

## 해양바이오품질이 PCB의 독성작용에 미치는 영향

이현교 · 김혜영 · 양재호\*

대구가톨릭대학교 의과대학 약리학교실

**Effects of Chitosan on the Toxicity of Environmental Pollutants.** Hyon-Gyo Lee, Hae-Young Kim and Jae-Ho Yang\*. *Department of Pharmacology and Toxicology, School of medicine, Catholic University of Daegu 3056-6 Daemyon-4-dong, Namgu, Daegu, 705-718 Republic of Korea*

**Abstract** Environmental contamination becomes a great public concern as our society gets industrialized rapidly. The present study examine the role of chitosan in a effort to intervene the environmental pollutant-induced toxicity. PCB-induced neurotoxicity with respect to the PKC signaling was examined. Since the developing neuron is particularly sensitive to PCB-induced neurotoxicity, we isolated cerebellar granule cells derived from 7-day old SD rats and grew cells in culture for additional 7 days to mimic PND-14 conditions. PCB showed the alteration of PKC signaling pathway. The alteration was structure-dependent. Mono-*ortho*-substituted congeners at a high dose showed a significant increase of total PKC activity at [<sup>3</sup>H]PDBu binding assay, indicating that mono-*ortho*-substituted congeners are more neuroactive than non-*ortho*-substituted congeners in neuronal cells. PKC isoforms were immunoblotted with respective monoclonal antibodies. PKC-beta II and -epsilon were activated with mono-*ortho*-substituted congeners exposure. The result suggests that the position with *ortho* has a higher potential of altering the signaling pathway. Alteration of PKC was blocked with treatment of high molecular weight of chitosan. The study demonstrated that the *ortho* position in PCBs are important in assessing the structure-activity relationship. The results suggest a potential use of marine bioactive materials as a means of nutritional intervention to prevent the harmful effects of pollutant-derived toxicity.

**Key words :** PCB, chitosan, PKC, signal transduction, cerebellum

### 서 론

Polychlorinated biphenyls (PCB)는 수소원자가 염소원자로 치환된 두 개의 비페닐 고리를 가진 방향족 탄화수소 화합물을 총칭하며 치환된 염소의 위치에 따라 약 207가지의 이성질체를 가지고 있다. PCB는 전기 절연성이 낮아서 변압기, 콘덴서 등의 전기 제품에 사용되었으며 [3], 화학공장이나 제지공장 등의 오염원으로부터 발생한 PCB는 물에는 불용성이지만 유기용매에 용해도가 좋아서 먹이사슬을 통해 체내에도 축적되어 인체 위해성이 우려되는 내분비계 장애물질로 잘 알려져 있다. PCB의 작용기전은 화학적인 구조 특성과 밀접한 관계를 가지고 있으며

다이옥신과 유사한 구조의 PCB는 성장기 초기에 신경전달 물질의 변화와 같은 신경내분비계 장애를 유도하여 신경계 독성을 유발하는 특성을 가지고 있다 [9]. 다이옥신, PCB 및 이와 유사한 구조를 가진 화합물들은 성인의 경우 인체 내에 축적되어 두통, 복통, 관절통 등의 증상과 신경 내분비계 장애 증상 등이 나타났으며 [12], 임신 중 PCB에 노출된 태어나 신생아 집단의 경우에는 성장과정에서 청각장애, 기억 및 학습의 장애, 운동 신경 장애 등의 심각한 증상이 나타나는 것으로 보고된 바 있다 [13]. 또한 이러한 화합물은 동물 실험을 통한 신경 독성 연구에서 두뇌의 갑상선 호르몬 및 신경전달물질의 조절 능력을 저하시켜 정상적인 두뇌의 발달에 장애를 일으키며

