

ผลของเจนิสตีอีต่อการเกิดมะเร็งเต้านมที่ถูกชักนำโดย NMU
และการเจริญของก้อนมะเร็งในหนูเพศเมียโตเต็มวัย



นางพิศมัย กิจเกื้อกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2479-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECTS OF GENISTEIN ON NMU-INDUCED
TUMORIGENESIS AND MAMMARY TUMOR GROWTH
IN ADULT FEMALE RATS

Mrs. Pisamai Kijkuokool

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Physiology

(Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-53-2479-5

481769

Thesis Title THE EFFECTS OF GENISTEIN ON NMU-INDUCED
TUMORIGENESIS AND MAMMARY TUMOR GROWTH IN ADULT
FEMALE RATS

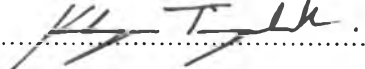
By Mrs. Pisamai Kijkuokool

Field of study Physiology

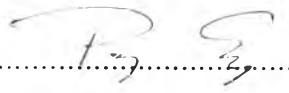
Thesis Advisor Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.

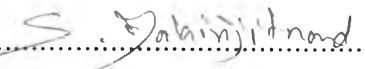
Thesis Co-advisor Professor Ishwar S. Parhar, Ph.D.

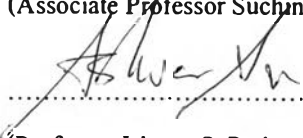
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Doctor's Degree

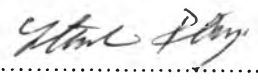
..... Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

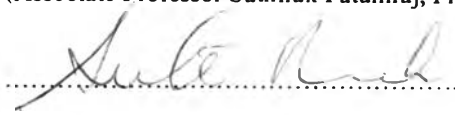
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Professor Ishwar S. Parhar, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, D.V.M., MS., Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Punya Temcharoen, D.V.M., MS)

พิศมัย กิจเกื้อกูล : ผลของเจนิสตีอินต่อการเกิดมะเร็งเต้านมที่ถูกชักนำโดย NMU และการเจริญของก้อนมะเร็งในหนูเพศเมียโตเต็มวัย (THE EFFECTS OF GENISTEIN ON NMU-INDUCED TUMORIGENESIS AND MAMMARY TUMOR GROWTH IN ADULT FEMALE RATS) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตร นนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : Professor Dr. Ishwar S. Parhar, 138 หน้า ISBN 974-53-2479-5

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของเจนิสตีอินต่อการเกิดมะเร็งเต้านมและการเจริญของมะเร็งในหนูขาวเพศเมียโตเต็มวัยที่ถูกชักนำโดย NMU และกลไกในการออกฤทธิ์ของเจนิสตีอินเมื่อเปรียบเทียบกับทาม็อกซิเฟน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของเจนิสตีอินต่อการเกิดมะเร็งเต้านม ทำการทดลองโดยใช้หนูขาวเพศเมียสายพันธุ์ Spague-Dawley อายุ 45 วัน ที่ชักนำให้เกิดมะเร็งเต้านมโดยการฉีดสารละลาย nitrosomethylurea (NMU) ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าทางเส้นเลือดดำที่หาง แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองได้รับสารละลายเจนิสตีอินขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมและกลุ่มควบคุมได้รับสารละลาย vehicle (2% DMSO ใน peanut oil) โดยการฉีดทางใต้ผิวหนัง เป็นเวลา 20 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจวงจรสัปดาห์ วดน้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่หนูกิน และขนาดของก้อนมะเร็งทุกสัปดาห์ เก็บเลือดเพื่อตรวจหาปริมาณ E_2 และเจนิสตีอินทุกเดือน เมื่อครบ 20 สัปดาห์หรือเมื่อก้อนมะเร็งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ทำการฆ่าหนู และเลาะก้อนมะเร็งออกและนำมาศึกษาทางพยาธิวิทยา ผลการทดลองพบว่าขนาดและจำนวนก้อนมะเร็งที่ลดลง หนูในหนูที่ได้รับเจนิสตีอินมีค่าสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุม โดยไม่มีผลต่อระยะเวลาในการเกิดมะเร็งและชนิดของมะเร็ง ซึ่งผลที่ได้สัมพันธ์กับระดับเจนิสตีอินรวมที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างของวงจรสัปดาห์ น้ำหนักตัวหนู ปริมาณอาหารที่หนูกิน น้ำหนักของมดลูกและรังไข่ ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับระดับ E_2 ที่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างหนูทั้งสองกลุ่ม

