

Effect of dietary isoflavones of soybean by-product on estrogen and testosterone levels in mouse

Sungkwon Park¹, Hojun Choi¹, Jinyoun Seo², Sangrae Cho², Jungsang Kim^{3*}, Sung Wook Hong⁴, Changseok Park^{2*}

¹Department of Food Science & Biotechnology, Sejong University, Seoul 05006, Korea

²BK21 plus Project Team, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

³School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

⁴World Institute of Kimchi, Gwangju 61755, Korea

⁵Yecheon Agriculture Technology Center 433, Chunghyo-ro, Yecheon-eup, Yecheon-gun, Gyeongsangbuk-do 36819, Korea

*Corresponding author: phj3578@korea.kr



OPEN ACCESS

Citation: Park SK, Choi HJ, Seo JY, Cho SR, Kim JS, Hong SW, Park CS. 2016. Effect of dietary isoflavones of soybean by-product on estrogen and testosterone levels in mouse. Korean Journal of Agricultural Science 43:742-749.

DOI: <https://doi.org/10.7744/kjoas.20160077>

Editor: Ki Teak Lee, Chungnam National University, Korea

Received: September 9, 2016

Revised: November 26, 2016

Accepted: November 29, 2016

Copyright: ©2016 Korean Journal of Agricultural Science.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Boar taint, an unpleasant odor of pork, is associated with two substances including androstenone and skatole. Testosterone is a steroid hormone as well as a strong predictor for androstenone secretion. Isoflavones of soy origin play a role in modulating the metabolism of sex hormones. Although several methods responsible for reducing boar taint are under investigation, the precise mechanism by which isoflavones reduce testosterone has not yet been identified. The objective of the current study was to investigate the effects of isoflavones extracted from a soy by-product on the concentration of serum testosterone in mouse. A total of 24 mice were supplemented with basal diet (control), daidzin plus genistin mix (T1), or isoflavone extracts (T2). After 11 days of treatment, size and weight of testis, as well as the concentration of sex hormones, including testosterone and estrogen, were analyzed. There was no difference in size or weight of testis from mice among control, T1, and T2. Serum testosterone levels were significantly decreased ($p < 0.05$) both in T1 and T2 when compared with the control group. Furthermore, estrogen concentration in blood was increased ($p < 0.05$) in T2 (numerically increased in T1) compared with the control group. Taken together, the use of isoflavones extracted from soy by-products would be a plausible strategy for reducing testosterone level, ultimately reducing boar taint without castration of piglets.

Keywords: boar taint, isoflavones, sex hormone, testosterone

Introduction

수퇘지에서 나는 불쾌한 냄새를 웅취(Boar taint)라고 하는데, 이 웅취는 고환에서 생성되는 성호르몬인 androstenone과 장내 미생물발효에 의해 생성되는 skatole이 지방에 축적되어 발생한다(Zamaratskaia and Squires, 2009). 웅취를 제거하기 위해 수컷자돈을 거세하는데, 최근 동물복지에 관심이 고조되고 기름기가 적은 고기가 선호되는 실정에서 돼지 거세에 대한 대안개발이 절실하다.

식물에 존재하는 식물성에스트로겐(phytoestrogen)은 동물체 호르몬과 유사한 활성을 나타내는 화합물로, 에스트로겐 수용체에 친화력을 지닌다(Kuiper et al., 1998b). Phytoestrogen은 크게 isoflavones, coumestans, lignans로 나뉘어지는데, 이 중 isoflavone은 대두에 약 1.5 - 2.5% (2 - 5 mg/g protein) 포함되어 있다. Isoflavone 중에서 isoflavone glycoside형태인 diadzin과 genistin이 60 - 70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있으며(Wang and Murphy, 1994), glycoside보다 생리활성이 강한 aglycone 형태인 daidzein과 genistein의 함량은 약 0.01 - 0.15%에 불과하다(Mahmoud et al., 2014). 그리고 대두 가공시 탈피, 정선과정에서 10 - 15%의 배아가 생성되며 isoflavone함량이 배유 보다 10 - 40배 정도 높다고 한다(Kudou, 1991).

