¹⁰⁾의 방법에 따라 실험하였다. 계대중인 세포를 CDFBS-

DMEM에 현탁시킨 후 24-well plate에 각 well당 5×10^5 cell/ml로 seeding한다. 24시간 동안 37°C, 5% CO₂배양기에서 세포를 부착시킨 후 시험물질과 2 nM의 [2,4,6,7-³H]E₂를 37°C, 5% CO₂배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 배양 종료후 각 well을 PBS로 3번 wash하고 1 ml의 EDTA(10 mM)를 가지고 receptor와 결합된 [³H]E₂를 25°C에서 15분간 용해시켰다. 이 EDTA액에 100 μ l의 0.77M KH₂PO₄로 중화시켜, 100 μ l를 취해 Bradford assay¹¹⁾에 의해 protein을 정량하였으며, 나머지 1 ml는 receptor-bound [³H]E₂양을 측정하기 위해 liquid scintillation counter(1209 Rackbeta, Pharmacia LKB)로 radioactivity를 측정하였다.

데이터 분석 - 각 데이터는 1회 시험에서 각 농도당 4개 well로 3회 단독 시험한 결과이다. 모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 본 실험의 유의성 검정은 Student's t-test로 실시하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의적인 차이를 인정하였다.

실험결과 및 고찰

에스트로겐 효과 - 피레스로이드계 살충제 중 일상 생활에서 노출이 많을 것으로 생각되는 fenvalerate, permethrin 및 allethrin에 대한 에스트로겐 효과를 평가하기 위해 E-screen assay를 수행하였다. 먼저 17 β -estradiol(E₂)에 대한 MCF7-BUS cell의 반응성을 본 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 10⁻¹³M에서 10⁻⁸M까지 용량의존적 반응이 나타났으며 10⁻¹⁰M에서부터 최고 반응에 도달하였다. 따라서 모든 시험물질의 에

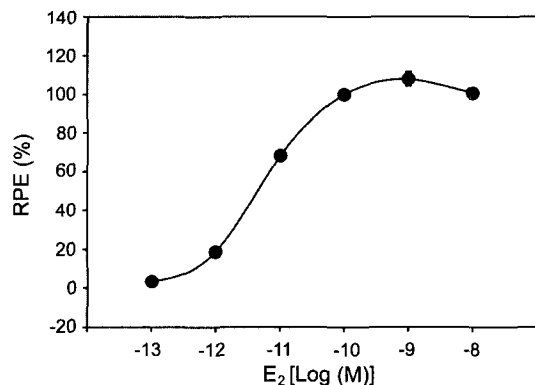


Fig. 1- Concentration-response curve for estrogenic effect of E₂ by E-screen assay.

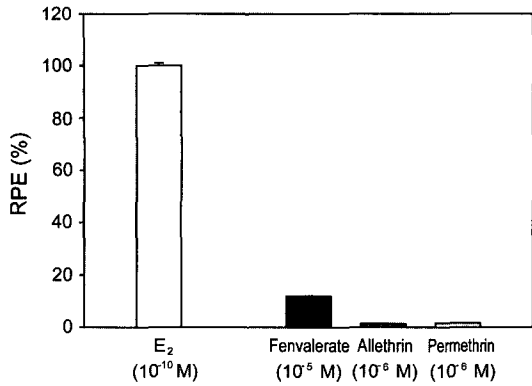


Fig. 2 – Estrogenic effect of pyrethroid insecticides by E-screen assay. All the samples were dissolved in ethanol and 1 μ l of this solution were added to the cell culture medium (1 ml) for treatments, that were done in 24-well plates and lasted 144 hrs. The data represent means of three independent experiments.

스트로겐 활성은 E₂ 10⁻¹⁰M의 반응을 100%로 한 상대적인 비교 즉, RPE값을 계산하였다.

Fenvalerate, permethrin 및 allethrin에 대한 E-screen assay 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M 및 10⁻⁶ M 농도에서 RPE값이 각각 11.87 \pm 0.19%, 1.31 \pm 0.30% 및 1.52 \pm 0.48%로 나타났으며 RPP값은 fenvalerate는 0.001%, permethrin과 allethrin은 0.01%로 나타났다. 이들 물질들의 용량-반응 곡선은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 양성 대조군인 10⁻¹⁰M E₂의 RPE값을 100%로 두었을 때 fenvalerate의 경우에는 10⁻⁷M에서부터 10⁻⁵M까지 용량 의존적인 반

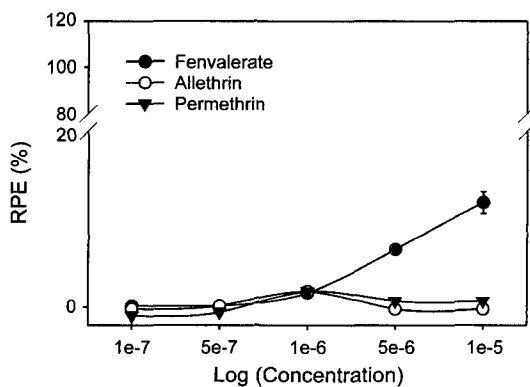


Fig. 3 – Concentration-response curves for estrogenic activity of pyrethroid insecticides by E-screen assay.