\* Corresponding author

Phone: +82-53-650-4473, Fax: +82-53-621-4106

E-mail: yangjh@cu.ac.kr

행동발달장애, 인식장애, 기억장애 등 지적 발달에도 영향을 준다 [7]. 이러한 독성은 신경세포의 발달이 활발한 태아 또는 영아의 두뇌에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다 [15]. 최근 WHO는 모유에서 다량의 PCB가 검출됨을 보고 하였으며 [14], 미국 환경청에서는 이들 화합물의 노출로 인한 태아 및 주산기, 젖먹이기 신생아의 신경 내분비 장애 연구가 진행 중이다. 신경 세포의 성장 및 발달은 early developmental age에 심각한 영향을 받을 수 있으므로 PCB에 의한 신경 독성 작용의 생체지표를 찾는 일은 앞으로 활발한 연구가 요구되는 분야이다 [1]. 본 연구에서는 뇌, 비장, 심장 등에 많이 분포하며 뇌세포의 성장조절과 신경전달물질의 분비, 유전자 발현, 세포의 대사 등에도 관여하는 Protein kinase C (PKC)의 작용기전 분석을 통하여 PCB가 신경 독성에 미치는 영향을 이해하고자 하였으며, non-ortho와 mono-ortho PCB의 구조적 특성에 따른 신경독성을 비교하여 효율적인 위해성 평가의 기준을 확립하고자 하였다. 아울러 PCB와 같은 환경오염물질에 의한 신경세포의 장애현상을 예방 또는 차단하는 방법을 모색하기 위해 면역계를 강화하고 암세포의 활동을 저하시키는 해양 생리활성물질인 키토산의 효능을 평가하고 이 물질의 활용가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 연구 대상물질

본 연구에 사용된 일반 시약은 Sigma사에서 구입하였으며 PKC의 항체 등은 Santa cruze사에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에서는 PCB 이성질체 중 non-ortho 형태인 PCB-77 (3,3',4,4'-tetraCB), PCB-81 (3,4,4',5-tetraCB)와 mono-ortho 형태인 PCB-105 (2,3,3',4,4'-pentaCB), PCB-123 (2',3,4,4',5-pentaCB)를 선택하였다. PCB는 ACCU standard제품을 구입하여 사용하였다.

### 화학물질 및 키토산 노출

PKC isozymes의 translocation을 확인하기 위해 6-well culture plate에서 7일간 배양한 소뇌 과립 신경세포에 DMSO (0.1%) control 및 25, 50  $\mu$ M의 PCB를 15분간 처리하였다. 키토산은 1 % acetic acid에 녹인

후 stock 용액을 만들었으며 pH는 5.9로 유지하였다. 이러한 처리 동안 세포 내 독성은 없었다.

### 소뇌과립층신경세포(cerebellar granule cell) 배양

소뇌의 과립 신경세포는 생후 7일된 Sprague Dawley (SD) rat을 사용하여 일차배양 하였으며, 세포 배양액은 Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, pH 7.35, containing 25 mM KCl, 5 mg/L insulin, 5 mg/L transferrin, 50  $\mu$ M  $\gamma$ -aminobutyric acid, 4.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM glucose, 4 mM glutamine, 10 % heat-inactivated fetal bovine serum)을 사용하였다. 소뇌 과립 신경 세포 적출 3시간 전에 50  $\mu$ g/ml의 poly-L-lysine을 처리한 6-well culture plate에 최종 세포농도가  $1 \times 10^6$  cells/ml 되게 한 cell suspension을 3 ml씩 넣었다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고 nonneuronal cell의 성장을 억제하기 위해 일차배양 후 24-48시간 사이에 5  $\mu$ M의 cytosine arabinoside를 처리하였다. 세포는 PCB에 대한 반응이 가장 민감한 시기인 생후 14일 즉, 일차배양 후 7일째에 실험에 사용하였다 [6]. 95% 이상의 전형적인 소뇌 과립 신경세포를 배양하였다.

### Protein kinase C receptor binding assay

12-well culture plate에서 7일간 배양된 세포를 Locke's buffer로 세척한 후 실험대상물질과 2 nM [<sup>3</sup>H] PDBu를 함유하는 Locke's buffer으로 15분간 배양한다. 배양액을 제거한 후 완충액으로 3회 세척한 후 0.1 M NaOH 1 ml로 혼탁시킨 후 0.7 ml을 9 ml의 Ultima gold에 섞어 liquid scintillation counter를 사용하여 [<sup>3</sup>H] PDBu 값을 측정한다 [15].

