

무당개구리 비텔로제닌 유전자의 발현의 RT-PCR 검출법

계명찬* · 이명식 · 강희정 · 정경아 · 안혜선

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

RT-PCR Analysis of Vitellogenin Gene Expression in *Bombina orientalis*

Myung Chan Gye*, Myung Sik Lee, Hee Jung Kang, Kyung Ah Jung and Hae Sun Ahn

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

Abstract - To develop a biomarker for the monitoring of the contamination of estrogenic endocrine disrupters in the aquatic environment, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of vitellogenin (Vg) mRNA expression was optimized in *Bombina orientalis*, a Korean red bellied toad species. Based on partial cDNA sequences of both Vg and beta actin genes of *B. orientalis*, specific primers for RT-PCR of Vg and beta actin mRNAs were developed. Semiquantitative RT-PCR of the Vg mRNA in liver was optimized using a beta actin mRNA as an internal control in both sexes. In female RT-PCR using 1 µg of the liver cDNA resulted in a linear increment in the PCR product of Vg from 18 to 34 cycles of amplification. In male, on the contrary, the RT-PCR product was first detected at 30 cycles of amplification and a linear increment was observed from 30 to 40 cycles of amplification, suggesting that male *B. orientalis* expresses minute amount of Vg mRNA which is a 2⁻¹² equivalent of female. In conclusion, the optimized protocol for semiquantitative RT-PCR analysis of Vg mRNA level in *B. orientalis* male liver will be useful for the environmental monitoring the xenoestrogen contamination in the freshwater environment in Korea.

Key words : vitellogenin, RT-PCR, liver, biomarker, endocrine disrupter, *Bombina orientalis*

서 론

습지 생태계에서 중요한 생태적 지위를 차지하는 양서류는 진화적으로 볼 때 최초의 육상 생활을 시작한 척추동물로 진화와 발생학 연구에 중요한 재료를 제공한다. 수정 후 변태에 이르는 생활사 과정을 수환경 내에서 진

행할 뿐 아니라 먹이사슬의 중간 소비자로서 오염물질의 생물 농축 효과가 나타날 수 있는 생태적 지위를 갖는다. 따라서 수환경 오염에 매우 민감할 뿐 아니라 수서생태계의 건강도를 대변하는 지표로서 유용한 까닭에 발생 중인 배아 또는 유생을 이용한 생체독성 및 발생학적 독성평가 및 이를 활용한 수환경 기준을 설정하기 위한 연구가 *Xenopus* 등 다양한 양서류에서 활발하다(Plotner and Gunther 1987; Boyer and Grue 1995; Lahr 1997; Loeffler et al. 2001; Bogi et al. 2003).

* Corresponding author: Myung Chan Gye, Tel: 02-2290-0958, Fax: 02-2298-9646, E-mail: mcgye@hanyang.ac.kr

최근 담수환경을 포함한 육상 생태계에서 양서류의 세계적인 감소 추세가 두드러진다. 내분비계장애물질(endocrine disrupting chemicals, EDCs) 및 다양한 농약들은 특정 지역에서 양서류의 감소 추세에 보이지 않는 원인으로 의심되고 있다(Blaustein and Wake 1995; Carey and Bryant 1995; Houlahan *et al.* 2000). EDCs는 생체호르몬의 작용을 교란하여 발생, 번식, 면역, 신경계 등에서 다양한 독성효과를 발휘한다. 따라서 환경잔류성이 높은 EDCs의 위해성을 정확히 평가하고 이들 물질의 생산 및 사용에 대한 허용기준치 및 규제 방안을 설정하는 것은 육수환경의 보존과 관리에 매우 중요하다. 이러한 EDCs의 수환경 잔류량은 수질, 저질 및 생체 등의 매디아로부터 정량적으로 평가할 수 있으나 야생의 생태계에서 각 분류군 별로 특정 EDCs에 대한 감수성은 차이를 보이므로 개별 종 특이성을 고려한 위해성 평가가 요구된다.

