

## PCB가 산개구리의 난자성숙과 프로제스테론 생성에 미치는 영향<sup>1\*</sup>

고선근<sup>2</sup> · 이두표<sup>3</sup>

### Effect of PCB on the Oocyte Maturation and Progesterone Production of Frog, *Rana dybowskii* in Vitro<sup>1\*</sup>

Sun-Kun Ko<sup>2</sup>, Doo-Pyo Lee<sup>3</sup>

#### 요약

PCB가 산개구리 여포난자의 성숙과 프로제스테론 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양액에 일정 농도의 PCB(Arochlor 1248)를 농도별로 첨가한 후 난자들을 20시간 배양하였다. 난자의 성숙과 프로제스테론 생성을 유도하기 위하여 FPH(Frog pituitary homogenate: 0.01p.e./ml)를 사용하였으며 여포난자의 성숙율은 난자 내의 핵막 붕괴율로부터 구하였고 프로제스테론 생성은 배양액내로 분비되는 양을 조사하였다. 실험 결과 PCB는 10ppb의 농도부터 여포난자의 성숙과 프로제스테론 생성을 현저히 억제하였으며 PCB 작용의 가역성을 조사하기 위해 3시간 동안 여포난자들을 PCB에 노출시킨 후 보통 배양액으로 옮겨 계속 배양을 해 본 결과 PCB 2.5ppb에서는 가역성을 나타내었으나 5 ppb에서는 비가역적인 손상을 주었다. 이와 같이 PCB는 낮은 농도에서 난자의 성숙과 프로제스테론의 분비 등을 억제하였으며, 개구리 난자 배양계는 환경오염물질의 독성 검정에 요긴하게 사용할 수 있음을 시사하였다.

주요어 : 난자배양, 환경독성물질, 독성검정

#### ABSTRACT

In order to know the effects of PCB(Arochlor 1248) on the oocyte maturation and progesterone(P<sub>4</sub>) production by FPH(Frog pituitary homogenate: 0.01 p.e./ml) of frog *in vitro*, the oocytes were cultured for 20 hours in presence of the PCB at various concentrations and examined their maturation(germinal vesicle breakdown: GVBD) rates and P<sub>4</sub> levels secreted by the oocyte in the culture medium. The results show that PCB concentration of 10 ppb suppressed

\*본 연구는 2001년도 호남대학교 교내연구비에 의해 조성된 연구임.

1 접수 1월 16일 Received on Jan. 16, 2003

2 호남대학교 자연과학대학 자연과학부 Faculty of Resources, College of Natural Sciences, Honam Univ., Kwangju (506-714), Korea(sunkun@honma.honam.ac.kr)

3 호남대학교 자연과학대학 자연과학부 Faculty of Resources, College of Natural Sciences, Honam Univ., Kwangju (506-714), Korea(dplee@honam.ac.kr)

the maturation of the oocytes and secretion of  $P_4$ . To examine the reversibility of the inhibitory effects, the oocytes were exposed to the PCB only for 3 hours, and then transferred to plain medium and cultured further for 17 hours. The oocytes were recovered from the toxic effect of the PCB when they were exposed to 2.5 ppb, but not to 5 ppb of the PCB. These results indicate that PCB suppress the maturation of oocytes and secretion of  $P_4$  at low concentration, suggesting that the frog oocyte culture system can be used as a useful tool to evaluate the toxicity of the pollutants in the environment.

