

In vitro 검출시스템을 이용한 해양생물 추출물로부터 에스트로겐 활성 검증

하종명 · 이상현*

신라대학교 생명공학과, 마린 바이오 산업화 지원센터

Verification of Estrogenic Activity in Ethanol Extracts of Marine Organisms Using *in vitro* Test System.

Jong Myung Ha and Sang-Hyon Lee*

Marine Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries
Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, San 1-1, Kwabop-dong,
Sasang-gu, Busan, 617-736 KOREA

Abstract

In order to verify the occurrence of an estrogenic compound in natural products, the estrogenic activity was measured using an *in vitro* detection system. For this system, human breast cancer cell line MCF7 was transfected using an estrogen responsive CAT reporter plasmid. Estrogenic activities of photosynthetic algae spirulina and sea lettuce were evaluated using this system. Estrogenic activities of a 500 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ ethanol extracts of spirulina were as much as that of 10^{-8} M standard solution (17β -estradiol) and activity of 5 $\mu\text{g/ml}$ ethanol extract of spirulina was as much as that of 10^{-10} M standard solution. However, no significant estrogenic activity was observed using sea lettuce extract. Estrogenic activities of marine animals, such as star fish and shrimp, were also evaluated using this system, however, no significant estrogenic activity was observed in these extracts. In this result, it is confirmed that spirulina extract possesses estrogenic compound.

Key words – estrogen, estrogenic activity, *in vitro* detection, marine organism, phytoestrogen.

서 론

자연계에 존재하고 있는 천연물이나 식품에는 약효를 나타내는 성분들이 많이 있으며, 천연물 성분들의 각 분획별 생리활성 물질을 규명하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 육상식물에서 많이 보고되고 있는 phytoestrogen은 성호르몬인 에스트로겐과 유사한 구조 및 기능을

가지고 있으며 배당체(glycoside) 형태로 발견된다[4,11,17, 18]. Phytoestrogen은 폐경기 이후의 여성에게 에스트로겐 대체 작용을 할 수 있는 것으로 밝혀져 질병예방 차원에서 많은 연구가 수행되고 있다[3,10,11,16,19,20]. Phytoestrogen은 *in vitro* 실험에서 에스트로겐과 유사한 작용을 함으로써 여성의 에스트로겐 결핍으로 유발되는 골다공증 예방, 폐경기 증상의 완화[1,2] 그리고 유방암, 전립선암, 심장질환 등의 예방에 중요한 역할을 하고[10,11], 알츠하이머 질환을 예방하는데 도움을 줄 수 있다는 연구결과가 발표된 바 있다[16].

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-999-5624, Fax : 051-999-5636
E-mail : slee@silla.ac.kr

그러나 지구 전체 생물의 80% 이상을 차지하고 있는 해양생물에 대해서는 육상생물 만큼의 연구가 이루어지지 않아 미지의 요소가 많이 산재해 있다. 최근 해양생물의 연구가 활발히 이루어짐에 따라 다양한 생리활성물질을 포함한 유용한 성분들이 지속적으로 밝혀지고 있다. 특히, 노화방지, 암 예방, 항 혈액응고 등 생리활성기능 측면에서 관심이 고조되고 있으며 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 해양생물을 대상으로 에스트로겐 유사활성을 탐색하여 에스트로겐 대체물질로의 이용 가능성 여부를 확인하기 위해 연구를 수행하였다.

불가사리는 steroidal glycoside인 triterpene glycosides를 대사산물로 생산하고, 다양한 형태의 saponine을 갖고 있는 것으로 알려져 있다[5,6,9]. 새우는 다량의 콜레스테롤이 함유되어 있어 콜레스테롤로부터 생성되는 에스트로겐의 존재 가능성이 높을 것으로 예상되어 실험에 이용하였다. 최근 건강식품으로 개발되어 크게 각광받고 있는 스피루리나는 여러 가지 기능성을 가진 미세 녹조류이다. 이들은 특히 단백질, 아미노산, 비타민, 페놀산 (phenolic acid), 토코페롤, 베타카로틴, 필수지방산, 탄수화물 등을 다량 함유하고 있으며, 이들 중 페놀산 (phenolic acid), 토코페롤, 베타카로틴 등은 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있다 [12,14]. 또한 스피루리나는 장내 유산균의 생육을 돕는 유익한 생리활성 물질을 생산하는 것으로도 알려져 있다[14]. 한편, 최근 해조류에서 다양한 생리활성물질이 발견되고 있는 녹조류의 하나인 파래도 에스트로겐 유사활성 탐색 대상으로 선정하여 연구를 수행하였다.