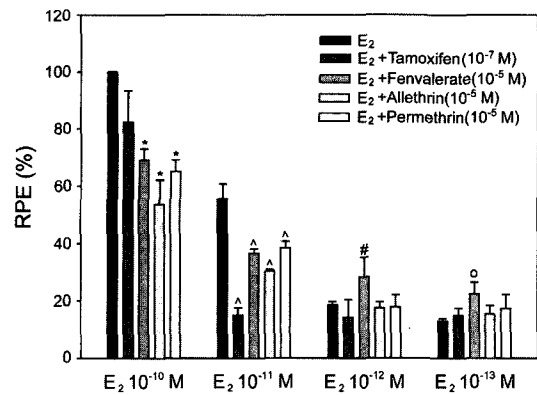


Fig. 4 – Antiestrogenic effect of pyrethroid insecticides by E-screen assay. All the sample were dissolved in ethanol and 1 ml of this solution were added to the cell culture medium (1 ml) for treatments, that were done in 24-well plates and lasted 144 hrs. The data represent means of three independent experiments. Statistically different from the corresponding E₂ (10⁻¹⁰M*, 10⁻¹¹M[^], 10⁻¹²M[#], 10⁻¹³M^o)(p<0.05).

응을 나타냈다. Allethrin 및 permethrin의 경우에는 10⁻⁶M에서 세포증식이 유도되었으나, 매우 미약하였으며 용량 의존적인 반응은 나타나지 않았다. 따라서 fenvalerate는 매우 약한 partial agonist로 판정되었으며, allethrin 및 permethrin의 경우에는 RPE값이 8%이하로 나타나 에스트로겐 효과는 없는 것으로 판정되었다.

항에스트로겐 효과 – 피레스로이드계 살충제의 항에스트로겐 효과를 조사하기 위해 E₂에 의한 세포증식을 fenvalerate, allethrin 및 permethrin이 저하시키는지를 실험하였다. 이를 위해 E₂와 pyrethroid 살충제를 세포에 병용 투여한 후 E-screen assay에 의해 평가하였다. 그 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 E₂ (10⁻¹⁰M)와 10⁻⁵M의 fenvalerate, permethrin 및 allethrin을 각각 병용 투여한 경우 각각의 RPE값은 69.08 \pm 3.99%, 53.65 \pm 8.53% 및 65.12 \pm 3.98%로 나타나 E₂에 의한 세포증식을 억제하는 것으로 나타났으며, 이러한 효과는 tamoxifen (10⁻⁷M)과 E₂(10⁻¹⁰M)를 병용 투여한 결과인 82.42 \pm 11.04%보다 더 강한 항에스트로겐 효과를 보였다.

E₂(10⁻¹¹M)과 fenvalerate, permethrin 및 allethrin의 10⁻⁵M을 각각 병용 투여한 경우에는 RPE값이 각각 36.51 \pm 1.67%, 30.36 \pm 0.59% 및 38.44 \pm 2.25%로 나타나 항에스트로겐 효과가 있는 것으로 나타났으며,

이 효과는 tamoxifen(10^{-7} M)과 E_2 (10^{-11} M)의 병용투여 결과인 $14.97 \pm 2.61\%$ 보다는 항에스트로겐 효과가 미약하였다.

한편 E_2 의 저농도 투여군(10^{-12} M, 10^{-13} M)과 10^{-5} M의 fenvalerate, permethrin 및 allethrin을 병용투여한 경우에는 permethrin 및 allethrin을 병용투여한 군은 E_2 단독군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 10^{-5} M의 fenvalerate와 E_2 10^{-12} M 및 10^{-13} M을 병용투여한 군은 RPE값이 각각 $28.34 \pm 6.75\%$ 및 $22.32 \pm 4.16\%$ 로써 각각의 E_2 단독 투여군에 비해 유의하게 증가되었다. 따라서 E_2 저농도 투여군(10^{-12} M 및 10^{-13} M)과 fenvalerate를 병용 투여할 경우에는 fenvalerate가 E_2 의 에스트로겐 효과를 증가시키는 (additive effect) 것으로 판단되었다. 이는 저농도 E_2 에 의해 미약하게 나타나는 세포증식이 fenvalerate에 의해 촉진되기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 저농도의 E_2 에 의해 유도되는 세포증식에는 피레스로이드계 살충제가 항에스트로겐 효과를 나타내지 않거나 fenvalerate 경우와 같이 오히려 항진시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

