

## 내분비계 장애물질이 미성숙한 흰쥐의 난소와 자궁에서의 에스트로젠 수용체 발현에 미치는 효과

이 경 엽 · 이 성 호<sup>†</sup>

상명대학교 생명과학전공

### Effects of Endocrine Disruptors on the Expression of Estrogen Receptors in Ovary and Uterus from Immature Rats

Kyeong-Yeup Lee and Sung-Ho Lee<sup>†</sup>

Department of Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

**ABSTRACT** : Although some phytoestrogens might have beneficiary rather than adverse effects, most endocrine disrupting compounds(EDCs) are considered to be harmful to human and wildlife health through interfering the endocrine system. Previously we found that prepubertal exposure to genistein(GS), a well-known isoflavone phytoestrogen, could activate the reproductive system of immature female rats resulting precocious puberty. Interestingly, di(2-ethyl hexyl) phthalate(DEHP) exposure brought inverse result, a delayed puberty, in the same experimental regimen. In this study, we examined whether prepubertal exposure to GS or DEHP affect the gene expressions of estrogen receptors(ER  $\alpha$  and ER  $\beta$ ) and LH receptor(LHR) which represent the maturational status of ovary and uterus in immature rats. GS (100 mg/kg/day) was administered daily from postnatal day 25 to the day when the first vaginal opening(VO) was observed, and the animals were sacrificed on the next day(day 32). Similarly, DEHP(100 mg/kg/day) was administered daily from postnatal day 25 through the day when the first V.O. in control group was observed, and the animals were sacrificed on the next day(day 36). To determine the transcriptional changes in the hormone receptors, total RNAs were extracted from ovary and uterus and were applied to semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). In the GS group, the transcriptional activities of ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  and LHR in uterus and LHR in ovary were significantly increased when compared to those of control group. In the DEHP group, the transcriptional activities of all the hormone receptors measured were significantly lowered when compared to those of control group. These alteration of the reproductive hormone receptor expressions in ovary and uterus might be represent the phenotypic aspects(secondary sexual characteristics) such as tissue weights and reproductive hormone levels during perinatal period in immature female rats.

**Key words** : Genistein(GS), Di(2-ethyl hexyl)phthalate(DEHP), ER  $\alpha$ , ER  $\beta$ , LH receptor, Puberty.

**요 약** : 일부 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)의 경우, 긍정적인 효과를 갖는 것으로 보이지만, 대부분의 내분비계 장애 물질(endocrine disruptor 또는 endocrine disrupting compound, EDC)은 노출된 개체의 내분비계를 교란시켜 인간이나 야생 동물의 건강에 해로운 것으로 알려져 있다. 선행 연구에서 본 연구자들은 사춘기 전에 단기간으로 식물성 에스트로젠인 genistein(GS)을 투여했을 때 암컷 흰쥐의 생식계가 활성화되어 조기 사춘기가 유도되지만, 플라스틱 가소제인 di(2-ethyl hexyl)phthalate(DEHP)를 투여했을 때 반대로 생식계의 불활성화가 유도되어 사춘기 지연이 초래됨을 보고하였다. 본 연구에서는 사춘기전 GS 또는 DEHP 투여가 흰쥐 난소와 자궁에서의 성적인 성숙 상태를 반영하는 에스트로젠 수용체(ER  $\alpha$  and ER  $\beta$ )와 LH 수용체(LHR) 발현에 미치는 효과를 조사하였다. GS(100 mg/kg/day i.p.)를 생후 25일부터 사춘기 개시의 지표인 최초의 질구 개방(vaginal opening, VO)이 일어나는 날까지 투여하고 다음 날(day 32) 희생시켰다. 유사하게, DEHP(100 mg/kg/day i.p.)를 생후 25일부터 대조군(corn oil 200  $\mu$ L)에서 최초 질구 개방(vaginal opening, VO)이 일어나는 날까지 투여하고 다음 날(day 36) 희생시켰다. 희생 직후 난소와 자궁의 total RNA를 추출하여 각 호르몬 수용체들의 전사 수준을 측정하기 위해 정량적인 RT-PCR을 수행하였다. GS 투여에 의해 자궁에서의 ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  그리고 LHR mRNA 수준 모두 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. GS군의 난소에서는 LHR 발현이 유의하게 증가하였으나 ER  $\alpha$ 와 ER  $\beta$ 의 발현은 증가하는 경향만을 보였다. 한편, DEHP군에서는 난소와 자궁에서의 ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  그리고 LHR mRNA 수준은 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 사춘기 전의 암컷 흰쥐의 난소와 자궁에서 성숙과 관련된 생식호르몬 수용체들의 발현 변화는 이들 조직의 무게와 해부학적인 변화, 그리고 혈중 생식호르몬들의 수준 등 사춘기 과정에서의 표현형적인 측면 변화-2차 성징-들을 반영하는 것으로 추정된다.