이 연구는 해양생물을 대상으로 에스트로겐 유사활성을 가질 가능성이 높은 생물을 선정하여 본 연구에서 개발한 에스트로겐 반응성 리포터 시스템을 이용하여 대상 생물의 에스트로겐 유사효과 활성을 검증하였다.

재료 및 방법

해양생물로부터 추출물의 제조

구멍갈파래(*Ulva pertusa*)와 별불가사리(*Asterina pectinifera*)는 부산시소재 민락수변공원 앞바다에서 채집하고, 세척 후 음건하여 사용하였다. 새우(*Penaeus chinensis*)는 건조새우를 구입하여 사용하였고, 스피루리나(*Spirulina*, Kordel's *Spirulina*, Australia)는 순수함량 100%의 제품을 사용하였

다. 각 건조시료 100 g에 95% 에탄올 500 ml를 첨가하여 65°C에서 3시간 동안 추출하였다. 추출액은 여과지 (GFC 20mm)로 여과하고, 여액을 진공 농축한 후, 동결건조하여 추출물을 얻었다. 추출물 0.5 g을 99% ethanol에 용해시킨 후 필터 (0.45 μm)를 통과시켜 멸균하여 사용하였다.

플라스미드의 구축

Xenopus vitellogenin A2 estrogen responsive elements (ERE)가 두 번 반복된 ERE119 [15]와 전사활성을 나타내는데 ERE 영역을 요구하는 promoter로 알려진 adenovirus-2 major later promoter (Ad2MLP)[13]의 cloning을 위해 합성된 oligonucleotide들의 sequence를 Table 1에 나타내었다. Ad2MLP에 해당하는 oligonucleotide 두 가닥을 annealing하여 이중가닥 DNA로 만든 후, 이를 먼저 pCAT-Basic (Promega, USA)의 CAT 유전자 상류인 *Pst*I과 *Xba*I 부위에 삽입하여 pCAT-Ad2MLP를 구축하였다. ERE119에 해당하는 oligonucleotide 두 가닥을 annealing하여 이중가닥 DNA로 만든 후, 이를 pCAT-Ad2MLP의 Ad2MLP promoter 상류인 *Hind*III와 *Pst*I 부위에 삽입하여 pCAT-ERE119-Ad2MLP를 구축하였다.

세포배양 및 Transient Expression Assay

MCF7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 획득하였다. MCF7 세포주는 10%의 Fetal Bovine Serum (FBS, Bio whittaker, USA)을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Bio whittaker, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

MCF7 cell은 DMEM 배지에 subculture하여 48시간 후에 transfection하였다. 배양된 cell은 phosphate buffered saline로 2번 세척 후, FBS를 포함하지 않는 DMEM 2 ml에 배양하였다. Transfection에 사용한 pCAT-ERE119-Ad2MLP 플라스미드는 Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Inc., USA)를 사용하여 분리하였다. FBS를 포함하지 않는 DMEM 250 μl에 pCAT-ERE119-Ad2MLP DNA 5 μl를 넣은 후 PLUS reagent (Life Technologies, USA)를 5 μl 첨가하여 조심스럽게 혼합한 뒤 실온에서 15분간 방치하여 Plus reagent와 DNA 혼합액 (용액 I)을 만들었다. 그리고, Lipofectamine reagent (Life Technologies, USA) 5 μl에 FBS를 포함하지