**KEY WORDS : OOCYTE CULTURE, ENVIRONMENTAL TOXICANTS, TOXICITY TEST**

## 서론

PCB(Polychlorinated biphenyls)는 Schmidt와 Schultz(1881)에 의해 최초로 합성되었으며 1929년부터 상업적으로 생산되어 사용되기 시작하였다. PCB의 사용량은 1950년대부터 급속히 증가하여 1960년대에 최고에 달했으며(Blechly, 1984) 1970년대에 비로소 환경을 오염시키고 있음이 밝혀져 생산 및 사용량이 감소하기 시작하였으나 오늘날까지도 환경에서 상당량이 검출되고 있다. 수많은 인공 화학물질 중에서도 PCB는 유독 환경오염과 독성학적 측면에서 가장 많은 사회적 관심과 연구의 대상이 되어 왔다. 이러한 PCB는 생산량이 많을 뿐만 아니라 세계 도처에서 사용되고 있어서 남극이나 북극의 환경 중에서도 검출되고 있을 정도로 지구 전체에 널리 퍼져 있다(Atlas and Giam, 1981; Tanabe and Tatsukawa, 1986). PCB의 난분해 특성 및 생물농축 특성은 특히 수계생태계에서 먹이사슬의 정점에 있는 포식자를 통해서 잘 확인되고 있다(Phillips, 1980; Tanabe *et al.*, 1984). PCB는 높은 지질친화성과 낮은 생분해성 때문에 특히 인간뿐만 아니라 육상동물에서 많이 검출되고 있다(Peakall *et al.*, 1975; Tanabe *et al.*, 1987; Jensen, 1987; Guruge *et al.*, 2001). PCB의 환경독성에 관하여는 아직 명확하게 규명되지 않았지만 야생동물이 이들 화학물질에 민감하다는 사실은 널리 알려져 있다(Delong *et al.*, 1973; Helle *et al.*, 1976; Helander *et al.*, 1982; Reijnders, 1986; Tanabe *et al.*, 1994). 최근에는 양서류의 생태학적·발생학적 특징을 이용하여 오염물질에 의한 형태적 기형발생과 호르몬의 작용양상에 미치는 영향에 대한 연구들이 활발히 진행되어져 갑상선 호르몬의 교란에 의한 변태(metamorphosis) 지연과 호르몬 분비를 조절하는

유전자의 이상으로 인한 변태중지 등이 알려져 있으며(Mondou and Kaltenbach, 1979; Bray and Sicard, 1982; Galton, 1992) 이러한 현상들을 활용하여 세계각국에서 자국 내에 서식하는 개구리들의 발생계를 활용하여 환경독성을 파악하려는 시도가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내에 널리 서식하고 있는 산개구리(*Rana dybowskii*)를 대상으로 하여 PCB가 난자성숙에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

산개구리(*Rana dybowskii*)는 2001년 10월~2002년 2월 중 광주 근교 및 전라북도 일원에서 필요에 따라 암컷 성체(약 30g)를 채집하여 저온실(4℃)의 물 속에 보관하면서 필요에 따라 사용하였다.

### 2. 호르몬 및 시약

배양액으로는 Amphibian Ringer's 용액(AR: NaCl, 6.6g/l; CaCl<sub>2</sub>, 0.15g/l; KCl, 0.15g/l)에 penicillin G(30mg/l) streptomycin sulfate(50mg/l) 및 sodium bicarbonate 완충용액(200mg/l)을 사용 직전에 첨가하여 사용하였으며 배양액의 pH는 0.1 N HCl을 사용하여 7.4로 맞추어 사용하였다. 난자의 성숙현상을 유도하기 위해 사용했던 뇌하수체 추출물(Frog pituitary homogenate: FPH)은 암컷 개구리 뇌하수체를 10개 정도 모은 다음 AR 용액에서 초음파 분쇄기로 부순 후(20 sec), 원심분리 (20min, 1000rpm, 4℃)하여 상층

액을 1 pituitary equivalent/*ml*(pit. equiv./*ml*) 농도로 만들었으며 이를 소량씩(1*ml*) 분주하여 냉동 보관(-20℃)하였다(Lin and Schuetz, 1985). 한번 녹인 뇌하수체 추출물은 당일에 사용하였다. 배양액에 첨가한 polychlorinated biphenyls (Arochlor 1248; AccuStandard Co; New Haven, CT)는 hexane에 녹인 후 hexane만을 제거하고 dimethyl sulfonyl oxaloacetate(DMSO)로 재구성하여 Stock solution으로 제조하고 이를 AR용액으로 희석하여 직접 배양액에 첨가하였다. 이때 배양액 내의 DMSO 양은 여포난자에 손상을 받지 않는 농도(0.02%)를 사용하였으며 PCB를 포함하지 않은 배양액을 동시에 사용하여 대조군으로 사용하였다.

