

## 초대 배양한 닭 간세포 증식에 대한 estradiol-17 $\beta$ 의 효과

백 결, 강주원\*

전남대학교 수의과대학  
(접수 2008. 9. 10, 게재승인 2008. 10. 27)

### Effect of estradiol-17 $\beta$ on proliferation in primary cultured chicken hepatocytes

Gyul Baek, Ju-Won Kang\*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju, 500-757  
(Received 10 September 2008, accepted in revised form 27 October 2008)

#### Abstract

The sex steroid hormone estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) mediate their biological effects on development, differentiation and maintenance of reproductive tract and other target tissue through gene regulation by nuclear steroid receptors. Although the importance of E<sub>2</sub> in many physiological process has been reported, but little is known about the effects of E<sub>2</sub> on primary cultured chicken hepatocyte. therefore, in the present study, we have examined the effect of E<sub>2</sub> on cell proliferation and it's related signal cascades. E<sub>2</sub> increase [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation in time- ( $\leq$  8 hr) and dose- ( $10^{-10}$  M)dependent manner and treatment of E<sub>2</sub> increased the phosphorylation of p44/43 MAPKs (p44/42 mitogen-activated protein kinase) and JNK(c-Jun N-terminal kinase) in a time dependent manner. In addition, PD98059 (p44/42 blocker,  $10^{-5}$  M), SP600125 (JNK blocker,  $10^{-6}$  M) blocked the estrogen-induced increase in [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. In conclusion, E<sub>2</sub> stimulates the proliferation of primary cultured chicken hepatocytes and this action is mediated by p44/42 MAPKs and JNK signal transduction pathway.

Key words : Chicken hepatocyte, Estradiol 17- $\beta$ (E<sub>2</sub>), MAPK, JNK

\*Corresponding author.

Phone : +82-62-530-2853, Fax : +82-62-530-2852

E-mail : juwondr@empas.com

스테로이드 호르몬은 각 기관 및 장기별로 특이적인 생리기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 식품, 의약품, 천연물 등 다양한 경로를 통해서 유입이 될 수 있다. 에스트로젠은 이 호르몬 중에서도 가장 강력한 생리활성을 나타내는 물질이며, 산업 동물분야에서는 생산성 향상을 위해서 지속적으로 광범위하게 사용되어 왔다.

E<sub>2</sub>는 표적세포의 원형질막을 통과하여 세포기질 또는 세포핵 안에 존재하는 수용체 단백질과 결합한다<sup>1,2)</sup>. 호르몬이 수용체와 결합하게 되면 수용체 단백질은 구조적인 변화를 일으켜, 유전자의 조절 염기서열에 결합하고, 그 결과로 특정유전자의 전사가 촉진되거나 억제된다<sup>3)</sup>. E<sub>2</sub>는 세포 증식을 촉진하고<sup>4)</sup>, *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 간세포 증식<sup>5)</sup>과 아울러 간에 작용하여 종양 형성을 촉진시키기도 한다<sup>6)</sup>. 또한 지방암 세포에서는 E<sub>2</sub>이 MAPKs/ERK, PI-3K 전달경로 및 세포주기에 영향을 미치지만<sup>7)</sup>, E<sub>2</sub>의 세포분열촉진 효과에 관련된 유전자 전사 조절기전에 대해서는 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않다. 그러므로 호르몬 작용에 대한 생리학적 기능 및 그와 관련된 신호전달 기전에 대한 정확한 규명과 아울러 호르몬에 의해 조절되는 장기의 기능변화에 대한 연구가 필요한 실정이다.

초대 배양한 간세포는 알부민 분비와 p450 1A 유도<sup>8)</sup> 및 tyrosine aminotransferase 발현<sup>9)</sup> 그리고 ascorbate 재순환<sup>10)</sup> 등의 기능유지와 간의 특이적인 기능발현에 의해 다양한 호르몬과 반응하기 때문에 간 기능에 대한 생체생리학 연구에 이용되어 왔다. 본 연구에서는 초대 배양한 닭 간세포의 특성을 이용하여 E<sub>2</sub>에 의한 간세포 증식 효과를 조사하였고, E<sub>2</sub>의 영향과 이와 관련된 신호전달체계에 대해서 알아보았다.

