

<Review paper>

## 알킬페놀류 화합물의 양서류 내분비계장애 효과

안혜선 · 박찬진 · 안효민 · 계명찬\*

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

## Endocrine Disruption by Alkylphenols in Amphibians

Hae Sun Ahn, Chan Jin Park, Hyo Min Ahn and Myung Chan Gye\*

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**Abstract – Amphibian population declines globally. Aquatic contamination by organic pollutants including endocrine disrupters has been suspected to be one of the reasons for the decline of amphibians which has obligate aquatic life style during larval period. Amphibians have been widely accepted as animal model for the study of endocrine disruption in aquatic ecosystem at molecular as well as individual levels. There is an increasing need for toxicological data in amphibians at multiple endpoints for management of contamination and development of safety guideline for important EDs in aquatic media. Alkylphenols have been widely used in agricultural, industrial, and housekeeping activities, contaminating the aquatic media and evoking endocrine disruption in aquatic animals. In this review, we summarized data concerning the endocrine disruption by alkylphenol organic pollutants on amphibians according to route, concentration, terms, and developmental stage of exposure together with mechanism of endocrine disruption.**

**Key words : endocrine disruption, alkylphenols, amphibia**

### 서 론

습지 생태계에서 중요한 생태적 지위를 차지하는 양서류는 육상생활을 최초로 시작한 척추동물로 진화와 발생학 연구에 중요한 재료를 제공한다. 수정 후 변태에 이르는 생활사를 수환경에서 진행하는 양서류는 수환경 내의 오염물질에 대해 1차적으로 노출되므로 어류와 마찬가지로 매우 높은 노출 감수성이 높다. 또한 먹이사슬의 중간소비자로 수환경 내의 오염물질의 먹이순환에 따른 독성효과의 생물농축 효과가 나타날 수 있는 생태적 특징을 갖는다. 따라서 수환경오염에 매우 민감할 뿐 아니라 수

생태계의 건강도를 대변하는 지표로서 유용한 까닭에 발생 중인 배아 또는 유생을 이용한 독성평가 및 이를 활용한 수환경 기준을 설정노력이 다양한 양서류에서 활발하다 (Plotner and Gunther 1987; Boyer and Grue 1995; Lahr 1997; Loeffler *et al.* 2001; Bögi *et al.* 2003; Kloas and Lutz 2006). 최근 담수환경을 포함한 육상 생태계에서 양서류의 세계적인 감소 추세가 두드러진다. 내분비계장애 물질 (endocrine disruptors, EDs)은 이러한 양서류의 감소의 원인으로 의심되고 있다 (Blaustein and Wake 1995; Carey and Bryant 1995; Houlihan *et al.* 2000). EDs는 생체호르몬의 작용을 교란하여 발생, 번식, 내분비, 면역, 신경계 등에서 다양한 독성효과를 발휘한다. 따라서 환경잔류성이 높은 EDs의 위해성을 정확히 평가하고 이들 물질의 생산 및 사용에 대한 허용기준치 및 규제 방안을

\* Corresponding author: Myung Chan Gye, Tel. 02-2220-0958, Fax. 02-2298-9646, E-mail. mcgye@hanyang.ac.kr

설정하는 것은 양서류가 서식하는 육수환경의 보존과 관리에 매우 중요하다. EDs의 환경 잔류량은 수질, 저질, 및 생체 등의 매디아로부터 정량적으로 평가할 수 있으나 야생의 생태계에서 양서류 종별로 특정 EDs에 대한 감수성은 규명되지 않고 있으므로 궁극적으로는 한국 수생태계에서 양서류의 보존과 생태적 건강성 관리를 위해서는 한국산 양서류에 대한 EDs의 독성효과에 대한 자료의 생성과 이에 기반한 잔류량, 생산 및 사용, 배출량규제가 매우 중요한 시점에 이르고 있다.

개체발생과정에서 일어나는 유전자발현은 신체 내외부 환경요인의 변동에 따라 가변적으로 조절되며, 동물의 생존과 진화의 중요한 메커니즘이다. 특정 발생과정에서 정상적인 유전자발현의 변형은 발생프로그램을 교란시켜 사망, 기형, 암 등을 초래할 뿐 아니라 번식, 면역, 신경 등 정상적인 생체기능의 변화를 유발할 수 있다. 개체의 특정 조직에서 유전자발현의 변화는 다양한 환경오염물질에 노출되었음을 판단하는 특별한 생물학적표지자(biomarker)로 활용될 수 있다(김과 계 2003). 생체 내 호르몬들은 미량으로 수용체를 발현하는 표적세포에서 활성을 나타내며, 특히 유전자발현에 심대한 영향을 미친다. 양서류 배아 및 유생에서 발생 중인 기관, 성체의 생식소 및 간 등에서 에스트로젠(estrogen)과 갑상선호르몬(thyroid hormone; TH)은 다양한 유전자발현을 촉발하고, 성적이형의 형성 및 유생변태를 주도하는 주요한 호르몬이다. 수환경 내에서 다양한 환경오염물질들은 수생동물에서 에스트로젠 또는 갑상선호르몬의 기능을 교란하며, 특히 양서류의 배아와 유생에서 다양한 기능적 지표들 변화시킨다. 따라서 이들 기능적 지표들을 바이오마커로 활용하여 개별 화학물질 및 환경매체의 생물학적 위해성을 평가할 수 있다.

알킬페놀(alkylphenols)은 비이온성 계면활성제로 사용되는 알킬페놀에톡실레이트(APEO)의 분해산물로서 분자적으로 페놀의 벤젠고리에 알킬그룹이 결합되어 있는 비교적 안정한 화합물이다. APEO 자체는 독성물질로 분류되어 있지 않지만, 그 대사생성 물질인 단사슬 APEO, 알킬페놀 및 카르복실 유도체 등은 폐수 또는 음용수의 염소처리 공정에서 mutagenic ring halogenated derivative를 생성한다. 알킬페놀은 공업적으로 플라스틱 생산원료로 사용되는데, 실체는 더 많은 양이 계면활성제의 원료인 APEO를 생산하기 위한 원료로 사용된다. 이러한 APEO는 자연계로 방출되면 에톡시기(ethoxy group)가 1차적 생물분해에 의해 쉽게 떨어져나가 알킬페놀류를 생성하며, 알킬페놀 생성과정에서 다양한 이성질체가 만들어지게 된다. 알킬페놀류를 비롯한 다양한 화학물질 및 그 대사유도체들은 에스트로젠 또는 갑상선호르몬과

유사하거나 길항하는 작용을 한다. 본 소고에서는 국내외에서 진행되어온 양서류의 배아, 유생 등을 이용한 알킬페놀류 화합물의 독성과 내분비계교란효과에 대한 자료를 정리하였다.