<sup>†</sup> 교신저자: 서울시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 생물학과, (우) 110-743, (전) 02-2287-5139, (팩) 02-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

발현 변화는 이들 조직의 무게와 해부학적인 변화, 그리고 혈중 생식호르몬들의 수준 등 사춘기 과정에서의 표현형적인 측면 변화-2차 성징-들을 반영하는 것으로 추정된다.

## 서 론

내분비계 장애물질(endocrine disruptor 또는 endocrine disrupting compound, EDC)들이 다양한 방식으로 내분비계를 교란시켜 항상성을 무너뜨리고 심지어는 후손에까지 피해가 전달될 수 있다는 가설들이 점차 사실로 확인되고 있다. 따라서 이들은 인간의 건강은 물론 생태계의 안정성에 심대한 영향을 끼치는 요인으로 지목되었고, 이에 대한 학계, 정부 그리고 일반인들의 관심이 날로 커지고 있다(Daston *et al.*, 2003; Lyons, 2006). 전 세계적으로 공업화가 이루어졌거나 진행 중인 나라들의 국민들은 일상생활에서 상당량의 EDC에 매일 노출되고 있는데, 플라스틱 가소제인 di(2-ethyl hexyl)phthalate(DEHP)와 같은 인공 합성물질들 외에도 콩 등의 식품에 포함된 천연 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)들을 예로 들 수 있다(Hoyer, 2001; Fitzpatrick, 2003). 그런데 식물성 에스트로겐의 주성분인 genistein(GS)의 경우는 유방암 및 전립선암의 발병 억제효과가 있고 폐경 이후 여러가지 증상(postmenopausal symptoms)의 완화에 유용하다는 연구 결과들이 있어서 오히려 섭취가 권장되고 있다(Magee & Rowland, 2004; Goldwyn *et al.*, 2000).

DEHP와 GS의 생식독성에 관한 연구는 주로 흰쥐를 대상으로 상당 수준 진행되었으며, 대부분 태아가나 신생아기에 투여하고 이후 발생과정에서의 생식기관의 분화, 생식주기의 변화 그리고 생식 행동 패턴의 변화 등을 조사한 것이었다(Santti *et al.*, 1998; Lamartiniere *et al.*, 1998). 그러나 연구 패러다임에 따라 성간의 차이, 효과의 유무, 심지어 정반대의 효과가 보고되기도 하였다(Christian, 2001; Hoyer, 2001). 예를 들어, 사춘기 개시에 관한 연구에서 GS의 효과는 노출 시기, 노출량, 그리고 노출경로에 따라 사춘기 개시의 지표인 질구 개방(vaginal opening, VO)의 지연(Levy *et al.*, 1995), 무변화(Nagao *et al.*, 2001), 또는 촉진(Casanova *et al.*, 1999)이 보고되었다. 유사하게, DEHP의 효과도 사춘기 개시 촉진(Ma *et al.*, 2006), 무변화(Moore *et al.*, 2001) 또는 지연(Grande *et al.*, 2006; Salazar *et al.*, 2004)으로 보고되었다. 따라서 사춘기 개시에 미치는 EDC 노출에 대한 실험모델은 실제 노출 상황을 충분히 고려하여 세분화할 필요가 있다.

