



에스트로겐 수용체 및 Luciferase 리포터 유전자 도입 사람 간 종양세포 (HepG2 cell)에서 Toxaphene과 Chlordane의 내분비 독성

김경배 · 정지원 · 양세란 · 강경선 · 이영순
서울대학교 수의과대학

Endocrinic Effects of Toxaphene and Chlordane in Human Hepatoma Cell (HepG2 Cell) Transfected with Estrogen Receptor and Luciferase Reporter Gene

Kyeong-Bae Kim, Ji-Won Jung, Se-Ran Yang, Kyung-Sun Kang and Yong-Soon Lee

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received May 3, 2004; Accepted July 27, 2004

ABSTRACT. Concern that some chemicals in our environment may affect human health by disrupting normal endocrine function has prompted a research on interactions of environmental contaminants with steroid hormone receptor. Toxaphene and chlordane are among the 12 persistent organic pollutants identified by the United Nations Environment Programme as requiring urgent attention. We compared the estrogenic activity of two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, at estrogen receptor α (ER α) and estrogen receptor β (ER β). Human hepatoma cells (HepG2) were transiently transfected with rat ER α or ER β plus an estrogen-responsive complement C3-luciferase (C3-Luc) reporter gene. After transfection, cells were treated with various concentrations of toxaphene and chlordane to investigate agonism or antagonism of these chemicals. Both toxaphene and chlordane were potent agonists in HepG2 cells for ER α . In contrast, these chemicals had a minimal agonist activity with ER β and almost abolished 17 β -estradiol-induced ER β -mediated activity. Therefore, toxaphene and chlordane behaved as an ER α agonist and an ER β antagonist with estrogen-responsive reporter plasmid C3-Luc, and exposure to these organochlorine pesticides could have a critical effect on normal endocrine function.

Keywords: Endocrine disruptor, Toxaphene, Chlordane, Estrogen receptors, ER α , ER β , agonist, antagonist.

서 론

우리 주변 환경에 존재하는 천연 또는 합성 화학 물질들 중에는 스테로이드 호르몬과 유사한 작용을 나타내면서 생체 내에서 만들어지는 호르몬과 비교하여 쉽게 분해되지 않고 지방친화성이 있어 체내에 축적됨으로써 정상적인 내분비계의 기능을 파괴하는 물질들이 많이 존재한

다. 이러한 내분비계 장애물질들은 체내에 유입되었을 때 정상적인 내분비계의 기능에 변화를 유발하여 생식기능과 면역기능의 저하, 기형, 성장 장애나 불임, 자궁내막증 혹은 유방, 자궁, 전립선 등에 암을 유발한다고 보고되고 있다(Arnold *et al.*, 1996; Gaido *et al.*, 1997; Maness *et al.*, 1998). 이러한 내분비계 장애물질로 추정되고 있는 물질에는 DDT, methoxychlor, vinclozolin과 같은 살충제 및 제초제 등의 농약류와 bisphenol A 나 *p*-nonylphenol 같은 산업적 화학물질 외에도 소각장의 다이옥신류 및 genistein, coumestrol과 같은 식물에 존재하는 에스트로겐(phytoestrogen), 합성 에스트로젠인 diethyl-

Correspondence to: Yong-Soon Lee, Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Shilim-9dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
E-mail: leeys@snu.ac.kr

stilbestrol(DES) 등이 있다(Gaido *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1997; Breithofer *et al.*, 1998).

환경호르몬의 공포는 우리가 일상 생활에서 늘 접하고 있으면서도 그 유해성을 당장 심각하게 느끼지 못하는 반면 그 영향은 매우 광범위하고 강력할 뿐더러 지속적일 수 있다는 데 있다. 현재 세계보건기구와 각국의 보건 당국이 '환경호르몬'으로 분류한 화학물질은 70종이 넘는다. 이 가운데에는 DDT, HCB, TBT 등처럼 이미 맹독성이 확인되어 환경호르몬으로 논의가 활발해지기 이전에 금지된 약물도 많다. 하지만 이들은 오랜 기간동안 환경이나 생체 내에 많은 양이 남아 있어 여전히 각별한 주의를 요하고 있다. 즉, 이러한 환경호르몬의 공포에도 불구하고 명확한 규제 기준이 마련되지 않았다는 점이다.