개체의 발생과정에서 일어나는 유전자 발현은 신체 내부 및 외부의 환경요인의 변동에 따라 가변적으로 조절된다. 이는 동물 생존과 진화적 적응의 중요한 메커니즘으로 “생태적발생(ecodevo)” 라는 용어로 정의된 바 있다(Gilbert 2001). 특정한 발생 과정에서 정상적으로 나타나는 유전자 발현의 변형은 발생프로그램을 교란시켜 사망, 기형, 암 등 심각한 결과 뿐 아니라 번식, 면역, 신경기능 등 정상적인 생리활성의 변화를 유발할 수 있다. 다양한 환경 오염물질에 노출된 개체의 특정 조직에서의 유전자 발현 양상의 변화는 이 물질에 노출되었음을 판단하는 특별한 생물학적표지자(biological indicator)로 활용될 수 있다. 따라서 환경오염원에 노출된 개체에서 특정 유전자 발현의 변화를 추적하는 일은 환경오염원에 의한 개체의 반응 추적과 오염원에 대한 노출 정도를 파악하는 중요한 수단으로 이용된다(김과 계 2003).

에스트로젠성 내분비계장애물질(xenoestrogen)은 개체의 성결정 및 생식소의 분화, 정자형성, 번식행동, 발생동을 변형시키며 야생의 척추동물에서 번식을 교란할 수 있다(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). Xenoestrogen에 노출된 수컷에서는 암컷에서 주로 발현되는 유전자들이 발현되므로, 이들 유전자는 xenoestrogen 노출의 biomarker로 이용되고 있다(계와 한 2000). 난황전구단백질(vitellogenin, Vg)은 난황기 암컷의 간에서 에스트로젠의 자극에 의해 대량 생산되며, 혈액으로 분비되어 난소까지 도달하며 receptor mediated endocytosis를 통해 난자 안으로 수송된 후 난황단백질로 전환되어 장차 발행 중인 배아의 에너지원으로 이용된다(Mommsen and Walsh 1988). 다양한



Fig. 1. *Bombina orientalis*. Male. Bar = 10 mm.

척추동물 수컷의 간 조직에서 estrogen의 자극에 의해 Vg가 생성되므로 Vg 발현을 biomarker로 이용하여 수환경 내 xenoestrogen의 오염을 검사하기 위한 연구가 다양한 어류에서 진행되어 왔으며, 양서류에서는 주로 실험양서류인 *Xenopus*와 옴개구리(*Rana rugosa*), 개구리(*Rana temporaria*), 유럽개구리(*Rana esculenta*), 황소개구리(*Rana catesbeiana*), 표범개구리(*Rana pipiens*), 영원류(*Triturus carnifex*) 등의 일부 야생종을 대상으로 진행되어 왔다(Herbener *et al.* 1983; Herbener 1989; Palmer and Palmer 1995; Mosconi *et al.* 2002; Bogi *et al.* 2003; van Wyk *et al.* 2003). 한국산 양서류 가운데는 유미양서류인 한국산 도롱뇽(*Hynobius leechii*)에서 살균제에 의한 배아 및 유생의 치사와 기형 유발이 보고되었고, 외래종인 황소개구리를 대상으로 내분비계장애물질 오염우려 지역에서 Vg 단백질 발현 동태에 관한 연구가 수행되었다(환경부 2001; 최 등 2002). 그러나 한국산 양서류를 대상으로 biomarker 유전자 수준에서 에스트로젠성 내분비계장애물질의 노출을 평가할 수 있는 기법은 개발되어 있지 않고 있다. 본 연구는 한국의 대표적인 무미양서류 가운데 하나이며 유라시아 대륙에 걸쳐 폭 넓게 분포하는 무당개구리(Fig. 1)를 모델로 수환경 내 xenoestrogen 노출을 평가하기 위한 biomarker 개발을 위해 간조직 내 Vg mRNA 발현량에 대한 RT-PCR 정량법을 개발하였다.

재료 및 방법

1. 동물재료

2003년 6월 경기도 가평군 가평천 일대로부터 한국산 무당개구리를 채집하였다(Fig. 2). 채집된 개체는 실험실로 운반하여 20°C, 습도 60%의 사육실에 설치한 사육장

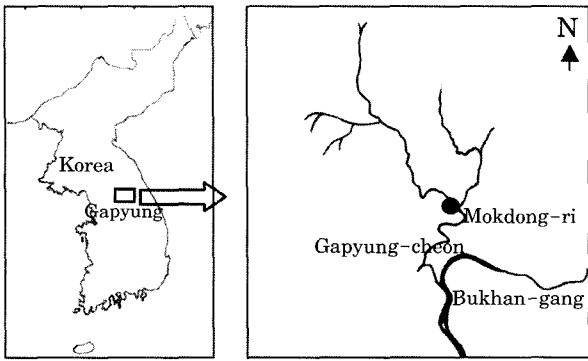


Fig. 2. Sampling site of *B. orientalis*.