## 재료 및 방법

## 실험재료

실험에 사용된 2주령의 레그혼은 대한 실험동물사(청주, 한국)로부터 구입하였다. 모든 실험동물은 서울대학교의 동물관리 기준 방침을 적용하여 관리하였다. 실험시약의 구입처는 아래와 같다. Class IV collagenase와 soybean trypsin inhibitor는 Life Technologies (Grand Island, NY), fetal bovine serum은 Biowhit-taker (Walkersville, MD), Estradiol-17β, PD 98059, SP600125은 Sigma (St. Louis, MO), [<sup>3</sup>H]-thymidine은 NEN (Boston, MA), Phospho-p44/42 MAPKs, p44/42 MAPKs, phospho-JNK, JNK 항체는 New England Biolabs (Herts, UK), 그리고 토끼 IgG에 대한 산양의 항체는 Jackson ImmunoResearch (West-Grove, PA, USA)로부터 각각 구입하였다.

그 외의 시약들은 순도가 가장 높은 제품을 사용하였다.

## 닭 간세포의 초대 배양

초대 배양을 위한 닭 간세포는 Hou 등이 보고한 방법<sup>8)</sup>을 응용하여 분리한 후 단층배양(monolayer culture)을 실시하였다. 간세포를 추출하기 위한 닭은 12시간 전부터 절식을 시켰다. 닭을 개복한 후 간을 노출시키고, 간 내의 혈액을 제거하기 위하여 먼저 Ca<sup>2+</sup>이 함유되지 않는 완충용액을 대동맥을 통해 관류시켰으며, 이 때 압력이 과도하게 상승되지 않기 위해서 간 문맥을 절단하였다. 혈액이 제거된 것을 확인 한 후 0.05% collagenase용액을 분당 15ml의 속도로 20분간 관류하였다. 간이 부풀어 오른 것을 확인하고, 간 조직을 절제하여 80 μm 나일론 메쉬에서 걸른 다음 50g의 속도로 원심분리 하여 세포를 3회 세척하였다. 이후 생사염색을 통해서 간세포의 90% 이상의 생육력을 검증한 뒤 배양접시에 분주하였다. 간세포를 75 U/ml penicillin, 75 U/ml streptomycin, 5% 송아지 혈청이 함유된 배양액(basal medium eagle supplemented

with essential amino acids)과 함께 배양 접시 ( $5 \times 10^5$  cells/60 mm collagen-coated dish)에 분주하고,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  분압의 조건하에서 4시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하고 20시간 이상 배양하여 간세포가 단층을 형성하도록 하였다.

### $^3\text{H}$ -thymidine incorporation

$^3\text{H}$ -thymidine incorporation 실험은 Brett 등의 방법<sup>11)</sup>을 적용하였다. 요약하면, methyl- $^3\text{H}$ -thymidine  $1\mu\text{Ci}$ 를 배양 세포에 첨가하고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양했다. 그 다음 닭의 간세포를 PBS로 두 번 세정하고, 10% trichloroacetic acid (TCA)를 넣어  $23^\circ\text{C}$ 에서 15분 동안 고정시켰다. 고정시킨 후 5% TCA로 세정하고, 0.2N NaOH를 넣고  $23^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 처리하여 산에 불용성인 물질을 용해시켰다. 그 다음 scintillation counter를 이용하여 방사선 활성도를 측정하였다. 모든 결과는 대조군에 대한 백분율로 환산하였다.

### Western blot 분석

세포 균질화액 ( $20\mu\text{g}$  단백질)을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용해 전기영동 시킨 후 nitrocellulose 막으로 옮겼다. Nitrocellulose은 TBST [10mM Tris-HCl(pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20]로 세정한 후, 막은 5% 탈지유로 1시간동안 차단한 다음, 권장된 농도에 맞춰서 적절한 1차 항체로 배양하였다. 그 다음 막을 세정하고, horseradish peroxidase를 부착시킨 goat anti-rabbit IgG로 1차 항체를 검출했다. 밴드는 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, England, UK)로 확인하였다.