Competitive binding assay - Competitive binding assay는 whole cell 및 에스트로겐 수용체를 분리한 두 가지 실험방법에 의해 조사하였는데 allethrin 및 permethrin의 경우 에스트로겐 수용체에 대해 약

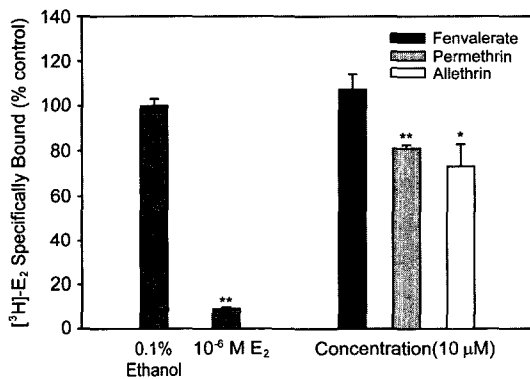


Fig. 5 - Displacement of [³H]E₂ in the MCF7-BUS whole-cell ER binding assay by 0.1% ethanol (vehicle control), 10 nM E₂, 10 μM fenvalerate, 10 μM permethrin and 10 μM allethrin. Cells were incubated for 3h at 37°C after chemical treatment. The data represent means of three independent experiments. Statistically different from the corresponding control 0.1% ethanol (*p<0.05, **p<0.01).

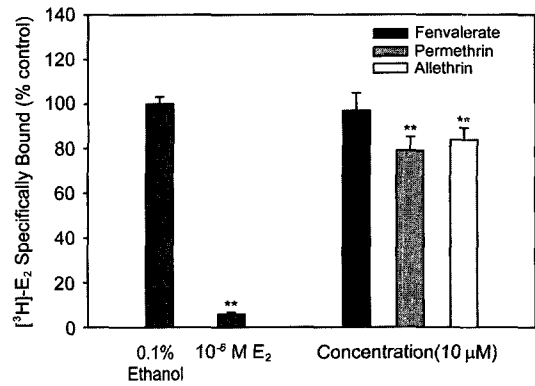


Fig. 6 - Displacement of [³H]E₂ in ER binding assay by 0.1% ethanol, 10⁻⁶ M E₂, 10 μM fenvalerate, 10 μM permethrin and 10 μM allethrin. Cells were incubated for 3h at 37°C after chemical treatment. The data represent means of three independent experiment. Statistically different from the corresponding control (0.1% ethanol) (**p<0.01).

20% 정도의 결합 친화력(binding affinity)이 있는 것으로 나타났으나, fenvalerate의 경우에는 수용체와의 결합이 나타나지 않았다(Fig. 5, 6). 일반적으로 에스트로겐 활성은 에스트로겐 수용체를 매개로 하여 이루어 지는데 그 기전에는 에스트로겐활성물질이 이 수용체에 ligand로써 작용하는 경우와 signal transduction에 의해 에스트로겐 수용체가 phosphorylation되어 유도되는 경우가 있다.¹²⁾ 에스트로겐 수용체의 구조는 activation function-1(AF-1), DNA-binding domain 및 activation function-2(AF-2)의 3부분으로 구분되어 있다. 이 중 AF-2는 호르몬이 ligand로서 결합될 때 transcription 기능을 하는 부분으로서 competitive binding assay는 이 부분에 대한 xenoestrogen의 결합능을 측정하는 방법이다. 본 연구에서 AF-2에 대한 결합 친화력이 있는 것으로 나타난 allethrin 및 permethrin의 항에스트로겐 효과는 에스트로겐 수용체에 ligand로써 작용하여 나타나는 것으로 판단되나, fenvalerate의 경우에는 AF-2에 대한 결합 친화력이 없는 것으로 나타나 이의 에스트로겐 및 항에스트로겐 효과는 에스트로겐 수용체에 ligand로써 작용하지 않는 signaling pathway에 의해 유도되는 것으로 추정되었다.