치에서 meal worm을 먹이로 사육하였다.

2. RNA 분리 및 역전사

두부를 타격하여 도살한 후 복강을 해부하여 암컷 및 수컷의 간 조직을 절취하였다. 분리된 간 조직은 20배 부피의 TRIzol 용액(Life Technologies, USA)에 옮긴 후 4°C에서 진동마쇄기(Polytron, USA)를 이용하여 균질화하였다. Dynabead kit(Dynaryl, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 mRNA를 분리한 후 0.1% DEPC로 처리된 증류수에 3 mg mL⁻¹ 농도로 용해하였다. 역전사 반응에는 RACE kit(Clontech, USA)를 이용하여 제조사의 용법에 따라 mRNA 1 µg을 이용하여 10 µL 부피의 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다. Tris-EDTA(pH 8.0)에 1/10로 희석하여 사용 시까지 보관하였다.

3. Vg mRNA의 semiquantitative RT-PCR을 위한 primer 고안

이와 계(2004)에 의해 확인된 Vg 및 beta actin cDNA 절편 염기서열에 근거하여 Primer3 software(Whitehead Institute for Biomedical Research, USA)을 이용하여 정량적 RT-PCR 목적의 primer sets를 고안하였다.

4. RT-PCR의 최적화

무당개구리 암수의 간조직으로부터 TRIzol 용액(Life Technologies, USA)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 total RNA를 분리한 후 0.1% DEPC로 처리된 증류수에 3 mg mL⁻¹ 농도로 용해하였다. 역전사 반응에는 murine leukemia virus [MuLV] reverse transcriptase (Applied Bioscience, USA)를 이용하였고, 제조사의 용법에 따라 RNA 1 µg을 이용하여 20 µL 부피의 역전사 반응을 수행

하여 cDNA를 합성하였다. 간 cDNA로부터 Vg 및 beta actin mRNA 발현 정량을 위한 최적 annealing 온도를 확인하기 위해 암컷 간을 이용하여 제작한 cDNA 1 µg을 Ex Taq™(Takara, Japan)를 이용하여 55~70°C의 annealing 온도 구배 조건에서 제조사의 용법에 따라 40회 PCR을 수행하였다. 최적의 PCR 반응 회수를 결정하기 위해 최적의 annealing 온도인 60.5°C(Vg) 및 55°C(beta actin)에서 14~40 cycle의 PCR을 진행하였다. 고안한 primer에 의한 genomic DNA의 증폭 여부를 확인하기 위해 암컷의 간조직에서 분리한 total RNA의 역전사반응 수행물과 역전사과정을 거치지 않은 RNA 시료를 최적조건에서 40회 PCR 증폭하였다. Vg mRNA의 상대적 정량을 위한 RT-PCR 실험에서는 PCR 반응산물의 양을 Gel Documentation System(Vilber Lourmat, France)을 이용하여 밴드의 강도를 측정 후 PCR 반응 회수-반응량 곡선을 얻어 차후 정량적 분석을 위해 PCR cycle 수의 증가에 따라 PCR 반응산물의 증가가 뚜렷한 구간을 설정하였다(Gye and Ohsako 2003).

