

In vitro 및 In vivo Assay를 통한 중금속의 에스트로젠성 평가

박 철 · 김소정 · 신원철 · 김혜경 · 최석영*

울산대학교 생활과학대학 식품영양전공

Assessing Heavy Metals for Estrogenicity Using a Combination of *In vitro* and *In vivo* Assays

Chul Park, So-Jung Kim, Wan-Chul Shin, Hae-Gyoung Kim and Suck-Young Choe*

Dept. of Food Science and Nutrition, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

Abstract

The estrogenicities of six heavy metal compounds, which contaminate frequently in foods, were assayed using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. The assays were 1) estrogen receptor dependent transcriptional expression assay, 2) E-screen assay and, 3) the uterotrophic assay in mice. The chemicals studied were 17 β -estradiol, diethylstilbestrol (DES), arsenic oxide, bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride, chromium chloride, lead acetate, and mercuric chloride. Using the estrogen receptor dependent transcriptional expression assay, the following estrogenicity ranking was measured: bis(tri-n-butyltin) > cadmium chloride > chromium chloride >> mercuric chloride > lead acetate = arsenic oxide. Using E-screen test, the following estrogenicity ranking was measured: bis(tri-n-butyltin) > cadmium chloride > chromium chloride >> mercuric chloride > lead acetate = arsenic oxide. Results from the uterotrophic assay showed that bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride, chromium chloride caused an increase in uterine wet weight, while lead acetate, mercuric chloride, and arsenic oxide failed to do so. Bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride and chromium chloride showed the highest estrogenicity in three assay systems. Recent studies suggesting that bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride have estrogenicities are compatible with the present finding. Furthermore, our study is suggesting that chromium chloride may be estrogenic. The results demonstrate that this three level-assay combination (transcriptional activation, cell proliferation, and an *in vivo* effect in an estrogen-responsive tissue) could serve as a useful method to assess the estrogenicity of heavy metals.

Key words: heavy metals, estrogenicity, estrogen receptor dependent transcriptional expression assay, E-screen assay, uterotrophic assay

서 론

내분비계는 신경계 및 면역계와 더불어 사람과 기타 생물에서 통합적인 제어를 하는 유기적인 시스템이다. 내분비계의 호르몬은 극히 미량이 내분비선으로부터 혈액으로 분비되며 혈액에 의하여 멀리 운반되어 표적조직의 세포에 있는 수용체 분자에 결합하여, 그 개체의 다양한 기능을 조절한다. 즉, 체내의 항상성유지, 외부자극에 대한 반응, 성장, 발육, 생식에 대한 조절, 체내 에너지 생산, 이용, 저장 등의 기능을 조절한다. 배자 발생, 세포 성장, 생식 등에 있어서 가장 강력한 호르몬 중 하나인 에스트로젠은 난자의 성숙, 난관 및 유선의 성장 및 발달 등과 같은 생리작용에서 중요한 역할을 한다. 주로 여성생식기 세포의 증식을 일으키나 에스트로젠은 과도하게 많으면 유방암 및 남성의 여성화 등을 일으킨다 (1). 에스트로젠은 또한 신경내분비계에 작용하여 뇌와 행동에도 영향을 미치기도 하고(2,3), 근골격계에도 영향을 미친

다(4). 20세기에 들어온 후 많은 환경오염물질(DDT와 그 대사물, PCBs 등)이 에스트로젠성을 갖고 있다는 것이 판명되었으며, 또한 플라스틱가소제(프탈산)나 수지 관련물질(비스페놀 A)도 에스트로젠성으로 내분비 교란 작용을 한다는 것이 알려졌다(5-8).