우리나라에서도 다양한 유기염소계 농약류의 사용과 폐기물의 소각처리량이 증가하면서, 이러한 내분비계 장애물질에의 노출 가능성이 점점 증가되고 있다. 특히, PCBs와 DDT가 일반 환경 중에서 검출된 바 있으며, 다이옥신류의 경우에도 극미량이라는 하나 토양에서 검출이 보고된 바 있으며, 일부 우리나라 사람의 지방조직 및 모유에서도 이러한 PCBs, DDT 및 다이옥신류가 검출되고 있어 이에 대한 국민들의 관심은 더욱 증대되고 있다.

스테로이드의 생물학적 활성은 스테로이드 수용체라고 알려진 특별한 세포내 단백질과 결합하여 발생한다(Ing and O'Malley, 1995). 수용체에 스테로이드의 결합은 수용체의 구조적인 변화를 일으켜 스테로이드와 스테로이드 수용체 복합체가 세포내 DNA의 특별한 위치에 결합하게 된다. 스테로이드와 스테로이드 수용체 복합체가 DNA와 결합하게 되면, 스테로이드 반응 유전자의 발현을 변화시킨다. 스테로이드의 세포 내 영향은 이러한 유전자 발현의 변화를 통해서 일어난다(Ing and O'Malley, 1995). 하나의 화학물질이 수용체 매개 과정을 변화시키는 데에는 여러 가지의 기전이 존재하며, 이러한 화학물질들은 특별한 곳에서 합성, 대사, 분포, 제거의 과정들에 변화를 주어 내생적인(endogenous) 스테로이드의 활성을 변화시킬 수 있다. 또한 이러한 물질들은 수용체의 level을 변화시키거나 2차적인 pathway를 통하여 수용체 기능에 영향을 주어 스테로이드의 조직 반응 정도를 변화시킨다고 한다(Gaido *et al.*, 1997). 또는 화학물질이 스테로이드 수용체와 직접 작용하여 스테로이드 반응과 유사한 효과를 나타내거나 이를 억제시키기도 한다고 한다. 이처럼 스테로이드 수용체와 직접적으로 작용하는 물질들은 매우 적은 농도에서도 영향을 줄 수 있는 가능성이 있다(Gaido *et al.*, 1997). 따라서 내분비계의 정상적인 기능을 파괴하는 것으로 알려진 이러한 화학물질들이 수용체를 매개하여 일어나는 영향에 대한 평가는 필수적이라 하겠다.

지금까지 알려진 내분비계 장애물질의 검색 방법에는 유방암 세포에서의 MCF-7 세포 증식(E-Screen)법, *in vivo* uterotrophic bioassay, 무지개 송어에서의 vitellogenin 생성법, 형질전환효모를 이용한 검색법 등 많은 시험법들이 소개되고 있으나(Chen *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 1997), 각각의 시험 방법들에는 몇 가지 다른 점들이 나타나고 있어 보다 정확한 검색이 요구된다 하겠다.

본 실험에 사용된 toxaphene과 chlordane은 우리가 흔히 접하는 유기염소계 살충제 중의 하나로서 에스트로겐 수용체와 관련되어 내분비계 장애물질로 의심되어 지고 있다. 특히 이 두 물질은 에스트로겐 수용체 α 와 β 에 각기 다르게 작용하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 내분비계 장애물질을 검색하는 *in vitro* 방법 중의 하나인 에스트로겐 수용체 α 와 β 및 Luciferase 리포터 유전자 도입 사람 간 종양세포(human hepatoma cell)를 이용하여 이 두 물질의 내분비 독성을 알아보려 한다.

재료 및 방법

시험물질

Toxaphene과 chlordane(Fig. 1)은 Supelco(Bellefonte, PA)에서, 양성 대조물질로 사용한 17β -estradiol(E2)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 모든 시험물질은 DMSO에 용해하여 사용하였다.