대두에 포함된 isoflavone 처리와 정소에서 testosterone 생산에 중요한 역할을 하는 Leydig cell의 관계 분석 연구에서, 신생 흰쥐에 isoflavone을 급여 한 결과 정소상체 내 정자의 농도 및 testosterone의 농도가 감소하는 결과를 보였다(Goyal et al., 2003). 단시간 phytoestrogen 처리 또한 정소의 스테로이드 호르몬의 수용체에 변화를 주는 것으로 나타났다(Glover and Assinder, 2006). 최근, 육계실험에서는 isoflavone 급여가 혈액 내 항산화 활성을 높이고 지방산 및 지방대사의 변화를 주어 근육 내 불포화 지방산 함량을 증가시키는 결과가 보고되었다(Kamboh and Zhu, 2013).

자궁 및 고환을 비롯하여 피부, 간, 신장, 심혈관, 지방 등 다양한 조직에서 발견되는 것으로 알려진 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD)는 androstenone 대사에 관여 할 뿐만 아니라, 모든 성 호르몬의 생합성에 관여하는 효소이다(Rasmussen and Ekstrand, 2014). 대두에 함유된 isoflavone이 인간과 쥐 고환의 Leydig cell의 androgen 생합성과 분비를 저해하고, 이 효과는 3β -HSD 활성감소에 의한 것임이 밝혀졌다(Akingbemi et al., 2007; Hancock et al., 2009; Hu et al., 2010).

따라서, 본 연구에서는 isoflavone을 마우스에 급여하여 daidzein과 genistein이 정소발달과 성호르몬의 생합성 및 혈중 testosterone 농도에 미치는 영향을 분석하였다. 본 연구의 결과는 phytoestrogen 중 isoflavone이 testosterone 농도를 조절하는 가능성을 제시함으로써, 향후 비거세 수태지의 응취를 효과적으로 감소하는 기술개발의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Materials and Methods

발효 isoflavone 제조

본 실험에 사용된 대두가공 부산물인 배아는 M업체(전남 광주)로부터 공급받아 homogenizer (Kinematica, Switzerland)를 이용하여 18,000 rpm에서 3분간 처리하여 균질화하였다. 균질화 된 배아와 증류수를 1:8 비율(w/v)로 가수하고 상업용 복합효소인 rapidase TF (DSM, Netherlands)를 0.5% (v/v)를 첨가한 후 55°C에서 4시간동안 반응하였다. 효소 반응 후 121°C에서 10분간의 열 처리를 통하여 미생물 제거 및 잔존 효소를 불활성화 하였다. 30°C로 냉각한 후에 *Weissella cibaria* KM14 균주를 10^6 CFU/ml 수준으로 접종하여 30°C에서 24시간동안 발효하였으며, 이 배양액을 동결건조 시켜 실험에 이용하였다.

선발미생물의 생균수 분석

선발미생물의 생균수는 시료 1 g을 취해 0.85% NaCl로 10배 희석한 후 희석액 100 μ L를 MRS agar (Difco, Sparks, MD, USA)에 도말하여 30°C에서 48시간 배양하여 colony 수가 50 - 200 사이의 평판의 균락수를 계수하였다.