지금까지 알려진 내분비계 장애 물질은 농약류, 잔류성 유기할로젠 화학물질, 플라스틱 관련물질 등으로 화학적으로 안정되고, 잘 분해되지 않고, 잔류하는 성질을 갖고 있다. 그러므로, 자연생태계에서 분해되지 않고 순환하면서 먹이사슬에 의하여 동물 및 인간에 노출되므로 비교적 많은 연구가 되어왔다(6,9). 그러나 중요한 오염물질인 중금속에 대하여는, 잘 분해되지 않고, 잔류하는 등의 비슷한 성질이 있음에도 불구하고, 별로 연구가 많지 않은 실정이다. 알려진 내분비 장애물질인 유기주석 외에는, 생식장애를 일으키는 수은, 납, 카드뮴 등에서 내분비 교란작용이 의심되고 있다. 또, 의심되는 내분비 장애물질인 수은, 납, 카드뮴도 생식기나

*Corresponding author. E-mail: sychoe@ulsan.ac.kr
Phone: 82-52-259-2373, Fax: 82-52-259-1699

내분비기관의 세포 그 자체의 변화(변성, 괴사, 염증, 부종 등)를 일으켜 생식장애와 내분비장애를 일으키는 것으로 보고 되고 있으나, 내분비 교란 작용에 의한 것인지 여부에 대하여는 거의 알려져 있지 않다(10,11). 에스트로젠성 시험법에는 reproductive tract responses를 이용하는 방법(Allen-Doisy assay)(12), non-reproductive tract target tissue response를 이용하는 방법(E-screen assay)(13), 에스트로젠 수용체 결합시험(estrogen binding assay)(14), 항체를 이용하는 방법(radioimmuno assay)(15), 수용체와 수용체 유전자의 발현을 이용하는 방법(estrogen receptor dependent transcriptional expression assay)(16) 등이 있다. 따라서 본 연구는 식품위생과 연관이 많은 6종의 중금속의 에스트로젠성을 *in vitro* assay로서 estrogen receptor dependent transcriptional expression assay와 E-screen assay를 이용하였고, *in vivo* test로서 mouse uterotrophic assay를 이용하여 분석하였다. 본 연구의 또 하나의 목적은 세 단계 수준(전사 활성화단계, 세포증식작용, *in vivo* assay)의 분석을 수행함으로써 세 분석방법의 상관성 및 수많은 대상물질에 대한 효과적인 분석법을 검토해 보고자 하는 것이다.

재료 및 방법

시약

17 β -estradiol, diethylstilbestrol(DES), arsenic(III) oxide, cadmium chloride, chromium(III) chloride, lead acetate, mercuric chloride는 Sigma(St. Louis, MO)에서, bis(tri-n-butyltin)은 Lancaster(Lancashire, UK)에서 구입하였다. Reporter gene을 가지고 있는 plasmid(TK-Luciferase)는 Clontech(Palo Alto, CA)에서 구입하였고, neomycin 저항성 유전자를 가지고 있는 pcDNA3.1(+)은 Invitrogene(Carlsbad, CA)에서 구입하였다. Restriction endonuclease, DNA modifying enzymes, enhanced chemiluminescence (ECL) reagent는 Amersham(Arlington Island, NY)에서 구입하였고, luciferase와 항생제 G418은 Promega(Madison, WI)에서 구입하였다. Dulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM)은 Hyclone(Logan, UT), 기타 mammalian cell culture media는 Gibco BRL(Grand Island, NY)에서 구입하였다.

Estrogen receptor dependent transcriptional expression assay

사람의 유방암세포(MCF-7)에 estrogen response element(ERE)를 도입시킨 클론의 제작방법 및 배양조건은 Kim 등(17)의 방법을 이용하였다. 즉, MCF-7 세포에 pTK-ERE 30 μ g과 pcDNA 3.1(+) 3 μ g을 세포 내로 transfection 하였고, selection marker를 갖는 다른 벡터(neomycin 저항성 유전자를 가지고 있는 pcDNA 3.1(+))를 동시에 cotransfection 하였다(18,19). Nonselective media에서 배양 후, 항생제 G418