### Cell fractionation

Cytosol과 membrane fraction사이의 PKC isozyme을 분리하기 위해 환경오염물질에 노출된 뇌 조직 또는 배양세포에 buffer A (20 mM Tris-HCl, 0.25 M sucrose, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, pH 7.5)를 이용하여 용해시킨다. Sonication 후 100,000 $\times$ g에서 1시간 동안 원심분리하여 상층액은 cytosol fraction으로 분리하고 침전물은 buffer B(20 mM Tris-HCl, 1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, pH8.0)로 용해시킨 후 15분간 원심분리하고 상층액을 detergent-soluble membrane fraction으로 분리한다.

## Immunoblot analysis for PKC isoforms

PKC isozyme의 translocation을 측정하기 위하여 cellular fraction 또는 extract에 대해 western blot을 실시하였다. cellular fraction의 sample을 10 % acrylamide gel에서 전기영동한 후 semi-dry electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 nitrocellulose paper에 10 V로 30 분에 걸쳐 blotting하고 blocking buffer로 1시간 동안 반응시킨 후 specific monoclonal antibodies (Santa Cruz, CA, USA)를 적정 비율로 희석한 후 1시간 동안 반응시킨다. 2회 세척 후 secondary IgG로 1시간 동안 반응시키고 ECL system (Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 X-ray film에 최적의 시간 동안 노출시킨 후 현상한다.

## 통계분석

실험결과와 통계학적 처리는 Student's *t*-test를 사용하였으며  $p < 0.05$  수준 이하에서 유의성을 결정하였다.

## 결 과

### PCB 노출에 의한 소뇌신경세포의 PKC 활성 변화

PKC의 전체적인 활성을 분석하기 위해 [<sup>3</sup>H]PDBu를 이용하여 PKC의 전체적인 활성을 분석한 결과 non-ortho PCB에 비해 mono-ortho PCB의 활성이 높게 나타났으며 mono-ortho 구조가 신경세포 내 PKC의 활성을 증가시키는 neuroactive한 화학적 구조임을 확인하였다(Table 1). Non-ortho 구조인 PCB-77과 PCB-81에 비해 mono-ortho 구조인 PCB-105와 PCB-123에서 PKC 활성이 뚜렷이 나타났으며 이러한 변화는 최고의 용량인 50  $\mu$ M에서 나타났다. [<sup>3</sup>H]PDBu를 이용한 정량적인 PKC활성 측정 방법은 PKC가 membrane fraction으로 옮겨가는 정도를 정확하게 측정할 수 있어 PKC활성의 전체를 추정하는데 유용하게 사용되고 있다 [15]. PCB-77의 경우 50  $\mu$ M에서 15 %의 증가를 나타내었으며 또 다른 non-ortho PCB인 PCB-81의 경우도 50  $\mu$ M에서 12 % 정도의 증가만 나타내었다. 즉 다이옥신과 유사구조를 가진 non-ortho PCB는 독성 증가값 (TEF)이 높을지라도 신경세포에서 신호전달기작에 중요한 역할을 하는 PKC의 활성에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로