### 양서류에서 알킬페놀류 내분비계장애물질의 에스트로젠성 효과

수환경은 각종 산업활동과 일상생활에서 사용된 에스트로젠 활성을 갖는 많은 화합물들이 유입되어 장기간 지속되는 특성을 갖는다. 따라서 이들 내분비교란 활성을 갖는 화학물질들은 장기간 노출을 통해 수생동물의 발달과 내분비계기능에 독성효과를 발휘할 수 있다. 에스트로젠 활성을 갖는 환경오염물질들은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor, ER)와 상호작용하여 에스트로젠과 유사한 효과를 내거나 억제함으로써 내분비계 기능을 교란하고 정상적인 발생에 장애를 초래한다(Colborn *et al.* 1992; McLachlan 2001). 에스트로젠성 내분비계장애물질(xenoestrogen)은 개체의 성결정 및 생식소의 분화, 정자형성, 번식행동, 발생을 변형시킨다(Presutti *et al.* 1994; Kloas *et al.* 1999; Lutz and Kloas 1999; Mann and Bidwell 2000, 2001; Mosconi *et al.* 2002; Bevan *et al.* 2003).

*In vitro* 및 *in vivo*에서 다양한 검색방법을 통하여 에스트로젠성 EDs에 의한 내분비계 변화를 추적할 수 있는 기술들이 개발되었다. Xenoestrogen에 노출된 수컷에서는 암컷에서 주로 발현되는 유전자들이 발현되므로, 이들 유전자는 xenoestrogen 노출의 biomarker로 이용된다(계와한 2000). 양서류 배아, 유생 및 성체에 알킬페놀의 에스트로젠 활성에 대한 *in vivo* 연구는 주로 양서류 성체 수컷의 간조직 내 난황전구단백질(vitellogenin, Vg) mRNA 또는 혈중 Vg 단백질량을 기준으로 분석한 것들이다. Vg은 난황기 암컷의 간에서 에스트로젠의 자극에 의해 생산되며, 혈액으로 분비되어 난소에 도달한 후 난자 안으로 수송되어 난황단백질로 전환되어 장차 발행 중인 배아의 에너지원으로 이용된다(Mommsen and Walsh 1988). 따라서 Vg 발현을 biomarker로 이용하여 수환경 내 xenoestrogen의 오염을 검사할 수 있다. 양서류에서는 아프리카발톱개구리(*Xenopus laevis*), 움개구리(*Rana rugosa*), 개구리(*Rana temporaria*), 유럽개구리(*Rana esculenta*), 황소개구리(*Rana catesbeiana*), 표범개구리(*Rana pipiens*), 영원류(*Triturus carnifex*)를 대상으로 천연 에스트로젠 및 다양한 xenoestrogen에 의한 Vg 유도 활성이 조사되었다(Herbener *et al.* 1983; Herbener 1989; Palmer and Palmer 1995; Mosconi *et al.* 2002; Bögi *et al.* 2003; van Wyk

et al. 2003). 배양된 *X. laevis*의 간세포 내 Vg 발현변화를 통해 에스트로젠성을 평가한 *in vitro* 실험에서 0.1 nM ~ 10  $\mu$ M 수준의 17 $\beta$ -estradiol (E2), 4-nonylphenol (NP), bisphenol-A (BPA)는 에스트로젠성을 갖는 것으로 나타났다. 이 결과는 *in vivo*에서 유생시기에 E2와 여성호르몬성 내분비장애물질 노출에 따른 성적분화 장애효과와도 일치한다 (Kloas et al. 1999). 배양된 *X. laevis*의 간세포를 이용한 다른 연구에서는 NP, BPA, 4-tert-octylphenol (OP)는 E2에 비해 각각 0.005%, 0.008%, 0.002%의 Vg 발현 유발 효과를 갖는 것으로 보고되었다 (Mitsui et al. 2007). 또한, 참개구리 (*Rana nigromaculata*) 유생에서 BSA와 NP는 15~60일간 2  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 20  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 200  $\mu$ g L<sup>-1</sup> 수준으로 노출 시 Vg 단백질의 유도에 따른 alkaline phosphatase 활성을 증가시키는 것으로 보고되었고, 같은 농도에서 NP가 BSA보다 효과적으로 유도하는 것으로 나타났다 (Yang et al. 2005). 또한, 수조 내에 NP를 처리하고 *R. esculenta* 수컷을 3주간 노출시켰을 때 혈중 Vg 농도가 증가하였다 (Mosconi et al. 2002). 그러나 수컷 *X. laevis*의 간에서 17 $\beta$ -estradiol은 Vg의 생성과 분비를 증가시켰지만, OP와 NP는 *in vivo*에서 100  $\mu$ g g<sup>-1</sup> week<sup>-1</sup>의 수준으로 28일 동안 노출 시 Vg 유도효과를 갖지 않았다 (van Wyk et al. 2003). 이와 유사하게 수조 내에 14일간 NP를 처리한 *X. laevis* 수컷에서 Vg 발현변화가 없다는 보고가 있다 (Matsumura et al. 2005). 이러한 결과의 차이는 OP와 NP의 미약한 에스트로젠 활성에 기인하거나 실험법의 민감도의 문제로 사료된다. 국내에서는 외래종인 황소개구리를 대상으로 내분비계장애물질 오염우려지역에서 수컷의 혈중 Vg 단백질의 증가가 보고되었다 (환경부 2001; 최 등 2002). 최근 한국산 무당개구리 (*Bombina orientalis*)에서 Vg mRNA를 바이오마커로 활용한 에스트로젠성 내분비계장애물질의 노출평가방법이 개발되었다 (계 등 2004). 이 시험법에 따르면 NP와 BPA는 *B. orientalis* 수컷 성체의 간에서 Vg mRNA를 유도하였다 (Gye and Kim 2005; Kang et al. 2006). 또한, NP와 BPA는 *B. orientalis* 암컷 난소에서 aromatase activity를 감소시키는 것으로 밝혀졌으며 (Lee et al. 2010), 이외의 한국산 양서류를 대상으로 알킬페놀류가 갖는 에스트로젠 활성은 조사되지 않았다.