### 3. 여포난자의 배양

개구리 복부를 절개하여 난소를 채취한 다음 AR 용액으로 옹긴 다음 해부현미경(Nikon, 20×) 아래서 난소로부터 여포난자를 분리해낸 다음 배양접시(Costa 3524)에 한 well당 2*ml*의 AR과 20개의 여포난자를 넣고 22℃가 유지되는 진탕기에서 배양하였다. 개구리 여포는 여포강이 없으므로 난자에서 여포조직을 떼어내기가 용이하지 않다. 따라서 여포세포가 붙어 있는 난자를 직접 배양하였으며 배양 후 여포난자를 TCA(trichloro acetic acid; Sigma)에 고정하여 해부현미경 아래서 이들을 쪼개어 핵(germinal vesicle; GV)의 유무를 판정하여 핵막 붕괴(germinal vesicle breakdown; GVBD)가 일어난 여포난자를 성숙현상(oocyte maturation)이 진행된 것으로 간주하여 난자의 성숙율을 조사하였다.

### 4. 배양액내의 스테로이드 추출 및 보관

뇌하수체호르몬의 자극에 의해 난자로부터 배양액으로 분리된 스테로이드를 측정하기 위해 Kwon 등(1990)의 방법에 따라 배양액을 1*ml*씩 취하여 원심분리(10,000xg, 20min, 4℃)한 후 Polyethylene tube에 넣어 밀봉한 후 -40℃를 유지하는 deep freezer에 보관하였으며 배양액내의 호르몬은 추출과정 없이 직접 RIA에 사용하였다.

### 5. Progesterone radioimmunoassay (RIA)

난자들로부터 배양액내로 분리된 progesterone

양을 RIA방법으로 측정하였다. Progesterone의 표준시료는 GPBS에 녹여(25.0-2000.0pg/100*μl*) 사용하였다. Progesterone 표준시료와 배양액을 얼음 수조 안에 넣은 일련의 Polyethylene tube에 100*μl*씩 각각 넣었다. 이후의 과정에서 모든 tube 내의 추적자로 약 5,000cpm으로 희석한 <sup>3</sup>H-progesterone(1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H-progesterone, spec. act. 110 Ci/mM, TRK 413, batch 29, Amersham)을 100*μl*와 progesterone antiserum 100*μl*씩을 넣고 잘 섞은 다음 입구를 막고 4℃에서 20-24시간 동안 반응시켰다. 위의 반응액에 dextran coated charcoal(DCC, charcoal(sigma) 0.625g, dextran(sigma) 0.0625g, in 100*ml* GPBS) 200*μl*를 넣고 잘 섞은 다음 4℃에서 10분간 반응시킨 후 원심분리(500xg, 100min, 4℃)하여 항체와 결합한 progesterone을 유리형으로부터 분리하여 상층액만을 scintillation vial(kimball)에 옮겼다. 각 vial에 4*μl*씩의 counting cocktail(NEN, Aquasol)을 첨가시켜 잘 섞은 다음 10시간 후에 각 vial의 방사선 활성을 Liquid scintillation counter(Packard Tri-cub 1500)로 측정하였다. Progesterone 표준시료는 2회 반복측정하였고 sample시료는 3회는 반복측정하였으며 호르몬의 양은 Parkard secu RIA program을 사용하여 계산하였다.

Progesterone 항체는 Progesterone-11-hemisuccinate-BSA 또는 Progesterone-2-CMO-BSA를 토끼에 면역 주사하여 얻은 항혈청을 사용하였다. 다른 스테로이드와의 교차 반응도는 17 $\alpha$ -dihydroprogesterone이 14%, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone이 0.2%, cortisol은 0.01%, 기타 스테로이드와는 0.001% 이하였다.

## 결 과

뇌하수체 호르몬의 자극에 의한 여포난자의 성숙을 유도하기 위해 산개구리의 FPH를 농도별로 배양액에 첨가하여 20시간 배양 후 난자의 성숙(핵막 붕괴)율을 조사하였다. 산개구리의 뇌하수체 0.001 pit. equiv./*ml*에서 난자의 성숙이 유도되기 시작하여(성숙율, 45%) 0.01 pit. equiv./*ml* 농도에서부터 대부분의 난자들이 성숙현상을 나타내었다(성숙율 88%)(Figure 1). 또한 여포난자가 성숙현상을

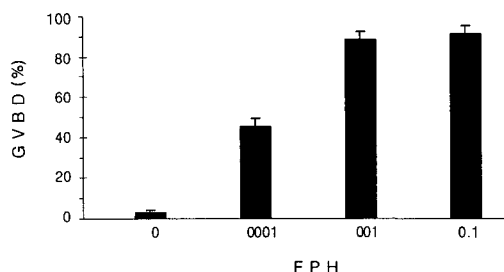


Figure 1. Effect of FPH to induce meiotic maturation(GVBD) of frog oocytes *in vitro*. Oocytes were cultured for 20 hours in wells contained 2ml AR in the different concentrations of FPH. GVBD was examined after cultured. Results depicted in the bar graphs represents GVBD % of 240 follicles in 8 animals.