공시동물

실험에 이용한 동물은 20 g 내외 5주령 마우스(C57BL/6종)의 수컷으로 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 구입

하였으며 Z배열법으로 군당 8두로 분류하여 2주일간 사료(AIN 76A; Feedlab Co., Gyeonggi-Do, Korea)와 물을 자유 급식하여 순치시킨 후 실험에 이용하였다. AIN 76A 사료는 옥수수전분(397.49 g/kg), 카제인(200 g/kg), 텍스트린 전분(132 g/kg), 대두유(70 g/kg), sucrose (100 g/kg), 섬유소(50 g/kg), 미네랄(35 g/kg), 비타민(10 g/kg), cysteine (3 g/kg), choline bitartrate (2.5 g/kg), TBHQ (14 mg/kg)이 포함되었다. 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 와 12시간 간격의 명암주기를 맞춰 유지하였고, 실험은 경북대학교 실험동물 윤리규정을 준수하여 수행하였다. 실험군은 대조구, 처리 1구(T1; daidzin and genistin mixture 57:3; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 처리 2구(T2; isoflavone extracts from soybean by-product; 50 mg/kg BW)로 나누고 각각의 처리에 따른 시료는 시료분쇄기(Cyclotec 1093, NY, USA)을 사용하여 입자를 200 μm 크기로 균질화하여 증류수에 희석한 후, 대조구 사료에 T1에는 daidzin과 genistin mixture를 마우스 무게 (kg) 당 50 $\mu\text{g/kg}$ 으로 첨가(daidzin 50.1 μg , Genistin 1.7 μg)하고, T2에는 isoflavone extracts를 마우스 무게(kg) 당 50 $\mu\text{g/kg}$ 로 첨가(daidzin 50.1 μg , Genistin 1.7 μg) 하였다(Cimafranca et al., 2010). 준비된 액상시료는 2일에 한번 경구투여를 통하여 급여하였다. Isoflavone 장기 급여서 독성을 나타내는 결과 (McCarver et al., 2011)에 따라 총 11일로 시험기간을 정하였다.

Isoflavone 동정

시료 2 g에 아세톤니트릴 1 mL, 증류수 7 mL, 0.1 N HCl 2 mL을 가하여 10분간 sonication시킨 후 20분간 진탕하고, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 회수한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC (JASCO 2000 series)분석을 시행하였다. Column은 Gemini C18 (2 mm x 150 mm, 5 μm), Mobile phase는 0.1% phosphoric acid와 Acetonitrile로 설정하였으며 0.8 mL/min의 속도로 280 nm에서 확인하였다. 시료 내 isoflavone (daidzin + genistin)의 농도를 측정(detector, 280 nm)하였다.

혈액채취 및 호르몬 분석

혈액채취는 오전 9 - 10시의 일정한 시간에 이루어졌다. 채취 전 2시간의 공복상태에서 생쥐의 꼬리에서 해파린 EDTA 처리된 Microcentrifuge 튜브(Corning, NY, USA)를 이용하여 마리당 약 0.1 - 0.2 mL씩 채취하였다. 채혈 즉시 상온에서 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈청부분만 회수하여 -70°C 에 보관 후 분석에 사용하였다. 혈액 내 호르몬농도는 Testosterone (ADI-900-065)와 Estrogen (ADI-901-174)을 ELISA kit (Enzo Life Sciences, Inc. NY, USA)을 사용하여 분석하였다.

정소 길이 및 무게 측정

실험 종료 시 채혈 직후, 경추탈골법으로 희생시킨 수컷 마우스의 왼쪽 정소를 적출하여 빙냉의 0.25 M sucrose 용액으로 세척한 후, 정소의 길이와 무게를 측정하기 위하여 정소를 여과지에 올려 건조시킨 후, 곧바로 정소의 길이와 무게를 측정하고 그 평균값을 구하였다.