Table 1. Oligonucleotides for plasmid construction

Ad2MLP	
Sense	5'-GCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCAC <i>Pst</i> I TCTCTTCCGCATCGCTCTCTGCGAGGGCCAGCT-3' <i>Xba</i> I
Antisense	5'-CTAGAGCTGGCCCTCGCAGACAGCGATCCGGAAG <i>Xba</i> I AGAGTGAGGACGAACGCGCCCCACCCCCTTTTATAGCTGCA-3' <i>Pst</i> I
ERE119	
Sense	5'-AGCTTCGAGATCAGGTCACAGTGACCTGACTCGAC <i>Hind</i> III ATCAGGTCACAGTGACCTGACTCTGCA-3' <i>Pst</i> I
Antisense	5-GAGTCAGGTCAGTGTGACCTGATCTCGAGTCAGGT <i>Pst</i> I CACTGTGACCTGATCTCGA-3' <i>Hind</i> III

않는 DMEM 250 μ l를 넣어 혼합한 용액 (용액 II)를 제조한 후, 용액 I과 II를 혼합하여 실온에서 방치하였다. 15분 후, 준비된 MCF7 cell에 첨가하여 3시간 배양한 뒤 20%의 dextran-coated charcoal stripped FBS [15]를 포함하는 DMEM 2.5 μ l를 첨가하였다.

Transfection이 완료된 1 시간 후, 시료들을 각각 5 μ l 씩 처리하였다. 각 시료의 추출물은 최종농도 500, 50, 5 μ g/ml 농도로 사용하였고, 표준물질로 이용된 17 β -estradiol (RBI, USA)은 최종농도 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ M로 사용하였다. 그 후, 48시간 동안 배양한 다음 세포를 회수하였고, -20 $^{\circ}$ C에서 5분, 37 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 4회 반복하여 cell을 lysis한 후, 14,000 \times g에서 5분 동안 원심분리하여 상등액 200 μ l를 취하여 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 활성을 측정하였다. CAT 활성은 CAT-ELISA Kit (Boehringer Mannheim, USA)를 이용하여 Manual에 따라 수행하였다. CAT 활성 결과는 BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce, Rockford, IL)를 이용해 측정한 각 추출물의 단백질함량으로 표준화시켰다.

결과 및 고찰

에스트로겐 유사물질의 수율
파래, 새우, 불가사리, 스피루리나 건조시료를 100 g을

에탄올로 추출하고, 농축한 후 동결건조하여 에탄올 추출물을 각각 5.6 g, 7.4 g, 4.3 g, 9.2 g 씩 얻었다. 이들의 수율은 약 4%~9%로 불가사리 추출물에서 가장 낮은 수율을 나타냈고 스피루리나 추출물에서 가장 높은 수율을 나타냈다. 이러한 결과는 사용한 시료의 물리적인 형태에 관계가 있는 것으로 판단되며 미세조류인 스피루리나의 경우는 입자가 적어서 효과적인 추출이 이루어진 것으로 사료된다.

에스트로겐 유사효과의 검증

일반적으로 생물체내로 유입된 에스트로겐 유사물질은 에스트로겐을 모방하여 세포 내에 있는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor: ER)와 결합하여 DNA의 특정 염기서열인 estrogen responsive element (ERE)를 인식하여 결합한다. 이러한 DNA 상의 반응인자와 단백질의 결합은 그 반응인자에 의해 조절되는 유전자의 전사를 증대시켜 결국 특정 단백질의 발현을 유도하여 에스트로겐 유사물질에 의한 세포반응을 유도하는 것으로 알려져 있다 [7, 8]. 이 연구에서는 에스트로겐 수용체를 발현하는 것으로 알려진 인체 유방암 세포주 MCF7에 에스트로겐에 반응성을 나타내도록 고안된 CAT 리포터 플라스미드인 pCAT-ERE119-Ad2MLP를 도입한 *in vitro* 검출시스템을 사용하

여 에스트로겐 활성을 측정하였다(Fig. 1).