세포 배양

HepG2 human hepatoma cell은 한국 세포주은행(KCLB; Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS, 2% L-glutamine 및 0.1% sodium pyruvate가 첨가된 EMEM (Life Technologies)배지를 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포 독성

HepG2 cell을 96-well flat-bottom tissue culture

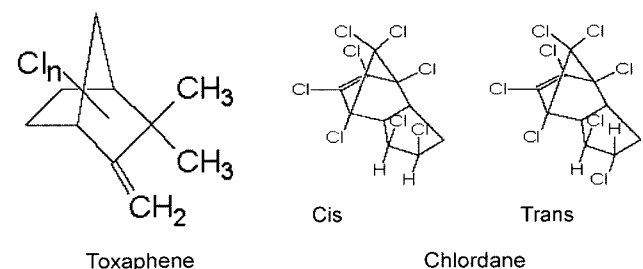


Fig. 1. Toxaphene과 Chlordane의 구조식.

plate에 1×10^4 cells/well 되도록 seeding한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양했다. 24시간 후, toxaphene와 chlordane를 무혈청배지에 농도별로 희석하여 처리했다. 또한 neutral red를 배지에 50 ng/ml로 희석하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 보관했다. 그 후 처리물질을 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)로 3번 세척한 다음, 각 well에 neutral red를 첨가하여 배양했다. 2~3시간 후 세포가 well에서 떨어지지 않도록 PBS로 주의해서 세척한 다음, 1% acetic acid/50% EtOH 용액을 첨가하여 살아있는 세포내의 neutral red를 용출시켰다. 세포를 확실히 용해시키기 위해 shaker로 빠르게 진동시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 cell viability를 측정했다.

HepG2 cell에서 transient transfection assay

HepG2 cell을 5.0×10^4 /well의 밀도로 24 well plate에 seeding하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 SuperFect™ Transfection Reagent (Qiagen)를 이용하여 estrogen receptor α , β 와 C3-Luc를 transfection시켰다. 5시간 후 transfection된 세포를 PBS로 세척한 다음, 각 농도별로 만들어진 toxaphene과 chlordane을 FBS가 포함된 배지에 첨가하여 24시간 동안 처리했다.

Dual-Luciferase Reporter assay

Culture plate를 PBS로 세척한 후, Passive Lysis Buffer (Promega)를 가하여 세포를 용해 시켰다. 용해된 cell의 lysate 20 μ l를 취하여 100 μ l의 Luciferase assay Reagent와 Stop & Glo reagent (Promega)를 차례로 첨가한 다음, 각각 luminometer (LB96P; Berthold technologies, Germany)로 그 활성을 측정했다.

Analysis

Dual Luciferase Reporter assay system에서 Firefly luciferase는 "experimental reporter"를 나타내고, *Renilla* luciferase는 "control reporter"를 나타낸다. LAR II를 첨가했을 때 Firefly reaction이 일어나고, 동시에 Stop & Glo reagent를 첨가했을 경우에는 *Renilla* reaction이 일어난다. 이때의 Luciferase activity는 각각의 처리 농도군에 대해서 *Renilla* luciferase에 대한 Firefly luciferase의 상대 비율로 측정했다.

결 과

Toxaphene과 chlordane에 대한 세포독성시험 결과

HepG2 cell에서 toxaphene과 chlordane의 세포독성 시험 결과 두 물질 모두 10^6 M 이하에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며(Fig. 2), 이 결과를 토대로 10^6 M 이하의 농도에서 HepG2 assay를 실시하였다.

ER α 에서 toxaphene과 chlordane의 agonist 효과

HepG2 cell에서의 두 물질에 대한 세포 독성 시험 결과를 토대로 하여 10^6 M에서 10^{-12} M까지의 여러 농도를 처리해 본 결과, 양성 대조물질로 사용한 17 β -estradiol (E2)에서 높은 에스트로겐 활성이 확인되었으며, 두 물질 모두 에스트로겐 수용체 알파(ER α)에 agonist 작용함을 관찰할 수 있었다. Toxaphene은 10^8 M에서 chlordane은 10^7 M에서 각각 최대의 활성을 나타냈다(Fig. 3).