통계분석

본 실험에서 얻어진 데이터는 mean \pm SEM으로 표시하였고, SAS 프로그램(Statistical Analysis System software; Cary, NC, USA)의 analysis of variance (ANOVA)와 Tukey 다중비교를 이용하여 분석 하였다. 처리구간 평균의 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

대두 가공부산물 추출물 125 mg 시료를 HPLC 방법으로 isoflavone의 농도를 측정된 결과, daidzin, genistin이 각 35.11, 44.46으로 이는 50.1 μg , 1.7 μg 로 계산되었다(Fig. 1). 이전 연구에서, 효소처리를 통해 고분자 물질을 분해 시키고, 발효과정에서 난소화성 올리고당의 분해 및 이소플라본을 alycone 형태로 변화시켜 체내 흡수율이 높아

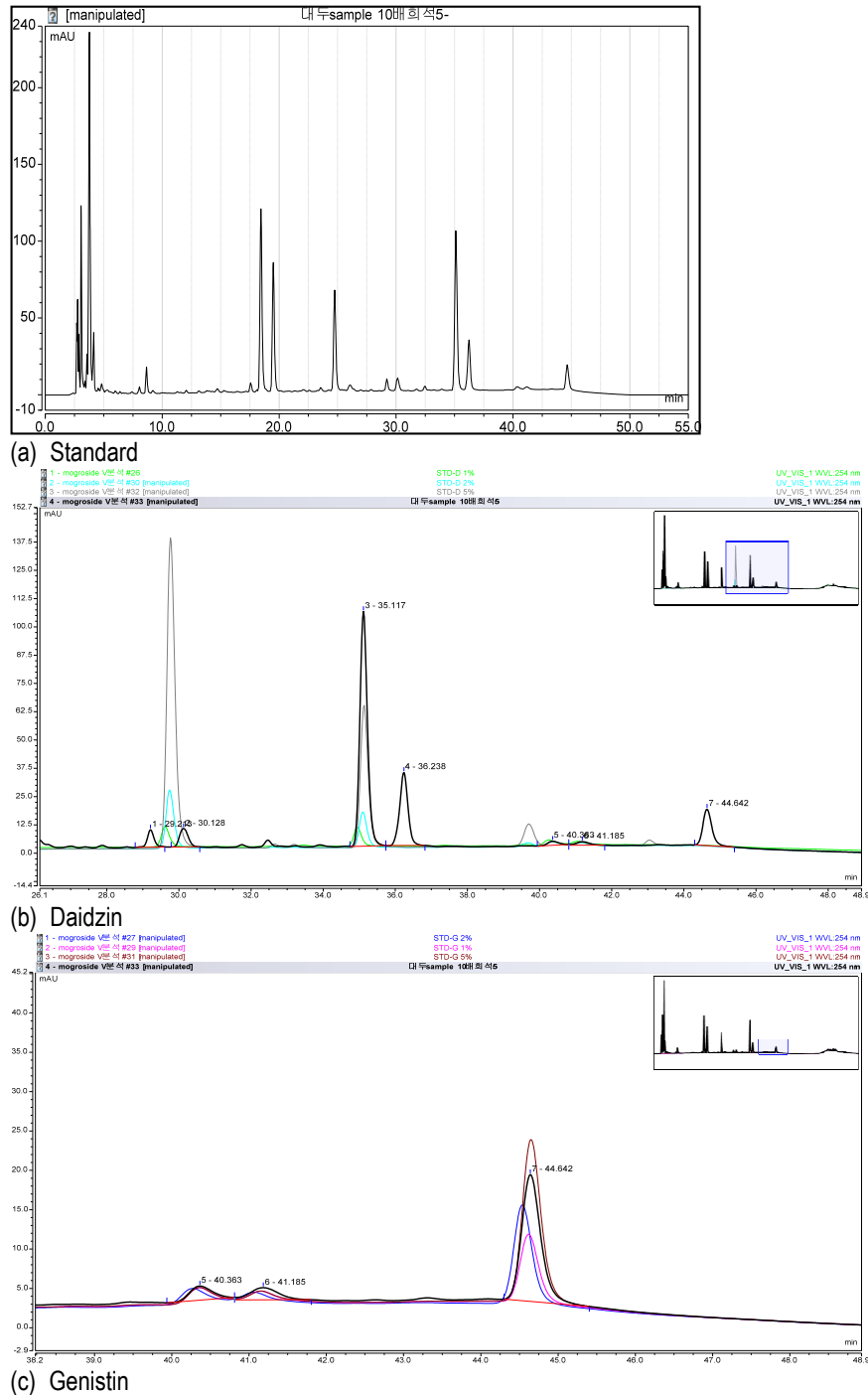


Fig. 1. HPLC chromatograms of isoflavone extracts from soybean by-product. a) genistin and daidzin standard calibration curves; b) daidzin, retention time = 35.117 min; c) genistin, retention time = 44.462 min.