한편 이러한 개별적 바이오마커 유전자의 발현을 조사하는 방법 이외에도 estrogen responsive element (ERE)/reporter gene 과발현 세포주를 이용해 유전자프로모터 활성을 측정하거나, ER 결합친화도를 측정하는 방법으로 특정화학물질의 에스트로젠성을 조사할 수 있다. ERE/luciferase 과발현 유방암 세포주를 이용해 luciferase 활성을 측정하는 *in vitro* 실험결과 BPA, NP, OP 등 alkyl-

phenol류는 17 $\beta$ -estradiol에 비해 1/2,500 ~ 1/5,000 정도의 에스트로젠 활성을 갖는 것으로 알려졌다 (Wu et al. 2008). 양서류에서는 *Xenopus*의 에스트로젠 수용체를 과발현시켜 방사성동위원소로 표지한 에스트로젠과 경쟁적 결합력을 측정한 결과에서 BPA, NP, OP 순으로 17 $\beta$ -estradiol에 비해 IC50 값 대비 1/1,000 ~ 1/10,000 정도의 에스트로젠수용체 결합활성을 갖는다 (Lutz and Kloas 1999). 국내 및 국외 양서류에서 보고된 알킬페놀류의 에스트로젠활성 연구결과들을 Table 1에 정리하였다.

### 양서류에서 알킬페놀류 내분비계장애물질의 (항)안드로젠성 효과

양서류를 대상으로 알킬페놀류 화합물의 항안드로젠성을 조사한 연구는 지극히 제한적이다. 컴퓨터를 이용한 가상적 결합모델에서 NP는 *X. laevis*와 *R. catesbeiana* 남성호르몬수용체 (androgen receptor, AR)의 호르몬결합부위 (ligand binding domain, LBD)에 높은 친화력을 갖는 것으로 나왔으며, 그 친화력은 생체 내 남성호르몬인 testosterone보다 높은 것으로 나타났다. BPA 또한 AR의 LBD에 친화력을 갖는다 (Wu et al. 2010). 따라서 이들 알킬페놀이 양서류에서 남성호르몬 유사 또는 길항작용을 할 가능성이 제시된다. *R. nigromaculata* 유생을 2  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 20  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 200  $\mu$ g L<sup>-1</sup> 수준의 BPA, NP, BPA+NP에 30일간 노출했을 때 낮은 농도에서 가장 높은 수준의 testosterone이 생성되는 것으로 나타났다. 노출기간에 따라서는 15일까지는 검출한계 이하였으나 30일까지 증가하다가 그 이후 다시 감소하였다 (Yang et al. 2005). 또한, *R. esculenta* 수컷을 수조 내에서 BPA에 3주간 노출시켰을 때 혈중 남성호르몬 농도가 증가하였다 (Mosconi et al. 2002). *X. laevis* 수컷 개체에 NP와 OP를 복각주사하였을 때 NP는 breeding gland 및 혈중 testosterone 변화에 영향을 미치지 못하였으며, OP만이 breeding gland의 크기를 감소시켰다 (van Wyk et al. 2003). 남성호르몬 생성은 시상하부-뇌하수체-생식소 축 (hypothalamus-pituitary-gonad axis; HPG axis)에서 작동하는 뇌하수체-생식소 축을 통해 조절되며, 유생의 생식소 또한 생식기관 분화에 필요한 남성호르몬 생성능력을 갖는다. 따라서 이들 알킬페놀류는 항안드로젠활성을 통해 뇌하수체-생식소 축을 교란함으로써 남성호르몬 생성과정을 교란하는 것으로 추정된다. 따라서 수중에서 생활하는 유생시기에 안드로젠수용체 결합활성을 갖는 알킬페놀류의 노출은 양서류 유생의 정상적인 생식소 발달을 저해할 수 있다. 이러한 내분비계교란 작용은 양서류의 성적이형 (sexual dimorphism)을 교

**Table 1.** Eestrogenic or (anti)estrogenic effects of alkylphenols on amphibians

Chemicals	Species	Exposure (Conc./Route/Stage/Duration)	Effect	References
Bisphenol A	<i>X. laevis</i>	0.1 $\mu$ M/Liver cell culture/36 hrs	Stimulating Vg expression (NP > BPA)	Kloas <i>et al.</i> 1999
		0.1 $\mu$ M/Tank/ Stage 38 ~ 40/12 weeks	Increasing percentages of female phenotypes	
	<i>R. nigromaculata</i>	1 nM ~ 1 mM/Liver cell cytosol/ 24 hrs incubation	Affinity ranking for estrogen receptor binding compared to E2 was BPA > NP > OP	Lutz and Kloas 1999
		Primary cultured hepatocytes	0.008% of E2 potency in Vg induction by ELISA	Mitsui <i>et al.</i> 2007
		2, 20, 200 $\mu$ g L <sup>-1</sup> /Tank/Tadpole/30 days	Increase in alkaline phosphatase in tadpoles	Yang <i>et al.</i> 2005
<i>B. orientalis</i>	1 mg kg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> /IP inj./Adult male/48 hrs	Hepatic Vg mRNA induction	Gye and Kim 2005	
	10 mg kg <sup>-1</sup> adult/IP inj./Adult female/48 hrs	Reduction of aromatase activity in ovary	Lee <i>et al.</i> 2010	
<i>H. japonica</i>	120 $\mu$ g head <sup>-1</sup> /IP inj./Adult female/24 hrs	Inhibition abdominal water absorption in female	Kohno <i>et al.</i> 2004	
Nonylphenol	<i>X. laevis</i>	0.01 $\mu$ M/Liver cell culture/36 hrs	Stimulation of Vg mRNA expression	Kloas <i>et al.</i> 1999
		0.1 $\mu$ M/Tank/Tadpole/12 weeks	Caused higher number of female phenotypes	
		100 $\mu$ g g <sup>-1</sup> week <sup>-1</sup> /IP inj./Adult male/4 weeks	No significant induction of Vg	van Wky <i>et al.</i> 2003
		10 ~ 100 $\mu$ g L <sup>-1</sup> /Tank/Adult male/14 days	No change in plasma Vg synthesis	Matsumura <i>et al.</i> 2005
	<i>R. nigromaculata</i>	Primary cultured hepatocytes	0.005% of E2 potency in Vg induction by ELISA	Mitsui <i>et al.</i> 2007
		2, 20, 200 $\mu$ g L <sup>-1</sup> /Tank/Tadpole/30 days	Increase in alkaline phosphatase	Yang <i>et al.</i> 2005
	<i>R. esculenta</i>	0.1 ~ 100 nM/Tank/Adult male/3 weeks	Plasma Vg induction	Mosconi <i>et al.</i> 2002
	<i>B. orientalis</i>	0.1 mg kg <sup>-1</sup> /IP inj./Adult male/48 hrs	Induction of hepatic Vg mRNA	Kang <i>et al.</i> 2006
10 mg kg <sup>-1</sup> adult/IP inj./Adult female/48 hrs		Reduced aromatase activity in ovary	Lee <i>et al.</i> 2010	
Octylphenol	<i>X. laevis</i>	0.01 $\mu$ M/Tank/Tadpole/12 weeks	Showed feminization	Kloas <i>et al.</i> 1999
		100 $\mu$ g g <sup>-1</sup> week <sup>-1</sup> /IP inj./Adult male/4 weeks	No significant induction of Vg	van Wky <i>et al.</i> 2003
		Primary cultured hepatocytes	0.002% of E2 potency in Vg induction by ELISA	Mitsui <i>et al.</i> 2007
	<i>R. catesbeiana</i>	1 nM/Tank/Stage 32 ~ 36/24 hrs	Accelerate sexual differentiation Defect in sexual dimorphic expression of SF1 No effect on gonadal differentiation	Mayer <i>et al.</i> 2003