결 과

Vg와 beta actin cDNA 염기서열에 근거하여 고안한

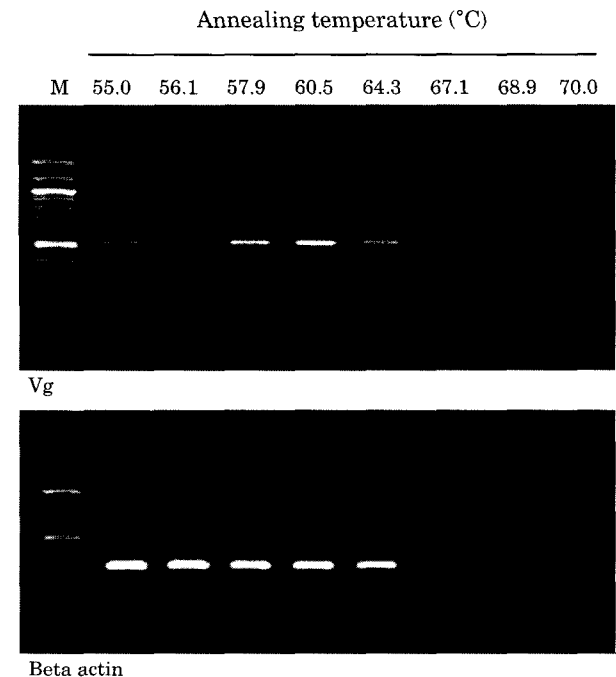


Fig. 3. Optimization of annealing temperature for RT-PCR of vitellogenin and beta actin mRNA in *B. orientalis*. M, size marker (100 bp ladder).

primer들을 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 Vg는 512 bp, beta actin은 325 bp의 산물이 확인되었다. 최적 annealing 온도를 확인하기 위해 암컷 간 cDNA를 이용하여 55~70°C의 온도 구배 조건에서 40회 PCR을 수행한 결과 Vg는 60.5°C, beta actin은 55°C에서 최적화되었다(Fig. 3). RNA 특이적 RT-PCR 반응의 유무를 확인하기 위해 역전사과정을 거치지 않은 RNA시료를 함께 분석하였을 때 Vg와 beta actin 모두 신호가 검출되지 않았다(Fig. 4).

암컷 간의 경우 18 cycle에서 최초로 PCR 반응물이 확인되었고 34 cycle 범위의 증폭 시 반응산물이 일정하게 증가하였으며 이후 PCR 반응이 포화되었다. 수컷의 간에서는 30 cycle에서 최초로 PCR 반응물이 확인되었고 40 cycle 사이에서 반응산물이 일정하게 증가하였다. 함께 증

폭한 beta actin mRNA의 경우 24~38 cycle에서 일정하게 증가하였다(Fig. 5).

고 찰

최근 수환경 내의 에스트로젠성 내분비계장애물질 오염을 추적하기 위해 어류와 양서류에서 RT-PCR 혹은 ELISA법 등으로 Vg를 비롯한 다양한 biomarker 유전자의 발현을 분석함으로써, 이들이 서식하는 환경의 xenoestrogen 오염 여부를 확인하고 있으며 Vg를 이용한 estrogen성 내분비계장애물질 검사법은 다양한 biomarker 가운데 OECD 표준으로 채택되었다(OECD 1992). 양서류에서 estrogen, androgen 및 xenoestrogen과 Vg 발현과의 인과관계에 대한 선행 연구가 있지만 대부분 Vg 항체를 이용하여 혈중 Vg 농도를 조사한 것으로, 본 연구에서처럼 미량의 Vg mRNA 발현까지 정밀하게 검출한 연구는 *Xenopus*, *Rana esculenta* 등 일부 실험 양서류에 불과하다(Carnevali *et al.* 1995; Bogi *et al.* 2003). 현재까지 한국산 야생 양서류를 대상으로 xenoestrogen 등의 내분비계장애물질의 위해성에 대한 평가는 황소개구리를 대상으로 Vg 단백질에 대한 항체시험법이 이용되어 왔으나(환경부 2001), Vg를 biomarker로 하여 mRNA 수준에서 정밀한 평가는 진행되지 않았다. 본 연구는 한국의 대표적 양서류인 무당개구리를 이용한 이와 관련된 최초의 연구로 의미를 갖는다.

다양한 양서류에서 Vg 발현은 에스트로젠 뿐 아니라 growth hormone, IGF-I, prolactin (PRL), 계절의 영향을 받는다(Gobbetti *et al.* 1985; Carnevali *et al.* 1993, 1995, 2000; Mosconi *et al.* 1994). Vg 발현을 위해서는 간조직에서 estrogen 수용체의 발현이 선행되어야 하는데, 비번식

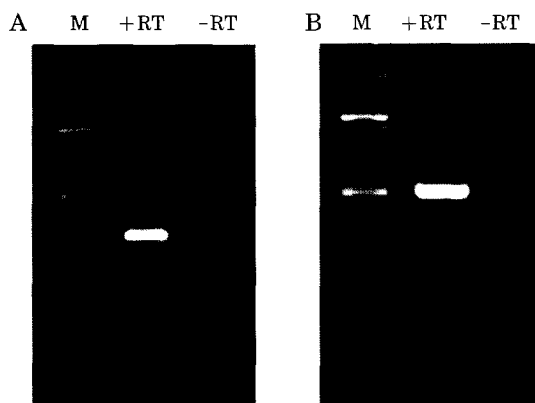


Fig. 4. Verification of RT-PCR of vitellogenin mRNA in *B. orientalis*. RT reactions with (+RT) or without (-RT) from female liver total RNA was subjected to 40 cycles of PCR. (A) Vg. (B) beta actin. M, size marker (100 bp ladder).