**Table 1.** [<sup>3</sup>H] PDBu binding following the exposure of substances (% of control)

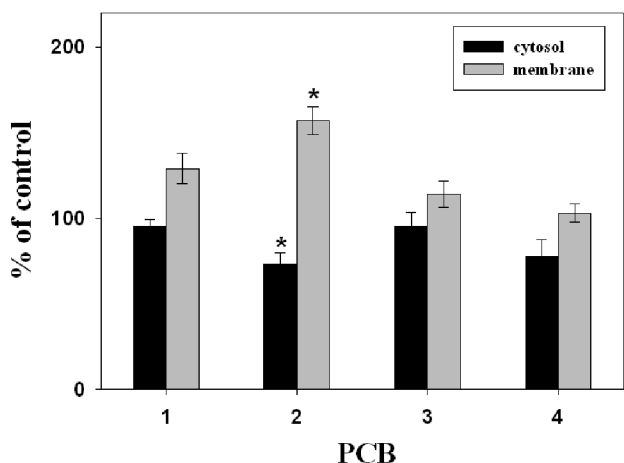
Momo-ortho-substituted PCBs( $\mu$ M)	0.1	1	25	50
2,3,3',4,4'-pentaCB(PCB-105)	92 $\pm$ 3	98 $\pm$ 6	115 $\pm$ 7	175 $\pm$ 8
2',3,4,4',5-pentaCB(PCB-123)	108 $\pm$ 6	125 $\pm$ 7	135 $\pm$ 6	165 $\pm$ 4
Non-ortho-substituted PCBs( $\mu$ M)	0.1	1	25	50
3,3',4,4'-tertaCB(PCB-77)	105 $\pm$ 8	98 $\pm$ 6	108 $\pm$ 7	115 $\pm$ 10
3,4,4',5-tertaCB(PCB-81)	95 $\pm$ 4	107 $\pm$ 5	115 $\pm$ 3	112 $\pm$ 12

나타났다. 반면 다이옥신과 유사구조가 아닌 mono-ortho PCB-105와 PCB-123은 PKC 활성에 높은 값을 나타내었다. PCB-123의 경우 1  $\mu$ M에서 부터 활성의 증가가 나타나기 시작하여 용량-의존적 형태로 활성이 증가하였으며 50  $\mu$ M에서는 1.6배 이상의 활성을 나타내었다. PCB-105의 경우도 50  $\mu$ M까지 용량 의존적인 증가를 나타내었으며 최대 1.7배 이상의 활성을 나타내었다.

### PCB가 PKC isoform에 미치는 영향

[<sup>3</sup>H]PDBu를 이용한 PKC활성 측정은 전체의 활성만을 알 수 있는 단점이 있다. PKC는 11개 이상의 이성질체를 가지고 있으며 이들은 세포 내 분포나 작용면에서 서로 많은 차이를 나타내고 있다 [16]. PKC 전체의 활성으로는 정확한 표적 물질을 알 수 없을 뿐만 아니라 작용기전을 이해하는데도 한계를 가지고 있다. 따라서 신경독성기전을 이해하기 위해서는 각각의 이성질체에 대한 분석이 요구된다.

본 연구에서는 Protein kinase C isoform의 활성을 측정하기 위하여 각각의 항체를 사용하여 cytosolic fraction에서 membrane fraction으로 이동되는 정도를 immunoblot을 이용하여 분석하였다. 이성질체 중 PKC-beta II는 PCB-77과 PCB-81에서 translocation을 보이지 않은 반면 PCB-105와 PCB-123에서는 membrane fraction의 상승을 보였다 (Fig. 1). PKC-epsilon의 경우도 PKC-beta II와 유사한 형태를 나타내었다. PCB-77과 PCB-81은 translocation을 보이지 않은 반면 PCB-105와 PCB-167은 cytosolic fraction의 저하와 membrane fraction의 상승을 보였으며 이는 PKC-epsilon이 PCB에 더욱 민감한 표적물질임을 암시하고 있다 (Fig. 2).

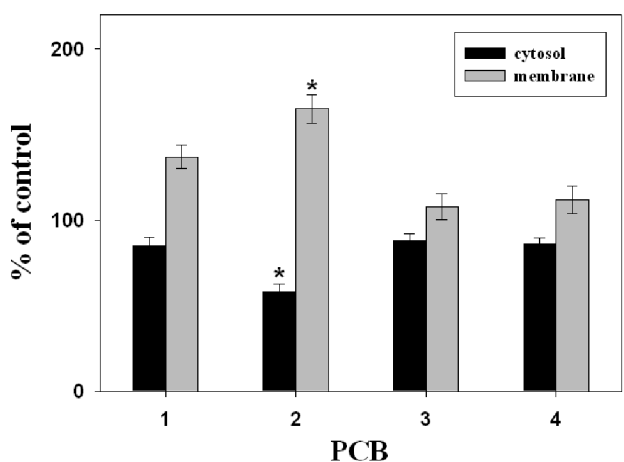


**Fig. 1.** Translocation of PKC-βII following PCB 50 μM exposure. \* Significantly different from control group by Student's *t*-test (*P* < 0.05).