การทดลองที่ 2 ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเจนิสตีอินต่อการเจริญของมะเร็ง เมื่อเปรียบเทียบกับทาม็อกซิเฟน ซึ่งเป็นสาร estrogen antagonist ทำการชักนำให้หนูเกิดมะเร็งเต้านมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ประมาณสัปดาห์ที่ 8-10 เมื่อก้อนมะเร็งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มเจนิสตีอิน กลุ่มทาม็อกซิเฟน และกลุ่มเจนิสตีอิน-ทาม็อกซิเฟน ซึ่งได้รับการฉีด vehicle สารละลายเจนิสตีอินขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สารละลายทาม็อกซิเฟนขนาด 100 ไมโครกรัม และสารละลายเจนิสตีอิน ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมคู่กับสารละลายทาม็อกซิเฟนขนาด 100 ไมโครกรัม ทางใต้ผิวหนัง เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ตามลำดับ เมื่อครบ 10 สัปดาห์หรือเมื่อก้อนมะเร็งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ทำการฆ่าหนูและเลาะก้อนมะเร็งเพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของมะเร็งโดยวิธี RT-PCR ผลการทดลองพบว่า เจนิสตีอินกระตุ้นการแสดงออกของยีน ในขณะที่ยีนที่ทาม็อกซิเฟนยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็ง ทั้งที่เมื่อให้โดยลำพังหรือเมื่อให้ร่วมกับเจนิสตีอิน เมื่อตรวจสอบในระดับยีน พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับทาม็อกซิเฟนอย่างเดียวหรือได้รับร่วมกับเจนิสตีอินมีการลดลงของการแสดงออกของยีน ER α มากกว่ากลุ่มเจนิสตีอิน ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับเจนิสตีอินมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน IGF-1 นอกจากนี้หนูกลุ่มที่ได้รับเจนิสตีอินมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังตับและมดลูกอย่างสัมพันธ์กันกับการลดลงของการแสดงออกของยีน GPR54 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ metastasis suppressor เมื่อติดตามดูผลที่ได้ต่อระบบสืบพันธุ์ พบว่าผลที่ได้จากการทดลองนี้ขึ้นผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 นั่นคือ เจนิสตีอินในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในระดับอวัยวะและระดับเซลล์และต่อระดับ E_2 และไม่แสดงความเป็นพิษต่อตับ ส่วนทาม็อกซิเฟนแสดงผล estrogen antagonist โดยไปลดขนาดและน้ำหนักของมดลูกและรังไข่ และเพิ่มระดับ E_2

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เจนิสตีอินในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมซึ่งเทียบได้กับขนาดที่คนบริโภค ไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์แต่มีผลส่งเสริมการเกิดมะเร็งเต้านมและเพิ่มการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง โดยมีกลไกการกระตุ้นผ่าน growth factor related gene (IGF-1) ในขณะที่ทาม็อกซิเฟนแสดงผล estrogen antagonist โดยไปยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งเต้านมผ่านทาง estrogen responsive related gene (ER α) และยับยั้งการเจริญและการทำงานของระบบสืบพันธุ์

สาขาวิชา สรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4489661020 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: GENISTEIN/ TUMORIGENESIS/ BREAST CANCER/ RATS

PISAMAI KIJKUOKOOL : THE EFFECTS OF GENISTEIN ON NMU-INDUCED
TUMORIGENESIS AND MAMMARY TUMOR GROWTH IN ADULT FEMALE

RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUCHINDA MALAIVIJITNOND, Ph.D.,

THESIS COADVISOR : PROF. ISHWAR S. PARHAR, Ph.D., 138 pp. ISBN 974-53-
2479-5

This study aimed to determine the effects of genistein on NMU-induced tumorigenesis and mammary tumor growth in adult female rats and its mechanism of action comparing to tamoxifen. The experiment was divided into 2 sets.

Experimental 1: Study the effects of genistein on tumorigenesis. Forty -five-day old female Sprague-Dawley rats were induced to develop the mammary tumors by a single injection of 40 mg/kg BW of NMU via tail vein. The rats were divided into 2 groups, treatment and control, and daily subcutaneously injected with 1mg/kg BW of genistein and vehicle (2% DMSO in peanut oil), respectively, for 20 weeks. The rat estrous cycles were checked daily. The body weight, food intake and mammary tumorigenesis parameters were monitored weekly. The blood samples were collected monthly for E_2 and genistein assays. After 20 weeks or when the tumor diameter was 3.5 cm, the rats were euthanized and the tumor tissues were dissected for histology study. The results showed that genistein increased tumor cross-sectional area and tumor multiplicity, which is related to the high levels of serum total genistein, but no changes in tumor incidence, latency period and mammary tumor types. There were no significant differences in the length of estrous cycle, food consumption and weights of body, uterus and ovary between genistein and vehicle groups. The results were congruent with the non-difference of E_2 levels between those two groups.

