J. Fd Hyg. Safety, 13(2), 106 - 111(1998)

콩류식품의 주성분인 Genistein과 식품포장재 및 용기에 사용되는 Bisphenol A의 에스트로젠 효과에 관한 연구

강경선*† · 이영순 · 신광순

*일본국립의약품식품위생연구소, 서울대학교 수의과대학

Estrogenicity of Genistein and Bisphenol A

Kyung-Sun Kang*†, Yong-Soon Lee and Kwang-Soon Shin

**National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 440-744, Korea

ABSTRACT — This study has been focused on both estrogenic and proliferating activity of genistein (GEN) and bisphenol A (BPA). GEN and BPA enhance the proliferation of estrogen-dependent MCF-7 human breast cancer cells at concentrations as low as 100 nM of GEN and 8 ng/ml of BPA achieving similar effect to that of estradiol at 1 nM. Expression of the estrogen responsive gene, pS2 was also induced in MCF-7 cells by treatment with genistein at dose as low as 1 nM and BPA at dose as low as 4 ng/ml. Using 21 day-old ovariectomized nude mice, we examined end-bud formation and mammary gland development after treatment with bisphenol A or genistein. Compared with untreated control, mammary gland development and end-bud formation were significantly increased in mice fed genistein or bisphenol A ($p<0.05$). Taken together, it is concluded that GEN and BPA can act as an estrogen agonist resulting in cell proliferation and induction of the estrogen responsive pS2 gene in MCF-7 cells in vitro and in athymic mice in vivo, respectively. Therefore, it is suggested that GEN and BPA might modulate human endocrine system and these compounds might be considered as a endocrine modulator at the low levels of doses.

Key words □ genistein, bisphenol A, estrogenicity, MCF-7, pS2

여성호르몬 중 에스트로젠은 여러 표적장기의 기능이나 세포의 성장 및 분화에 관여하는 중요한 호르몬 중의 하나이다.[1] 에스트로젠의 표적장기는 유선, 자궁, 난소 및 고환과 전립선을 포함한 여성 및 남성의 생식기관들과 뇌이며,[2] 뼈의 유지와 심맥관계에 생리적으로 매우 중요한 역할을 하고 있다.[3] 그러나 최근 천연적인 에스트로젠이나 사람이 만든 합성 에스트로젠이 여성이나 남성의 표적 장기에 암을 일으키는 중요한 요인임이 보고되었다.[4]

특히, 식품오염물질 중 오늘날 미국을 비롯한 선진국에서 새로이 규제하려는 물질은 산업화 과정에서 생긴 인간이 만든 여성호르몬성 물질들이다. 이러한 물질들은 수질이나 토양에 축적되어 분해되지 않은 채로 식물이나 어패류를 주원료로 하는 식품이나 동물성 식육 등에 그대로 잔류하며, 그것이 사람에게 섭취되어 여성호르몬과 같은 역할 또는 그 역할을 방해한다.[5] 이러한 물질 중 대표적인 것으로는 PCBs, DDT, dieldrin, toxaphene 등으로 이미 70년대 말 80년대 초에 그 사용이 금지된 물질들이 대부분이다. 그러나 이러한 물질들이 수질이나 토양 중에 잔류하여, 그대로 자연의 먹이사슬을 통해, 동물이나 사람의 체내에 축적되어 인간의 건강을 지속적으로 위협하는데 그 심각성이 크다.[6,7] 역학 조사에 의하면, 이러한 물질들은 인간이나 야생 동물들의 기형유발, 수컷의 정자 수의 감소, 수생이나 지상의 수컷동물의 암컷화 경향이 뚜렷하다는 보고들이 있다. 사람에게 있어서도 정자수의 감소, 생식과 관련한 장기의 질병증가 등, 이들 물질에 의한 영향이 심각하게 대두되고 있다.[8] 특히, 여성의 유방암 등과 같은 호르몬관련 암 등을 일으키는 주요한 요인으로 밝혀지고 있다.[9]

Bisphenol A는 현재 세계적으로 널리 사용되는 물질로 합성수지와 폴리카보네이트 프라스틱의 원료로 사용되고 있다. 이들 프라스틱류들은 음식용기와 음료포장재로 이용

†Author to whom correspondence should be addressed.