1) PCB-105, 2) PCB-123, 3) PCB-77, 4) PCB-81

**키토산이 PKC활성에 미치는 영향**

새우, 게, 곤충의 껍질, 오징어 뼈 등 갑각류의 chitin을 탈 아세틸화하여 얻은 해양 바이오 물질인 키토산은 간기능 개선, 당뇨병 예방, 혈압 조절, 항암 작용 등의 효과가 알려진 기능성 물질로 널리 상용되고 있다 [5]. 키토산은 항균작용이 높으며 분자량에 따라 흡착력도 높은 것으로 알려져 있다 [4]. 본 연구에서는 키토산이 PCB와 같은 환경오염물질의 유해성을 예방 또는 차단하는데 어떤 역할을 하는지 밝히고자 하였다. 과거 연구에서 키토산의 흡착력을



**Fig. 2.** Translocation of PKC-ε following PCB 50 μM exposure. \* Significantly different from control group by Student's *t*-test (*P* < 0.05).

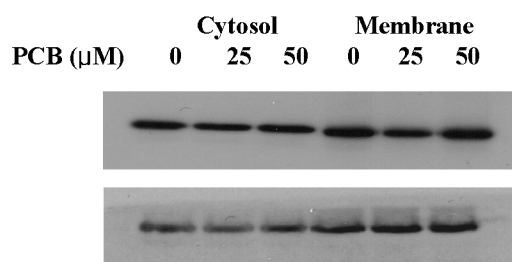
1) PCB-105, 2) PCB-123, 3) PCB-77, 4) PCB-81

이용한 중금속이나 다이옥신 등의 오염물질 해독작용이 보고 된 바 있으나 지금까지 PCB에 대한 신경독성 해소에 대한 연구는 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 다양한 키토산의 분자 용량을 활용하여 PCB의 신경 장애 현상인 PKC의 활성을 억제할 수 있는지를 분석하고자 하였다.

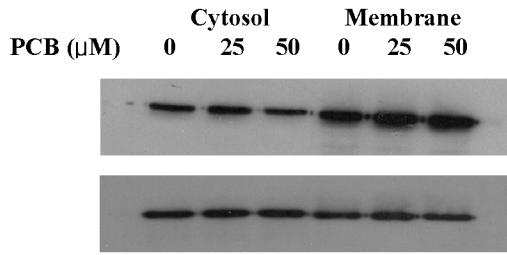
키토산의 분자량이 1000 kDa 이상의 고분자의 경우 PCB의 영향을 억제시키는 작용이 뚜렷함을 알 수 있었다. 특히 강력한 PKC 활성을 보인 PCB-105에 의한 PKC 활성은 1,000 kDa 이상 값에서 확실한 억제작용이 나타났으며 낮은 분자량인 50 kDa에서는 억제효과가 매우 낮은 것으로 나타났다 (Table 2). 특정 PKC isoform에 대한 키토산의 영향을 측정하기 위하여 immunoblot 방법으로 특정 PKC isoform에 대한 translocation을 억제하는지를 분석하였다. PKC-betaII의 경우 PCB-105는 cytosol의 단백질이 감소하는 반면 membrane의 단백질은 증가하여 PCB에 의한 활성을 나타내었다. 그러나 1,000 kDa 이상의 고분자의 키토산 처리 시에는 translocation이 억제되어 키토산이 특정 PKC isoform에 대한 작용을 억제함을 알 수 있다 (Fig. 3). PCB-105에 의해 PKC-epsilon은 용량 의존적으로 translocation 되었다. 그러나 1,000 kDa 이상의 고분자 키토산에 의해 이러한 PKC- epsilon의 translocation은 억제되었다 (Fig. 4).