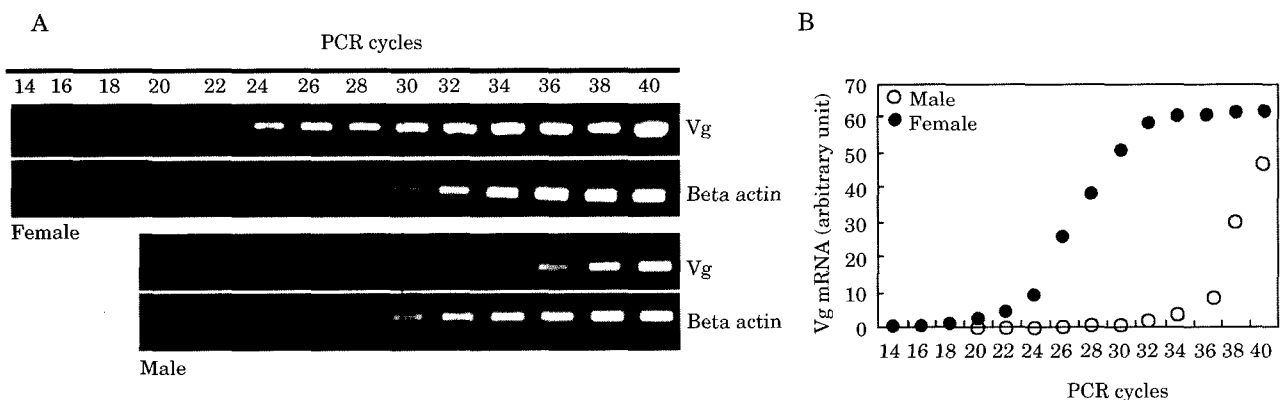


Fig. 5. Optimization of cycle number for semiquantitative RT-PCR of vitellogenin and beta actin mRNA in *B. orientalis*. (A) RT-PCR, (B) Relative expression of Vg mRNA vs. beta actin mRNA.

기의 간조직은 estrogen 수용체의 발현이 매우 낮아 estrogen 처리 시에도 Vg가 유도되지 않는다(Korsgaard *et al.* 1986; Hernandez *et al.* 1992; Mackay and Lazier 1993). 따라서 계절적으로 변동하는 뇌-생식소 축 상에 작용하는 생식내분비호르몬 뿐 아니라 다양한 내분비 펩타이드호르몬 및 간에서 국부적으로 발현되는 성장인자의 변동이 난황형성기에 에스트로겐의 감수성을 담보하는 것으로 사료된다. 무당개구리 암컷의 경우 난소의 발달은 동계에 서서히 발달하여 춘계에 최고조에 달하며 5월에 주로 산란한다. 산개구리(*Rana dybowskii*) 등 초봄(3월) 주 산란기에 모두 산란하는 양서류와는 달리 무당개구리는 춘계의 주 산란기가 지난 후에도 소규모의 산란이 진행되며 실내의 사육 조건에서 순치한 경우 연중 난소의 발달과 산란을 유도할 수 있다. 따라서 춘계와 하계를 통해 번식이 이뤄지는 무당개구리의 경우 이 시기에 채집한 개체를 대상으로 Vg mRNA 분석을 할 경우 에스트로겐에 대한 감수성을 유지하는 상태로 추정할 수 있으며 결과의 신뢰도를 높일 수 있을 것이다. 야생의 무당개구리 수컷에서 에스트로겐 또는 xenoestrogen에 의해 Vg mRNA 유도를 확인하고자 할 때는 암컷의 난황형성기로 수컷에서도 estrogen 감수성이 유지되는 동계 또는 춘계에 채집한 개체를 이용하여 Vg 발현을 검사하는 것이 적합할 것이다.