**Table 2.** Androgenic or (anti)androgenic effects of alkylphenols on amphibians

Chemicals	Species	Exposure (Conc./Route/Stage/Duration)	Effect	References
Bisphenol A	<i>X. laevis</i>	Computational study	Binding energy for ligand binding domain of AR was 0.97 fold of testosterone	Wu <i>et al.</i> 2010
		<i>R. esculenta</i>	0.1 nM/Tank/Adult male/3 weeks	Increased plasma androgen levels
	<i>R. catesbeiana</i>	Computational study	Binding energy to ligand binding domain of AR was 0.8 fold of testosterone	Wu <i>et al.</i> 2010
		<i>R. nigromaculata</i>	2 $\mu$ g L <sup>-1</sup> /Tank/Tadpole/30 days	No effect on plasma testosterone increased serum testosterone level in combination of 2 $\mu$ g L <sup>-1</sup> NP
Nonylphenol	<i>X. laevis</i>	100 $\mu$ g g <sup>-1</sup> week <sup>-1</sup> /IP inj./Adult male/4 weeks	No effect on breeding glands and plasma testosterone	van Wyk <i>et al.</i> 2003
		Computational study	Binding energy to ligand binding domain of AR was 1.24 fold of testosterone	Wu <i>et al.</i> 2010
	<i>R. catesbeiana</i>	Computational study	Binding energy to ligand binding domain of AR was 1.14 fold of testosterone	Wu <i>et al.</i> 2010
		<i>R. nigromaculata</i>	2 $\mu$ g L <sup>-1</sup> /Tank/Tadpole/30 days	Increased serum testosterone level
Octylphenol	<i>X. laevis</i>	100 $\mu$ g g <sup>-1</sup> week <sup>-1</sup> /IP inj./Adult male/4 weeks	Decrease breeding glands no effect on plasma testosterone	van Wyk <i>et al.</i> 2003

란하고 정상적인 생식소의 분화와 성체에서의 기능에 교란을 초래함으로써 양서류 감소의 원인으로 추측할 수 있다. 국내 및 국외 양서류에서 보고된 알킬페놀류의 (항)안드로젠 활성 연구결과들을 Table 2에 정리하였다.

### 알킬페놀류 내분비계장애물질에 의한 양서류 생식소 발달 및 성적이형 장애

ED는 양서류 유생의 성분화에서 명백한 영향이 관찰

된다. 항여성호르몬성 ED는 성비를 변화시키지는 않지만 일반적인 생식선 발생을 저해하는 반면, 에스트로젠성 및 항남성호르몬성 ED는 유전적 수컷에서 암컷 생식선이 유도되는 성전환을 야기한다(Kloas *et al.* 1999; Bögi *et al.* 2002; Kloas 2002). 이와 유사하게 성분화 발달 동안 E2나 dibutylphthalate에 노출된 수컷 *R. rugosa*에서 부분적 또는 완전한 난소발달이 약물로 유도된다(Ohtani *et al.* 2000). 또한 유생발달시기에 제조제에 노출된 *R. pipiens*와 *X. laevis*에서 자웅동체현상, 발달 지연과 같은 생식선 이상이 보고되었다(Hayes *et al.* 2002a).

전사인자 SF-1은 적절한 스테로이드호르몬 생성에 필요하며 성적발달에 영향을 미치는데(Ikeda *et al.* 1994), SF-1 발현 장애는 성분화 패턴을 변화시킨다. 성적분화시기의 *R. catesbeiana* 유생을 OP에 노출시킨 경우 1nM의 낮은 농도에서 성적분화의 개시를 가속화했으며 SF-1의 성적 이형 발현에 장애를 초래했으나 최종적인 생식선분화에는 영향이 없었다(Mayer *et al.* 2003). 반면 *X. laevis* 유생에서 OP는 성비를 암컷으로 기울게 하였다(Kloas *et al.* 1999). 이와 유사하게 ammonium perchlorate(Goleman *et al.* 2002)에 변태과정 동안 노출된 *X. laevis*에서도 암컷이 우세한 성비변화가 관찰되었으며, E2, 4-nonylphenol, bisphenol A, butylhydroxyanisol(Kloas *et al.* 1999; Goleman *et al.* 2002)에 노출된 개체들에게서도 관찰된다. 아트라진에 노출된 개구리에서 간성개체 비율이 증가하며(Hayes *et al.* 2002b, 2003), polychlorinated dibenzofurans와 polychlorinated biphenyls(Reeder *et al.* 1998) 오염지역의 귀뚜라미개구리(*Acris crepitans*) 개체군의 성비변화와 간성개체의 증가가 보고되었다. 양서류에서 E2는 고환을 난소조직으로 변환시킨다(Chang and Witschi 1956). NP는 *in vivo*와 *in vitro*에서 에스트로젠 수용체와 결합하여 에스트로젠 활성을 나타내는데 발생 중의 수컷 *X. laevis*에서 성전환이 유도됨이 보고되었다(Kloas *et al.* 1999; Knudsen and Pottinger 1999). BPA도 수컷 *X. laevis*의 여성화를 유도한다(Iwamuro *et al.* 2003).