되고 있으며, 합성수지는 식품용 용기나 병마개 그리고 물 공급용 파이프 등에 금속을 코팅하는 물질로 널리 이용되고 있다.[10] 또한 bisphenol A는 치과치료제에도 포함되어 있는 것으로 보고된 바 있다.[11]

한편 genistein은 일본이나 한국의 주요식품 중의 하나인 콩으로 만든 식품에 존재하는 주요물질 중의 하나이며, 이 물질 또한 에스트로젠양 물질로 분류되고 있으나 그 생체내효과에 대하여는 아직 논쟁의 여지가 많이 있다.[12,13] 또한, bisphenol A가 실제 사람에서의 노출농도에서 에스트로젠 호르몬효과가 있는지에 대해서도 아직 논쟁중에 있다.

따라서 본 연구는 bisphenol A와 genistein의 에스트로젠 효과를 알아보기 위하여 실제 사람의 노출농도에서 에스트로젠 수용체 양성 유방암세포인 MCF-7세포와 난소를 적출한 무흉선 마우스를 이용하여 실험해 보았다.

재료 및 방법

세포배양 및 세포성장촉진 시험

실험을 위한 MCF-7(Michigan Cancer Foundation-7, Michigan State University, MI, USA) 세포를 5% 우혈청, penicillin(100 units/ml)과 streptomycin(100 ug/ml)을 포함하는 수정된 MEM 배지에서 배양하였다. 세포를 10^4수로 세포배양용 폴리스칠렌 접시에 하루 동안 배양한 후 배지를 제거하고 150 mM 생리적식염수로 세척후 5%의 활성탄과 덱스트란을 처리한 우혈청(Hyclone Inc., Logan, UT)이 첨가된 페놀무첨가 배지에 2일간 배양하였다. 세포성장실험을 위해 배지에 genistein을 10 nM, 100 nM, 1 μM과 10 μM을 투여하였고, bisphenol A는 2 ng/ml, 4 ng/ml, 8 ng/ml, 16 ng/ml을 투여하여 4일간 배양하였다. 4일후 세포는 10 mM EDTA(pH 12.3) 용액으로 30분간 세포를 융해하고 KH_2PO_4 용액으로 중화하였다. DNA측정을 위해 Hoechst reagent 33256을 세포 융해액에 넣고 형광을 350 nm excitation과 455 nm emission 하에서 DNA양을 측정하였다. Genistein 및 bisphenol A와 17-a-estradiol(1 nM)은 100% 알코올에 녹였으며, 각 투여농도군에 투여볼륨을 0.01%로 고정하여, 투여농도가 다를지라도 알코올 투여량은 일정하게 고정하였다. 배지는 3일에 한 번씩 바꾸어 주었다.