PCR 반응 사이클 수에 따른 Vg 증폭산물의 증가 양상은 암컷에서는 최저 18 cycle에서 확인된 반면 수컷에서는 30 cycle에서 확인된다. 따라서 산술적으로 수컷에서 Vg mRNA의 발현량은 암컷의 2⁻¹²배에 상당한다. 따라서 수컷에서도 미량의 Vg mRNA가 발현됨을 알 수 있다. 이처럼 수컷에서 Vg가 발현되는 이유는 수컷 체내에 존재하는 estrogen 때문으로 추정된다. 비록 수컷이라도 혈중에는 미량의 에스트로겐이 존재하며 이들은 spermatogonial stem cell의 증식을 촉진하는 등의 정상적인 정자형성에 중요한 역할이 있다(Hess *et al.* 1997; Miura *et al.* 1999). 또한 척추동물 수컷의 정소 뿐 아니라 뇌조직에도 testosterone을 estrogen으로 전환하는 aromatase의 발현이 확인된다(Schlenger *et al.* 1992; Nitta *et al.* 1993). 따라서 간 조직에서 estrogen 수용체를 발현할 경우 미량의 estrogen에 의해 Vg 전사가 가능하며 RT-PCR과 같이 민감한 검출방법을 사용하게 되면 미량의 Vg mRNA의 존재를 확인할 수 있을 것이다. 그러나 미량의 Vg mRNA가 검출되었다고 해서 본 연구에 사용된 수컷 개체가 xenoestrogen에 의해 오염되었다고 단정하기는 어렵다. 본 연구에서 estrogen을 처리하지 않은 수컷에서 확인되는 Vg의 발현은 결코 무시할 수 있는 양이 아니다. 따라서 xenoestrogen에 노출된 개체를 판정하기

위한 Vg mRNA 발현량의 기본 값 설정은 수컷 체내의 생리적 농도의 estrogen에 의한 Vg mRNA의 발현정도 및 동태에 기초해야 할 것이다.

본 연구에서 시행한 것과 같이 무당개구리 수컷의 간에서 Vg mRNA의 RT-PCR 반응을 수행할 경우 30~40 사이클의 PCR 반응 동안 증폭산물이 일량하게 증가하므로 이 범위 내에서 RT-PCR반응을 수행할 경우 estrogenic 활성을 갖는 다양한 xenoestrogen의 검색 뿐 아니라 특정 담수역에서 xenoestrogen에 의한 오염의 추적이 가능할 것이다. 향후 bisphenol, nonylphenol 등 이미 다양한 척추동물에서 Vg 발현을 유도하는 것으로 알려진 다양한 외인성 에스트로겐에 의한 영향을 확인하기 위해서는 물질 별로 투여량-발현량 관계에 근거한 구체적인 기준이 설정되어야 할 것이며 무당개구리 이외에도 다양한 한국산 양서류를 대상으로 xenoestrogen을 포함한 내분비계장애물질 검색을 위한 biomarker gene의 발굴과 표준화 연구가 필요하다.

결 론

무당개구리 vitellogenin (Vg) 및 beta actin cDNA의 부분적 염기서열에 근거하여 Vg mRNA의 발현 검출에 필요한 RT-PCR 시험법을 최적화하였다. 성체의 간을 조사한 결과 수컷은 암컷의 2⁻¹² 배에 상당하는 극미량의 Vg mRNA를 발현하였다. 본 시험법을 이용하여 한국산 양서류에서 에스트로겐 활성을 갖는 내분비계장애물질의 민감하고도 특이적인 검색이 가능할 뿐 아니라 국내 하천의 특정 수역에서의 양서류를 대상으로 xenoestrogen 노출 여부에 판정이 가능할 것이다.

사 사

본 연구는 학술진흥재단의 중점연구소(KRF-2002-005-C00022) 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- 계명찬, 한명수. 2000. 척추동물의 난황형성과 환경에스트로젠. 환경생물. 18:291-298.
- 김호승, 계명찬. 2003. 프로테오믹스를 이용한 내분비계 교란 물질 환경독성 연구. 환경생물. 21:87-100
- 이명식, 계명찬. 2004. 한국산 무당개구리(*Bombina orientalis*) 난황전구단백질 cDNA 염기서열 결정 및 유전자발현의