750 μ g/mL를 가하고 약 2주 배양 후, 1 nM 17 β -estradiol 처리에 의해 luciferase 발현이 증가하는 클론을 선택하였다(이하 MCF 7-ERE cell이라 함). 선택된 클론은 17 β -estradiol에 매우 민감하게 반응하는데, 1 pM에서 유도되기 시작하여 1 nM에서 포화됨을 보였다($ED_{50}=2.71 \times 10^{-11}$ M). MCF-7-ERE 세포를 10% bovine calf serum을 포함한 L-DMEM 배지로 5% CO₂ 95% air로 유지시킨 CO₂ incubator에서 37 °C로 계대배양하였다. 이후 charcoal-dextran으로 처리한 5% BCS를 포함한 L-DMEM(without phenol red) 배지에 5×10^3 cells로 나누어 96 well plate에 넣고 24시간 후 시료를 첨가하였다. Arsenic oxide는 DMSO에, bis(tri-n-butyltin)은 에탄올에 녹였고, cadmium chloride, chromium chloride, lead acetate, mercuric chloride는 증류수에 녹여 사용하였다. 36시간 배양 후, 1% Triton X-100을 함유한 완충액(20 mM Tris, pH 8.0, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 2 mM DTT)을 넣고 cell을 lyse시켰다. Cell lysate(5 μ L)에 luciferase activity assay reagent(Promega) 25 μ L를 첨가하여 혼합한 후, luminol을 첨가한 후 생성되는 luminescence를 luminometer(Cytofluor 2300, Perspective Biosystems, Framingham, MA)로 측정하였다. Luciferase 활성은 relative light unit(RLU)로 나타내었다(18,20).

E-screen assay

E-screen assay는 Soto 등(21)에 의해 개발되어 현재 화학물질의 에스트로젠성을 검사하는 *in vitro* method로 널리 사용되고 있다. E-screen assay는 human breast cancer cell인 MCF-7이 estrogen에 의해 세포수가 증가하는 것을 측정하는 것이다. MCF-7세포는 5% FBS를 포함한 DMEM 배지에서 연속 배양하였다. 혈청 내 steroid를 제거하기 위해 charcoal-dextran으로 24시간 처리한 FBS 5%, 2.2 g/L sodium bicarbonate, 10 mg/mL apotransferrin, 20 μ g/mL BSA in DMEM without phenol red 배지에 세포를 현탁하여 12 well에 20,000개의 cell을 plating하고, 세포를 6일간 배양한 후 0.25% trypsin 처리하여 세포를 분리한 후 coulter counter(Particle Data, Inc., Elmhurst, Ill)로 세포수를 계수하였다.

Uterotropic assay

Mouse uterine enlargement assay는 Song 등(22)의 방법으로 시행하였다. Inbred ICR mice를 효창사이언스(대구)에서 구입하였고, 마우스들은 AIN 93-G 사료(23)를 급여하였다. 젖 뎀지 4일된 마우스를 군당 8마리씩 임의배치한 후, arsenic oxide, bis(tri-n-butyltin)은 5% Tween 80에 현탁하여 cadmium chloride, chromium chloride, lead acetate, mercuric chloride는 생리식염수(0.1 mL)에 녹여 3일간 garbage needle로 경구투여하였다. 투여용량은 마우스 당 DES는 0.1 μ g, bis(tri-n-butyltin)은 0.1 mg, cadmium chloride는 1.0 mg, 나머지 시료는 10 mg씩이었다. 최종투여 다음날 마우스를 도살한 후 자궁 중량을 측정하였다.

통계 처리

용량-반응 곡선은 횡축에 대수용량, 종축에 RLU 활성을 도시하였고, 이들 데이터를 logistic dose-response function (Microcal Origin, Version 5.0, Microcal Software Inc., MA, USA)으로 적합화하였다. 효율(efficiency; % maximal value) 및 효능(potency; EC₅₀)은 적합함수로부터 구했다. 통계 처리는 ANOVA로 수행하였으며 유의성은 95% 신뢰성으로 검정하였다.