짐으로써 그 기능성이 강화되는 결과를 얻은 바 있다(미발표 데이터). 수컷마우스에 isoflavone을 11일간 경구투여한 결과, 대조구와 처리구 T1, T2의 BW 및 정소길이에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 2(a)). 정소길이와 마찬가지로, 정소의 무게는 대조구(207 mg), T1 (200 mg), T2 (206 mg)로 T1에서 약간 감소하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다(Fig. 2(b)). 마우스의 경우, 에스트로겐 수용체 활성화제가 전립샘 무게를 감소시키고, 정낭의 무게에도 영향을 주는 것으로 나타났다(Dupont et al., 2000; Napier et al., 2014). 수컷 rat에 isoflavone을 급여 한 후 Leydig 세포의 증식을 분석한 결과, 세포수가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났고, 이는 고환 내 anti-Mullerian hormone receptors (AMHR)의 발현이 증가되는 것과 연관이 있는 것으로 나타났다(Sherrill et al., 2010). 생후 21일 이후 isoflavone을 90일까지 급여 한 결과 Leydig 세포의 증식과 분화를 촉진하였으며, 이는 protein kinase B (AKT), mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 연관된 estrogen receptor 신호체계와 관련이 있는 것으로 나타났다(Thuillier et al., 2009). 따라서, isoflavone처리 기간 및 농도에 따른 Leydig 세포의 반응 및 호르몬 생성에 관련된 신호전달인자 발현의 종합적인 해석 연구가 필요할 것으로 사료된다.

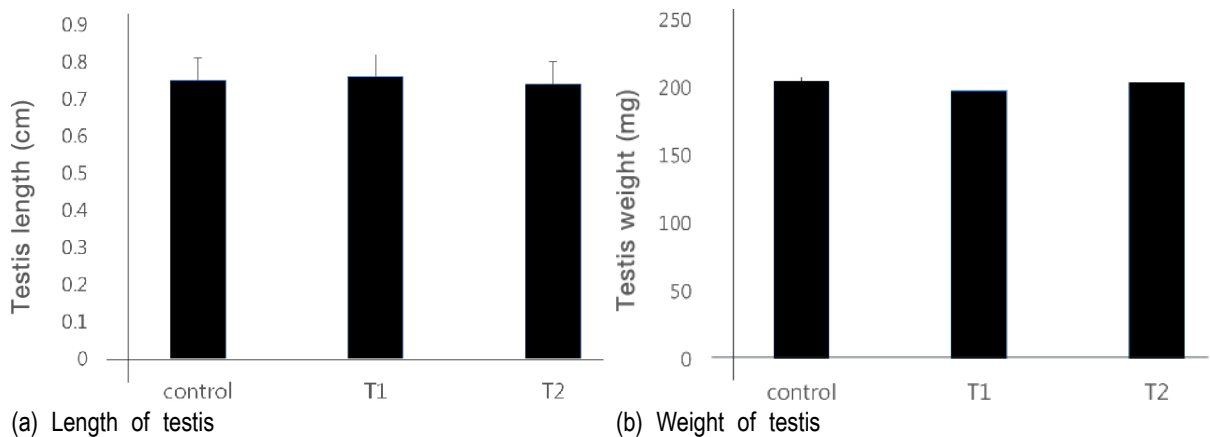


Fig. 2. Effect of isoflavone administration on length (a) and weight (b) of testis from mice at 11 d post treatment (T1: daidzin and genistin mixture; T2: isoflavone extracts from soybean by-product).