Figure 2. Time course of oocyte maturation (GVBD) of frogs induced by FPH (0.01P) *in vitro*. The oocyte were checked for GVBD at different time point. Each point in the fig. represents GVBD% of 120 oocytes in 6 animals.

나타내는데 필요한 뇌하수체호르몬의 자극 시간을 조사하기 위해 배양액에 여포난자와 난자성숙을 효과적으로 유도했던 뇌하수체 호르몬 농도 0.01 pit. equiv./ml 을 처리하여 1, 6, 9, 12, 15시간 동안 각각 배양한 다음 뇌하수체 호르몬이 처리되지 않는 배양액으로 여포난자들을 옮겨 20시간까지 배양한 후 난자의 성숙율을 조사하였다. 1시간 동안 뇌하수체호르몬에 노출되었던 난자들은 약 30% 정도의 성숙율을 나타내었으나 3시간 이상 뇌하수체호르몬에 노출되었던 난자들은 대부분 80% 이상의 성숙율을 나타내어 난자성숙에 필요한 뇌하수체호르몬의 자극은 3시간 정도면 충분함을 알 수 있었다(Figure 2). PCB가 뇌하수체호르몬에 의해 유도된 난자의 성숙현상을 저해하는지의 여부를 알아보기 위해 배양액에 PCB(Arochlor 1248)를 1ppb, 10ppb, 100ppb, 1000ppb가 되도록 첨가한 후 20시간 배양하였다. Figure 3에서와 같이 1ppb의 농도에서는 80% 이상의 성숙율을 나타내었으나 PCB의 농도가 10ppb, 100ppb로 농도가 증가함에 따라 난자의 성숙율도 50% 이하로 급격히 감소하여 10ppb 이상의 농도에서는 난자성숙을 강력히 억제함을 알 수 있었다(Figure 3). 예비실험에서 PCB 계구성 용액으로 사용했던 0.02%의 DMSO와 뇌하수체 호르몬 0.01 pit. equiv./ml 배양액에 첨가하여 배양한 결과 난자의 성숙현상에 아무런 영향을 미치지 않는 것을 확인한 바 있다(unpublished). 이러한 현상으로

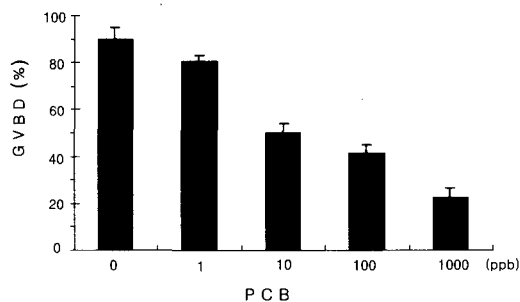


Figure 3. Effect of PCB on the meiotic maturation (GVBD) of frog oocytes *in vitro*. The oocytes were cultured for 20 hours in wells contained 2ml AR and FPH (0.01P) in the different concentrations of PCB. GVBD was examined after cultured. Results depicted in the bar graphs represents GVBD % of 120 follicles in 5 animals.

보아 난자의 성숙현상의 저해작용은 PCB에 의해 나타났다는 사실을 알 수 있었다. PCB가 난자의 성숙현상을 일정농도 이상에서 강력히 억제한다는 사실을 토대로 하여 PCB 효과를 보다 자세히 파악하기 위하여 농도구간을 세분화하고 이들 효과의 가역성 여부와 함께 난자의 성숙현상에 미치는 효과를 조사하였다. 난자들을 PCB가 없는 대조군 배양액에서 20시간 배양했을 때 90% 이상의 난자들이 성숙현상을 나타내었으나 PCB 1ppb가 포함된 배양액에서는 80%의 난자들이 성숙현상을 나타내었으며