### 양서류에서 알킬페놀류 내분비계장애물질의 항갑상선호르몬 효과

에스트로젠과 항안드로젠성 화합물의 내분비장애 효과는 많이 보고된 반면 TH의 작용을 저해하는 물질과 그 작용기작은 아직 이해가 부족한 편이다. 양서류에서 TH의 증가는 초기 발생단계에서 유생의 크기를 감소시키며 변태를 촉진하는 반면 TH의 감소는 변태과정을 억제하거나 저지하므로 갑상선계의 기능은 양서류 생존에

매우 중요하다. 양서류의 변태과정 및 그 정도는 꼬리길이 감소 및 뒷다리의 성장 정도로서 수치화가 가능하기 때문에 알킬페놀류의 항갑상선계 효과는 양서류 유생의 변태활성 측정으로서 분석이 가능하며, 이를 이용한 시험법이 최근 OECD test guideline 231(TG231)로서 공개된 바 있다(OECD 2009). 알킬페놀류의 항갑상선호르몬 효과기작으로는 1) 갑상선호르몬 수송에 관여하는 transthyretin에 대한 경쟁적 결합, 2) 표적세포에서 TH와 TR 결합의 경쟁적 억제, 3) 시상하부-뇌하수체-갑상선 축(hypothalamus-pituitary-thyroid axis; HPT axis)에 대한 복합적 교란 등이 효과기작으로 제시되고 있다(Ishihara *et al.* 2003; Yamauchi *et al.* 2003; Kaneko *et al.* 2008). 따라서 알킬페놀류의 갑상선호르몬계 교란효과 분석을 위해서 먼저 갑상선호르몬 신호전달 체계 중 분석대상 메커니즘 각각에 적합한 시험법 개발 및 활용에 대한 연구가 이루어지고 있다. OECD TG 231의 경우 무미양서류 유생에 시험물질을 직접 처리함으로써 개체 내 총체적인 갑상선계 교란효과를 분석하는 시험법이다(OECD 2009). 최근 변태를 조절하는 갑상선호르몬 작용의 직접적인 교란효과 분석을 위해 무미양서류 유생의 꼬리조직을 분리하여 배양하면서 시험하는 C-fin analysis가 소개된 바 있다(Hinther *et al.* 2010). 또한, 인위적인 변태 유발을 위한 3,5,3'-triiodothyronine(T3), thyroxine(T4) 처리 유무에 따라 갑상선의 호르몬 분비 기능 분석이 가능하며, 갑상선에 대한 조직화학적 분석을 통해 갑상선 호르몬 합성 및 저장 기능에 대한 분석이 가능하다(Christensen *et al.* 2005; Opitz *et al.* 2006). 최근 갑상선의 기능 및 변태와 관련된 유전자들이 밝혀지고 있으며, 이를 이용한 유전자발현 수준의 내분비계교란효과 분석이 활발해질 것으로 예상된다(Opitz *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006; Opitz and Kloas 2010). 최근 *X. laevis*를 이용한 연구에서 BPA가 변태시기 개체의 장(intestine) 리모델링에 관여하는 T3 반응 유전자들에 대해 길항작용을 한다는 것이 밝혀진 바 있다(Heimeier *et al.* 2009). Tetrabromobisphenol A(TBBPA)는 BPA의 브롬화유도체로 전형적인 에스트로젠활성을 나타내는데 환경에 쉽게 축적되지 않으며 독성이 높지 않아 비교적 안전한 연소지연제로 고려되어 왔다(Helleday *et al.* 1999). 그러나 TBBPA와 그 dimethoxylated 유도체가 일본 오사카의 하천침전물에서 발견되었으며(Watanabe *et al.* 1983), 스웨덴에서는 플라스틱공장 폐수침전물에서 검출되었다(Sellström and Jansson 1995). 따라서 자유형태(unbound form)의 TBBPA의 환경유출에 따른 생물축적 가능성이 제시되었다(Herrmann *et al.* 2003). *R. rugosa* 유생에서 갑상선호르몬으로 유도되는 꼬리단축에 대한 TBBPA의 효과가 조사되었다. 50

**Table 3.** Thyroid hormone antagonizing effect of alkylphenols on amphibians

Chemicals	Species	Exposure (Conc./Route/Stage/Duration)	Effect	References
Bisphenol A	<i>X. laevis</i>	10 ~ 100 $\mu\text{M}$ / Tadpole tail culture/4 days	Blocking of T3-inducible resorption of tail segments	Iwamuro <i>et al.</i> 2003
		10 ~ 25 $\mu\text{M}$ /Tank/Stage 52 tadpoles/21 days	Deceleration of both spontaneous and T4-induced metamorphic changes Suppression of TH receptor $\beta$ <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	
		0.83, 2.1, 9.5, 23.8, 100, 497 $\mu\text{g L}^{-1}$ /Tank/Stage 43/Stage 45 ~ 66 tadpoles	No effect on developmental stage distributions at exposure days 32 and 62, or mean time to completion of metamorphosis, and post-metamorphic sex ratio	Pickford <i>et al.</i> 2003
		0.1 $\mu\text{M}$ /Tadpole tail culture/5 days	Inhibition of T3-induced tail resorption, expression of TR $\alpha$ , TR $\beta$ mRNA	Iwamuro <i>et al.</i> 2006
	0.1 $\mu\text{M}$ /Tank/Premetamorphic tadpoles/4 days	T3-induced intestinal remodeling, antagonized the regulation of most T3-response genes	Heimeier <i>et al.</i> 2009	
	<i>R. nigromaculata</i>	2, 20, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ /Tank/Tadpole/15 ~ 60 days	Decrease in total T4 in tadpoles, but not significant	Yang <i>et al.</i> 2005
Tetrabromobisphenol A (TBBPA)	<i>R. rugosa</i>	0.01 ~ 1 $\mu\text{M}$ /Tank/Stage X tadpoles/9 days	Suppressive action on 0.05 $\mu\text{M}$ T3 enhancement of tail shortening	Kitamura <i>et al.</i> 2005
Nonylphenol	<i>R. catesbeiana</i>	234, 468, 936 $\mu\text{g L}^{-1}$ /Tank/Tadpole/7 days	Inhibitory effect on the rate of metamorphic progression and tail resorption	Christensen <i>et al.</i> 2005
	<i>R. nigromaculata</i>	2, 20, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ /Tank/Tadpole/15 ~ 60 days	Decrease in T4 in tadpoles but not significant	Yang <i>et al.</i> 2005
	<i>B. orientalis</i>	1 $\mu\text{M}$ /Tank/Premetamorphic tadpoles/7 days	Inhibition of exogenous T3-induced tail resorption No change in total T3 and T4	Park <i>et al.</i> 2010
Octylphenol	<i>R. pipiens</i>	0.01, 10 nM/Tank/Stage 25 tadpoles/Stage 34	No change in T3 in stages 29 and 34 tadpoles Decrease in deiodinase type 2 (D2; TH activator) or increase in deiodinase type 3 (D3; TH inactivator) mRNA	Croteau <i>et al.</i> 2009