### 통계분석

결과는 means  $\pm$  standard errors (SE)로 표시하였다. 모든 실험은 ANOVA를 이용해

서 분석한 후, Bonnferroni Dunn test를 이용하여 대조군과 평균을 비교해서 분석하였다.  $P < 0.05$ 인 결과를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 세포 증식에 대한 estradiol- $17\beta$ 의 영향

$\text{E}_2$ 가 초대 배양한 닭 간세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해서  $^3\text{H}$ -thymidine 자가 방사 측정법을 실시하였다.  $\text{E}_2$ 을  $10^{-10}\text{M}$  농도로

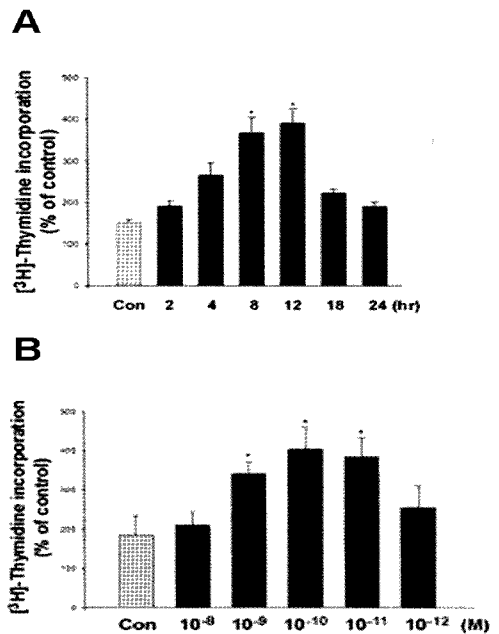


Fig 1. Dose and time dependent effects of estradiol- $17\beta$ ( $\text{E}_2$ ) on  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation.

(A) Chicken hepatocytes were incubated in the presence of  $10^{-10}\text{M}$   $\text{E}_2$  for different time periods and pulsed with  $1\mu\text{Ci}$  of  $^3\text{H}$ -thymidine for 1 h. (Values are means  $\pm$  SE of four independent experiments with triplicate dishes.)

(B) Chicken hepatocytes were incubated with various dose of  $\text{E}_2$  for 8 h and pulsed with  $1\mu\text{Ci}$  of  $^3\text{H}$ -thymidine for 1 h.

\*  $P < 0.05$  vs control

처리한 후 8시간, 12시간이 경과하면 시간 의존적으로 세포의 증식이 촉진되어, [<sup>3</sup>H]-thymidine 자가 방사 측정값은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig 1A). 그리고 10<sup>-9</sup>M - 10<sup>-11</sup>M에서는 E<sub>2</sub>가 농도 의존적으로 세포의 증식을 유의성 있게 촉진시켰다(Fig 1B).

### Estradiol-17β의 영향에 의한 p44/42 MAPK와 JNK의 활성화

E<sub>2</sub> 영향에 의한 p44/42 MAPKs (p44/42 mitogen-activated protein kinase)와 JNK (c-Jun N-terminal kinase)활성화로 인하여 인산화된 단백질을 관찰 한 결과, 시간이 경과함에 따라 (30분-90분) 증가하였다가 감소 (120-240분)하는 양상을 나타냈다(Fig 2A, B 위). 그러나 인산화 및 비 인산화된 total form의 p44/42 MAPKs와 JNK 단백질을 관찰한 결과는 30분에서 240분이 경과하여도 그 양상은 변화하지

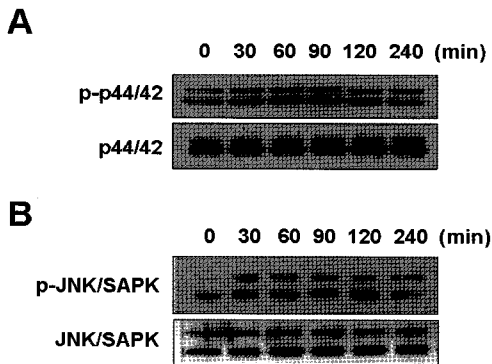


Fig 2. Effect of E<sub>2</sub> on p44/42 MAPKs and JNK activation.