RNA분리 및 Northern blot

총 RNA는 estradiol과 genistein 및 bisphenol A를 투여후 72시간 뒤에 Chomczynski 등의 방법에 따라 분리하였다. 간단히 방법을 기술하면 다음과 같다. 세포를 4 M quanidium thiocyanate 100 mM 2-mercaptoethanol과 0.5% sodium sarcosyl(pH 7.0)을 포함하는 세포융해완충액에 처리한 후 세포융해물을 15 ml Corex tube에 바꾸어 담고, 0.04%(w/w) hydroxyquinoline과 2 M sodium acetate(pH 5.0)를 10:10:1의 비율로 포함하는 페놀용액으로 처리하였다. 이 용액에 0.36 ml chloroform:isoamylalcohol(24:1)을 넣어주고 10에서 20초간 볼텍스한 후 얼음위에서 30분간 정치시켜 놓은 후 12,000 g에서 30분간 원심분리 시켜 RNA를 추출하였으며, isopropanol로 RNA를 침전시킨 후 70% 알코올로 세척하였다. 진공상태에서 RNA pellets를 말린 후 RNA를 100 ul diethyl pyrocarbonate 처리한 물로 녹여, northern blot 분석을 위해 10 ug의 RNA를 이용하였다. 전체길이의 pS2를 코딩하는 0.559 kilobase 분획을 포함하는 plasmid를 미국의 ATCC로부터 구입하였으며, pS2 probe를 만들기 위해 이 plasmid를 PstI 효소로 잘라준 후 1% agarose gel (Low EEO, Sigma, Luois, USA)에 전기영동하여 DNA 편을 분리하였다. 25 ng의 pS2 cDNA를 random priming 방법으로 50 uCi(a-^{32}P)dCTP로 표지하여 이용하였다.

10 ug의 총RNA를 1.2% formaldehyde agarose gels에서 분리를 한 후, Hybond-N Nylon 막(Amersham, Arlington Heights, IL)에 분리한 RNA를 전이하였다. 막에 붙어 있는 RNA를 UV로 cross-link한 후 ^{32}P로 표지된 DNA probe로 autoradiography에 의하여 검색하였으며, 유전자의 발현은 G3PDH RNA로 표준화하였다.

난소를 적출한 무흉선 마우스를 이용한 유선발달에 관한 분석

21일령의 무흉선 마우스(Harland, IN)를 난소를 적출한 후 28일령에 무처치 사료와 genistein및 bisphenol A를 포함하는 사료를 5일간 먹인 후, 유선의 발달을 무처치 대조군과 비교 평가하였으며, 각군당 암컷마우스를 5마리씩 사용하였다. 유선발달의 평가를 위해 95% 알코올과 5% 초산을 함유하는 조직고정액으로 30분간 고정한 후, 16시간 동안 alum carmine으로 유선을 염색하였다. 또한, 톨루엔으로 지방을 제거후 유선의 발달 및 end-bud의 형성을 관찰하였다. 본 시험에서의 사료는 American Institute of Nutrition (AIN)의 추천에 의한 그들이 공급하는 AIN-93G 사료를 선택하였으며,[14] 특히 AIN-93G 사료의 단백질원은 시중에서 흔히 구할 수 있는 것과는 달리 콩단백이 아닌 casein 단백을 포함하는 사료를 선정하였다. 사료중 genistein은 750 ppm, bisphenol A는 1000 ppm이 되도록 하여 마우스에 투여하였으며 양성대조군의 마우스에는 사료에 17-a-estradiol이 1 ppm이 되게 제조하여 투여하였다. 투여농도의 설정이유는 예비시험을 통하여 혈장내 genistein과 bisphenol A의 농도가 각각 9.5~10.9 uM과 12~14 uM이 되는 것을 HPLC를 이용하여 확인하였으며, 이러한 혈장내 농도는 pS2 유전자의

발현을 유도하기에 충분한 양으로 사료되어 이들 농도를 채택하였다.

결 과

MCF-7세포에서 genistein과 bisphenol A의 세포성장 촉진효과

MCF-7 세포에서의 세포성장촉진에 대한 반응은 17-a-estradiol(1 nM)에 대한 다른 물질의 반응을 비교하였으며, 이것은 Fig. 1에서 나타난 것처럼 아무런 물질을 투여하지 않은 대조군의 세포성장을 0%로 환산하여 이에 각 처치군의 성장비율로 나타내었다. 대조군은 단지 5% 활성탄과 덱스트란으로 전 처리한 5% 우혈청을 포함하는 배지만을 이용하여 72시간 동안 배양하였다. Genistein은 농도 10 nM에서 1 uM까지 세포의 성장을 촉진하였으며, bisphenol A는 2 ng/m*l*에서 16 ng/m*l*까지 세포의 성장을 촉진하였다. Genistein의 최고 세포성장촉진은 1 uM에서 알코올투여대조군에 비하여 대략 3배이었고, 10 uM 투여군에서는 1 uM 투여군에 비하여 세포의 성장이 40% 정도 감소되었으나 알코올 투여군과 무처치 대조군에 비하여 세포의 성장이 여전히 촉진됨을 관찰하였다.