결 과

Estrogen receptor dependent transcriptional expression assay

MCF-7-ERE 세포들은 17β-estradiol에 대해 투여용량에 비례해서 반응하는 것을 보여주었다(Fig. 1). 1 pM에서 유도되기 시작하여 1 nM에서 포화됨을 보였다(ED₅₀=2.71 × 10⁻¹¹ M). Fig. 1에서 보는 바와 같이 Estrogen receptor dependent transcriptional expression assay로 분석한 중금속들에 대한 에스트로겐성은 다음과 같았다: bis(tri-n-butyltin) > cadmium chloride > chromium chloride >> mercuric chloride > lead acetate = arsenic oxide.

Table 1은 중금속들의 potency와 efficiency를 비교한 결과이다. 표에서 보는 바와 같이 bis(tri-n-butyltin)의 ED₅₀은 1.90 × 10⁻⁹ M으로서 17β-estradiol과 비교한 potency는 1.43 × 10⁻²(1/70)이었다. 이는 다른 연구자들이 보고한 식물성 에스트로겐이나 환경성 내분비교란물질의 potency와 비교할 때 매우 큰 에스트로겐성을 보여주고 있다. 예를 들면 식물성 에스트로겐 중에서 가장 큰 potency를 갖는 zearalenone이

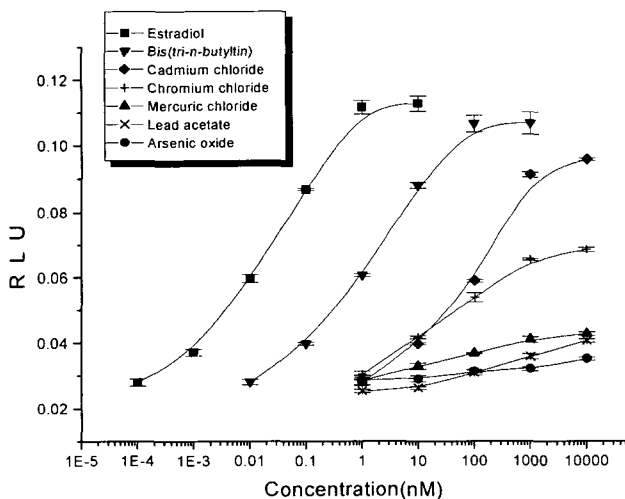


Fig. 1. Dose-response curves of 17β-estradiol and heavy metals in the receptor dependent transcriptional expression assay.

Luciferase activities were measured in MCF-7-ERE cells. Cultures were analyzed after 36 hr of treatment with increasing concentration of estradiol or heavy metals, as indicated. Each point represents the mean ± SD of triplicate determinations of RLU.

Table 1. Comparison of the potencies and efficiencies of selected heavy metals to 17β-estradiol in the receptor dependent transcriptional expression assay

Substances	Potency (EC ₅₀ , M) ¹⁾	Relative Efficiency ²⁾
17β-Estradiol	2.71 × 10 ⁻¹¹	100
Bis(tri-n-butyltin)	1.90 × 10 ⁻⁹	94.5
Cadmium chloride	3.45 × 10 ⁻⁸	73.8
Chromium chloride	1.90 × 10 ⁻⁷	46.4
Mercuric chloride	>10 ⁻⁶	12.4
Lead acetate	>10 ⁻⁶	8.5
Arsenic chloride	>10 ⁻⁶	5.6

¹⁾EC₅₀ is the molar concentration which elicit the 50% of maximal activity.

²⁾Relative efficiency is 100 times the ratio between the luciferase activity obtained with the chemicals and with 17β-estradiol. Luciferase activity of bis(tri-n-butyltin) was measured at 100 nM, and luciferase activity of other test compounds at 1 μM, and luciferase activity of 17β-estradiol at 1 nM.