nM의 T3 처리 시 유생에서 변태를 유발하여 꼬리가 점점 짧아지는데 0.01 ~ 1  $\mu\text{M}$ 의 TBBPA 단독처리 시 꼬리 단축 효과를 갖지 않았으나 TBBPA (0.01 ~ 1  $\mu\text{M}$ )에 T3 (50 nM)를 적용했을 때 T3에 의해 유도된 꼬리 재흡수와 다리성장이 현저히 감소되는 것으로 나타났다 (Kitamura *et al.* 2005). 이는 TBBPA가 갑상선호르몬의 길항제로 작용하여 꼬리 단축에 대한 T3의 작용을 억제함을 의미한다. 이밖에도 변태전시기 (premetamorphic stage) *X. laevis*를 비롯한 다양한 무미양서류 유생에서 BPA, NP, OP 등은 변태를 저해하는 것으로 잘 알려져 있다 (Iwamuro *et al.* 2003, 2006; Christensen *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005; Croteau *et al.* 2009). 국내에서는 토종양서류인 *B. orientalis* 유생에서 NP는 TH의 작용을 억제하여 변태를 지연시키는 것으로 확인되었다 (Park *et al.* 2010). 양서류에서 보고된 알킬페놀류의 항갑상선 호르몬 효과에 관한 연구 결과들을 Table 3에 정리하였다.

### 양서류에서 알킬페놀류 내분비계장애물질의 기타생리 조절 효과

개구리와 두꺼비는 일반적으로 복부피부를 통해 수분을 흡수하는데 수컷이 암컷보다 더 많이 흡수한다. 이는 vasotocin (VT)에 의해 촉진되며 VT와 mesotocin (MT)는 각각 항이뇨, 이뇨효과를 갖는데 성호르몬 또는 에스트로젠성 내분비계장애물질이 양서류의 수분흡수와 항상성 조절에 미치는 효과는 잘 알려져 있지 않다. Japanese tree frog (*Hyla arborea japonica*)의 복부를 통한 수분흡수에 E2, testosterone propionate (TP), BPA, methoxychlor (Mx)의 영향을 확인한 결과 수컷 개구리에서는 암컷 개구리에서 보다 더 많은 수분을 흡수하였다. 이러한 성적 이형은 E2, BPA 또는 Mx 투여로 사라졌으며, 물에 용해된 Mx도 역시 암컷에서의 수분 흡수를 저해시켰다 (Kohno *et al.* 2004). 이러한 결과로부터 환경시료 내의 에스트로젠성 화학물질들은 개구리류에서 경피적 수분흡수 기능에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

## 전 망

수중에 존재하는 내분비계장애물질은 양서류 배아 및 유생에서 호르몬과 유사한 작용하거나 길항제로 작용하여 정상적인 생리기능을 교란 또는 저해한다. 본 소고를 통해 현재까지 양서류를 대상으로 EDC의 독성 및 내분비계장애효과에 대한 자료를 정리한 결과 1) 양서류 가운데 주로 *Xenopus*를 대상으로 연구되어 왔으며, 야생 양서류 대상으로 수행된 연구는 제한적이다. 동물지리학 적 특성과 양서류 종간에 독성민감도가 차이를 고려할 때 국내 수계 특성에 맞는 양서류 종 선정과 이에 따른 독성연구가 필요한 것으로 판단된다. 2) 양서류에서 보고된 알킬페놀류 EDs의 내분비계장애효과 및 발생, 생식 독성 자료를 고찰하면 동종에서도 실험방법에 의해 상이한 결과가 나오거나 같은 실험법에 의해서도 최소효과 농도(NOEC) 등의 지표에서 다른 결과가 보고되고 있어 독성실험법의 표준화가 요구된다. 3) 다양한 화학물질들이 유사한 내분비계교란 효과를 가지는 경우에도 그 독성작용 기작에는 물질별로 상이할 수 있으므로 생체 메커니즘에 근거한 다양한 시험법의 개발이 요구된다. 4) 내분비계장애 효과가 나타나는 다양한 독성 종말점을 대상으로 NOEC 정보가 보강되어야 할 것이다. 5) 저농도 장기간 노출에 따른 발생학적 위해성에 대한 독성자료가 매우 부족한 상태로 이 부분에 대한 독성자료의 축적이 필요하다. 독성자료가 미흡한 EDC들을 대상으로 노출경로, 사용기간 및 농도 등에 따른 위해성 자료가 보강된다면 개별 EDs 물질별 수환경 잔류량에 대한 기준 설정이 가능하게 될 전망이다.

## 적 요

지구적으로 양서류가 감소하고 있다. 수정 후 변태에 이르는 생활사를 수중에서 진행하는 양서류는 수환경 내의 오염물질에 1차적으로 노출되며 독성효과에 대한 감수성이 높아 수환경의 오염에 특히 취약하다. 양서류는 수서생태계의 건강도 지표로서 유용할 뿐 아니라 배아 또는 유생에서 분자 및 개체수준의 다양한 생체지표를 이용한 내분비계장애물질을 비롯한 다양한 환경오염물질의 독성평가 모델로서도 유용하다. 양서류에서 얻어진 독성자료는 수환경 오염물질의 관리와 안전관리기준의 설정에 활발히 이용되고 있다. 다양한 알킬페놀류 화합물이 농업, 공업, 가정활동에 사용되고 있으며, 수환경 내에 잔류한다. 이들은 다양한 수생동물에서 내분비계장애

효과를 갖는 것으로 알려졌다. 본 소고에서는 양서류의 배아, 유생을 대상으로 알킬페놀류 화합물의 종류별, 노출경로 및 농도, 노출기간 및 발생단계 등에 따른 내분비계장애효과와 그 기작에 관한 국내외 자료를 정리하였다.