Genistein과 bisphenol A를 MCF-7세포에 투여후 pS2 mRNA 발현

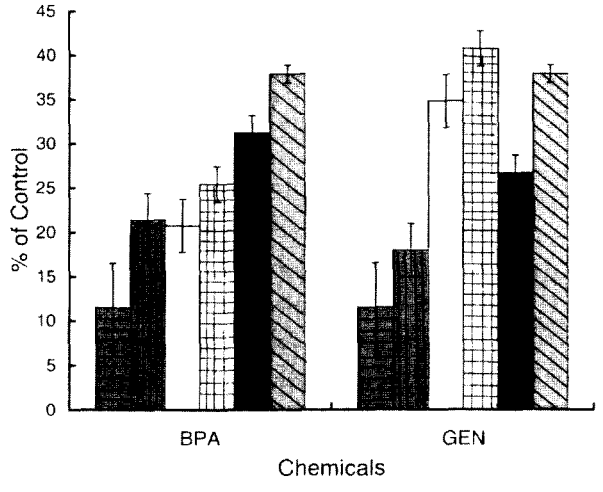

Fig. 1. Growth stimulative effect of genistein and bisphenol A in estrogen-responsive MCF-7 cells. (▤), vehicle control; (▥), bisphenol A 2 ng/m*l* or genistein 10 nM; (□), bisphenol A 4 ng/ml or genistein 100 nM; (▦), bisphenol A 8 ng/ml or genistein 1 uM; (▩), bisphenol A 16 ng/m*l* or genistein 10 uM; (▧), estradiol.

앞의 세포성장촉진결과는 genistein이 에스트로젠 수용체를 통하여 세포의 성장을 촉진하는 것으로 추정되기 때문에 에스로젠 의존적으로 발현되는 유전자 중의 하나인 pS2 유전자의 발현을 알아보았다. 양성대조인 estradiol은 농도 200 pM과 1 nM에서 pS2 유전자를 MCF-7세포에서 발현시켰으며, genistein과 bisphenol A도 pS2 mRNA고 발현시켰다. 이러한 genistein의 pS2 유전자 발현은 10 nM의 낮은 용량에서도 관찰되었으며, bisphenol A의 경우도 2 ng/m*l*의 매우 낮은 용량에서 또한 관찰되었다(Fig. 2).

난소를 적출한 무흉선 마우스에서 genistein과 bisphenol A의 유선발달효과

Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼, estradiol과 bisphenol A 및 genistein을 투여한 마우스의 유선발달이 무처치 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 평균 end-bud의 수는 무처치 대조군에서 2.7이었고, estradiol투여군 10.1, genistein 투여군 7.5, bisphenol A투여군 5.6이었다(Fig. 4).

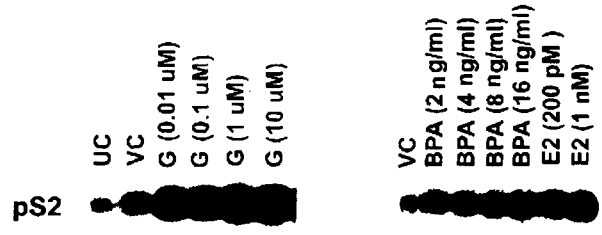

Fig. 2. Northern analysis for the expression of pS2 gene after treatment with genistein and bisphenol A in MCF-7 cells. UC, untreatred control; VC, vehicle control; G, genistein; BPA, bisphenol A; E2, estradiol.