생후 4주령 마우스에 daidzin + genistin 혼합물(T1)과 대두부산물 유래 isoflavone 추출물(T2)를 각각 11일간 경구투여한 결과, 두 처리구 모두 혈액 내 testosterone 농도를 감소시키는 결과를 보였다(Fig. 3). Positive control로 사용된 T1 처리구가 대조구에 비해 큰 감소차를 보였으나(106 ± 0.01 pg/mL vs. 212 ± 4.96 pg/mL), 대두부산물에서 추출한 isoflavone 처리구인 T2에서는 감소차가 다소 적게 나타났다(137 ± 5.51 pg/mL vs. 212 ± 4.96 pg/mL). 하지만 두 그룹 모두 대조구와 비교하여 통계적으로 유의한($p < 0.05$) 차이를 보였다. 이러한 결과는 마우스에 genistein과 daidzein을 40 mg/kg BW 수준으로 급여한 이전 연구(Cline et al., 2004)와 비슷하다. 하지만, 이 연구에서는 50 μ g/kg 처리한 본 연구에 비해 높은 농도의 isoflavone을 처리하여 혈액 내 testosterone 농도 감소뿐만 아니라 성선 자체의 위축 현상도 초래하였다. 마우스에 더 높은 농도의 phytoestrogen을 급여(22 - 26 mg/kg/day)하여 수컷의 생식능력 변화를 분석한 또 다른 연구(Cederroth et al., 2010)에서는 phytoestrogen 함량이 높은 사료가 수컷 마우스의 생식능력을 저해시킨다고 결론지었다. 이 연구에서 수컷마우스의 행동에는 차이가 없었지만, 정자의 숫자가 약 25% 감소하고, 한 배새끼수가 약 21% 감소하였다. 이러한 결과들에서 동물을 이용한 in vivo 실험에서 isoflavone은 수컷의 생식능력 및 관련 유전자발현의 저해 및 음성호르몬(testosterone) 농도를 감소시킬 수 있는 능력이 확인되었다. 이는 향후 돼지에서도 isoflavone이 함유된 콩 또는 콩 부산물을 이용하여 비 물리적 거세효과를 얻을 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

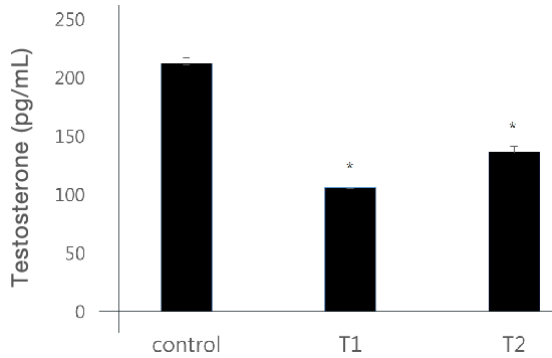


Fig. 3. Effect of isoflavone administration on serum testosterone levels from mice at 11 d post treatment (T1: daidzin and genistin mixture; T2: isoflavone extracts from soybean by-product).

Isoflavone 급여 마우스의 혈액 내 에스트로겐 호르몬(17β -estradiol)의 농도 변화는 Fig. 4에 나타내었다. 대조구에 비해 T1에서 증가하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 하지만 대조구에 비해 콩 부산물에서 추출한 isoflavone을 급여한 T2 처리구에서는 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 이는 T1 처리구의 genistin과 daidzin이 위 장관(gastrointestinal tract)에서 genistein이나 daidzein 형태의 aglycones으로 전변되는 과정에서 효율성이 떨어졌을 가능성과 isoflavone의 흡수적인 측면에서 배아의 발효처리 되어서 T2가 높은 것으로 사료된다. Isoflavone의 생체 내 대사 및 흡수적인 면에서 estrogen receptor (ER)의 binding affinities가 genistein에서 ER β 87%, ER α 4%이며 daidzein은 ER β 0.5%, ER α 0.1%이다(Kuiper et al., 1998a). 이것은 phytoestrogen은 농도 의존적으로 agonistic 혹은 antagonistic으로 작용하는 것을 뜻한다. 다시 말해 ER agonists는 에스트로겐이 낮은 환경, ER antagonists는 높은 에스트로겐 환경을 의미한다. 성성숙 이전 마우스의 경우 isoflavone을 급여 하였을 때 발정주기와 배란이 비정상적으로 나타나는데(Bateman and Patisaul, 2008), 성성숙 이전에는 생체 내 에스트로겐 농도가 낮기 때문에 나타나는 현상으로 보여진다.