에스트로겐 반응성 리포터 플라스미드가 도입된 인체 유방암 세포주 MCF7에 스피루리나 추출시료를 최종농도 500 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 에탄올로 희석하여 세포주에 처리하였고, 구멍갈파래, 불가사리, 새우 추출시료는 최종농도 500 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 에탄올로 희석하여 세포주에 처리하였으며, 표준물질로서 17 β -estradiol을 최종농도 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M이 되도록 처리하였다. Fig. 2는 에탄올만을 처리한 세포의 CAT 활성을 1로 하였을 때의 여러 농도의 해양생물유래 시료를 처리한 세포 혹은 표준물질인 17 β -estradiol을 처리한 세포의 CAT 활성을 비교한 결과이다. 스피루리나 추출물의 CAT 활성은 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 표준물질인 17 β -estradiol의 농도 10^{-8} M과 비슷한 정도의 에스트로겐 활성 효과를 나타내었고 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 표준물질인 17 β -estradiol의 농도 10^{-9} M 보다 높은 에스트로겐 활성 효과를 나타내었다. 또한 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 표준물질인 17 β -estradiol의 농도 10^{-10} M과 비슷한 정도의 에스트로겐 활성 효과를 나타내었다(Fig. 2). 즉, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 스피루리나 추출물은 에탄올을 처리한 대조군에 비해 약 3

배의 활성을 나타냈으며, 농도 10^{-8} M의 표준물질 17 β -estradiol도 에탄올을 처리한 대조군에 비해 약 3 배의 활성을 나타냈다. 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 스피루리나 추출물은 에탄올을 처리한 대조군에 비해 약 2 배의 활성을 나타냈고, 농도 10^{-10} M의 표준물질 17 β -estradiol도 역시 에탄올을 처리한 대조군에 비해 약 2 배의 활성을 나타냈다. 이 결과로 스피루리나 추출물에는 표준물질과 비슷한 효과의 에스트로겐 활성을 나타내는 에스트로겐 유사물질이 포함되어 있음이 확인되었다. 한편, 해조류인 구멍갈파래 추출물의 경우는 500 $\mu\text{g/ml}$ 와 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 모두에서 에탄올을 처리한 대조군에 비해 유의한 활성변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이는 항암활성 등 여러 가지 생리활성을 가진 해조류이지만 이러한 생리활성들이 에스트로겐 유사효과에 의한 것이 아니라는 것을 확인할 수 있었다. 불가사리 추출물

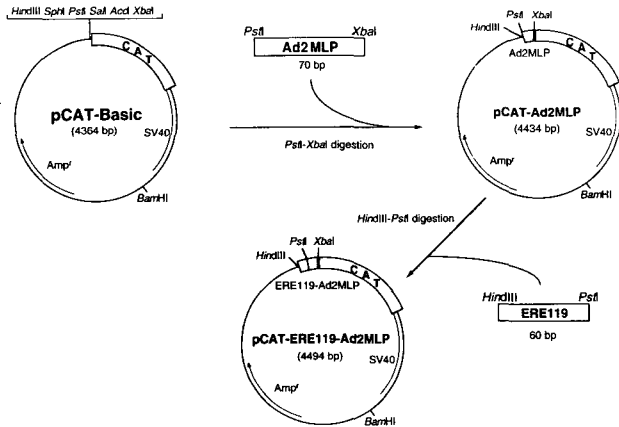


Fig. 1. Construction of estrogen responsive reporter plasmid.

An Ad2MLP fragment was inserted in *PstI-XbaI* sites of pCAT-Basic yielding pCAT-Ad2MLP. And then an ERE119 fragment was inserted in *HindIII-PstI* sites of pCAT-Ad2MLP yielding pCAT-ERE119-Ad2MLP. CAT; chloramphenicol acetyltransferase gene, Amp^r; β -lactamase coding region, SV40; simian virus 40 small T antigen region.