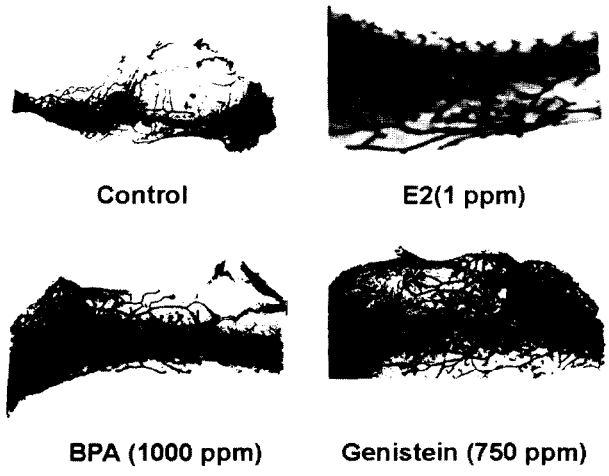

Fig. 3. Whole mount mammary gland from inguinal region of athymic nude mice.

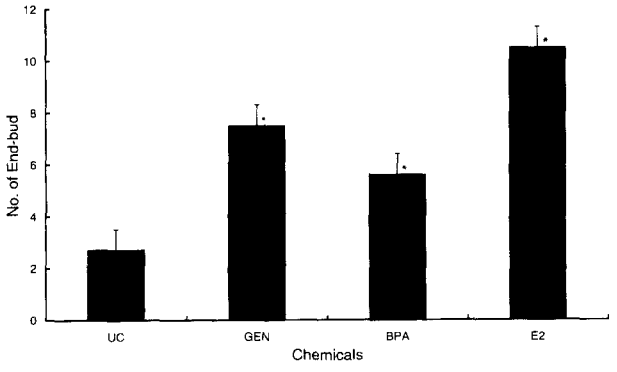

Fig. 4. Number of End-bud formation in whole mount mammary glands after treatment with genistein, bisphenol A and estradiol. Each bar represents the mean ± SD of four mice per experimental group.
*, significantly different from untreated control ($p< 0.05$ by ANOVA).

고 찰

에스트로젠 수용체는 핵막에 존재하며, 에스트로젠과 결합하여 DNA에 달라붙어 progesterone 수용체, growth factors 등 여러 가지 유전자의 발현에 관여하여 조직의 성장이나 분화에 관여한다. 본 연구는 자연식품, 특히 콩으로 만든 식품 중에 존재하는 genistein과 프라스틱용기의 주요성분인 bisphenol A의 실제 사람에서의 노출농도에서의 에스트로젠 호르몬효과를 살펴보았다. Fig. 1에서 볼 수 있는 것처럼, bisphenol A와 genistein이 MCF-7세포의 성장을 용량이 높아짐에 따라 촉진시켰다. 이러한 결과는 bisphenol A와 genistein이 에스트로젠과 같은 작용을 하는 것으로 생각되며, 이것을 증명하기 위해서 에스트로젠에 의존적으로 발현되는 유전자로써 Brown 등[15]이 보고한 pS2 유전자의 발현을 bisphenol A와 genstein을 투여후 살펴보았다. Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼, pS2 유전자의 발현이 에스트로젠 투여에서와 마찬가지로 bisphenol A와 genistein을 투여한 세포 군에서도 유전자 발현이 되었다. 이 결과는 bisphenol A와 genistein이 에스트로젠과 마찬가지로 에스트로젠 수용체와 결합하여 DNA와 반응하는 전형적인 에스트로젠 경로를 따르고 있는 것으로 볼 수 있다. 또한, 본 연구에서 사용한 bisphenol A의 농도 2 ng/m*l*에서 16 ng/m*l*은 실제 음식깡통(Food Can) 등에서 음식으로 용출되어 나오는 농도로 이 농도에서의 bisphenol A의 에스트로젠 효과는 식품위생학적으로 매우 중요한 의미를 가지고 있다고 할 수 있다. 실제 사람의 bisphenol A에 의한 노출농도를 살펴보면, 음식저장용깡통에 들어있는 야채에서 10~20 ug/can 또는 50~100 nM로서, Brotons(1995) 등의 보고에 의하면 음식저장용 깡통에서 액상 내용물에 용해되어 있는 bisphenol A의 범위가 4~23 ug이었다고 보고하였다.[10] 또한 Olea (1996) 등은 치과치료환자가 치과 치료후 1시간 후에 검사하였을 때, 침속에 포함되어 있는 bisphenol A의 양이 90~931 ug이었다고 보고하였다.[11]