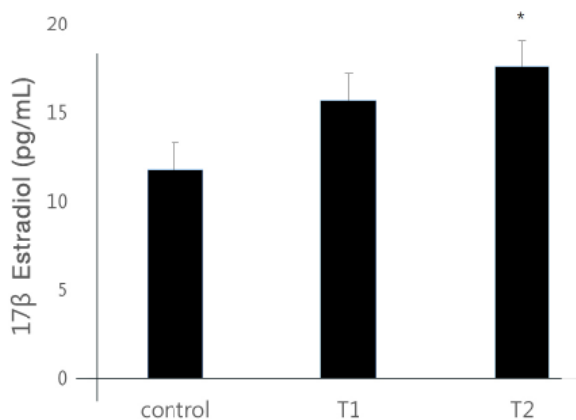


Fig. 4. Effect of isoflavone administration on serum 17β -estradiol levels from mice at 11 d post treatment (T1: daidzin and genistin mixture; T2: isoflavone extracts from soybean by-product).

연령이 높은(50 - 85세) 남성의 콩단백질 급여 실험에서는 6개월간 섭취 시 혈중 estrogen 농도가 약 20% 가량 증가했다는 보고가 있다(Hamilton-Reeves et al., 2007). 좀 더 젊은 층(건강한 20 - 40세)에 대한 급여 실험에서는 그 증가 범위가 작게 나타났다(Dillingham et al., 2005). 이러한 결과들에서 유추하여볼 때, isoflavone의 다양한 연령에 대한 효과 분석 및 최적 농도에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Conclusion

콩부산물에서 추출 정제한 isoflavone을 마우스에 11일간 경구 투여하여 수컷 마우스의 생식기관 발달 및 혈중 성호르몬의 농도를 분석한 결과, isoflavone 처리는 생식기관의 크기나 무게에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 하지만 혈중 testosterone의 농도는 유의적으로 낮게 나타났고, 혈중 estradiol의 농도는 증가하였다. 결과적으로 이번 연구의 결과는 11일간의 isoflavone 급여가 수컷마우스의 호르몬 생산체계 변화를 유도하여 음성호르몬인 testosterone 농도를 감소시킴으로써, 돼지 모델에서도 그 효과에 대한 가능성을 보인 결과라 할 수 있다. 향후 testosterone 농도 감소에 대한 정확한 메커니즘 구명 연구와 더불어 비거세 자돈에 농도별, 처리기간별 isoflavone 급여시험이 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(no. 2015R1C1A1A01051767).