Experimental 2: Study the mechanism of action of genistein comparing to tamoxifen, an estrogen antagonist, on mammary tumor growth. The induction of tumor development in rats was similar to the Experiment 1. After 8-10 weeks or when the tumor diameter was 1 cm, rats were randomized into four groups, and daily subcutaneously injected with vehicle, genistein (1 mg/kg BW), tamoxifen (100 μ g) and tamoxifen (100 μ g) plus genistein (1 mg/kg BW), respectively, for 10 weeks. After 10 weeks or when the tumor diameter was 3.5 cm, the rats were euthanized and the tumor tissues were dissected for gene expression determination. The mRNA expression levels of the estrogen responsive related genes ($ER\alpha$, $ER\beta$ and pS2), growth factor related genes (IGF-1 and *neu*) and metastasis suppressor gene (GPR54) were determined using RT-PCR techniques. It was found that genistein stimulated the mammary tumor growth, while tamoxifen, alone or in combination with genistein, reduced the tumor growth. At the molecular level, tamoxifen treatments, alone or in combination with genistein, suppressed the expression of $ER\alpha$ gene, and the genistein treatment increased the IGF-1 mRNA levels. In addition, genistein treatment increased the tumor metastases to the liver and uterus, together with the decrease of the GPR54 gene expression. There were no significant differences in the levels of *neu* mRNA among four treatment groups. In agreement with the Experiment 1, genistein at dosage of 1 mg/kg BW did not exhibit the reproductive effects, both on the reproductive organs and E_2 levels, and toxicity effect on livers. Tamoxifen showed the estrogen antagonistic effect on reproductive organs and increased E_2 levels.

From this study, it can conclude that the supplementation of genistein at dosage of 1 mg/kg BW, in comparable to the human consumption dose, has no effect on reproductive organs, but it can enhance the tumorigenesis and tumor growth, via the growth factor related gene (IGF-1). Tamoxifen can show the estrogen antagonistic effect by reduction of tumor growth, via the estrogen responsive related gene ($ER\alpha$), and inhibit the reproductive organs and functions.

Field of study Physiology (Inter-Department)

Academic year 2005

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Pisamai Kijkuokool

S. Dalavijitnond

Ishwar S. Parhar

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Suchinda Malaivijitnond, for her excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout my study. I am greatly indebted to Professor Dr. Ishwar S. Parhar, my co-advisor, for his full support in my molecular study and his kindness throughout my stay in his laboratory at Department of Physiology I, Nippon Medical School, Japan.

I would like to express my sincere thanks to the chairman, Associate Professor Prasong Siriviriyakul and the thesis committee, Associate Professor Suthiluk Patumraj, Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti and Associate Professor Punya Temcharoen, for their valuable comments, suggestions and corrections of this thesis.

My great appreciation would extend to Assistant Professor Kuzuo Asaoka from Primate Research Institute, Kyoto University, Japan, for his helpfully training the HPLC technique, Assistant Professor Dr. Orawan Satayalai from Chulalongkorn University, who kindly supported methodology and assisted in preparing fresh tissue, and remarks, to Mr. Satoshi Ogawa from Nippon Medical School, Japan, for his assistant.

I am very grateful to The Ministry of University Affairs, Graduate School, and Interdepartment of Physiology of Chulalongkorn University, Payap University and the Thailand Research Fund, Jubilee Ph.D. program for the financial support.

Thankfulness would be given to all members in Primate Research Unit and all my friends for their help and friendship.

I am also indebted to all experimental rats for their sacrifice, which bring me to succeed my study.

Finally, I am extremely grateful to my parents, my husband and my daughter for their love, understanding and encouragement throughout my long period study and thanksgiving to my Lord, Jesus Christ, who love, lead and strengthen me with his mighty hand.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	4
- Breast cancer.....	4
- The known risk factors for breast cancer.....	5
- Estrogens and breast cancer.....	7
- Estrogen receptors (ERs).....	7
- Mammary gland development in rats.....	9
- Normal mammary gland structure.....	10
- NMU-induced tumorigenesis.....	11
- Phytoestrogens.....	12
Classification and Metabolism of the Major Phytoestrogens.....	12
- Genistein.....	13
Antiestrogenic activity of genistein.....	13
Anticarcinogenic activity of genistein.....	13
Estrogenic activity of genistein.....	14
Animal studies on the mammary cancer.....	16
- Tamoxifen.....	18