ER β 에서 toxaphene과 chlordane의 antagonist 효과

에스트로겐 수용체 베타(ER β)에서 두 물질에 대해 HepG2 assay를 실시해 보았으나, 두 물질 모두 ER β 에는 뚜렷한 agonist 효과를 나타냈지 않았다. 이런 결과

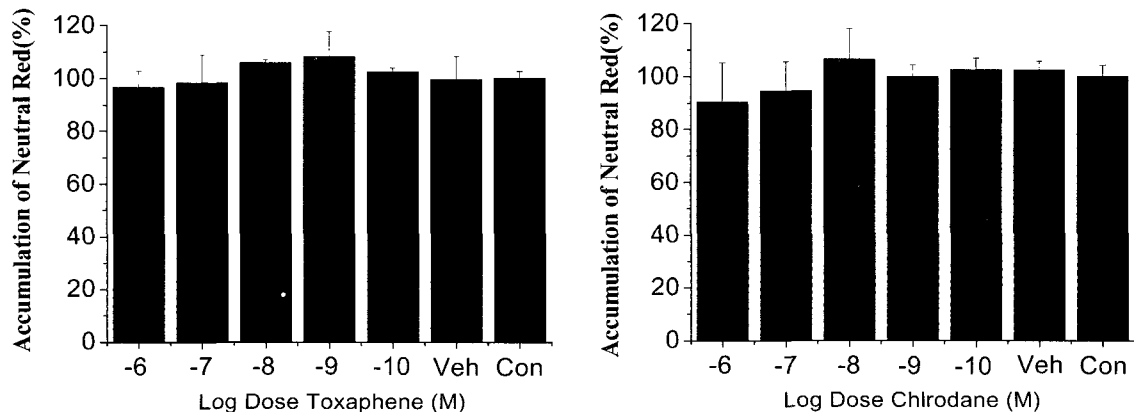


Fig. 2. Cytotoxic effect of Toxaphene and Chlordane on HepG2 cells. Cell viability was measured by the amount of neutral red (NR) accumulated in lysosomes of viable uninjured cells. Values represent the mean \pm SD.

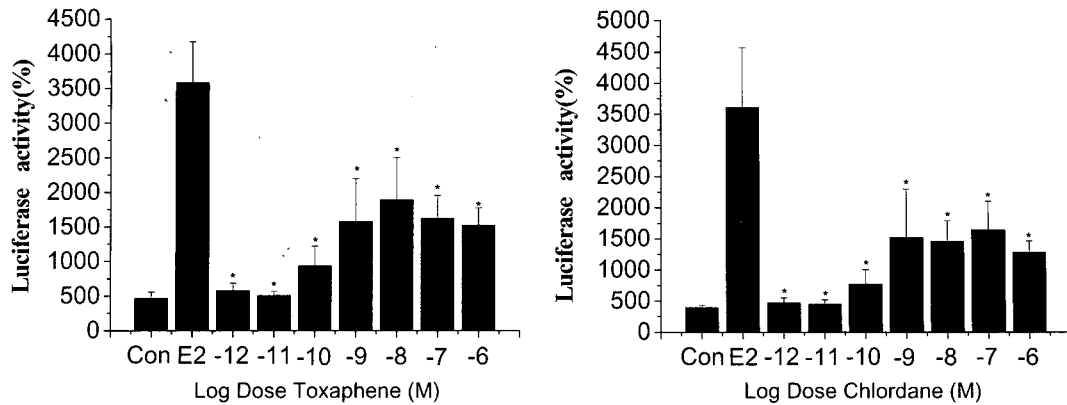


Fig. 3. Activities of Toxaphene and chlordane at ER α . HepG2 cells were transiently transfected with expression plasmids for ER α plus C3-luciferase reporter plasmids (C3-Luc). Cells were treated with increasing concentration of Toxaphene and Chlordane or with 10 nM E2. After 24-h incubation, cultures were assayed with dual luciferase reporter assay system. The controls were treated with DMSO at a final concentration 0.1%. Values represent the mean \pm SD. * indicates that value is significantly different from E2 at $p < 0.05$ by Duncan's multiple test.