본 연구자들은 선행 연구에서 사춘기 전 비교적 단기간에 GS를 투여했을 때 암컷 흰쥐의 생식계가 활성화되어 조기 사춘기가 유도되고, 동일한 조건하에서 DEHP를 투여했을 때 반대로 생식계의 불활성화로 사춘기 지연이 초래됨을 보고하였다(Lee & Lee, 2006a,b). 이를 바탕으로 본 연구에서는 암

컷 흰쥐의 사춘기 개시와 관련된 2차 성징 발현과 여러 성 호르몬 수용체 유전자 발현간의 상관관계를 조사하기 위해, GS 또는 DEHP 투여에 의해 각각 사춘기 개시가 촉진 또는 지연된 상태에서 난소와 자궁에서의 에스트로겐 수용체(ER  $\alpha$  and ER  $\beta$ )와 LH 수용체(LHR) 발현 수준을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 18~22 °C로 일정하게 유지되는 온도와 일정한 광주기(12시간 조명, 12시간 소등) 그리고 먹이와 물의 접근을 자유롭게 한 상태(*ad libitum*)에서 사육한 Sprague-Dawley(SD) strain 흰쥐를 사용하였다.

생후 25일(53~58 g)의 미성숙한 암컷 흰쥐에 GS(100 mg/kg B.W., Biospectrum) 또는 DEHP(100 mg/kg/day; Sigma, USA)를 매일복강 주사하였고, 대조군으로는 corn oil(Sigma, USA)을 개체 당 200  $\mu$ L씩 복강 주사하였다. 동물들은 매일 오전 10시에 질구 개방 여부를 확인하였으며, 질구 개방이 일어난 경우 생리식염수를 사용한 질도말법(vaginal smear)으로 슬라이드에 도포한 질 상피세포를 현미경하에서 관찰하여 생식주기 중 estrus 시기에 나타나는 각질 세포(cornified cell)의 출현을 확인하였으며, 다음 날 오후 5시에 희생시켰다. 희생 후 즉시 난소와 자궁을 적출하여 RNA를 추출하였다.

### 2. RNA 추출과 Semi-Quantitative RT-PCRs

조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method(Chomczynski & Sacchi, 1987)에 따라 추출하였다. 1  $\mu$ g의 total RNA를 주형으로 하고 0.5  $\mu$ g의 dT<sub>20</sub> primer와 AccuPower™ RT PreMix(Bioneer)를 사용하여 역전사하였다. PCR 반응은 1  $\mu$ L의 역전사 산물을 주형으로 하여 각각의 전사물에 해당하는 primer들과 Taq DNA polymerase(Takara)를 사용하였으며, 최종 반응 volume은 20  $\mu$ L였다. Table 1은 본 실험에서 사용된 primer들의 염기서열과 annealing 온도를 표시한 것이다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하였고 ethidium bromide로 염색한 후 ImagerIII-1D main software(Bioneer)로 정량하였다. 정량을 위한 internal control PCR로는 GAPDH primer를 사용하여 수행하였다.

### 3. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's *t*-test에 의해 이루어

**Table 1. Primer sets for the semi-quantitative RT-PCR analyses**

Gene	Sequences of nucleic acid	Product size	A.T.(°C)
ER $\alpha$	F 5'-TCATGGAGTCTGCCAAGGAG R 5'-GTGTGCTTGATCACAAGTGG	378 bp	61
ER $\beta$	F 5'-CACGTCACCCACATCACTAA R 5'-CCCAGATGCTAGGGTACATG	270 bp	62
LHR	F 5'-TCTGCTCCATTACTGAGCCT R 5'-CCAGTTTGTAGTCGTTTGC	557 bp	60
GAPDH	F 5'-CCATCACCATCTCCAGGAG R 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG	576 bp	50