## 사 사

본 연구는 환경부 차세대 핵심 환경기술개발사업 지원(091-091-025)에 의한 것임.

## 참 고 문 헌

- 계명찬, 이명식, 강희정, 정경아, 안혜선. 2004. 무당개구리 비텔로제닌 유전자의 발현의 RT-PCR 검출법. 환경생물. 22:329-335.
- 계명찬, 한명수. 2000. 척추동물의 난황형성과 환경에스트로젠. 환경생물. 18:291-298.
- 김호승, 계명찬, 2003. 프로테오믹스를 이용한 내분비계 교란물질 환경독성 연구. 환경생물. 21:87-100.
- 최영주, 윤춘식, 박주홍, 진정효, 정선우. 2002. 한국산 도롱뇽(*Hynobius leechii*)의 농경지에서의 배 발생 이상과 살균제 Benomyl의 독성 효과. 한국육수학회지. 35:198-212.
- 환경부. 2001. 내분비계장애물질에 의한 생태영향조사.
- Bevan CL, DM Porter, A Prasad, MJ Howard and LP Henderson. 2003. Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis*. Environ. Health Perspect. 111:88-96.
- Blaustein AR and DB Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. Sci. Am. 272:52-57.
- Bögi C, G Levy, I Lutz and W Kloas. 2002. Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 133:559-570.
- Bögi C, J Schwaiger, H Ferling, U Mallow, C Steineck, F Sinowatz, W Kalbfus, RD Negele, I Lutz and W Kloas. 2003. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. Environ. Res. 93:195-201.
- Boyer R and CE Grue. 1995. The need for water quality criteria for frogs. Environ. Health Perspect. 103:352-357.
- Carey C and CJ Bryant. 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. Environ. Health Perspect. 103 Suppl 4:13-17.
- Chang CY and E Witschi. 1956. Genetic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. Proc. Soc. Exp. Biol. 93:140-144.
- Christensen JR, JS Richardson, CA Bishop, B Pauli and J Elliott. 2005. Effects of nonylphenol on rates of tail resorption and

- metamorphosis in *Rana catesbeiana* tadpoles. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 68:557-572.
- Colborn T and C Clement. 1992. Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. Princeton Scientific Publishing, Princeton.
- Croteau MC, M Davidson, P Duarte-Guterman, M Wade, JT Popesku, S Wiens, DR Lean and VL Trudeau. 2009. Assessment of thyroid system disruption in *Rana pipiens* tadpoles chronically exposed to UVB radiation and 4-tert-octylphenol. *Aquat. Toxicol.* 95:81-92.
- Goleman WL, JA Carr and TA Anderson. 2002. Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit thyroid function and alter sex ratios in developing *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:590-597.
- Gye MC and DH Kim. 2005. Bisphenol A induces hepatic vitellogenin mRNA in male *Bombina orientalis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75:1-6.
- Hayes T, K Haston, M Tsui, A Hoang, C Haeffele and A Vonk. 2002a. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419:895-896.
- Hayes T, K Haston, M Tsui, A Hoang, C Haeffele and A Vonk. 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 111:568-575.
- Hayes TB, A Collins, M Lee, M Mendoza, N Noriega, AA Stuart and A Vonk. 2002b. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99:5476-5479.
- Heimeier RA, B Das, DR Buchholz and YB Shi. 2009. The xenoestrogen bisphenol A inhibits postembryonic vertebrate development by antagonizing gene regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 150:2964-2973.
- Helleday T, KL Tuominen, A Bergman and D Jenssen. 1999. Brominated flame retardants induce intragenic recombination in mammalian cells. *Mutation Research* 439:137-147.
- Herbener GH. 1989. Use of the protein A-gold immunocytochemical and enzyme-gold cytochemical techniques in studies of vitellogenesis. *Am. J. Anat.* 185:244-254.
- Herbener GH, RC Feldhoff and ML Fonda. 1983. A correlated morphometric and biochemical study of estrogen-induced vitellogenesis in male *Rana pipiens*. *J. Ultrastruct. Res.* 83:28-42.
- Herrmann T, M Ball, K Rothenbacher and M Wesselmann. 2003. Emissions of tetrabromobisphenol A from computer monitors. *Organohalogen Compounds* 61:259-262.
- Hinther A, D Domanski, S Vawda and CC Helbing. 2010. C-fin: a cultured frog tadpole tail fin biopsy approach for detection of thyroid hormone-disrupting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 29:380-388.
- Houlahan JE, CS Findlay, BR Schmidt, AH Meyer and SL Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404:752-755.
- Ikeda Y, W Shen, HA Ingraham and KL Parker. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8:654-662.
- Ishihara A, N Nishiyama, S Sugiyama and K Yamauchi. 2003. The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134:36-43.
- Iwamuro S, M Sakakibara, M Terao, A Ozawa, C Kurobe, T Shigeura, M Kato and S Kikuyama. 2003. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133:189-198.
- Iwamuro S, M Yamada, M Kato and S Kikuyama. 2006. Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture. *Life Sci.* 79:2165-2171.
- Kaneko M, R Okada, K Yamamoto, M Nakamura, G Mosconi, AM Polzonetti-Magni and S Kikuyama. 2008. Bisphenol A acts differently from and independently of thyroid hormone in suppressing thyrotropin release from the bullfrog pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155:574-580.
- Kang HS, JS Noh and MC Gye. 2006. Effect of nonylphenol on the expression of hepatic vitellogenin mRNA in male *Bombina orientalis* (Boulenger). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77:15-20.
- Kitamura S, T Kato, M Iida, N Jinno, T Suzuki, S Ohta, N Fujimoto, H Hanada, K Kashiwagi and A Kashiwagi. 2005. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci.* 76:1589-1601.
- Kloas W. 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *Int. Rev. Cytol.* 216:1-57.
- Kloas W and I Lutz. 2006. Amphibians as model to study endocrine disruptors. *J. Chromatogr. A*. 1130:16-27.
- Kloas W, I Lutz and R Einspanier. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* 225:59-68.
- Knudsen FR and TG Pottinger. 1999. Interaction of endocrine disrupting chemicals, singly and in combination, with estrogen-, androgen-, and corticosteroid-binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 44:159-170.
- Kohno S, M Fujime, Y Kamishima and T Iguchi. 2004. Sexually dimorphic basal water absorption at the isolated pelvic