지금까지 bisphenol A는 24시간 SHE, 7일 SHE 및 Overal SHE 등의 transformation test에서 그리고 rodent bioassay, salmonella test 등의 유전자변이 및 발암성 시험에서 음성을 나타내었으나[16] 이제부터는 독성학적으로 중요한 의미를 지니게 될 것으로 판단된다. 그래서 본연구에서 사용한 bisphenol A의 용량은 지금까지 실험되어진 용량범위보다 낮은 용량에서 그 에스트로젠 효과를 알아보는데 역점을 두었다. 왜냐하면, 미국의 상공인 연합회측의 주장에 의하면, 지금까지 알려진 bisphenol A의 에스트로젠 효과는 ug/m*l* 심지어 mg/m*l* 농도에서 나타나는 것으로 실제 사람의 노출농도와 거리가 멀며, 실제 노출농도에서 그 에스트로젠 효과를 인정할 수 없다는 주장을 펴왔기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 bisphenol A의 실제 사람노출농도(2 ng/m*l*~16 ng/m*l*)에서 그 estrogenicity가 최초로 확인되었다고 볼 수 있겠다.

지금까지 genistein은 유방암 세포를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있는데, 그 항암작용은 항-tyrosine kinase 효과인 것으로 밝혀져 있다.[12] 이러한 genistein의 항암효과를 뚜렷하게 나타내는 농도는 100 uM이상의 비교적 높은 농도임을 또한 다른 시험에서 확인하였다(투고준비중). 따라서 이러한 농도는 콩등에서 추출하여 항암제로 개발할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 그러나 100 uM 이상의 고농도는 실제 사람이 식품을 통하여 섭취할 수 없다는 결론을 내렸다. 따라서 본연구에서 채택한 용량은 100 uM 이하에서 무처치 대조군에 비하여 세포의 성장을 억제하지 않는 용량범위인 10 nM에서 10 uM 사이를 선택하였으며, 실제 Fig. 1에서와 같이 10 nM 이하에서는 세포에 어떠한 효과도 관찰할 수 없었다. 즉 genistein이 10 nM에서 1 uM 사이에서 에스트로젠호르몬과 마찬가지로 용량의존적으로 세포의 성장을 촉진하는 것으로 판단되며, 이러한 용량은 실제 사람이 식품을 통해 섭취할 수 있는 용량으로 생각된다. Genistein의 생체효과를 크게 두가지로 볼 수 있는데, 100 uM 이상의 농도에서는 항-tyrosine kinase로 작용해 그 항암성을 나타내는 반면, 10 nM에서 10 uM 사이에서는 확실하게 에스트로젠호르몬과 같이 에스트로젠 수용체를 경유하여 유방암세포의 성장을 촉진하는 것으로 생각된다. 따라서 genistein은 용량에 따라서 그 생체내 효과를 달리하므로 용량에 따른 생체내 두 개의 창(window)을 가지고 있는 물질로 사료된다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 10

