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

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของเจนิสติอินต่อการเกิดมะเร็งเต้านมและการเจริญของมะเร็งในหนูขาวเพศเมียโตเต็มวัยที่ถูกชักนำโดย NMU และกลไกในการออกฤทธิ์ของเจนิสติอินเมื่อเปรียบเทียบกับทาม็อคซิฟีน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของเจนิสติอินต่อการเกิดมะเร็งเต้านม ทำการทดลองโดยใช้หนูขาวเพศเมียสายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 45 วัน ที่ชักนำให้เกิดมะเร็งเต้านมโดยการฉีดสารละลาย nitrosomethylurea (NMU) ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าทางเส้นเลือดดำที่หาง แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลอง ได้รับสารละลายเจนิสติอินขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมและกลุ่มควบคุมได้รับสารละลาย vehicle (2% DMSO ใน peanut oil) โดยการฉีดทางใต้ผิวหนัง เป็นเวลา 20 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจวงจรสัดทุกวัน วัดน้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่หนูกินและขนาดของก้อนมะเร็งทุกสัปดาห์ เก็บเลือดเพื่อตรวจหาปริมาณ $E_2$ และเจนิสติอินทุกเดือน เมื่อครบ 20 สัปดาห์หรือเมื่อก้อนมะเร็งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ทำการฆ่าหนู เลาะก้อนมะเร็งออกและนำมาศึกษาทางพยาธิวิทยา ผลการทดลองพบว่าขนาดและจำนวนก้อนมะเร็งต่อตัวหนูในหนูที่ได้รับเจนิสติอินมีค่าสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุม โดยไม่มีผลต่อระยะเวลาในการเกิดมะเร็งและชนิดของมะเร็ง ซึ่งผลที่ได้สัมพันธ์กับระดับเจนิสติอินรวมที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างของวงจรสัด น้ำหนักตัวหนู ปริมาณอาหารที่หนูกิน น้ำหนักของมดลูกและรังไข่ ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับระดับ $E_2$ ที่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างหนูทั้งสองกลุ่ม

การทดลองที่ 2 ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเจนิสติอินต่อการเจริญของมะเร็ง เมื่อเปรียบเทียบกับทาม็อคซิฟีน ซึ่งเป็นสาร estrogen antagonist ทำการชักนำให้หนูเกิดมะเร็งเต้านมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ประมาณสัปดาห์ที่ 8-10 เมื่อก้อนมะเร็งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มเจนิสติอิน กลุ่มทาม็อคซิฟีน และกลุ่มเจนิสติอิน-ทาม็อคซิฟีน ซึ่งได้รับการฉีด vehicle สารละลายเจนิสติอินขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สารละลายทาม็อคซิฟีนขนาด 100 ไมโครกรัม และสารละลายเจนิสติอิน ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมคู่กับสารละลายทาม็อคซิฟีนขนาด 100 ไมโครกรัม ทางใต้ผิวหนัง เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ตามลำดับ เมื่อครบ 10 สัปดาห์หรือเมื่อก้อนมะเร็งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ทำการฆ่าหนูและเลาะก้อนมะเร็งเพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของมะเร็งโดยวิธี RT-PCR ผลการทดลองพบว่า เจนิสติอินกระตุ้นการเจริญของก้อนมะเร็ง ในขณะที่ทาม็อคซิฟีนยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็ง ทั้งที่เมื่อให้โดยลำพังหรือเมื่อให้ร่วมกับเจนิสติอิน เมื่อตรวจสอบในระดับยีน พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับทาม็อคซิฟีนอย่างเดียวหรือได้รับร่วมกับเจนิสติอินมีการลดลงของการแสดงออกของยีน ER$\alpha$ มากกว่ากลุ่มเจนิสติอิน ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับเจนิสติอินมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน IGF-1 นอกจากนี้ในหนูกลุ่มที่ได้รับเจนิสติอินมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต้บและมดลูกอย่างสัมพันธ์กันกับการลดลงของการแสดงออกของยีน GPR54 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ metastasis suppressor เมื่อติดตามดูผลที่ได้ต่อระบบสืบพันธุ์ พบว่าผลที่ได้จากการทดลองนี้ยืนยันผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 นั่นคือ เจนิสติอินในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในระดับอวัยวะและระดับเซลล์และต่อระดับ $E_2$ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อตับ ส่วนทาม็อคซิฟีนแสดงผล estrogen antagonist โดยไปลดขนาดและน้ำหนักของมดลูกและรังไข่ และเพิ่มระดับ $E_2$

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เจนิสติอินในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมซึ่งเทียบได้กับขนาดที่คนบริโภค ไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์แต่มีผลส่งเสริมการเกิดมะเร็งเต้านมและเพิ่มการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง โดยมีกลไกการกระตุ้นผ่าน growth factor related gene (IGF-1) ในขณะที่ทาม็อคซิฟีนแสดงผล estrogen antagonist โดยไปยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งเต้านมผ่านทาง estrogen responsive related gene (ER$\alpha$) และยับยั้งการเจริญและการทำงานของระบบสืบพันธุ์

สาขาวิชา สรีรวิทยา (สหสาขาวิชา) ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2548 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 $\mu$g) and tamoxifen (100 $\mu$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 Pisamai Kijkuokool

Advisor's signature S. Malaivijitnond

Co-advisor's signature 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 LITERRATURE 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 presenelin-2 (pS2) mRNA as an indicator of estrogenic response ..... 21
- Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) system and breast cancer ..... 22
- The HER2/*neu* 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 ± 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$\alpha$ and ER$\beta$. ....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$\beta$. ....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 vernia 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$\alpha$ mRNA ..... 69

**Figure 29.** The nested RT-PCR result of ER$\beta$ mRNA ..... 70

**Figure 30.** Semi-quantitative RT-PCR of pS2 mRNA ..... 71

**Figure 31.** Semi-quantitative RT-PCR of *neu* 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

| | | |
|---|---|---|
| $\mu$g | = | Microgram |
| $\mu$l | = | Microliter |
| AF-1 | = | Activation function 1 |
| AP-1 | = | Activating protein – 1 |
| BW | = | Body weight |
| cm | = | Centimeter |
| DBD | = | DNA binding domain |
| DCIS | = | Ductal carcinoma *in situ* |
| DMBA | = | Dimethyl benz anthracene |
| DMSO | = | Dimethylsulfoxide |
| DNA | = | Deoxyribonuclei acid |
| $E_2$ | = | 17$\beta$-Estradiol |
| EGF | = | Epidermal growth factor |
| ER | = | Estrogen receptor |
| ER$\alpha$ | = | Estrogen receptor alpha |
| ER$\beta$ | = | 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 *in situ* |
| 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 | = | Radioimmuoassay |
| RPMI | = | Roswell Performance Memorial Institute |
| RT-PCR | = | Reverse transcriptase polymerase chain reaction |
| SD | = | Sprague Dawley |
| s.c. | = | Subcutaneous injection |
| TGF-$\alpha$ | = | Transforming growth factor – alpha |
| USA | = | United State of America |