Tamoxifen and genistein action on growth of estrogen-dependent tumors.....	19
- The regulation of mammary tumor growth.....	20
- Gene related to estrogen receptor (ER) pathway.....	21
Estrogen receptors and breast cancer.....	21
The expression of presenilin-2 (pS2) mRNA as an indicator of estrogenic response	21
- Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) system and breast cancer	22
- The HER2/ <i>neu</i> gene and breast cancer	22
- GPR54 and breast cancer.....	23
III MATERIALS AND METHODS	24
- Animals	24
- The preparation of NMU, tamoxifen and genistein solutions	24
- Experiment 1: The effects of genistein on NMU- induced tumorigenesis	26
Vehicle treated group	26
Genistein treated group	26
- Experiment 2: The effects and mechanism of genistein and tamoxifen on NMU- induced mammary tumor growth	27
Vehicle group.....	27
Tamoxifen group.....	27
Genistein group	27
Tamoxifen and genistein treated group	27
- Vaginal cytology assay in rats	28
- Monitoring the mammary tumorigenesis in rats	28
- Serum estradiol determination.....	30
- Serum genistein determination	30

- Histopathological study of tumor tissues, liver and reproductive organs	32
- Determination of cancer related gene expression.....	34
Fresh tissue preparation.....	34
RNA extraction and cDNA synthesis	34
DNA amplification.....	35
- Statistical Analysis	36
IV RESULTS	37
- Experiment 1: The effects of genistein on NMU-induced tumorigenesis	37
The effects of genistein on NMU-induced mammary tumorigenesis	37
Diet intake and body and organ weights of rats.....	53
Effect of genistein treatment on estrous cycle	53
Effect of genistein treatment on serum estradiol concentration.....	58
Serum genistein concentration in vehicle and genistein treated rats.....	58
- Experiment 2: The effect and mechanism of genistein and tamoxifen on NMU-induced mammary tumor growth	61
The effect of tamoxifen and genistein on mammary tumor growth.....	61
The mechanism of action of tamoxifen and genistein on mammary tumor growth.....	67
Expression of genes related to estrogen receptor pathway.....	67
Expression level of genes related to growth factor signaling pathway	67
Expression of gene related to metastasis suppressor	68

Effect of genistein and tamoxifen on serum estradiol concentration	76
Effect of genistein and tamoxifen on weights of liver, ovary and uterus.....	76
V DISCUSSION.....	86
Experiment 1: The effects of genistein on NMU-induced tumorigenesis.....	86
Experiment 2: The effects and mechanism of genistein and tamoxifen on NMU-induced mammary tumor growth	90
VI CONCLUSION.....	96
REFERENCES	98
APPENDIX.....	110
LISTS OF PUBLICATIONS.....	111
BIOGRAPHY	123

LIST OF TABLES

	PAGE
Table 1. Factors correlate with the relative risk for breast cancer in women.....	6
Table 2. Effects of soy or soy isoflavone on chemically induced mammary tumorigenesis	17
Table 3. Classification of rat mammary gland tumors	33
Table 4. Primers used for PCR	36
Table 5. Tumor parameters after vehicle and genistein treatment for 20 weeks.....	39
Table 6. Histological classification of mammary tumors.....	45
Table 7. Body weights and absolute and relative organ weights of vehicle and genistein treated NMU-rats.....	56
Table 8. Estrous cycle lengths (mean \pm SE) during 5 months of study period in NMU-rats treated with vehicle or genistein.....	57
Table 9. Relation of percentage of metastases to the whole body and levels of GPR54 expression of mammary tumor.....	75
Table 10. Average body weight and absolute and relative organ weights at termination.....	79