**Table 2.** [<sup>3</sup>H]PDBu binding following PCB-123 exposure in presence of chitosan

PCB(μM)	chitosan(kDa)			
	1000	500	200	50
0.1	100±5	98±2	105±6	107±2
1	98±6	112±4	106±7	115±3
25	125±2	125±4	121±4	125±7
50	145±3	122±6	140±12	145±6



**Fig. 3.** Western blot analysis of PKC-βII following PCB-123 exposure in presence or absence of 0.1 % chitosan (Mw: 1110 kDa)



**Fig. 4.** Western blot analysis of PKC- $\epsilon$  following PCB-123 exposure in presence or absence of 0.1 % chitosan (Mw: 1110 kDa)

## 고 찰

다이옥신은 산업화과정에서 극미량이 불순물로 발생하는 반면 PCB는 지난 수십 년간 수십만 톤이 생산되어 산업용 제재로 널리 사용되어왔으며 과거에 생산된 산업제품으로부터도 지속적인 환경오염을 일으키는 물질이다 [8]. PCB는 대기, 수질, 음식물 오염뿐만 아니라 이로 인한 인체 내 축적이 일어나 모유를 통한 어린 영아 집단의 노출이 심각한 수준이다 [2]. 두뇌의 갑상선 호르몬 감소, 도파민 및 세로토닌의 저하, 기억력 및 IQ감소, 학습력 저하, 운동신경 장애 등은 PCB가 성장기 두뇌에 노출되었을 때 나타나는 대표적인 신경독성들이다 [8,10,12]. 그러나 지금까지 태어나 영아집단에 대한 신경독성 기전은 잘 알려져 있지 않았다.

본 연구는 생 후 7일 된 SD rat의 소뇌로부터 과립층 세포를 확보하여 성장기에 취약한 신경독성 물질을 선별 할 수 있는 근거를 확보하였다. 다이옥신과 유사한 구조 및 작용을 가지고 있는 non-ortho PCB에 비해 Ah 수용체와 친화력이 없거나 매우 낮은 mono-ortho PCB는 위해성 평가에서 지금까지 제외되어 왔으며 기존의 Toxic equivalent factor (TEF) 개념으로 환산할 때 non-ortho 구조인 PCB-77은 mono-ortho PCB-123의 30배나 되는 독성 물질이지만 [11], mono-ortho PCB가 성장기 소뇌 세포에서 non-ortho PCB에 비해 PKC 활성화에 더 강력한 영향을 주는 것으로 확인되어 뇌 세포에서 중요한 신경독성물질임이 확인되었다. 따라서 본 연구 결과는 앞으로 PCB의 독성 평가 뿐 아니라 지금까지 활용되어오고 있는 TEF의 새로운 개념의 설정 필요성을 강조하여 앞으로 새로운 차원의 위해성 평가모델의 확립을 가져오게 할 것으로 사료된다. 또한 본 연구 결과는

PCB의 구조-활성 관계를 확보하여 식품 또는 환경 중에 존재하는 신경 내분비계 장애 물질을 효율적으로 선별하고 위해성 평가의 효율을 향상시키는데 기여 할 것으로 전망된다. 키토산의 고분자 물질은 전체 PKC의 활성화 뿐 만아니라 특정한 PKC isoform에 대한 활성화도 억제하는 것으로 나타나 키토산이 환경오염물질에 의한 신경세포의 내분비계 장애현상에 어떤 형태로든 관여하고 있음을 암시하고 있어 앞으로 해양바이오 소재에 대한 기능성 및 신소재로서의 발전 가능성을 암시하는 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