17β-estradiol의 1/100, genistein이 1/10,000의 potency를 나타내며, chlordecone 및 o', p'-DDT의 potency를 10⁻⁶이라고 보고하고 있다(24,25).

E-screen assay

MCF-7 세포들은 17β-estradiol에 대해 투여용량에 비례해서 반응하는 것을 보여주었다(Fig. 2). 10 pM에서 유도되기 시작하여 10 nM에서 포화됨을 보였다(ED₅₀=1.43 × 10⁻¹⁰ M). 그림에서 보는 바와 같이 E-screen assay로 분석한 중금속들에 대한 에스트로겐성은 다음과 같았다: bis(tri-n-butyltin) > cadmium chloride > chromium chloride >> mercuric chloride > lead acetate = arsenic oxide.

Table 2는 중금속들의 potency와 efficiency를 비교한 결과이다. 표에서 보는 바와 같이 bis(tri-n-butyltin)의 ED₅₀은 5.76 × 10⁻¹⁰ M으로서 17β-estradiol과 비교한 potency는 2.5

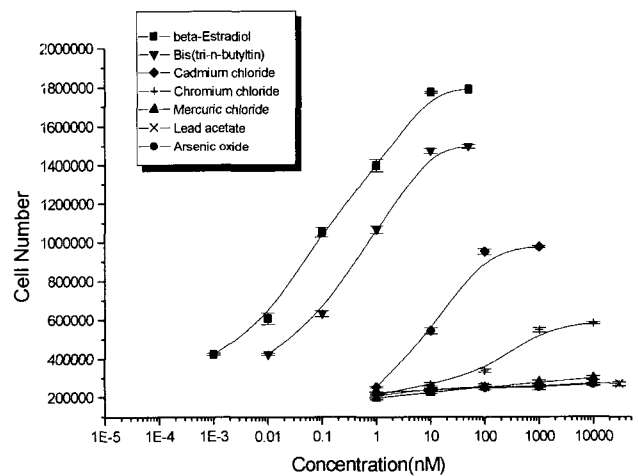


Fig. 2. Dose-response curves of 17β-estradiol and heavy metals using E-screen assay.

Cultures were analyzed after 6 days of treatment with the heavy metal (1 μM). Each data point represent the mean ± SD of triplicate determinations of cell numbers.

Table 2. Comparison of the potencies and relative proliferative effect (RPE) of selected heavy metals using E-screen assay

Substances	Potency (EC ₅₀ , M) ¹⁾	RPE ²⁾
17β-Estradiol	1.43 × 10 ⁻¹⁰	100
Bis(tri-n-butyltin)	5.76 × 10 ⁻¹⁰	80.9
Cadmium chloride	1.48 × 10 ⁻⁸	59.8
Chromium chloride	1.76 × 10 ⁻⁷	23.2
Mercuric chloride	>10 ⁻⁶	16.0
Lead acetate	>10 ⁻⁶	7.1
Arsenic chloride	>10 ⁻⁶	2.4

¹⁾EC₅₀ is the molar concentration which elicit the 50% of maximal activity.

²⁾RPE is 100 times the ratio between the cell yield obtained with the chemicals and with 17β-estradiol. Proliferative effect of bis (tri-n-butyltin) and 17β-estradiol were measured at 10 nM, cadmium chloride at 100 nM, and other test compounds at 1 μM.

X 10⁻¹(1/4)이었다. 마찬가지로 이는 다른 연구자들이 보고한 식물성에스트로젠이나 환경성 내분비교란물질의 potency와 비교할 때 매우 큰 에스트로젠성을 보여주고 있다.

Uterotropic assay

Uterotropic assay 결과는 Table 3에 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 bis(tri-n-butyltin)은 매우 낮은 용량(0.1 mg/day)에서 자궁 중량을 증대시켰고, cadmium chloride, chromium chloride도 자궁 중량의 증대를 보여주었다. 그러나, lead acetate, mercuric chloride, arsenic oxide 투여군에서는 자궁 중량의 증대가 보이지 않았다.