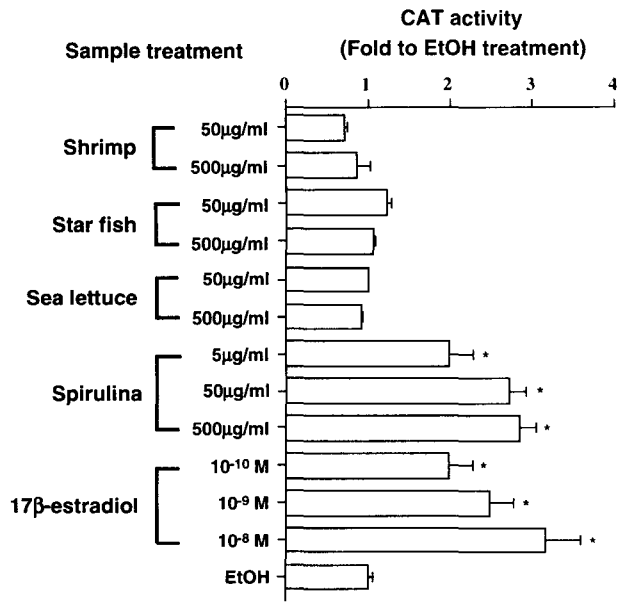


Fig. 2. Estrogenic activity of extracts.

MCF7 cells were transfected with pCAT-ERE119-Ad2MLP using Lipofectamine. Transfected cells were then treated with spirulina, sea lettuce, star fish, and shrimp extracts, 17 β -estradiol or ethanol as indicated concentrations. CAT activity was measured using the CAT-ELISA kit and normalized to protein concentration of cell lysates. Means \pm SEM for three plates are shown as fold compared with ethanol treatment. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test: * $p < 0.0001$ compared with ethanol treatment. These experiments were repeated at least twice yielding reproducible results.

의 CAT 활성은 500 $\mu\text{g/ml}$ 와 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 모두에서 에탄올을 처리한 대조군에 비해 유의한 활성변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이 결과로 불가사리가 steroidal glycoside인 triterpene glycosides를 대사산물로 생산하고, 다양한 형태의 saponine을 갖고 있는 것으로 알려져 있지만 이들 사포닌이 구조적 유사성에도 불구하고 에스트로겐 유사효과를 나타내지 않는다는 것을 확인할 수 있었다[8,6,5]. 또한 새우 추출물의 CAT 활성도 500 $\mu\text{g/ml}$ 와 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 모두에서 에탄올을 처리한 대조군에 비해 유의한 활성변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이 결과 역시 콜레스테롤 농도가 높은 새우의 경우에도 이들 콜레스테롤이 에스트로겐 유사효과를 나타내지 않는다는 것을 나타내는 결과이다(Fig. 2).

이 연구의 목표는 폐경기 이후 여성에게 에스트로겐 대체 작용을 할 수 있는 물질을 신속하고도 정확하게 탐색해 내는데 있다. 본 연구 결과로 광합성 조류인 스피루리나에 에스트로겐 유사효과를 나타내는 물질이 포함되어 있을 가능성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 스피루리나가 가지고 있는 에스트로겐 유사물질을 이용하여 폐경기 이후의 여성에 있어서 에스트로겐 대체작용을 할 수 있는 식품을 개발할 수 있는 가능성을 보여주는 결과로 사료된다.

요 약

천연물에 포함되어 있는 에스트로겐 효과를 가지는 성분의 생체 내에서의 직접적인 효과를 검증하기 위하여, 에스트로겐 수용체를 발현하는 것으로 알려진 인체 유방암 세포주 MCF7에 에스트로겐에 반응성을 나타내도록 고안된 CAT 리포터 플라스미드를 도입한 *in vitro* 검출시스템을 사용하여 에스트로겐 활성을 측정하였다. 이미 여러 분야에서 그 기능성의 연구가 활발히 진행되고 있는 광합성 조류인 스피루리나(spirulina)와 파래 등의 해양식물을 대상으로 에스트로겐 반응 리포터 시스템을 이용하여 에스트로겐 활성을 측정하였다. 그 결과, 스피루리나 에탄올 추출물의 CAT 활성은 500 $\mu\text{g/ml}$ 와 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 표준물질인 17 β -estradiol의 농도 10^{-8} M과 비슷한 정도의 에스트로겐 활성 효과를 나타내었고, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 표준물질인 17 β -estradiol의 농도 10^{-10} M과 비슷한 정도의 에스트로겐 활성 효과를 나타내었다. 하지만 파래 추