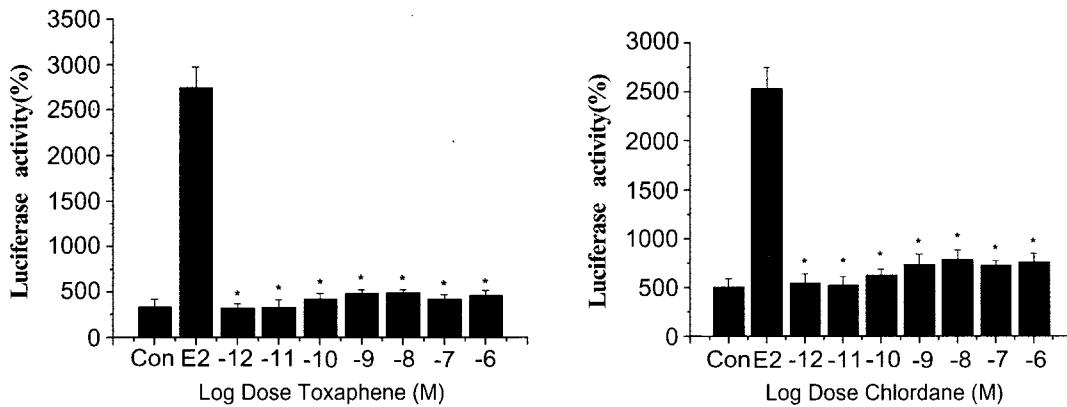


Fig. 4. Activities of Toxaphene and chlordane at ER β . HepG2 cells were transiently transfected with expression plasmids for ER β plus C3-luciferase reporter plasmids (C3-Luc). Cells were treated with increasing concentration of Toxaphene and Chlordane or with 10 nM E2. After 24-h incubation, cultures were assayed with dual luciferase reporter assay system. The controls were treated with DMSO at a final concentration 0.1%. Values represent the mean \pm SD. * indicates that value is significantly different from E2 at $p < 0.05$ by Duncan's multiple test.

를 토대로 하여 양성 대조물질로 사용한 10^{-8} M의 17 β -estradiol(E2)과 toxaphene을 동시 처치해 보았을 때, toxaphene을 고농도로 처치한 균일수록 농도 의존적으로 E2에 의해 유도된 ER β 의 반응을 길항(antagonize)시켰다 (Fig. 4, 5). Chlordane도 역시 에스트로겐 수용체 베타 (ER β)에 대해서는 antagonist로 작용함을 관찰할 수 있었다.

고 찰

현재 세계 각 국에서는 내분비계 장애물질이 인체에 미치는 영향에 대한 많은 우려와 보고들이 증가하고 있으며, 이러한 물질들의 검색과 그 작용 기전을 밝히는데 있어 스테로이드 호르몬 수용체에 대한 연구가 활발히 이루어

지고 있다. 본 연구에서는 대표적인 유기 염소계 살충제로서 내분비계 장애물질로 추정되고 있는 toxaphene과 chlordane이 에스트로겐 수용체 α 와 β 에 어떠한 작용을 나타내는지를 조사하기 위하여 내분비계 장애물질을 검색하는 *in vitro* 방법 중의 하나인 에스트로겐 수용체 α 와 β 및 Luciferase 리포터 유전자 도입 사람 간 종양세포 (human hepatoma cell)를 이용하여 이 두 물질의 내분비 독성을 알아보았다.