(A) Chicken hepatocytes were treated with E<sub>2</sub> (10<sup>-10</sup>M) for various time points(0-240 min). The p44/42 MAPKs were detected as described in Materials and Methods, respectively. Each example shown is a representative of three experiments.

(B) Chicken hepatocytes were treated with E<sub>2</sub> (10<sup>-10</sup>M) for various time points (0-240 min). The JNK were detected as described in Materials and Methods, respectively. Each example shown is a representative of three experiments.

않았다(Fig 2A, B 아래).

### p44/42 MAPK와 JNK의 신호전달경로를 경유한 세포 증식 효과

p44/42 MAPK와 JNK의 신호전달경로를 경유한 세포의 증식 효과를 확인하기 위하여 PD 98059 (p44/42 blocker, 10<sup>-5</sup>M), SP600125 (JNK blocker, 10<sup>-6</sup>M)를 전 처리하여 [<sup>3</sup>H]-thymidine 자가 방사 측정법을 실시하였다. E<sub>2</sub> 만을 단독으로 처리할 때는 세포증식이 증가되었지만, p44/42와 JNK 억제약물인 PD98059와 SP600125을 혼합 투여하였을 경우에는 E<sub>2</sub> 영향에 의한 세포증식이 억제되었다(Fig 3). E<sub>2</sub>에 의한 간세포의 증식은 p44/42와 JNK 단백질 활성화경로를 경유하여 촉진되었다.

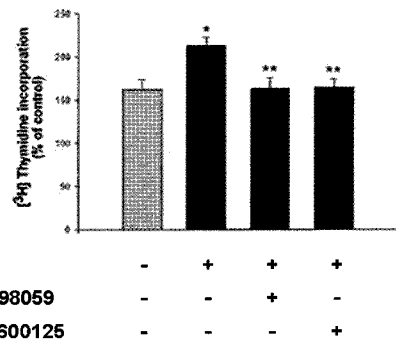


Fig 3. Involvement of p44/42 MAPKs and JNK in E<sub>2</sub>-induced increase of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. Chicken hepatocytes were pretreated with PD98059 (p44/42 inhibitor, 10<sup>-5</sup>M) and SP600125 (JNK inhibitor, 10<sup>-6</sup>M) for 30 min prior to E<sub>2</sub> treatment for 8 hr and pulsed with 1 μCi of [<sup>3</sup>H]-thymidine. (Values are mean ± SE of four independent experiments with triplicate dishes.) \* P < 0.05 vs. control; \*\*P < 0.05 vs. E<sub>2</sub> alone.

## 고 찰

본 연구에서는 초대 배양한 닭 간세포에 대한 E<sub>2</sub>의 세포증식 효과와 이에 대한 신호경로에 대해서 알아보았다.

지금까지의 연구에 따르면 조류와 포유동물은 간의 특이적인 기능 차이가 있고<sup>12)</sup>, 이와 같은 독특한 특징을 조사하기 위하여 에스트로젠을 투여하기 전, 후 기능변화에 따른 병아리 간세포의 기능적 조절에 대한 기전연구가 진행되어 왔다<sup>13)</sup>. 전통적인 개념에서의 에스트로젠 수용체(ER)는 유전자 발현을 조절하는 전사인자로서의 기능을 수행하며, 각각의 세포에서 다양한 신호전달 기전에 의해 기능이 매개된다<sup>14)</sup>. 그러나 최근 연구에 의하면 E<sub>2</sub>가 DNA에 직접적으로 작용하지 않고 세포막의 ER을 경유하는 신호전달체계를 통하여 non-genomic action으로 영향을 미치기도 한다고 보고하고 있다<sup>15)</sup>. 이러한 경우 E<sub>2</sub>과 결합한 ER은 G proteins 활성을 통해서 adenylate cyclase, PLC, PKC, ERK 등을 활성화 시킨다고 알려져 있다<sup>16)</sup>. 본 연구에서는 E<sub>2</sub>가 초대 배양한 닭 간세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 [<sup>3</sup>H]-Thymidine incorporation assay을 실시하였다. 쥐의 간세포에서 에스트로젠이 세포의 성장조절인자로 영향을 미친다는 보고<sup>17)</sup>와 마찬가지로 본 연구에서는 E<sub>2</sub>를 처리한 후 8-12 시간이 경과하면 간세포 증식이 유의성있게 나타났으며, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-11</sup> M의 농도에서는 세포증식이 농도 의존적으로 유의성있게 촉진되는 것을 확인하였다.