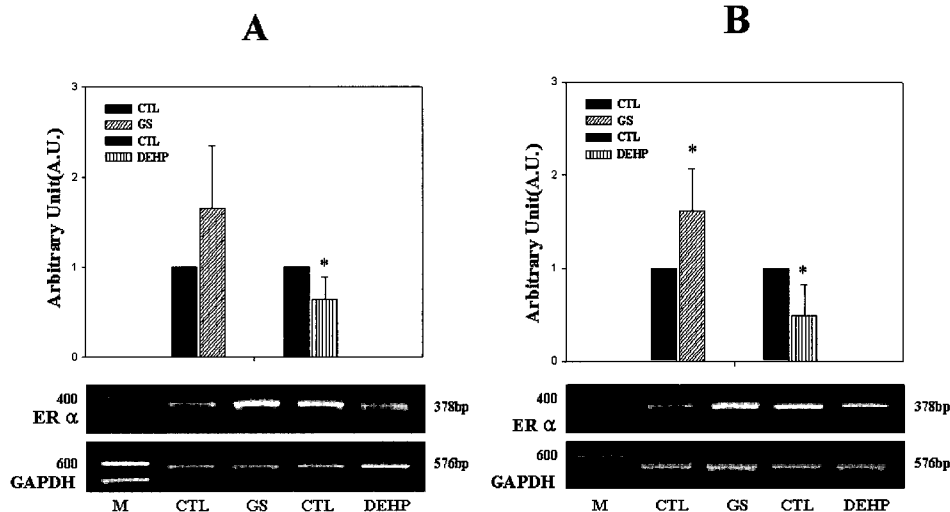
ER  $\alpha$ , estrogen receptor alpha; ER  $\beta$ , estrogen receptor beta; LHR. LH receptor; F, forward; R, reverse; A.T., annealing temperature.

였으며 *P*-value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

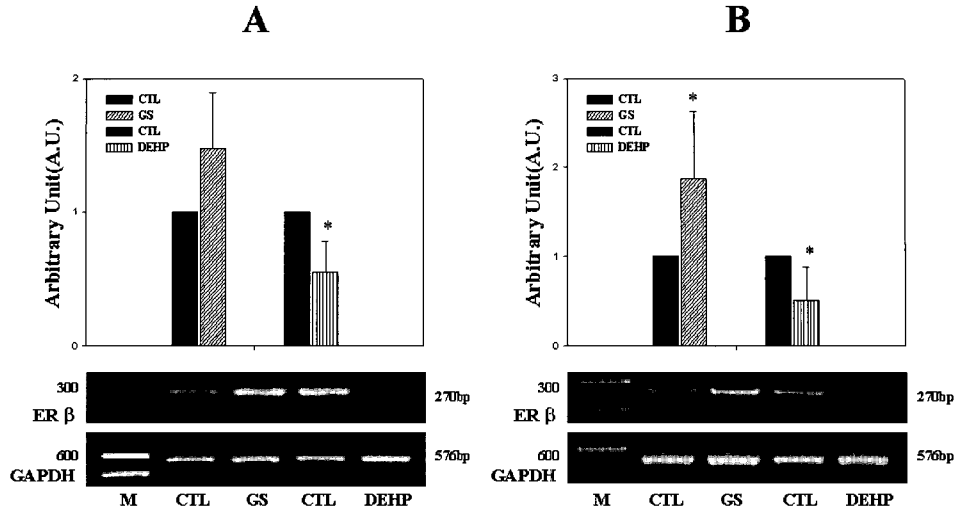
### 결 과

선행 연구에서 이유기를 지난 생후 25일부터 GS를 매일 투여한 결과, 질구 개방이 생후 31.2±0.6일 그리고 대조군에서는 생후 35.3±0.7일에 일어나 GS에 의해 성적인 성숙이 유의하게 촉진됨이 확인되었다(Lee & Lee, 2006a). 따라서 GS에 의한 평균 질구 개방일 다음 날인 생후 32일에 GS군과 대조군을 희생시켜 난소와 자궁에서의 ER  $\alpha$  mRNA 수준을 조사한 결과, 난소(대조군:GS군=1:1.66±0.68 AU, Fig. 1A