사람의 에스트로겐 수용체는 nuclear receptor의 하나로 에스트로겐 수용체 알파(ER α)와 최근에 발견된 에스트로겐 수용체 베타(ER β)가 존재한다(Mosselman *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 1998). 이러한 ER α 와 ER β 는 조직에 특이하게 발현한다. 즉, ER α 가 난소나 자궁, 질, 유선

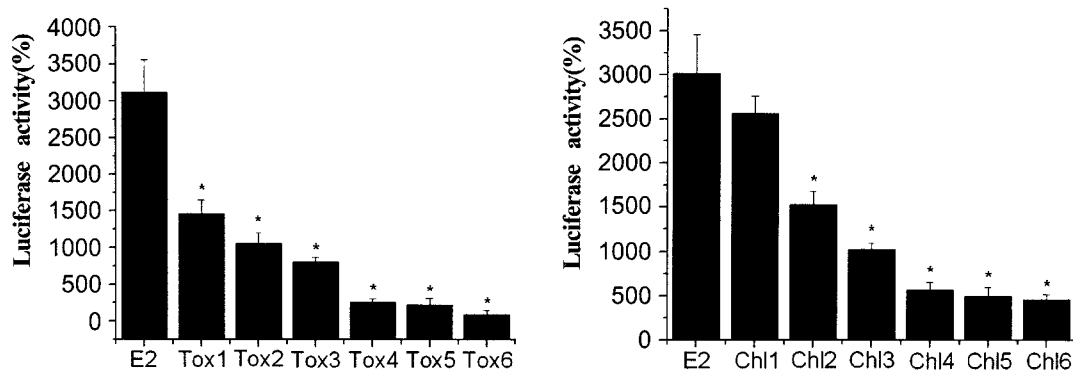


Fig. 5. Dose response of antagonists of toxaphene and chlordane on ER β . HepG2 cells were transiently transfected with expression plasmids for ER β plus C3-luciferase reporter plasmids (C3-Luc). Cells were treated with increasing concentration of toxaphene and chlordane plus 10 nM E2. After 24-h incubation, cultures were assayed with dual luciferase reporter assay system. The controls were treated with DMSO at a final concentration 0.1%. Values represent the mean \pm SD. * indicates that value is significantly different from E2 at $p < 0.05$ by Duncan's multiple test. E2, 10^{-8} M; Tox 1, 10^{-11} M tox+E2; Tox 2, 10^{-10} M tox+E2; Tox 3, 10^{-9} M tox+E2; Tox 4, 10^{-8} M tox+E2; Tox 5, 10^{-7} M tox+E2; Tox 6, 10^{-6} M tox+E2, Chl 1, 10^{-11} M chl +E2; Chl 2, 10^{-10} M chl+E2; Chl 3, 10^{-9} M chl+E2; Chl 4, 10^{-8} M chl+E2; Chl 5, 10^{-7} M chl+E2; Chl 6, 10^{-6} M chl+E2.

과 같은 주요 여성 생식기관에 발현되는 반면에, ER β 는 고환이나 전립선과 같은 남성의 생식기관과 난소에서 발현된다고 알려져 있다(Mosselman *et al.*, 1996; Muramatsu and Inoue, 2000). ER α 와 ER β 는 유전자 조절에 있어서도 다른 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Paech *et al.*, 1997). 대표적인 항유방암 약물인 tamoxifen은 ER α 와 ER β 백터/ERE에 조절되는 luciferase 리포터 유전자 검색법에서 에스트로겐과 항에스트로겐 활성을 나타낸다고 보고한 바 있다(Paech *et al.*, 1997).

Gaido *et al.*(1998)은 염소계 탄화수소 살충제인 methoxychlor의 일차 에스트로겐 대사 산물인 HPTE가 에스트로겐 반응 리포터 구조물들을 transfection시킨 사람 간암 세포(HepG2 cell)에서 ER α 에 대해서는 agonist 효과를 가지나 ER β 에 대해서는 antagonist로 작용함을 보고한 바 있다. 본 연구에 사용된 두 물질도 에스트로겐 수용체 알파(ER α)에 대해 agonist 반응을 보였고(Fig. 3), 에스트로겐 수용체 베타(ER β)에 대해서는 미미한 agonist 효과를 나타냈으며(Fig. 4), 17 β -estradiol(E2)에 의해 유도된 ER β 의 반응을 감소시켰다(Fig. 5). 이처럼 이 두 물질은 ER α 에 대해서는 agonist로 작용하나, ER β 에 대해서는 경쟁적인(competitive) antagonist의 관계에 있음을 알 수 있었다.