2.5ppb에서는 68%, 5ppb에서는 60%, 10ppb 55%로 농도가 증가함에 따라 난자의 성숙율이 급격히 감소하였다(Figure 4A). 이러한 PCB의 저해효과가 가역성을 갖고 있는지의 여부를 조사하기 위해 산개구리 난자에 FPH(0.01P)를 처리하여 3시간 배양하면 대부분의 난자들이 성숙현상을 나타낸다는 사실을 토대로 하여(Figure 2) PCB가 포함되어 있는 배양액에 3시간 노출시킨 후 PCB가 포함되어 있지 않는 배양액으로 옮겨 17시간 배양하였다. PCB 2.5ppb에 3시간 노출되었던 난자들은 PCB의 영향으로부터 상당히 회복되어 85%이상의 성숙현상을 나타내었으나(회복율: 15%) PCB의 농도가 5ppb, 10ppb에서는 회복성이 급격히 떨어져 5ppb에 노출된 난자들의 회복현상(회복율: 1.7%)은 거의 나타

나지 않았으며 이 농도에서는 회복이 불가능한 손상을 받은 것으로 여겨진다(Figure 4B). 뇌하수체추출물(0.01 pit. equiv./ml)의 자극에 의한 progesterone 생성에 미치는 PCB의 영향을 파악하기 위해 배양 중인 난자에 뇌하수체추출물 0.01 pit. equiv./ml을 처리하고 PCB를 각각의 농도별로 처리하여 20시간 배양 한 후 배양액 내로 분비되어진 progesterone 양을 RIA의 방법으로 조사하였다. PCB가 처리되지 않는 대조군에서는 약 560pg/oocyte의 progesterone이 분비되었으나 PCB 1ppb가 첨가된 실험군에서는 약 450pg/난자의 양을 나타내었으며 10ppb(약 250pg/oocyte), 100ppb(약 200pg/oocyte)로 PCB의 농도가 증가함에 따라 progesterone의 양도 급격하게 감소되는 경향을 나타냈다(Figure 5).

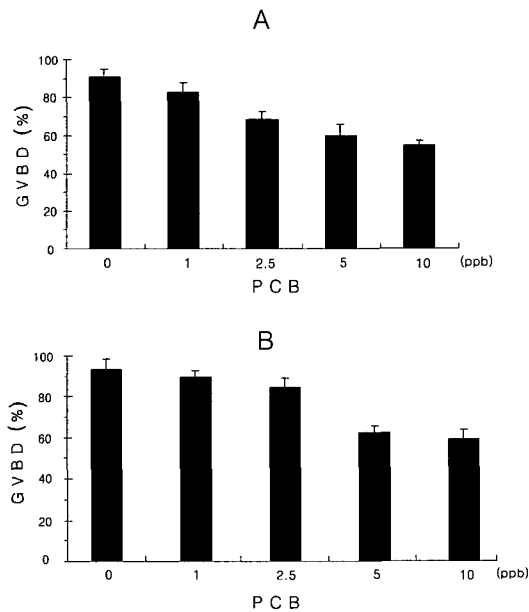


Figure 4. Effect of PCB on the maturation of frog oocytes *in vitro*. A: The oocytes were incubated for 20 hours in continuous presence of PCB and examined the oocyte maturation. B: The oocytes were exposed to the PCB for three hours and transferred to plain medium for 17 hours. Results depicted in the bar graphs represents GVBD % of 120 follicles in 6 animals.

## 고찰

전세계적으로 양서류의 개체 수는 수십년 전부터 점점 감소해 가는 경향을 보이고 있으며 그 원인으로는 서식지 파괴, 자외선 량의 증가 같은 물리적인 위협뿐만 아니라 PCB와 같은 난분해성 유기화합물 등의 환경오염물질도 중요한 원인으로 거론되고 있다(Wake, 1991:

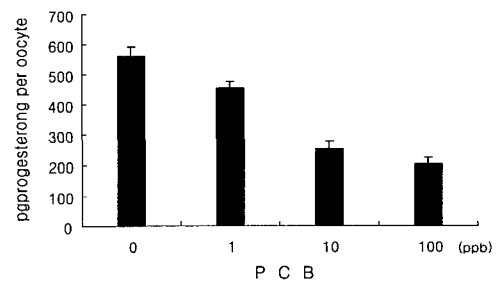


Figure 5. Effect of various doses of PCB on the secretion by the oocytes with FPH (0.01P) *in vitro*. Isolated oocytes were cultured in the presence of FPH(control), FPH and PCB(100ppb, 10ppb, 1ppb)for 20hours. After culture  $P_4$  levels in the culture medium secreted by the follicles were determined. Each bar in the figure represents pg(mean  $\pm$  SEM)  $P_4$  per oocytes (n=3 animals, triplicate incubation).