left bars)에서는 GS군이 높은 경향만을 보였으나 자궁(대조군:GS군=1:1.61±0.46 AU, *p*<0.05, Fig. 1B left bars)에서는 GS군이 유의하게 높았다. 한편, 선행 연구에서 DEHP군과 그 대조군의 질구 개방일은 각각 생후 37.3±0.7일과 35.3±0.7일에 일어나 DEHP에 의해 유의하게 성적인 성숙이 지연됨이 확인되었다(Lee & Lee, 2006b). 따라서 대조군에 의한 평균 질구 개방일 다음 날인 생후 36일에 DEHP군과 대조군을 희생시켜 난소와 자궁에서의 ER  $\alpha$  mRNA 수준을 조사한 결과, 난소(대조군:DEHP군=1:0.65±0.25 AU, *p*<0.05, Fig. 1A right bars)와 자궁(대조군:DEHP군=1:0.49±0.34 AU, *p*<0.05, Fig. 1B right bars)에서 모두 DEHP군이 유의하게 낮았다. 생후 32일에 GS군과 대조군 난소와 자궁에서의 ER  $\beta$  mRNA



**Fig. 1. Effects of prepubertal GS or DEHP administration on the expression of ER $\alpha$  in the rat ovaries(A) and uteri(B).** In this and following two figures, two separate control groups were applied. The animals of first control group(for GS experiment) and GS group were sacrificed on the day after VO occurred in GS group(day 32; left bars in A & B). The animals of second control group(for DEHP experiment) and DEHP group were sacrificed on the day after VO occurred in control group(day 36; right bars in A & B). Semi-quantitative RT-PCR was carried out as described in 'Materials and Methods'. Bars are mean±S.E.(n=6). \* Significantly different from control group, *p*<0.05.



**Fig. 2.** Effects of prepubertal GS or DEHP administration on the expression of ERβ in the rat ovaries(A) and uteri(B). Bars are mean±S.E.(n=6). \* Significantly different from control group, *p*<0.05.

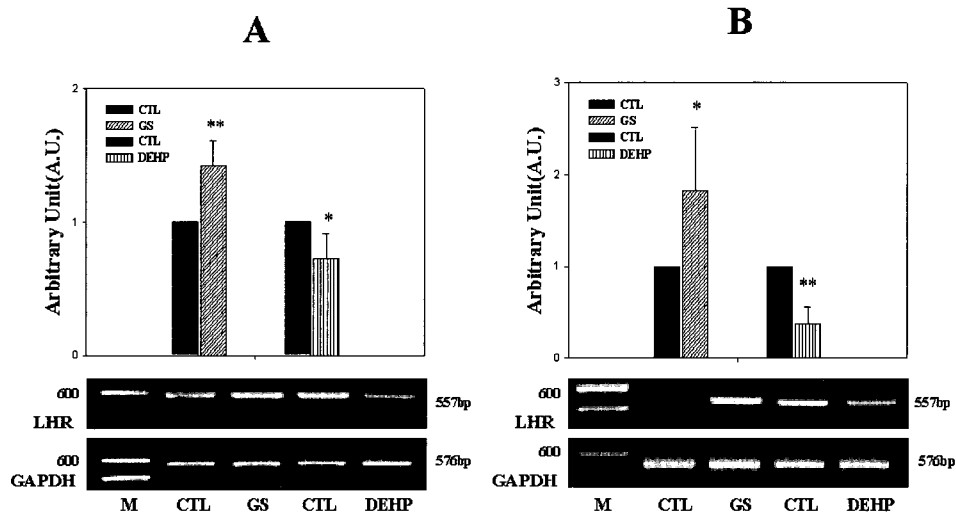
수준을 조사한 결과, 난소(대조군:GS군=1:1.47±0.42 AU, Fig. 2A left bars)에서는 GS군이 높은 경향만을 보였으나 자궁(대조군:GS군=1:1.88±0.75 AU, *p*<0.05, Fig. 2B left bars)에서는 GS군이 유의하게 높았다. 생후 36일에 DEHP 군과 대조군 난소와 자궁에서의 ERβ mRNA 수준을 조사한 결과, 난소(대조군:DEHP군=1:0.55±0.23 AU, *p*<0.05, Fig. 2A right bars)와 자궁(대조군:DEHP군=1:0.50±0.38 AU, *p*<0.05, Fig. 2B right bars)에서 모두 DEHP군이 유의하게 낮았다.