References

- Akingbemi BT, Braden TD, Kempainen BW, Hancock KD, Sherrill JD, Cook SJ, He X, Supko JG. 2007. Exposure to phytoestrogens in the perinatal period affects androgen secretion by testicular Leydig cells in the adult rat. *Endocrinology* 148:4475-4488.
- Bateman HL, Patisaul HB. 2008. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology* 29:988-997.
- Cederroth CR, Zimmermann C, Beny JL, Schaad O, Combepine C, Descombes P, Doerge DR, Pralong FP, Vassalli JD, Nef S. 2010. Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 321:152-160.
- Cimafranca MA, Davila J, Ekman GC, Andrews RN, Neese SL, Peretz J, Woodling KA, Helferich WG, Sarkar J, Flaws JA, Schantz SL, Doerge DR, Cooke PS. 2010. Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice. *Biology of Reproduction* 83:114-121.
- Cline JM, Franke AA, Register TC, Golden DL, Adams MR. 2004. Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. *Toxicologic Pathology* 32:91-99.
- Dillingham BL, McVeigh BL, Lampe JW, Duncan AM. 2005. Soy protein isolates of varying isoflavone content exert minor effects on serum reproductive hormones in healthy young men. *Journal of Nutrition* 135:584-591.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127:4277-4291.
- Glover A, Assinder SJ. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Journal of Endocrinology* 189:565-573.
- Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K. 2003. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biology of Reproduction* 68:2081-2091.
- Hamilton-Reeves JM, Rebello SA, Thomas W, Slaton JW, Kurzer MS. 2007. Isoflavone-rich soy protein isolate suppresses androgen receptor expression without altering estrogen receptor-beta expression or serum hormonal profiles in men at high risk of prostate cancer. *Journal of Nutrition* 137:1769-1775.

- Hancock KD, Coleman ES, Tao YX, Morrison EE, Braden TD, Kempainen BW, Akingbemi BT. 2009. Genistein decreases androgen biosynthesis in rat Leydig cells by interference with luteinizing hormone-dependent signaling. *Toxicology Letters* 184:169-175.
- Hu GX., Zhao BH, Chu YH, Zhou HY, Akingbemi BT, Zheng ZQ, Ge RS. 2010. Effects of genistein and equol on human and rat testicular 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 activities. *Asian Journal of Andrology* 12:519-526.
- Kamboh AA, Zhu WY. 2013. Effect of increasing levels of bioflavonoids in broiler feed on plasma anti-oxidative potential, lipid metabolites, and fatty acid composition of meat. *Poultry Science* 92:454-461.
- Kudou S, Shimoyamada M, Imura T, Uchida T, Okubo K. 1991. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL), glycitein 7-O- β -D-(6"-O-Acetyl) glucopyranoside. *Agricultural and Biological Chemistry* 55:859-860.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. 1998a. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. 1998b. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology* 139:4252-4263.
- Mahmoud AM, Yang W, Bosland MC. 2014. Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 140:116-132.
- McCarver G, Bhatia J, Chambers C, Clarke R, Etzel R, Foster W, Hoyer P, Leeder JS, Peters JM, Rissman E, Rybak M, Sherman C, Toppari J, Turner K. 2011. NTP-CERHR expert panel report on the developmental toxicity of soy infant formula. *Birth Defects Research (Part B)* 92:421-468.
- Napier ID, Simon L, Perry D, Cooke PS, Stocco DM, Sepehr E, Doerge DR, Kempainen BW, Morrison EE, Akingbemi BT. 2014. Testicular development in male rats is sensitive to a soy-based diet in the neonatal period. *Biology of Reproduction* 90:40.
- Rasmussen MK, Ekstrand B. 2014. Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and sulphotransferase 2A1 gene expression in primary porcine hepatocytes by selected sex-steroids and plant secondary metabolites from chicory (*Cichorium intybus* L.) and wormwood (*Artemisia* sp.). *Gene* 536:53-58.
- Sherrill JD, Sparks M, Dennis J, Mansour M, Kempainen BW, Bartol FF, Morrison EE, Akingbemi BT. 2010. Developmental exposures of male rats to soy isoflavones impact Leydig cell differentiation. *Biology of Reproduction* 83:488-501.
- Thuillier R, Manku G, Wang Y, Culty M. 2009. Changes in MAPK pathway in neonatal and adult testis following fetal estrogen exposure and effects on rat testicular cells. *Microscopy Research and Technique* 72:773-786.
- Wang H, Murphy PA. 1994. Isoflavone composition of american and japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:1674-1677.
- Zamaratskaia G, Squires EJ. 2009. Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. *Animal* 3:1508-1521.