Blaustein, 1994; Pechman and Wilbur, 1994).

야생동물 중 특히 양서류는 투과성이 양호한 피부를 가지고 있고 알과 올챙이 시기에는 물 속에서 발생하고 성장하는 특성이 있으며 식성도 올챙이 단계에는 식물성을 주로 섭취하지만 개구리로 변태 후에는 육식성으로 변하는 독특한 생활사 때문에 PCB와 같은 난분해성 오염물질에 노출되기 쉽다. 이러한 개구리(*Rana*)의 여포난자의 핵상은 제1 감수분열 전기에서 분열이 정지된 상태로 난자가 성장하여 번식시기가 되면 뇌하수체호르몬의 자극으로 여포세포에서 난자의 성숙을 유도하는 스테로이드의 일종인 progesterone( $P_4$ )을 생성 분비한다(Schuetz, 1967; Smith and Ecker, 1971). 이렇게 생성되어진  $P_4$ 는 난자의 표면에 작용하여 제2 감수분열 중기까지 난자의 성숙을 유도하고 배란을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Masui and Clarke, 1979) 개구리에서 성장이 완료된 여포난자들이 주로 생성하는 스테로이드가  $P_4$ 라는 것과 *in vitro*에서 이 스테로이드가 가장 효율적으로 난자의 성숙을 유도한다는 점에서  $P_4$ 는 개구리의 성숙유도호르몬으로 간주되어  $P_4$ 의 생성과정은 바로 난자의 성숙과 직결된다고 할 수 있겠다(Masui and Clarke, 1979; Schuetz, 1985). 한편, 우리나라에 서식하고 있는 개구리의 경우 성장이 완료된 여포난자들을 배양하면서 뇌하수체추출물을 처리하면  $P_4$ 의 생성이 현저하게 증가하며 배양액 내로 다량의  $P_4$ 가 분비되어지고 난자의 성숙이 효율적으로 진행됨이 알려져 있다(Kwon *et al.*, 1988, 1990). 본 실험에 사용된 산개구리의 난자들도 뇌하수체추출물에 반응하여 여포난자들이 효율적인 성숙율을 나타내었으며(Figure 1, 2) 다량의  $P_4$ 를 배양액 내로 분비하였다(Figure 5). 본 실험의 결과로부터 산개구리 여포난자의 성숙현상을 억제했던 중금속 이온들의 농도( $Cd^{2+}$  1ppm;  $Hg^{2+}$ 와  $Cu^{2+}$  2.5 ppm;  $Pb^{2+}$  5ppm)(Ko and Lee, 1997)와 다르게 PCB 경우 수ppb 수준인 매우 저농도에서 난자의 성숙현상과  $P_4$ 의 분비를 억제하여 산개구리 난자는 PCB에 매우 민감하게 반응한다는 사실을 알 수 있었으며(Figure 3) 난자성숙과 호르몬 분비에 해당하는 형태적 변화 및 생리적인 뚜렷한 변화를 단시간 내에 판정 할 수 있어서 오염물질의 독성효과를 판정 할 수 있는 좋은 재료가 된다는 것을 알 수 있었다. 실험에 사용했던 PCB(Arochlor 1248)는 10ppb에서부터 50%이상의 난자 성숙현상을 억제하였으며 농도가 증가함에 따라 난자의 성숙을 보다 강력하게 억제하였다. 이