생후 32일에 GS군과 대조군 난소와 자궁에서의 LHR mRNA 수준을 조사한 결과, 난소(대조군:GS군=1:1.42±0.19 AU, *p*<

0.01, Fig. 3A left bars)와 자궁(대조군:GS군=1:1.83±0.69 AU, *p*<0.05, Fig. 3B left bars)에서 모두 GS군이 유의하게 높았다. 생후 36일에 DEHP군과 대조군 난소와 자궁에서의 LHR mRNA 수준을 조사한 결과, 난소(대조군:DEHP군=1:0.73±0.19 AU, *p*<0.05, Fig. 3A right bars)와 자궁(대조군:DEHP군=1:0.37±0.19 AU, *p*<0.01, Fig. 3B right bars)에서 모두 DEHP군이 유의하게 낮았다.

### 고찰

지난 20세기 말까지 EDC의 생식독성에 관한 연구는 대부



**Fig. 3.** Effects of prepubertal GS or DEHP administration on the expression of LHR in the rat ovaries(A) and uteri(B). Bars are mean±S.E.(n=6). \* Significantly different from control group, *p*<0.05; \*\* Significantly different from control group, *p*<0.01.

본 EDC 또는 추정물질을 투여한 후 생식 관련 조직들의 무게와 조직학적인 변화, 항문-생식소간 거리(anogenital distance), 정자 수, 생식주기의 길이, 배란율, 자궁 내 치사율과 출생율, 에스트로겐이나 테스토스테론, 그리고 생식소 자극 호르몬과 같은 생식 관련 호르몬의 혈중 수준 등 여러 현상적인 생식지표들의 조사하여 생식독성의 존재 유무를 조사하는 수준이었다(Daston *et al.*, 2003; Hoyer, 2001). 그러나 21세기에 들어와서는 과거와는 다른 연구 패러다임에 대한 고려와 함께 분자수준에서의 작용기작에 대한 이해가 축적되고 있다. 특히 GS의 경우, 스테로이드 의존성 종양들의 예방 가능성 때문에 여타 EDC들 보다 비교적 자세한 연구들이 수행되어 왔는데, 종양세포의 세포자연사를 유도하고 성장을 억제하는 과정에서 NF $\kappa$ B와 Akt 신호전달계를 억제하는 것으로 알려졌다(Sarkar *et al.*, 2006). 그런데 GS는 종양세포의 세포분열 억제와는 반대로 난소와 자궁의 세포분열을 촉진하는 것으로 보이며, 이 경우 다른 신호전달계를 통하는 것으로 보인다. 이유키 말기의 흰쥐에 GS(500 mg/kg B.W.)를 주사한 경우 자궁 상피세포의 과도성장(hypertrophy)을 보이는데, 이때 EGF와 그 수용체의 발현이 증가하는데 비해 TGF $\alpha$  발현은 감소하였다(Brown & Lamartiniere, 2000). 아마도 GS는 에스트로겐 의존성 종양세포들에는 항에스트로겐(antiestrogen)으로, 그리고 난소나 자궁에서는 유사 에스트로겐으로 작용하여 상반된 결과를 야기하는 것으로 보인다(Santell *et al.*, 1997; Wade *et al.*, 2003; Ford *et al.*, 2006). 본 연구자들의 선행 연구에서도 GS 투여에 의해 난소의 성숙을 대표하는 그래프 난포와 황체가 다수 관찰되었고, 자궁의 경우도 모든 세포층들이 잘 발달된 과도성장 상태와 함께 분비선 수의 증가가 나타났다(Lee & Lee, 2006a).