결론

Pyrethroid계 살충제 3종(fenvalerate, allethrin,

Table I - Estrogenic and antiestrogenic effect of pyrethroid insecticides in MCF7-BUS cell

| Compounds | Estrogen ¹⁾ (antiestrogen ²⁾ effect (%) | Competitive binding assay (%) | | Results |
|-------------|---|-------------------------------|-------------------|-----------------------|
| | | Whole cell | Estrogen receptor | |
| Fenvalerate | 11.87 ± 0.19 (30.92 ± 1.79) | 107.32 ± 6.87 | 96.93 ± 8.00 | Estrogen/antiestrogen |
| Allethrin | 1.31 ± 0.30 (46.35 ± 7.37) | 80.92 ± 1.54** | 78.99 ± 6.08** | Antiestrogen |
| Permethrin | 1.52 ± 0.10 (34.88 ± 2.13) | 73.07 ± 9.76* | 83.79 ± 5.38** | Antiestrogen |

¹⁾RPE : Relative Proliferative Effect

²⁾Inhibition effect of cell proliferation by E₂ (10⁻¹⁰M)

Statistically different from the corresponding control (0.1% ethanol, 100%) (*p<0.05, **p<0.01)

permethrin)의 E-screen assay 및 competitive binding assay 수행한 결과를 Table I에 정리하였다. 이들 살충제 중 fenvalerate는 RPE값이 11.87%로 매우 약한 partial agonist로 분류되었으며, allethrin 및 permethrin의 경우에는 RPE값이 8%이하로 나타나 에스트로겐 효과는 없는 것으로 판정되었다.

항에스트로겐효과는 고농도의 E₂투여군인 10⁻¹⁰M에서는 대표적인 항에스트로겐 약물인 tamoxifen보다 그 효과가 크게 나타났으나, 10⁻¹¹M의 경우에는 tamoxifen에 비해 그 효과가 적었다. E₂의 저농도 투여군인 10⁻¹²M, 10⁻¹³M의 경우에는 항에스트로겐이 나타나지 않았으며, fenvalerate의 경우에는 오히려 E₂의 세포증식을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

Competitive binding assay 결과 allethrin 및 permethrin의 항에스트로겐 효과는 에스트로겐 수용체를 매개로 하여 나타날 가능성이 높으나 fenvalerate의 경우에는 에스트로겐 수용체를 매개하지 않는 다른 기전에 의한 것으로 추정되었다.

이상의 결과로 보아 fenvalerate, allethrin 및 permethrin은 약한 에스트로겐 효과 및 강한 항에스트로겐 효과를 지니는 것으로 나타나 내분비계 장애작용을 유발할 수 있을 것으로 추정되었다.

감사의 말씀

본 연구는 2000년도 한국과학재단 연구비(과제번호 : 2000-2-30700-003-3)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

문헌

1) Lutz-Ostertag, Y. and Lutz, H. : Sexualite et pesticides.

Ann. Biol. **13**, 173 (1974).

- 2) Sattin, R. W., Roisin, A., Kafriksen, M. E., Dugan, J. B., Farer, L. S. : An epidemic of gynecomastia among illegal haitian entrants. *Public Health Rep.* **99**, 504 (1984).
- 3) Eil, C. and Nisula, B. C. : The binding properties of pyrethroids to human skin fibroblast androgen receptors and to sex hormone binding globulin. *J. Steroid Biochem.* **35**(3-4), 409 (1990).
- 4) Garey, J. and Wolff, M. S. : Estrogenic and antiprogesteragenic activities of pyrethroid insecticides. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **251**, 855 (1998).
- 5) Go, V., Garey, J., Wolff, M. S., and Pogo, B. G. T. : Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environmental Health Perspectives.* **107**(3), 173 (1999).
- 6) Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Serrano, F. O., Rivas, A., Fertrell, A. N., Pedraza, V., Soto, A. M., and Sonnenschein, C. : Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect.* **104**(3), 298 (1996).
- 7) Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V., and Olea, N. : The Estrogenicity of Bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Perspect.* **106**(3), 298 (1998).
- 8) Oh, S. M., Lee, S. K. and Chung, K. H. : Quantitative assessment of xenoestrogenic environmental pollutants using E-screen assay. *Yakhak Hoeji*, **44**(5), 416 (2000).
- 9) Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L.,

- Fernandez, M. E., Olea, N. and Serrano, F. O. : The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* **103**(Suppl 7), 113 (1995).
- 10) Gierthy, J. E., Spink, B. C., Figge, H. L., Pentecost, B. T., and Spink, D. C. : Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and 17 β -estradiol on estrogen receptor regulation in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **60**, 173 (1996).
- 11) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 12) Grandien, K. A. J., Berkenstam A., Gustafsson J. : The estrogen receptor gene : Promoter organization and expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 1343 (1997).