러한 PCB의 저해작용은 일부가 부분적으로 회복 가능한 구간도 있지만 일정농도 이상에서는 거의 회복이 불가능한 손상을 주는 것으로 나타났다(Figure 4). 즉 PCB 1ppb, 2.5ppb에 3시간 동안 노출되었던 여포난자들은 대조군과 비슷한 비율로 회복되었으나 5ppb 이상의 농도에 노출되었던 여포난자는 회복율이 현저히 낮아 불과 3시간 동안에 치명적인 손상을 입었다는 것을 알 수 있었으며 이러한 사실은 PCB가 매우 낮은 농도에서도 여포난자들의 생리적 변화를 강하게 억제하며 대부분 단시간 내에 비가역적인 손상을 줄 수 있음을 의미한다. 또한 본 실험에서 PCB는 일정 농도 이상에서  $P_4$ 의 분비를 억제하고(Figure 5) 난자의 성숙현상도 억제하였다(Figure 3). 이러한 결과들을 뇌하수체호르몬의 자극으로 생성되어진  $P_4$ 가 난자의 표면에 작용하여 난자의 성숙을 유도하고 배란을 일으킨다는 사실에(Masui and Clarke, 1979) 비추어 볼 때 PCB는  $P_4$ 의 생성 및 분비과정에 영향을 나타내어 난자의 성숙이 억제되는 것으로 판단되어지나 PCB의 구체적인 저해 작용기작을 파악하기에는 본 실험의 결과로는 아직 미흡하다. 개구리의 발생계를 활용하여 환경오염물질의 독성효과 및 이들의 작용기작을 파악하는 방법으로는 개구리의 배아를 올챙이 단계까지 배양하여 성장과정을 보면서 화학물질이나 혼합물질의 기형유발능 또는 발생독성을 평가하는 FETAX(Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) 방법(Gutleb *et al.*, 1999; Fischer and Dietrich, 2000)과 올챙이 단계에서 개구리로 변태(metamorphosis)되는 과정인 tail resorption 현상을 활용하는 방법 등이 이용되어지고 있다(Takeda, 1997; Fritz *et al.*, 1996). 이러한 방법들과 본 실험에서 사용했던 개구리의 여포난자의 배양계의 활용성을 비교해 보면 96시간을 배양해야 하는 FETAX 방법이나 3주-4주간 올챙이를 사육해야 하는 tail resorption 방법에 비해 여포난자는 20시간의 비교적 단시간의 배양을 통하여 핵막붕괴와 같은 뚜렷한 변화양상을 쉽게 파악 할 수 있고 이 기간에 일어나는 생리적 변화를 직접 조사 할 수 있으며 여포난자는 배아보다 채취가 쉽고 다량을 얻을 수 있는 장점들이 있다. 따라서 이러한 여포난자의 장점들을 활용하여 오염물질들의 작용기작 등을 파악 할 수 있는 연구가 더 진행되어지면 환경오염물질 등이 생물체 및 환경독성에 미치는 영향을 파악 할 수 있는 좋은 방법으로 활용되어 질 수 있을 것으로 생각된다.