일반적으로 에스트로겐 반응은 두 가지의 다른 수용체 ER α 와 ER β 를 통하여 매개된다. 이러한 두 수용체는 비슷한 DNA와 리간드 결합 위치를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Kuiper and Gustafsson, 1997; Tremblay *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 1998). 한편 ligand가 ER α 에 agonist와 ER β 에 antagonist로 작용한다는 분자 기전은 독성학과 약리학에서 주요 관심사 중의 하나이다. ER β 의

ligand-binding domain의 전체적인 구조는 ER α 와 유사하며(Pike *et al.*, 1999), 대부분의 화합물들은 ER α 와 ER β 에 유사한 binding affinity와 transcriptional activity를 가지고 있다(Kuiper *et al.*, 1996, 1998; Mosselman *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1997). 특히 주목할 만한 사실은 두 수용체에 존재하는 helix 12 region은 에스트로겐 수용체의 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Darimont *et al.*, 1998), Pike *et al.*(1999)은 ER α 와 ER β 의 ligand binding domain의 X-ray crystallography와 sequence 분석 비교를 통해 ER β 의 경우 helix 12의 agonist orientation이 불안정하여 ER α 에 비해 쉽게 길항된다고(antagonize) 제안한 바 있다.

Toxaphene과 chlordane은 1980년대 중반까지 살충제로서 널리 사용되었다. 미국이나 캐나다, 서유럽에서의 이 화학물질들의 일반적인 사용에 대한 금지에도 불구하고, 중·남미, 아프리카, 동유럽과 아시아 등에서는 지금도 이용되고 있다(Bonefeld *et al.*, 1997). 이 두 화학물질은 유엔의 환경 프로그램에서 지정된 12 가지 POPs(Persistent Organic Pollutants; 수천마일의 거리도 이동할 수 있고 먹이 사슬에 따라 생체에 축적되며, 환경에 지속적으로 존재하여 사람의 건강과 환경에 위해를 유발하는 화합물들; Fisher 등)에 속하는 물질로 절대적인 주의가 요구되고 있다. POPs에 대한 노출은 야생 동물에게서의 생식 장애나 다양한 암의 발생, 면역계의 기능 이상, 생식 문제 등을 유발할 수 있는 물질로 잘 알려져 있다. Toxaphene은 몇몇 물고기에게 매우 독성이 강한 물질로서 체중이나 알의 출산과 부화 생존 등을 감소시키는 화합물이다. Chlordane은 수중 침전물과 쉽게 결합하여 유기체의 지

방에 축적이 잘 일어난다. Chlordane을 포함한 사료를 섭취한 마우스에게서 생식의 결함이 발생하기도 했다. 그러나 이 화합물은 여전히 다른 나라들에서 흰개미(termite) 구제를 위해서 사용되고 있다. 반면에 이러한 두 물질들이 인간에게 노출되었을 때의 건강에 미치는 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다. IARC(International Agency for Research on Cancer)는 이 두 화합물을 사람에게서 암을 유발 가능성이 있는 물질로서 지정하고 있다(Chun and Shiuan, 1999).

일반적으로 에스트로겐 활성은 다음과 같은 세포 내에서의 과정을 통해 나타난다. Ligand(eg. endocrine disrupting chemicals)가 ER(Estrogen Receptor)라 알려진 특정의 세포 내 단백질에 결합하여 조절된다. Ligand가 ER에 결합하면 수용체의 구조적인 변화를 유도하여 결합된 ligand-receptor는 이합체(dimer)를 형성하여 DNA의 특정 부분과 작용한다. 이러한 ligand-receptor 복합체는 에스트로겐 반응 유전자의 표현을 변화시키게 되고 궁극적으로 세포의 기능을 변화시킴으로써 조직 특이적인(tissue-specific) 에스트로겐 반응을 유도한다. 에스트로겐 수용체 α 와 β 및 Luciferase 리포터 유전자를 도입한 사람 간암 세포에서 toxaphene과 chlordane은 이러한 mechanism을 통해 에스트로겐 수용체 알파에서는 agonist로서 작용하여 10^{-8} M과 10^{-7} M에서 최대의 활성을 나타냈다(Fig. 3). 반면에 에스트로겐 수용체 베타에서는 E2와 경쟁적인 작용을 통해 E2에 의해 유도된 ER β 의 반응을 감소시킴으로써 antagonist로 작용함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4, 5).