이상의 세 가지 분석방법을 이용한 연구결과 bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride, chromium chloride은 강력한 에스트로젠성을 나타내었다. 그러나 mercuric chloride, lead acetate, arsenic oxide는 거의 없거나 무시할 정도의 에스트로젠성을 보여주었다.

고 찰

본 연구는 *in vitro*와 *in vivo* 시스템을 병용한 세 가지 에

스트로젠성 평가 시스템(estrogen receptor dependent transcriptional expression assay, E-screen assay, uterotrophic assay)을 이용하여 식품오염에 밀접한 연관이 있는 6종의 중금속의 에스트로젠성을 평가하였다. 세 가지 평가시스템 모두에서 bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride, chromium chloride는 매우 큰 에스트로젠성을 나타내었다. 반면, arsenic oxide, lead acetate, mercuric chloride는 매우 약한 에스트로젠성을 보이거나 전혀 나타내지 않았다.

특히 본 연구 결과 bis(tri-n-butyltin)의 potency는 매우 커서 대표적인 식물성에스트로젠인 genistein(17)과 비교하여 potency가 100배 이상 강할 수 있다는 것을 제시하고 있다. 이 결과와 유사하게 최근 Golub & Doherty(26)는 triphenyltin이 인간에서 강력한 내분비교란물질일 수 있으며, 흰 쥐에서 1.4~20 mg/kg/day의 용량으로 생식기의 형태적 및 기능적 이상을 초래한다고 주장하고 있다. 이러한 결과는 bis(tri-n-butyltin)에 오염된 수산식품을 다량 소비할 수 있는 우리나라 국민들의 식품안전에 중대한 위협이 될 수 있으며, bis(tri-n-butyltin) 및 그 대사물의 환경오염 및 식품오염 실태 및 그 독성 및 위해성에 대한 연구가 절실함을 제시하여 준다. 카드뮴의 에스트로젠성에 대해서도 최근 활발히 연구되고 있다(27-29). Henson & Chedrese(28)는 카드뮴이 스테로이드-생성 조직 및 투여 용량에 따라 프로게스테론의 합성을 저해 혹은 증대시키는 이중작용을 나타낸다고 밝히고 있다. 또한 Johnson 등(30)은 카드뮴은 유방암세포에서 에스트로겐 수용체와 강력하게 결합하며, *in vivo*에서도 자궁 중량을 증대시키고, 유선의 성장과 발육을 촉진한다는 것을 밝히고 있다. 크롬의 내분비 교란 작용에 관한 연구로는 크롬을 경구 투여한 마우스에서 정자 수 감소 및 정세관 외세포층의 퇴화가 관찰되었으며(31), Martin 등(29)은 MCF-7 breast cancer cell에서 크롬이 세포증식을 2~5배 촉진하였다고 발표하였다. 따라서 본 연구결과는 다른 연구자들의 결과와 잘 일치하고 있음을 알 수 있었다.

본 연구결과로부터 estrogen receptor dependent transcriptional expression assay, E-screen assay, 그리고 uter-

Table 3. Estrogenic activities of heavy metals in mice¹⁾

Estrogen	Treatment		% Uterine ²⁾	Relative potency ³⁾
	Dose (mg/day)			
Control	0		0.16 ± 0.01	
DES	0.0001		0.33 ± 0.03*	1
Bis(tri-n-butyltin)	0.1		0.27 ± 0.02*	0.001
Cadmium chloride	1		0.25 ± 0.02*	0.0001
Chromium chloride	10		0.23 ± 0.01*	0.00001
Mercuric chloride	10		0.17 ± 0.02	<10 ⁻⁶
Lead acetate	10		0.17 ± 0.01	<10 ⁻⁶
Arsenic oxide	10		0.16 ± 0.01	<10 ⁻⁶

¹⁾Administered by gavage needle in three daily dose of 0.1 mL/day beginning on the day after weaning for 4 days.