uM이 용매 및 무처치 대조군에 비해서 여전히 세포의 성장을 촉진할지라도 1 uM 투여군과 비교할 때 약 40% 정도 세포의 성장을 감소시키는 것으로 보아 genistein농도 10 uM과 100 uM 사이는 에스트로젠 효과와 항-tyrosine kinase 효과가 상존하며 두 효과가 농도에 따라 변화하는 양상을 나타내는 것으로 생각된다. 실제로 1 uM을 정점으로 10 uM, 25 uM, 50 uM, 100 uM, 500 uM 에서 용량의존적으로 세포의 성장이 감소하였다. 한편, 미국 Ohio주의 Children Hospital Medical Center의 Kenneth Setchell 등은, 콩을 섭취한 유아에서의 isoflavon의 혈중농도가 콩식품을 섭취한 어른에 비해 6배에서 11배까지 높았으며, 두유를 먹인 유아의 혈중 isoflavon이 에스트로젠의 혈중치보다 13,000에서 22,000배까지 높았다고 보고하였다. 또한, 성성숙이전의 SD rat에 genistein을 주었을 때, 조기 질개구(precocious vaginal opening)와 성주기의 지연이 관찰되었다.[17] 실제 사람에 있어서, 콩단백을 1개월간 섭취한 폐경기이전의 여성에서 평균적으로 2.5일 정도 난포기(follicular phase)의 길이가 증가되었다.[18] 또한, 유방조직의 세포분열이 난소의 난포기 보다 황체기(leuteal phase)인 휴지기동안 거의 4배 이상 증가되었다.[19] 따라서 실제로 식물유래 에스트로젠이 어른에 있어서 유방암을 억제하거나 다른 이로운 역할을 할지라도, 유아에 있어서의 성장기동안과 폐경기 전의 여성에 있어서 식물유래 에스트로젠에 의한 영향에 관한 평가가 하루 빨리 이루어져야 할 것으로 생각된다.

최근 에스트로젠 베타수용체가 동정되고[20]이 수용체는 주로 남자의 전립선에서 에스트로젠 알파수용체보다 그 발현정도가 3~4배 높고, genistein과 같은 식물유래 에스트로젠이나 bisphenol A와 같은 물질들이 알파수용체보다 베타수용체와의 친화력이 훨씬 높았다.[2] 이들의 결과는 이러한 여성호르몬성 물질이 또한 전립선암과도 관련이 있을 수 있음을 시사하고 있고, 앞으로 이 부분의 연구가 활발히 진행되리라 기대된다.

국문요약

본 연구는 bisphenol A의 실제 식품을 통한 사람의 노출농도에서 에스트로젠 효과를 알아보기 위하여 사람의 유방암 세포인 MCF-7와 난소를 적출한 무흉선 마우스를 이용하여 살펴보았다. MCF-7세포를 이용한 genistein과 bisphenol A가 용매대조군과 무처치대조군에 비하여 genistein(10 nM, 100 nM, 1 uM, 10 uM)과 bisphenol A (2 ng/ml, 4 ng/ml, 8 ng/ml, 16 ng/ml)의 세포성장촉진 효과가 용량의 증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. genistein의 경우 1 uM을 정점으로 세포성장촉진이 극에 달하다가 10 uM 투여군에서 1 uM 투여군에 비하여 약 40% 정도 세포성장이 감소하였으나 대조군에 비하여 여전히 세포의 성장을 촉진하였다. 이러한 결과는 bisphenol A와 genistein이 에스트로젠과 같이 에스트로젠 수용체와 결합하는 경로로 MCF-7세포의 성장을 촉진한 것으로 생각된다. 따라서 이러한 결과를 확인하기 위하여, 에스트로젠 의존적으로 유전자가 발현되는 유전자 중의 하나인 pS2 유전자의 발현을 살펴보았다. Genistein과 bisphenol A가 pS2 유전자의 발현을 유도하는 것이 northern blot 분석에 의하여 관찰되었다. 또한, 21일령의 무흉선 마우스를 이용한 in vivo 연구에서, 무처치 대조군에 비하여 genistein과 bisphenol A를 투여한 마우스 군에서 유선의 발달과 end-bud의 형성이 유의하게 증가됨이 관찰되었다($p<0.05$). 결론적으로, bisphenol A와 genistein이 MCF-7 세포에서 에스트로젠 효과가 매우 낮은 농도에서도 나타날 수 있다는 것은 식품위생상 큰 의미를 갖고 있으며, 이러한 물질들의 실제 사람에서의 위해성 특히 성장기 유아의 위해성에 대하여 좀 더 면밀히 연구되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Muldoon, T.G.: Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue, *Endocrinology,* **109**, 1339-1346 (1981).
2. Kuiper, George G.J.M., Carlsson, B., Grandien K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J.-A.: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors a and b., *Endocrinology,* **138**, 863-870 (1997).
3. Goldfien, A. and Monroe, S.E.: Ovaries. *In Basic & clinical endocrinology*, 5th Ed. (Greenspan, F.S., and Strewler, G.J. eds) Appleton Lange Company, London, pp. 474-