## 인 용 문 헌

- Atlas, E., and C.S. Giam(1981) Global transport of organic pollutants: Ambient concentrations in the remote marine atmosphere. *Science* 211: 163-165.
- Blaustein, A.R.(1994) Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica* 50(1): 85-97.
- Blechly, J.D.(1984) Polychlorinated biphenyls: Productions, current use and possible rate of future disposal in OECD member countries. In *Proceedings of PCB Seminar, Ministry of Housing, Physical Planning and Environment. Netherlands.* pp. 343-372.
- Bray T, R.E. Sicard(1982) Correlation among the changes in the levels of thyroid hormones, thyrotropin and thyrotropin releasing hormone during the developing of *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Biol.* 50: 101.
- Delong, R.L., W.G. Gilmartin and J.G. Simpson(1973) Premature births in California sealions: Association with high organochlorine pollutant residue levels. *Science*, 181: 1168-1170.
- Fischer, W.J. and D.R. Dietrich(2000) Toxicity of the cyanobacterial cyclic toxins microcystin-LR and RR in early life-stages of the African clawed frog(*Xenopus laevis*). *Aquatic Toxicology*. 49: 189-198.
- Fritz, A., D.L. Gorlick, and G.D. Burd(1996) Neurogenesis in the olfactory bulb of the frog *Xenopus laevis* shows unique patterns during embryonic development and metamorphosis. *Int. J. Devel. Neuroscience*. Vol. 14: 931-943.
- Galton V.A.(1992) The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *TEM* 3: 96.
- Guruge, K.S., H. Tanaka and S. Tanabe(2001) Concentration and toxic potential of polychlorinated biphenyl congeners in migratory oceanic birds from the North Pacific and Southern Ocean. *Marine Environmental Research*, in press.
- Gutleb, A.C, J. Appelman, M.C. Bronkhorst J.H.J. van den Berg, A. Spenkelink, A. Brouwer, A.J. Murk(1999) Delayed effect of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species(*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environmental Toxicology and Phamacology* 8: 1-14.
- Helender, B., M. Olsson, and L. Reutergardh(1982) Residue levels of organochlorine and mercury compounds in unhatched eggs and the relationships to breeding success in white tailed sea eagles *Haliaeetus albicilla* in Sweden. *Holarctic Ecol.* 5: 346-366.
- Helle, E., M. Olsson, and S. Jensen(1976) DDT and PCB levels and reproduction in ringed seal from the Bothnian Bay. *Ambio*, 5: 188-189.
- Jensen, A.A.(1987) Polychlorobiphenyls(PCBs), polychlorodibenzo-p-dioxines(PCDDs) and polychlorodibenzo-furans(PCDFs) in human milk, blood, and adipose tissue. *Sci. Total. Environ.* 64: 259-293.
- Kwon, H. B., C. H. Choi, and C. G. Choi(1988) Studies on the oocyte maturation of korean frogs(*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) in vitro. *Korean J. Zool.* 31: 87-94.
- Kwon, H.B., J.Y. Kim and S.K. Ko(1990) Progesterone production and oocyte maturation of frog(*Rana nigromaculata* and *Rana rugosa*) follicle in vitro. *Korean J. Zool.* 33: 175-182.
- Ko, S.K. and D.P. Lee(1997) Effect of heavy metal ions on the oocyte maturation of frog, *Rana dybowskii* in vitro. *Kor. J. Env. Eco.* 11(3): 310-315.
- Lin, Y. and A.W. Schuetz(1985) Intrafollicular action of estrogen in regulating pituitary-induced ovarian progesterone synthesis and oocyte maturation in *Rana pipiens*: Temporal relationship and locus of action. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58: 421-435.
- Masui, Y. and H.J. Clarke(1979) Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* 57: 185-281.
- Mondou PM, JC. Kaltenbach.(1979) Thyroid concentrations in blood serum and pericardial fluid of metamorphosing tadpoles and adult frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39: 343.
- Pechman, J.H.K., and H.M. Wilbur(1994) Putting declining amphibian populations into perspective: Natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica* 50: 65-84.
- Peakall, D.B., T.J. Cade, C.M. White, and J.R. Hauge(1975) Organochlorine residues in Alaskan peregrines. *Pesticide Monitoring Journal*, 8: 255-260.

- Phillips, D.J.H.(1980) Quantitative aquatic biological indicators: Their use to monitor trace element and organochlorine pollution. Applied Sci. Publ, London.
- Reijnders, P.J.H.(1986) Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature*, 324: 456-457.
- Schmidt, H., and G. Schultz(1881) Uber benzidin( $\alpha$ -di-amidodiphenyl). *Ann. Chem. Liebigs*. 207: 320.
- Schuetz A. W.(1967) Effect of steroids on the germinal vesicle of oocytes of the frog(*Rana pipiens*) in vitro. *proc. soc. Exp. Biol. Med.*124: 1307-1310.
- Schuetz A. W.(1985) Local control mechanisms during oogenesis and folliculogenesis In: developmental Biology, Vol. 1. Oogenesis.(Browder, L. W. ed.) Plenum press, New York and London, pp. 3-83.
- Smith, L. D. and R.E. Ecker(1971) The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 232-2117.
- Takeda, N.(1997) The metabolism of biogenic monoamines during embryogenesis and metamorphosis in two anuran species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106: 361-373.
- Tanabe, S., H. Iwata, and R. Tatsukawa(1994) Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *The Science of the Total Environment*, 154: 163-177.
- Tanabe, S., N. Kannan, A.N. Subramanian, S. Watanabe and R. Tatsukawa(1987) Highly toxic coplanar PCBs: Occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans. *Environ Pollut.*, 47: 41-62.
- Tanabe, S., T. Mori, and R. Tatsukawa(1984) Bioaccumulation of DDTs and PCBs in the southern minke whale(*Balaenoptera acutorostrata*). *Mem. Natl. Inst. Pola Res.* 32: 140-150.
- Tanabe, S. and R. Tatsukawa(1986) Distribution, behavior and load of PCB in the oceans. In *PCBs in the environment*, Vol.1, ed, by J.S. Waid, pp. 143-161. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Wake, D.B.(1991) Declining amphibian populations. *Science* 253: 860.