²⁾% uterine weight is uterine weight/body weight × 100. Values are expressed as the mean ± SE of 8 mice. An asterisk represents the value that are significantly different from control (p < 0.05).

³⁾Relative potency was calculated on the basis of the doses of chemicals required to produce a 10 mg increase of uterine weight.

otrophic assay를 병행하는 분석방법으로 중금속의 에스트로젠성을 확인할 수 있었으며, 이러한 병행 분석방법이 수많은 화학종에 따른 중금속의 에스트로젠성을 탐색하는데 유용하게 적용될 수 있음을 제시해주고 있다.

각종 환경오염 중금속으로 인한 생태계 및 인간의 생존이 위협받고 있는 현실에서 또 다른 위해가능성 및 유용성을 제시해줄 수 있는 중금속의 에스트로젠성에 대해 보다 체계적이고 심도 깊은 연구가 진행될 필요가 있다고 사료된다.

요 약

식품오염 관련 중금속들의 에스트로젠성을 *in vitro* 와 *in vivo* 분석방법을 병행하여 평가하였다. 분석방법은 1) estrogen receptor dependent transcriptional expression 분석법, 2) E-screen assay 그리고, 3) 마우스 자궁비대시험 (uterotropic assay)을 사용하였다. 시험에 사용한 물질로는 17 β -estradiol, diethylstilbestrol(DES), arsenic oxide, bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride, chromium chloride, lead acetate, mercuric chloride를 사용하였다. Estrogen receptor dependent transcriptional expression 분석 결과, bis(tri-n-butyltin) > cadmium chloride > chromium chloride 순으로 에스트로젠성이 크게 나타났으며, mercuric chloride, lead acetate, arsenic oxide는 거의 나타나지 않았다. E-screen test 결과, bis(tri-n-butyltin) > cadmium chloride > chromium chloride 순으로 에스트로젠성이 크게 나타났으며, mercuric chloride, lead acetate, arsenic oxide는 거의 나타나지 않았다. 자궁비대시험 결과도 마찬가지로 bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride, chromium chloride은 자궁중량 비대를 크게 초래하였으며, 반면에 mercuric chloride, lead acetate, arsenic oxide는 그러한 효과가 미약하거나 없었다. 세 분석방법 결과 bis(tri-n-butyltin), cadmium chloride, chromium chloride 순으로 에스트로젠성이 크게 나타났다. 이러한 결과는 최근 bis(tri-n-butyltin)과 cadmium chloride이 에스트로젠성이 있다는 다른 연구결과들과 잘 일치하며, 또한 크롬화합물도 에스트로젠성이 있다는 것을 새롭게 제시하고 있다. 본 연구는 세 단계 수준(전사활성화단계, 세포증식작용, *in vivo* assay)의 분석을 병행함으로써 수많은 중금속의 에스트로젠성을 효과적으로 평가할 수 있다는 것을 제시해주고 있다.

감사의 글

본 논문은 2003년 울산대학교 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Hui R, Cornish AL, McClelland RA, Robertson JFR, Blamey