세포증식과정이 스테로이드 호르몬 의존적이 잘 알려진 난소와 자궁에서 GS가 세포분열 촉진효과를 나타내는 과정은 필연적으로 스테로이드 호르몬 수용체들의 발현 조절을 수반할 것으로 추정되는데, 임신기에 GS(1~100 mg/kg BW)를 투여했을 때 흰쥐 태아의 자궁과 난소에서의 프로게스테론 수용체(PR)의 발현이 최대 5.7배까지 농도 의존적으로 증가함이 보고되었다(Naciff *et al.*, 2002). 이와 유사하게, 선행 연구에서 난자와 자궁의 성숙 개시 지표인 PR mRNA 수준이 GS 투여에 의해 유의하게 증가함이 관찰되었고(Lee & Lee, 2006a), 본 연구에서도 GS 투여에 의해 미성숙한 흰쥐 난소와 자궁에서의 ER $\alpha$ , ER $\beta$  그리고 LHR mRNA의 유의한 발현 상승이 나타났다. 난소와 자궁의 ER 발현에 미치는 GS의 영향은 다소간 복잡한데, 출생 직후 생쥐에 GS를 투여하면 다난자 난포(multioocyte follicle)와 ER $\alpha$  발현의 즉각

적인 증가가 관찰되는데, 이는 출생 후 난포의 세포자연사가 정상적인 난소분화에 중요함을 시사한다(Jefferson *et al.*, 2002). 인간의 자궁 내막 선세포 배양에 GS와 daidzein을 처리했을 때 ER $\alpha$  발현의 감소와 ER $\beta$  발현의 증가가 관찰되었다(Staar *et al.*, 2005). 또 암컷 흰쥐의 생후 16, 18, 20일에 GS(500 mg/kg B.W.)를 투여하면 21일에 자궁에서의 PR 발현의 증가, ER $\alpha$  발현 감소 그리고 ER $\beta$  발현 증가가 관찰되었다(Cotroneo *et al.*, 2001). 한편 폐경기 이후 발생하는 여러 증상에 GS가 ER $\beta$  agonist로 작용할 때 긍정적인 효과를 나타냄이 알려졌는데, 유선에서 ER $\alpha$ 는 상피세포의 증식에 관여하는 데 반해 ER $\beta$ 는 억제적으로 작용한다(Mc-Carty, 2006). 기존의 연구들과 본 연구 결과에서 ER $\beta$ 의 증가는 자궁과 난소에서 모두 일치하지만, 자궁의 ER $\alpha$  발현 결과가 상이한 것은 아마도 실험모델의 차이에 기인하는 것으로 보인다.

한편 DEHP의 경우, 수컷에서의 항안드로겐 효과와 암컷에서의 항에스트로겐 효과가 있음이 알려졌는데(Hoyer, 2001), 난소에서의 DEHP 작용기작은 먼저 체내에서 MEHP로 대사되어 세포내에 유입되고, MEHP가 FSH에 의해 증가된 세포내 cAMP 농도를 감소시키고, P450 $\alpha$  활성을 낮추거나, peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)인 PPAR $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 를 활성화시켜 아로마타아제의 전사와 활성을 낮춤이 제안되었다(Lovekamp-Swan & Davis, 2003). 아로마타아제 활성 저하의 결과는 mitogen 효과가 있는 에스트로겐의 감소로 이어져 세포분열 감소로 나타날 것인데, 선행 연구에서도 DEHP 투여에 의해 난소와 자궁의 무게가 유의하게 감소하였다. 또한 성성숙이 개시된 대조군에서 난소에 그래프 난포와 황체가 다수 존재함에 비해 DEHP군 난소에서는 작고 미성숙한 1차와 2차 난포들과 퇴화중인 난포(atretic follicle)들이 관찰되고, 대조군의 잘 발달된 자궁에 비해 DEHP군의 자궁에서는 모든 세포층과 분비선의 발달이 미약한 상태(hypotrophy)였으며, 난소와 자궁에서의 PR 발현도 대조군에 비해 유의하게 낮았다(Lee & Lee, 2006b). GS와 달리 ER 발현에 미치는 DEHP의 영향에 관한 연구는 수행된 바 없는데, 본 연구에서는 DEHP에 의해 난소와 자궁에서의 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$  발현이 저하됨을 보였다. 따라서 DEHP가 암컷 흰쥐에서 나타내는 생식 독성은 아로마타아제 활성 저하에 의한 에스트로겐 결핍 효과와 더불어 에스트로겐 수용체의 결핍에 기인할 가능성이 있다.