출물의 경우에는 에탄올을 처리한 대조군과 비교하여 유의한 CAT 활성 변화를 나타내지 않았다. 한편, 불가사리와 새우 등의 해양동물을 대상으로 한 실험에서는 에탄올을 처리한 대조군과 비교하여 유의한 CAT 활성 변화를 나타내지 않았다. 이 연구 결과로 광합성 조류인 스피루리나에 에스트로겐 활성을 효과적으로 나타내는 생리활성성분이 포함되어 있을 수 있다는 가능성을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Albertazzi, P. and D. W. Purdie. 2002. The nature and utility of the phytoestrogens: A review of the evidence. *Maturitas*. **42**, 173-185.
2. Anderson, J. B. and S. C. Garner. 1998. Phytoestrogen in bone. *Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.* **12**, 543-557.
3. Anthony, M. S., T. B. Clarkson, C. L. Hughes, T. M. Morgan and G. L. Burke. 1996. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.* **126**, 4350.
4. Brzezinski, A. and A. Debi. 1999. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur. J. Obstet. & Gynecol.* **85**, 47-51.
5. Bruno, I., L. Minale, R. Riccio, L. Cariello, T. Higa and J. Tanaka. 1993. Starfish saponins. Part 50. Steroidal glycosides from the Okinawan starfish *Nardoa tuberculata*. *J. Nat. Prod.* **56**, 1057-1064.
6. De Marino, S., M. Iorizzi, E. Palagiano, F. Zollo and C. Roussakis. 1998. Starfish saponins. 55. Super (1) Isolation, structure elucidation, and biological activity of the steroid oligoglycosides from an antarctic starfish of the family Asteriidae. *J. Nat. Prod.* **61**, 1319-1327.
7. Gaido, K. W., L. S. Leonard, S. C. Maness, J. M. Hall, D. P. McDonnell, B. Saville and S. Safe. 1999. Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol.* **140**, 5746-5753.
8. Gronen, S., N. Denslow, S. Manning, S. Barnes, D. Barnes and M. Brouwer. 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health Perspect.* **107**, 385-390.
9. Kalinovskiy, A. I., A. S. Antonov, S. S. Afiyatullo, P.

- S. Dmitrenok, E. V. Evtuschenko and V. A. Stonik. 2002. Mycaloside A, a new steroid oligoglycoside with an unprecedented structure from the Caribbean sponge *Mycale laxissima*. *Tetrahed. Lett.* **43**, 523-525.
10. Kurzer, M. S. and X. Xu. 1997. Dietary phytoestrogens. *Ann. Rev. Nutr.* **17**, 353-281.
 11. Lissin, L. W. and J. P. Cooke. 2000. Phytoestrogens and cardiovascular health. *J. Am. Col. Cardiol.* **35**, 1403-1410.
 12. Miranda, M. S., R. G. Cintra, S. B. Barros and J. Mancici Filho. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 1075-1079.
 13. Miyamoto, N. G., V. Moncollin, J. M. Egly and P. Chambon. 1985. Specific interaction between a transcription factor and the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. *EMBO J.* **4**, 3565-3570.
 14. Parada, J. L., G. Z. de Caire, M. C. Z. de Mule and M. M. S. de Cano. 1998. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *Int. J. Food Microbiol.* **45**, 225-228.
 15. Ponglikitmongkol, M., J. H. White and P. Chambon. 1990. Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J.* **9**, 2221-2231.
 16. Simpkins, J. W., P. S. Green, K. E. Gridley, M. Singh, N.C. de Fiebre and G. Rajakumar. 1997. Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* **103**, 19S-25S.
 17. Song, Y. S., C. Jin, K. J. Jung and E. H. Park. 2002. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *J. Ethnopharmacol.* **82**, 89-95.
 18. Strauss, L., R. Santti, N. Saarinen, T. Streng, S. Joshi and S. Makela. 1998. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol. Lett.* **102**, 349-354.
 19. Tikkanen, M. J., K. Wahala, S. Ojala, V. Vihma and H. Adlercreutz. 1998. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3106-3110.
 20. Yang, N. N., M. Venugopalan, S. Hardikar and A. Glasebrook. 1996. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 β -estradiol and raloxifene. *Science* **273**, 1222-1225.

(Received July 12, 2003; Accepted November 14, 2003)