- RW, Musgrove EA, Nicholson RI, Sutherland RL. 1996. Cyclin D1 and estrogen receptor messenger RNA levels are positively correlated in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2: 923-928.
2. Jacobson JL, Jacobson SW. 1996. Dose-response in perinatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs): The Michigan and North Carolina cohort studies. *Toxicol Ind Health* 12: 435-445.
3. Koopman-Esseboom C, Weisglas-Kuperus N, de Ridder MAJ, Van der Paauw CG, Tuinstra LGMT, Sauer PJJ. 1996. Effects of polychlorinated biphenyls/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development. *Pediatrics* 97: 700-706.
4. Ernst M, Parker MG, Rodan GA. 1991. Functional estrogen receptors in osteoblastic cells demonstrated by transfection with a reporter gene containing an estrogen element. *Mol Endocrinol* 5: 1597-1606.
5. Bern HA. 1992. The fragile fetus. In *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*. Colborn T, Clement C, eds. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ. p 9-15.
6. Jobling S, Sumpter JP. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol* 27: 361-372.
7. Newbold R. 1995. Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 103(Suppl.): 83-87.
8. White R, Jobling S, Hoarse SA, Sumpter JP, Parker MG. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175-182.
9. Kelce WR, Gray LE, Wilson EM. 1998. Antiandrogens as environmental endocrine disrupters. *Reprod Fertil Dev* 10: 105-111.
10. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effect of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101: 378-384.
11. ATSDR. 1998. *Toxicological Profile for Mercury*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
12. Reel JR, Lamb V, Neal BH. 1996. Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam Appl Toxicol* 34: 288-305.
13. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. 1995. The E-screen assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103(Suppl. 7): 113-122.
14. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carsson B, Corton JV, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson J-Å. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139: 4252-4263.
15. Lopic KO, Hampl R, Hill M, Whi K, Maharik NA, Adlercreutz H. 1998. Radioimmunoassay of free genistein in human serum. *J Steroid Biochem Molec Biol* 64: 261-268.
16. Miksicek RJ. 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol* 44: 37-43.
17. Kim SJ, Park C, Kim HG, Shin WC, Choe SY. 2004. A study on the estrogenicity of Korean arrowroot (*Pueraria thunbergiana*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 16-21.
18. Kramer V, Helferich WG, Bergman A, Klasson-Wehler E, Giesy JP. 1997. Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites are anti-estrogenic in a stably transfected human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 144: 363-376.
19. Lee SJ, Kim CM, Lee SD, Park JG, Ryi SH, Suh PG. 1995. Overexpression of phospholipase C- α 1 in colorectal carcinoma.

- nomas is associated with overexpression of factors that bind its promoter. *J Biol Chem* 270: 16378-16384.
20. Lee SK, Choi HS, Song MR, Lee MO, Lee JW. 1998. Estrogen receptor, a common interaction partner for subset of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 12: 1184-1192.
 21. Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102: 380-383.
 22. Song TT, Hendrich S, Murphy PA. 1999. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J Agric Food Chem* 47: 1607-1610.
 23. Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. 1993. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: Result on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* 123: 1923-1931.
 24. Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, Shuey DL, Nikiforov AI, Fico TA, Gorsuch JW. 1997. Environmental estrogens and reproductive health: A discussion on the human and environmental data. *Reprod Toxicol* 11: 465-481.
 25. Breithofer A, Graumann K, Scicchitano MS, Karathanasis SK, Butt TR, Jungbauer A. 1998. Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 67: 421-429.
 26. Golub M, Doherty J. 2004. Triphenyltin as a potential human endocrine disruptor. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 7: 281-295.
 27. Gotz R. 2004. Cadmium is a metalloestrogen. *Pharm Unserer Zeit* 33: 83-87.
 28. Henson MC, Chedrese PJ. 2004. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med* (Maywood) 229: 383-392.
 29. Martin MB, Reiter R, Pham T, Avellanet YR, Camara J, Lahm M, Pentecost E, Pratap K, Gilmore BA, Divekar S, Dagata RS, Bull JL, Stoica A. 2003. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 144: 2425-2436.
 30. Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB. 2003. Cadmium mimics the *in vivo* effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 9: 1081-1084.
 31. Zahid ZR, Al-Hakkak ZS, Kadhim AHH. 1990. Comparative effects of trivalent and hexavalent chromium on spermatogenesis of the mouse. *Toxicol Environ Chem* 25: 131-136.

(2004년 8월 3일 접수; 2004년 11월 8일 채택)