따라서, 유기 염소계 살충제인 toxaphene과 chlordane은 에스트로겐 수용체 α , β 와 에스트로겐에 반응하는 리포터 유전자인 C3-Luc을 도입한 사람 간종양세포에서 에스트로겐 수용체 알파에서는 agonist로 에스트로겐 수용체 베타에서는 antagonist로 작용함을 알 수 있었으며, 이러한 화학 물질에의 노출은 정상적인 내분비계에 커다란 영향을 미칠 가능성이 있다고 생각된다.

감사의 말씀

이 연구는 국립독성연구원/식품의약품안전청 2001년도 내분비계장애물질 평가사업 연구비에 의해 수행되었습니다(ED 2001-35). 또한, 본 연구는 서울대학교 수의과학연구소 연구비 지원에 의하여 이루어졌습니다.

참고문헌

- Arnold, S.F., Robinson, M.K., Notides, A.C., Guillette, L.J. Jr. and McLachlan, J.A. (1996): A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 544-548.
- Bonefeld Jorgensen E.C., Autrup H. and Hansen J.C. (1997): Effect of toxaphene on estrogen receptor functions in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, **18**, 1651-1654.
- Breithofer, A., Graumann, K., Scicchitano, M.S., Karathanasis, S.K., Butt, T.R. and Jungbauer, A. (1998): Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **67**, 421-429.
- Chen, C.W., Hurd, C., Vorojeikina, D.P., Arnold, S.F. and Notides, A.C. (1997): Transcriptional activation of the human estrogen receptor by DDT isomers and methbolites in yeast and MCF-7 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1161-1172.
- Chun, Y. and Shiuan, C. (1999): Two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor alpha-1 orphan receptor. *Cancer Res.*, **59**, 4519-4524.
- Collins, B.M., McLachlan, J. and Arnold, S.F. (1997): The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids*, **62**, 365-372.
- Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J. and Yamamoto, K.R. (1998): Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.*, **12**, 3343-3356.
- Fisher, B. E. (1999): Most unwanted: persistent organic pollutants. *Environ. Health Perspect.*, **107**, A18-A23.
- Gaido, K.W., Leonard L.S., Lovell S., Gould J.C., Babal D., Portier C.J. and McDonnell D.P. (1997): Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 205-212.
- Ing, N.H. and O'Malley, B.W. (1995): The steroid hormone receptor superfamily-Molecular mechanisms of action. In *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*, Raven Press, New York, pp. 195-215.
- Kuiper, G. and Gustafsson, J.A. (1997): The novel estrogen receptor-beta subtype: Potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and antiestrogens. *FEBS Lett.*, **410**, 87-90.
- Kuiper, G., Enmark, E., Peltouhikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5925-5930.
- Kuiper, G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. and Gustafsson J.A. (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, **139**, 4252-4263.
- Maness, S.C., McDonnell, D.P. and Gaido, K.W. (1998): Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **151**, 135-142.
- Mosselman, S., Polman, J. and Dijkema, R. (1996): ER

- beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.*, **392**, 49-53.
- Muramatsu, M. and Inoue, S. (2000): Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 1-10.
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. and Muramatsu, M. (1998): The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 122-126.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., Kushner, P.J. and Scanlan, T.S. (1997): Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*, **277**, 1508-1510.
- Petit, F., Le Goff, P., Cravedi J.P., Valotaire, Y. and Pakdel, F. (1997): Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *J. Mol. Endocrinol.*, **19**, 321-335.
- Pike, A.C.W., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J.K. and Carlquist, M. (1999): Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.*, **18**, 4608-4618.
- Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F. and Giguere, V. (1997): Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol. Endocrinol.*, **11**, 353-365.