## 요 약

산업의 발달과 함께 환경오염에 대한 국민적인 관심도는 날로 증가하고 있다. PCB는 우리 주변에 널리 퍼져 있고 먹이사슬을 통해 체내에도 축적되어 인체의 위해성이 우려되는 대표적인 환경오염물질이다. PCB의 노출은 성장기의 두뇌에서 가장 큰 신경독성을 나타내며 영아 및 유아는 상대적으로 높게 노출되어 위험집단으로 분류된다. 본 연구는 PCB의 신경독성에 구조-활성관계가 미치는 영향을 분석하고 PCB에 의한 독성을 최소화 할 수 있는 방안으로서 해양활성물질의 사용가능성을 이해하고자 하였다. PCB노출에 따른 신경세포의 신호전달 체계변화를 분석하기 위하여 Protein Kinase C (PKC)의 변화를 측정하였다. PKC의 전체적인 활성을 [ $^3$ H]PDBu로 분석한 결과 ortho-position(PCB-105, -123)을 가지고 있는 PCB가 non-ortho (PCB-77, -81) 구조보다 신경에 미치는 영향은 더 높았다. Western blot 결과 PKC isoform 중에는 PKC-betaII 및 epsilon의 경우 ortho-position PCB에서 더 높은 활성을 보였다. 이러한 PKC의 변화는 성장기 신경세포에서 신호전달기작의 변화에 많은 영향을 미치므로 이를 예방하거나 차단 할 수 있는 물질을 발견하고자 다양한 키토산을 처리하였다. 그 결과 1백만 달톤 이상의 고분자 키토산의 경우 PCB에 의한 신호전달 기작 변화를 억제할 수 있음을 보였다. 본 연구는 환경오염 등에 의한 독성예방에 키토산의 활용가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

본 연구는 국립수산물학원의 연구사업에 의해 지

원되었음.

## 참 고 문 헌

1. Abraham, K., Papke, O. and Wahn, H. 1999. Changes of Biological parameter in breast-fed infants due to PCDD/PCDF/PCB background exposure. *Organohalogen Comp.* **44**, 59-61.
2. Eriksson, P. 1997. Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonates. *Neurotoxicology*. **18**, 719-726.
3. Erickson, P. and Fredriksson, A. 1996. Developmental neurotoxicity of four *ortho*-substituted polychlorinated biphenyls in the neonatal mouse. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1**, 155-165.
4. Kitamura, K. and Morita, M. 2005. Effect of chlorophyllin-chitosan on excretion of dioxins in a healthy man. *Env. Sci. Technol.* **39**, 1084-1091.
5. Kimura, Y. and Okuda, H. 1999. Prevention by chitosan of myelotoxicity, gastrointestinal toxicity and immunocompetent organic toxicity induced by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**, 765-774.
6. Kodavanti, P.R.S. and Tilson, H.A. 1997. Structure-activity relationship of potentially neurotoxic PCB congeners in the rats. *Neurotoxicol.* **18**, 425-442.
7. Kodavanti, P.R.S., Shin, D. and Tilson, H.A. 1993. Comparative effects of two PCB congeners on ca homeostasis in rat cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **123**, 97-106.
8. Rahaman, S.O., Ghosh, S. and Sarkar, P.K. 2001. Hypothyroidism in the developing brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. *Neurosci Res.* **40**, 273-279.
9. Safe, S. 1994. PCBs; Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 87-149.
10. Tilson, H.A. and Kodavanti, P.R.S. 1997. Neurochemical effects of PCBs; an overview and identification of research needs. *Neurotoxicol.* **18**, 727-744.
11. Van den Berg, M. and Birnbaum, L. 1998. Toxic equivalency factors for PCB, PCDD, PCDF for humans and wildlife. *Env. Health. Persp.* **106**, 775-792.
12. Vreugdenhil, H., Lanting, S. and Pantadin, S. 1999. Prenatal and postnatal PCB and dioxin exposure and cognitive ability in Dutch cohort. *Organohalogen comp.* **44**, 421-425.
13. Weisgla-Kuperus, N. 1998. Neurodevelopmental, immunological and endocrinological indices of prenatal human exposure to PCBs and Dioxins. *Chemosphere.* **37**, 9-12.
14. WHO. 1996. Levels of PCBs, PCDD, and PCDF in breast milk; Environmental Health Series No.3, WHO regional office, Copenhagen.
15. Yang, J.H. and Kodavanti, P.R.S. 2001. Possible molecular targets of halogenated aromatic hydrocarbons in neuronal cells; structure-activity relationship. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1372-1377.
16. Yang, J.H., Der-Yellin, E.C. and Kodavanti, P.R.S. 2003. Alteration in brain protein kinase C isoforms following developmental exposure to PCB mixture. *Molecular Brain Res.* **109**, 176-190.