- patch of Japanese tree frog, *Hyla japonica*. J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol. 301:428-438.
- Lahr J. 1997. Ecotoxicology of organisms adapted to life in temporary freshwater ponds in arid and semi-arid regions. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32:50-57.
- Lee KM, W Yang, JS Rhee, DS Hwang, CJ Park, MC Gye, JS Lee and I Shin. 2010. Effects of endocrine disruptors on *Bombina orientalis* P450 aromatase activity. Zoolog. Sci. 27:338-343.
- Loeffler IK, DL Stocum, JF Fallon and CU Meteyer. 2001. Leaping lopsided: a review of the current hypotheses regarding etiologies of limb malformations in frogs. Anat. Rec. 265:228-245.
- Lutz I and W Kloas. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. Sci. Total Environ. 225:49-57.
- Mann RM and JR Bidwell. 2000. Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. Aquat. Toxicol. 51:19-29.
- Mann RM and JR Bidwell. 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. Environ. Pollut. 114:195-205.
- Matsumura N, H Ishibashi, M Hirano, Y Nagao, N Watanabe, H Shiratsuchi, T Kai, T Nishimura, A Kashiwagi and K Arizono. 2005. Effects of nonylphenol and triclosan on production of plasma vitellogenin and testosterone in male South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Biol. Pharm. Bull. 28:1748-1751.
- Mayer LP, CA Dyer and CR Propper. 2003. Exposure to 4-tert-octylphenol accelerates sexual differentiation and disrupts expression of steroidogenic factor 1 in developing bullfrogs. Environ. Health Perspect. 111:557-561.
- McLachlan JA. 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. Endocr. Rev. 22:319-341.
- Mitsui N, O Tooi and A Kawahara. 2007. Vitellogenin-inducing activities of natural, synthetic, and environmental estrogens in primary cultured *Xenopus laevis* hepatocytes. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 146:581-587.
- Mommsen TP and PJ Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. pp.347-406. In Fish Physiology (Hoar WS and DJ Randall eds.). vol. 11. Academic Press, New York.
- Mosconi G, O Carnevali, MF Franzoni, E Cottone, I Lutz, W Kloas, K Yamamoto, S Kikuyama and AM Polzonetti-Magni. 2002. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. Gen. Comp. Endocrinol. 126:125-129.
- OECD, 2009 OECD, Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. (OECD ed.) OECD Publishing.
- Ohtani H, I Miura and Y Ichikawa. 2000. Effects of dibutyl phthalate as an environmental endocrine disrupter on gonadal sex differentiation of genetic males of the frog *Rana rugosa*. Environ. Health Perspect. 108:1189-1193.
- Opitz R and W Kloas. 2010. Developmental regulation of gene expression in the thyroid gland of *Xenopus laevis* tadpoles. Gen. Comp. Endocrinol. 168:199-208.
- Opitz R, S Hartmann, T Blank, T Braunbeck, I Lutz and W Kloas. 2006. Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles. Toxicol. Sci. 90:337-348.
- Palmer BD and SK Palmer. 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog. Environ. Health Perspect. 103 Suppl 4:19-25.
- Park CJ, HS Kang and MC Gye. 2010. Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3,5,3'-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). Chemosphere 81:1292-1300.
- Pickford DB, MJ Hetheridge, JE Caunter, AT Hall and TH Hutchinson. 2003. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. Chemosphere 53:223-235.
- Plotner J and R Gunther. 1987. Toxicity of an anionic detergent to the spawn and larvae of anurans (Amphibia). Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 72:759-771.
- Presutti C, C Vismara, M Camatini and G Bernardini. 1994. Ecotoxicological effects of a nonionic detergent (Triton DF-16) assayed by ModFETAX. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53:405-411.
- Reeder AL, GL Foley, DK Nichols, LG Hansen, B Wikoff, S Faeh, J Eisold, MB Wheeler, R Warner, JE Murphy and VR Beasley. 1998. Forms and prevalence of intersexuality and effects of environmental contaminants on exuality in cricket frogs (*Acris crepitans*). Environ. Health Perspect. 106:261-266.
- Sellström U and B Jansson. 1995. analysis of tetrabromophenol A in a product and environmental samples. Chemosphere 31:3085-3092.
- van Wyk JH, EJ Pool and AJ Leslie. 2003. The effects of anti-androgenic and estrogenic disrupting contaminants on breeding gland (nuptial pad) morphology, plasma testosterone levels, and plasma vitellogenin levels in male *Xenopus laevis* (African clawed frog). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44:247-256.
- Watanabe I, T Kashimoto and R Tatslukawa. 1983. Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 31:48-52.
- Wu B, T Ford, JD Gu, XX Zhang, AM Li and SP Cheng. 2010.

- Computational studies of interactions between endocrine disrupting chemicals and androgen receptor of different vertebrate species. *Chemosphere* 80:535-541.
- Wu F, S Khan, Q Wu, R Barhoumi, R Burghardt and S Safe. 2008. Ligand structure-dependent activation of estrogen receptor alpha/Sp by estrogens and xenoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110:104-115.
- Yamauchi K, A Ishihara, H Fukazawa and Y Terao. 2003. Competitive interactions of chlorinated phenol compounds with 3,3',5-triiodothyronine binding to transthyretin: detection of possible thyroid-disrupting chemicals in environmental waste water. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187:110-117.
- Yang FX, Y Xu and S Wen. 2005. Endocrine-disrupting effects of nonylphenol, bisphenol A, and p,p'-DDE on *Rana nigromaculata* tadpoles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75: 1168-1175.
- Zhang F, SJ Degitz, GW Holcombe, PA Kosian, J Tietge, N Veldhoen and CC Helbing. 2006. Evaluation of gene expression endpoints in the context of a *Xenopus laevis* metamorphosis-based bioassay to detect thyroid hormone disruptors. *Aquat. Toxicol.* 76:24-36.

Manuscript Received: January 25, 2011

Revision Accepted: February 15, 2011

Responsible Editor: Baik Ho Kim