본 연구 결과는 EDC 노출에 의해 사춘기 개시가 교란되는 상황에서 ER들 LHR 같은 생식호르몬 수용체들의 발현 변화를 보인 것으로써, 이들 수용체 발현 양상은 난소와 자

궁의 무게와 해부학적인 변화, 그리고 혈중 생식호르몬들의 수준 등 사춘기 과정에서의 표현형적인 측면 변화-2차 성징-들을 반영하는 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Brown NM, Lamartiniere CA (2000) Genistein regulation of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor(EGF), and EGF receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell Growth Differ* 11:255-260.
- Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck HA (1999) Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta *in vitro*. *Toxicol Sci* 51:236-244.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Christian MS (2001) Introduction/overview: gender-based differences in pharmacologic and toxicologic responses. *Int J Toxicol* 20:145-148.
- Cotroneo MS, Wang J, Eltoum IA, Lamartiniere CA (2001) Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Mol Cell Endocrinol* 173:135-145.
- Daston GP, Cook JC, Kavlock RJ (2003) Uncertainties for endocrine disruptors: our view on progress. *Toxicol Sci* 74:245-252.
- Fitzpatrick LA (2003) Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas* 44(supp 11):S21-S29.
- Ford JA Jr, Clark SG, Walters EM, Wheeler MB, Hurley WL (2006) Estrogenic effects of genistein on reproductive tissues of ovariectomized gilts. *J Anim Sci* 84:834-842.
- Goldwyn S, Lazinsky A, Wei H (2000) Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns. *Drug Metabol Drug Interact* 17:261-289.
- Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, Grote K, Chahoud I (2006) A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: effects on female rat reproductive development. *Toxicol Sci* 91:247-254.
- Hoyer PB (2001) Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem Pharmacol* 62:1557-1564.
- Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, Korach KS, Newbold RR (2002) Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor(ER) alpha expression and multi-oocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod* 67:1285-1296.
- Lamartiniere CA, Zhang JX, Cotroneo MS (1998) Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am J Clin Nutr* 68(suppl):1400S-1405S.
- Lee K-Y, Lee S-H (2006a) Effect of genistein on the onset of puberty in female rats. *Dev Reprod* 10:55-61.
- Lee K-Y, Lee S-H (2006b) Effect of di(2-ethyl hexyl) phthalate(DEHP) on the onset of puberty in female rat. *Dev Reprod* 10:147-154.
- Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL Jr (1995) The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:60-66.
- Lovekamp-Swan T, Davis BJ (2003) Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 111:139-145.
- Lyons G (2006) Viewpoint: Policy requirements for protecting wildlife from endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1:142-146.
- McCarty MF (2006) Isoflavones made simple - genistein's agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Med Hypotheses* 66:1093-1114.
- Ma M, Kondo T, Ban S, Umemura T, Kurahashi N, Takeda M, Kishi R (2006) Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. *Toxicol Sci* 93:164-171.
- Magee PJ, Rowland IR (2004) Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 91:513-531.
- Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K (2001) Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 109:

- 229-237.
- Naciff JM, Jumo ML, Torontail SM, Carr GJ, Daston JP, Overmann GJ, Daston GP (2002) Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicol Sci* 68:184-199.
- Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Nakagomi M, Usumi K, Ono H (2001) Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod Toxicol* 15:399-411.
- Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Campon R, Tresguerres JA (2004) Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. *Toxicology* 205: 131-137.
- Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG (1997) Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr* 127:263-269.
- Santti R, Makela S, Strauss L, Korkman J, Kostian ML (1998) Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. *Toxicol Ind Health* 14:223-237.
- Sarkar FH, Adsule S, Padhye S, Kulkarni S, Li Y (2006) The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. *Mini Rev Med Chem* 6:401-407.
- Staar S, Richter DU, Makovitzky J, Briese V, Bergemann C (2005) Stimulation of endometrial glandular cells with genistein and daidzein and their effects on ERalpha- and ERbeta-mRNA and protein expression. *Anticancer Res* 25:1713-1718.
- Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I (2003) The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem Toxicol* 41:1517-1525.