- RT-PCR 검출. 한국환경생물학회, 육수학회, 생태학회 공동학술대회 초록집. 2004년 5월.
- 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 Persp. 111:88-96.
- Blaustein AR and DB Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. Sci. Am. 272:52-57.
- Bogi 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 Persp. 103:352-357.
- Carey C and CJ Bryant. 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. Environ. Health Persp. 103 Suppl. 4:13-17.
- Carnevali O, G Mosconi and AM Polzonetti-Magni. 2000. Involvement of tyrosine kinase and cAMP in growth hormone-induced vitellogenin synthesis in the anuran, *Rana esculenta*. Life Sci. 67:1467-1476.
- Carnevali O, G Mosconi, K Yamamoto, T Kobayashi, S Kikuyama and AM Polzonetti-Magni. 1993. In-vitro effects of mammalian and amphibian prolactins on hepatic vitellogenin synthesis in *Rana esculenta*. J. Endocrinol. 137:383-389.
- Carnevali O, MG Sabbieti, G. Mosconi and AM Polzonetti-Magni. 1995. Multihormonal control of vitellogenin mRNA expression in the liver of frog, *Rana esculenta*. Mol. Cell Endocrinol. 114:19-25.
- Gilbert SF. 2001. Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world. Dev. Biol. 233: 1-12.
- Gobbetti A, A Polzonetti-Magni, M Zerani, O Carnevali and V Botte. 1985. Vitellogenin hormonal control in the green frog, *Rana esculenta*. Interplay between estradiol and pituitary hormones. Comp. Biochem. Physiol. A 82:855-858.
- Gye MC and S Ohsako. 2003. Effects of flutamide in the rat testis on the expression of occludin, an integral member of the tight junctions. Toxicol. Lett. 143:217-222.
- Herbener GH. 1989. Use of the protein A-gold immunocytochemical and enzyme-gold cytochemical techniques in studies of vitellogenesis. Am. J. Anat. 185:244-54.
- Herbener GH, Feldhoff RC and Fonda ML. 1983. A correlated morphometric and biochemical study of estrogen-induced vitellogenesis in male *Rana pipiens*. J. Ultrastruct. Res. 83:28-42.
- Hernandez I, A Poblete, R Amthauer, R Pessot and M Krauskopf. 1992. Effect of seasonal acclimatization on estrogen-induced vitellogenesis and on the hepatic estrogen receptors in the male carp. Biochem. Int. 28:559-567.
- Hess RA, D Bunick, KH Lee, J Bahr, JA Taylor, KS Korach and DB Lubahn. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature 390:509-512.
- Houlahan JE, CS Findlay, BR Schmidt, AH Meyer and SL Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. Nature 404:752-755.
- 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.
- Korsgaard B, TP Mommsen and RL Saunders. 1986. The effect of temperature on the vitellogenic response in Atlantic salmon post-smolts (*Salmo salar*). Gen. Comp. Endocrinol. 62:193-201.
- 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.
- 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.
- Mackay ME and CB Lazier. 1993. Estrogen responsiveness of vitellogenin gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kept at different temperatures. Gen. Comp. Endocrinol. 89:255-266.
- 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.
- Miura T, C Miura, T Ohta, MR Nader, T Todo and K Yamauchi. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. Biochem. Biophys. Res. Co. 264:230-234.

- Mommsen TP and PJ Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. pp. 347-406. In *Fish Physiology* (Hoar WS and DJ Randall eds.). Vol XIA. 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.
- Mosconi G, K Yamamoto, O Carnevali, M Nabissi, A Polzonetti-Magni and S Kikuyama. 1994. Seasonal changes in plasma growth hormone and prolactin concentrations of the frog *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93:380-387.
- Nitta H, D Bunick, RA Hess, L Janulis, SC Newton, CF Millette, Y Osawa, Y Shizuta, K Toda and JM Bahr. 1993. Germ cells of the mouse testis express p450 aromatase. *Endocrinology* 132:1396-1401.
- OECD. 1992. Guideline 204: OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Organization for Economic Cooperation and Development. Paris.
- Palmer BD and SK Palmer. 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog. *Environ. Health Persp.* 103 Suppl 4:19-25.
- 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.
- Schlinger BA and AP Arnold. 1992. Circulating estrogen in a male songbird originate in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7650-7653.
- 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.

Manuscript Received: April 28, 2004

Revision Accepted: May 20, 2004

Responsible Editorial Member: Wonchoel Lee
(Hanyang Univ.)