세포의 신호전달체계는 MAPKs 및 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 효소인 cyclins과 cyclin dependent kinases (CDKs)복합체를 활성화시켜 세포 증식을 유발한다고 알려져 있다<sup>18-20)</sup>. MAPKs는 44/42 MAPKs, JNK, p38 MAPKs 등이 있으며, 세포증식, 노화, 분화, 세포소멸 등과 같은 다양한 조절에 관여한다<sup>21)</sup>. JNK는 NH<sub>2</sub>-terminal의 전사인자인 c-JUN을 인산화하여 스트레스에 의해서 현저히 활성화되므로 stress-activated protein kinase (SAPK)경로로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 세포 이외의 화학물질에 의한 스트레스나, 만성염증, 심장질환, 뇌일혈 등과 같은 심맥관계 질환에서도 다양한 MAPKs 신호체계를 활성화시킨다<sup>23)</sup>. 한편 악성 갑상선 세

포에서도 E<sub>2</sub>은 ER 및 MAPKs 신호전달체계의 활성을 조절하여 암세포 등의 성장에 영향을 미친다고 보고하고 있다<sup>24)</sup>. 이 신호전달체계는 세포질이나 핵 내에서 coregulators나 여러 가지 전사 인자들을 인산화 시킴으로써 세포내의 유전자 발현을 조절한다. 세포증식에 대한 신호전달경로를 조사한 결과 E<sub>2</sub>에 의해 p44/42 MAPKs와 JNK가 활성화되는 것을 확인하였으며, PD 98059(p44/42 blocker), SP600125 (JNK blocker)를 전 처리하였을 경우 E<sub>2</sub>의 영향에 의한 세포증식 효과가 억제되었다. 따라서 E<sub>2</sub>에 의한 간 세포증식은 p44/42와 JNK의 신호전달 단백질 활성화경로를 경유해서 증가된다고 할 수 있다. 본 연구의 결과는 MAPKs에 의해 CDK2와 CDK4 및 cyclin D1과 E의 활성화를 통해 세포 증식을 촉진하고, 이러한 세포주기 단백질의 활성화가 PD98059(MEK 억제제)에 의해 억제되었다는 선행 연구 결과와 일치하였으며<sup>25)</sup>, 마우스 배아줄기에서도 에스트로젠은 세포의 증식을 촉진시키며, 이러한 작용은 MAPKs, CDKs, protooncogenes를 경유하여 세포의 분화가 이루어진다는 보고<sup>26)</sup> 및 지방암세포에서 MAPK/ERK의 활성을 촉진시켰다는 연구결과 와도 일치하였다<sup>27)</sup>. 결론적으로 E<sub>2</sub>는 p44/42 MAPKs와 JNK 활성화를 통한 신호전달 체계를 경유하여 초대 배양한 닭 간세포의 증식을 촉진시켰다.

## 결 론

스테로이드 호르몬은 핵내 수용체를 경유하여 다양한 생리화학적 생체기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 E<sub>2</sub>이 세포 성장에 미치는 영향을 초대배양한 닭 간세포를 이용하여 조사하였고, E<sub>2</sub>의 영향과 이와 관련된 세포 신호전달체계에 대해서 알아보았다.

E<sub>2</sub>을 10<sup>-10</sup>M 농도로 처리한 후 8시간, 12시간이 경과하면 세포의 증식이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, E<sub>2</sub>가 10<sup>-9</sup>M - 10<sup>-11</sup>M 농도에서는 농도 의존적으로 세포의 증식이

촉진되었다. 그리고 p44/42와 JNK 활성화에 따라 인산화된 단백질은 시간이 경과함에 따라 증가되었다가 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 total form의 p44/42 MAPKs와 JNK 단백질은 시간경과와는 무관하게 그 양상이 변화하지 않았다. 그리고 신호전달체계를 확인하기 위해 E<sub>2</sub>만을 단독처리할 때는 세포증식이 증가되었지만, p44/42 와 JNK 억제약물인 PD98059와 SP600125을 혼합 투여하였을 경우에는 세포증식이 억제되었다.