LIST OF FIGURES

	PAGE
Figure 1. Anatomic structures of human breast	4
Figure 2. Comparison of the primary structures of ER α and ER β	9
Figure 3. Transverse section of normal duct from 100-day-old female rat.....	10
Figure 4. Group of mature acini	10
Figure 5. Metabolic pathways of isoflavones and a comparison of chemical structure of the isoflavones and estradiol-17 β	13
Figure 6. Detection of small size tumor (0.5-0.6 cm in diameter) by rolling up the rat skin and pinching it between the fingers.	29
Figure 7. Measurement of tumor sizes by a digital vernier caliper.	29
Figure 8. HPLC profiles of genistein standard (A) and serum sample of genistein treated NMU-rats (B).....	31
Figure 9. Standard curve of peak areas of genistein.	32
Figure 10. Tumor cross-sectional area (A) and multiplicity (B) of NMU-rats treated with 2% DMSO in peanut oil (vehicle) or genistein.	40
Figure 11. Metastatic cancer in liver of genistein treated NMU-rats.	41
Figure 12. Metastatic cancer in spleen of genistein treated NMU-rats	42
Figure 13. Papillary carcinoma of vehicle treated NMU-rat (A) and genistein treated NMU-rat (C)	46
Figure 14. The number of mitoses is generally high in carcinoma.	47
Figure 15. Cribriform carcinoma of vehicle treated NMU-rat (A) and genistein treated NMU-rat (C).	48
Figure 16. Cribriform and Comedo carcinomas of vehicle treated NMU-rat (A).	49
Figure 17. Tubular carcinoma of vehicle treated NMU-rat (A) and genistein treated NMU-rat (C)	50
Figure 18. Carcinosarcoma of vehicle treated NMU-rat (A).	51
Figure 19. Tubular adenoma of vehicle treated NMU-rat (A) and genistein treated NMU-rat (B)	52
Figure 20. The diet intake of NMU-rats treated with vehicle or genistein	54
Figure 21. The body weights of NMU-rats treated with vehicle or genistein.....	55
Figure 22. Changes of serum estradiol levels in NMU-rats treated with vehicle or genistein.....	59

Figure 23. Serum free and total genistein concentrations in NMU-rats treated with vehicle or genistein.....	60
Figure 24. Tumor cross-sectional area of NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein.....	63
Figure 25. Tumor multiplicity of NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein.....	64
Figure 26. Tumor weights of NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	65
Figure 27. Percent metastases of NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	66
Figure 28. Semi-quantitative RT-PCR of ER α mRNA.....	69
Figure 29. The nested RT-PCR result of ER β mRNA.....	70
Figure 30. Semi-quantitative RT-PCR of pS2 mRNA.....	71
Figure 31. Semi-quantitative RT-PCR of <i>neu</i> mRNA.....	72
Figure 32. Semi-quantitative RT-PCR of IGF-1 mRNA.....	73
Figure 33. The nested RT-PCR result of GPR54 mRNA.....	74
Figure 34. Serum estradiol concentration in NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	78
Figure 35. Comparison of histopathology alteration of liver in NMU-rats treated vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	80
Figure 36. Comparison of histopathology alteration of uteri in NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	81
Figure 37. Comparison of histopathology alteration of uteri in NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	82
Figure 38. Comparison of histopathology alteration of uteri in NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	83
Figure 39. Comparison of histopathology alteration of ovaries in NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	84
Figure 40. Comparison of histopathology alteration of ovaries in NMU-rats treated with vehicle, tamoxifen, genistein and tamoxifen plus genistein at the end of study period.....	85

LIST OF ABBREVIATIONS

μg	=	Microgram
μl	=	Microliter
AF-1	=	Activation function 1
AP-1	=	Activating protein – 1
BW	=	Body weight
cm	=	Centimeter
DBD	=	DNA binding domain
DCIS	=	Ductal carcinoma <i>in situ</i>
DMBA	=	Dimethyl benz anthracene
DMSO	=	Dimethylsulfoxide
DNA	=	Deoxyribonuclei acid
E_2	=	17 β -Estradiol
EGF	=	Epidermal growth factor
ER	=	Estrogen receptor
ER α	=	Estrogen receptor alpha
ER β	=	Estrogen receptor beta
EREs	=	Estrogen response elements
ERT	=	Estrogen replacement therapy
FSH	=	Follicle stimulating hormone
GADPH	=	Glyceradehyde – 3 – phosphate dehydrogenase
GPR54	=	G protein – couple receptor 54
H&E	=	Hematoxylin and eosin
HPLC	=	High performance liquid chromatography
IGF-1	=	Insulin-like growth factor – 1
LBD	=	Ligand binding domain
LCIS	=	Lobular carcinoma <i>in situ</i>
LH	=	Luteinizing hormone
MAPK	=	Mitogen activated protein kinase
ml	=	Milliliter

ml	=	milligram
mm ²	=	Square millimeter
MMPs	=	Matrix metalloproteinases
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
NaCl	=	Sodium chloride
NLS	=	Nuclear localization signal
NMU	=	Nitrosomethylurea
PDGF	=	Platelet – derived growth factor
PKC	=	Protein kinase C
PR	=	Progesterone receptor
PRL	=	Prolactin
pS2	=	Presenelin – 2
RIA	=	Radioimmunoassay
RPMI	=	Roswell Performance Memorial Institute
RT-PCR	=	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SD	=	Sprague Dawley
s.c.	=	Subcutaneous injection
TGF- α	=	Transforming growth factor – alpha
USA	=	United State of America