477 (1997).
4. Henderson, B.E., Ross, R. and Bernstein, L.: Estrogen as a cause of human cancer. *Cancer Res.*, **48**, 246-253 (1988).
5. Colborn T., Vom Saal F.S. and Soto, A.M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Envron. Health Perspect,* **101**, 378-384 (1993).
6. Houghton, D.L. and Ritter, L.: Organochlorine residues and risk of breast cancer, *J. Am. Coll. Toxicol.,* **14**, 71-89 (1995).
7. Djdordjevic, M.V., Hoffman, D., Fan, J., Prokopczyk B., Citron M.L. and Stellman S.D.: Assessment of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose breast tissue using a superficritical fluid extraction method, *Carcinogenesis,* **15**, 2581-2585 (1994).
8. Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jegou, B., Jenson, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Muller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J. and Skakkebaek, N.E.: Male reproductive health and environmental Xenoestrogens, *Environ. Health Perspect.,* **104**, Supplement 4, 741-803 (1996).
9. Falk F. Jr., Ricci, A. Jr. and Wolf M.S.: Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer, *Arch Environ. Health Perspect.,* **47**, 143-146 (1992).
10. Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V. and Olea, N.: Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans, *Environ. Health Perspect.,* **103**, 608-612 (1995).
11. Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M. and Sonnenschein C.: Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, *Environ. Health Perspect.,* **104**, 298-305 (1996).
12. Pagliacci, M.C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi C. and Nicoletti, I.: Growth-inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer,* **30**, 1675-1682 (1994).
13. Wang, T.T.Y., Sathyamoorthy Neeraja and Phang and James M.: Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis,* **17**, 271-275 (1996).
14. Reeves, P.G., Nielson, F.H. and Fahey, Jr, G.C.: AIN-93 puified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr,* **123**, 1939-1951 (1993).
15. Brown, A.M.C., Jeltsch, J.-M., Roberts, M. and Chambon, P.: Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **81**, 6344-6348 (1984).
16. LeBoeuf R.A., Kerckaert, G.A., Aardema, M.J., Gibon, D.P., Brauninger, R. and Isfort, R.J.: The pH 6.7 syrian hamster embryo cell transformation assay for assessing the carcinogenic potential of chemicals, *Mut. Res.,* **356**, 85-107(1996).
17. Murrill, W.B., Brown, N.M., Zhang, J.-X., Manzolillo, P. A., Barnes, S. and Lamartiniere, C.A.: Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis,* **17**, 1451-1457 (1996).
18. Cassidy, A., Bingham, S. and Setchell, K.D.: Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.,* **60**, 333-340 (1994).
19. Ferguson, D.J. and Anderson, T.J.: Morphological evaluation of cell turn-over in relation to the menstrual cycle in the 'resting' human breast, *Br. J. Cancer,* **44**, 177-181 (1981).
20. Mosselman, S., Polman, J., and Dijkeman, R.: ER b: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS,* **392**, 49-53 (1996).