결론적으로 초대 배양한 닭 간세포는 p44/42 MAPKs (p44/42 mitogen-activated protein kinase)와 JNK(c-Jun N-terminal kinase)의 신호전달경로를 통해 세포의 증식을 활성화시켰다. 이와 같은 신호전달체계의 규명은 호르몬에 의해 발생하는 병태생리학적인 기능변화를 예측할 수 있으며, 질병의 예방과 치료대책을 강구하기위한 기초자료로 활용이 가능할 것이다.

## 참고문헌

- Edwards DP. 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67: 335 - 376.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, et al. 2004. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69: 537 - 542.
- Simoncini T, Genazzani AR. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 148: 281 - 292.
- Yager JD, Liehr JG. 1996. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 203 - 232.
- Francavilla A, Polimeno L, DiLeo A. 1989. The effect of estrogen and tamoxifen on hepatocyte proliferation *in vivo* and *in vitro*. *Hepatology* 9: 614 - 620.
- Villa E, Camellini L, Dugani A. 1995. Variant estrogen receptor messenger RNA species detected in human primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 55: 498 - 500.
- Gaben AM, Saucier C, Bedin M, et al. 2004. Mitogenic activity of estrogens in human breast cancer cells does not rely on direct induction of mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase or phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Endocrinol* 18: 2700 - 2713.
- Hou DX, Kunitake T, Kusuda J, et al. 2001. Primary culture of chicken hepatocytes as an *in vitro* model for determining the influence of dioxin. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(1): 218-221.
- Sasaki K, Kitaguchi Y, Fukuda T, et al. 2000. Ascorbic acid supplementation to primary culture of chicken hepatocytes with non-serum medium. *Int J Biochem cell Biol* 32: 967-973.
- Sasaki K, Kitaguchi Y, Koga K, et al. 2001. dehydroascorbic acid reduction in several tissue and cultured hepatocytes of the chicken. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2288-2290.
- Brett CM, Washington CB, Ott RJ, et al. 1993. Interaction of nucleoside analogues with the sodium-nucleoside transport system in brush border membrane vesicles from human kidney. *Pharm Res* 10: 423-426.
- Pearce J. 1997. Some differences between avian and mammalian biochemistry(mini review). *Int J Biochem* 8: 269-275.
- Lee MY, Lee SH, Kim YH, et al. 2006. Effect of on [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation and cell cycle regulatory proteins in primary cultured chicken hepatocyte. Involvement of Ca<sup>2+</sup>/PKC and MAPKs.

- J Cell Biochem.* 99: 1677-1687.
14. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, et al. 2002. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem* 277(52): 50768-50775.
  15. Kelly MJ, Levin ER. 2001. rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12: 152 - 156.
  16. Simoncini T, Genazzani AR. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 148: 281 - 292.
  17. Fisher B, Gunduz N, Saffer EA, et al. 1984. Relation of estrogen and its receptor to rat liver growth and regeneration. *Cancer Res* 44: 2410 - 2415.
  18. Nelsen CJ, Rickheim DG, Timchenko NA, et al. 2001. Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth *in vivo*. *Cancer Res* 61: 8564 - 8568.
  19. Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Cossu C. 2001. Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3). *FASEB J* 15: 1006 - 1013.
  20. Rossi AG, Sawatzky DA, Walker A, et al. 2006. Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Med* 12(9): 1056-1064.
  21. Dent P, Yacoub A, Fisher PB, et al. 2003. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 22: 5885 - 5896.
  22. Hibi M, Lin A, Smeal T, et al. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Gene Dev*(7): 2135-2148.
  23. Kyriakis JM, Avruch J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807 - 869.
  24. Mandole D, Schildknecht B, Gosnell B, et al. 2001. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1072-1077.
  25. Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. 2003. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320: 3 - 21.
  26. Han HJ, Heo JS, Lee YJ. 2006. Estradiol-17beta stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as proto-oncogenes. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(4): C1067-1075.
  27. Massarweh S, Schiff R. 2006. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr Relat Cancer Suppl* 1: S15-24.