

Proteomics를 이용한 내분비계장애물질인 nonylphenol에 노출된 무당개구리의 단백질 발현 비교 연구

김 호 승 · 계 명 찬*

(한양대학교 자연과학대학 생명과학과)

Proteomics of Liver Tissues of *Bombina orientalis* Following Exposure to Nonylphenol. Kim, Ho Seung and Myung Chan Gye * (Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

Nonylphenol (NP), an well known aquatic contaminant, has been known to induce abnormalities in various aquatic animals. In an effort to develop proteome in the study of aquatic contamination of NP and its impact on the amphibia, protein changes in liver tissues of Korean red bellied frog, *Bombina orientalis* was investigated following the NP exposure. NP was administered intraperitoneally to male *B. orientalis* at 10 mg/kg body weight. At 48 and 96h after the treatment, the frog livers were sampled, and the protein fraction was separated using two dimensional gel electrophoresis (2D/E) and visualized with Coomassie brilliant blue staining. The 2D/E images of the tissue from the animals treated with NP showed marked changes of protein spots (about 20% of total protein spots). Analysis of the 50-60 separated spots allowed identification of the major protein changes in the overall pattern for the stressor (NP) by time (0, 48 and 96 h). At 48h after treatment, 8 spots were increased and 12 spots were reduced. Then, at 96h after treatment, 10 spots were increased and 8 spots were reduced. In total, approximately 29% of liver proteins showed the altered expression following the NP treatment. It is suggested that protein expression was repressed by blocking of certain metabolisms at 48 h and induced by the synthesis of new proteins for adaptation at 96 h following NP exposure. This application for 2D/E analysis may show promise in searching biomarkers for environmental proteomics in amphibians.

Key words : 2D/E, Nonylphenol, liver, *Bombina orientalis*

서 론

대량으로 소비되며 잔류성이 높은 환경오염원들에 대한 위해성을 정확히 평가하고 이들 물질의 생산 및 사용에 대한 허용기준치 및 규제 방안을 설정하는 것은 육수환경의 보존과 관리에 매우 중요하다. 환경오염원에 노출된 개체에서 단백질 발현의 변화를 추적하는 일은

환경오염원에 의한 개체의 반응을 추적하고 오염원에 노출 정도를 파악하기 위한 중요한 수단으로 이용된다 (김과 계, 2003). 단백질 변화는 궁극적인 생체 구조와 기능의 변화를 유발하므로 내분비계장애물질 등 다양한 환경 오염원에 노출된 후 특정 조직에서의 단백질 발현 양상의 변화에 대한 연구가 Biomarker 개발을 목적으로 세계적으로 활발하였다 (Blom *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1996). 단백질 발현은 개체의 발생, 조직과 내부 또는 외

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

부의 환경 변화에 따라 변화한다 (Gilbert, 2001). 특정한 시간에 발현된 전체적 단백질의 양상은 병 (disease)과 생리학적 대사회로에 관여하는 중요한 단백질 분자들을 확인하는데 이용되어 왔다 (William and Hochsattler 1997). 즉, proteome 분석은 주로 biomarker 또는 약물의 표적으로써 개개의 단백질을 분리동정 하는데 초점을 맞추고 있다 (Blackstock and Weir, 1999). 이러한 연구들에서 stress의 매우 특별한 표지자 (indicator)를 발견하려는 시도는 환경변화에 의해 감소되거나 증가된 일련의 단백질을 찾는 데 그 목적이 있다 (Culter et al., 1999). 예를 들면 polycyclic aromatic hydrocarbons (PCA), polychlorinated biphenyls (PCB)와 중금속 그리고 삼투압을 포함한 다양한 stressor에 노출시켜 대장균과 암세포주 등에 적용해 왔다 (Jellum et al., 1983; Blom et al 1992; Gonzalez and Bradley, 1994). 2D 전기영동을 이용한 단백질 발현의 변동을 추적함으로써 특별한 stressor들을 확인하고 상위의 효과들 (higher-order effects)과 연계된 기능적 연결고리로 작용하는 주요 단백질의 발현이 가능하게 되었다 (Shepard et al., 2000).

최근 담수환경을 포함한 육상 생태계에서 양서류의 세계적인 감소 추세가 두드러진다 (Blaustein and Wake, 1995; Carey and Bryant, 1995). 양서류는 수정 후 변태에 이르는 생활사 과정을 수환경 내에서 진행할 뿐 아니라 먹이사슬의 중간 소비자로서 오염물질의 생물 농축 효과가 나타날 수 있는 생태적 지위를 갖는다. 따라서 수환경 오염에 매우 민감할 뿐 아니라 수생태계의 건강도를 대변하는 지표로서 유용하다 (Plotner and Gunther, 1987; Lahr, 1997). 현재까지 존재하는 수환경 내 오염물질에 의한 양서류 생태독성에 대한 대부분의 연구는 주로 *Xenopus* 등의 일부 실험 양서류를 대상으로 진행되어 왔으며 FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*) protocol 등이 개발되어 이용되고 있다 (Presutti et al., 1994; Mann and Bidwell, 2000). 한국에 서식하는 양서류를 대상으로 농약의 일종인 benomyl이 유미류인 한국산 도롱뇽 (*Hynobius leechii*) 배아 및 유생의 치사와 기형을 유발한다는 결과가 보고되었다 (최 등, 2002). 그러나 아직까지도 다양한 야생의 양서류를 대상으로 중금속, 유기염소계 농약 등 여러 종류의 수환경 오염물질에 의한 생태독성은 정확히 평가되지 않고 있다. 이러한 원인으로 연구개발 투자의 부족과 함께 이들 물질의 위해성에 대한 적절한 모니터링 수단의 부재, 동물의 지리적 분포를 고려한 접근이 시도되지 않은 이유 등을 들 수 있다.

노닐페놀 (nonylphenol, NP)은 분자자량이 215 Da이며,

산화에틸렌 (ethylene oxide)과 반응시켜 섬유직물의 염색과 가공 등에 광범위하게 사용되며 가정용 진공청소기, 페인트, 살충제, 계면활성제, 합성세제의 원료 등으로 광범위하게 사용된다. NP는 약한 에스트로제닉한 특성을 가지며 내분비계장애 효과를 발휘한다 (Chapin et al., 2000). 현재까지 양서류에서 확인된 NP의 독성효과로는 *Xenopus laevis*의 초기발생 저해 (Bevan et al., 2003), 혼수상태의 유발 (Mann and Bidwell, 2001) 등이 보고되었고 특별히 내분비계장애효과로는 개체수준에서 수컷 혈중 testosterone 수치 증가, gonadotropin과 prolactin 분비 억제효과가 알려졌다 (Mosconi et al., 2002; van Wyk et al., 2003). NP는 breeding gland (nuptial pad) 형태변화 및 vitellogenin 수치를 높이는 등의 자성표현형의 발현을 증가시킨다 (Mosconi et al., 2002; van Wyk et al., 2003). *In vitro* model에서 양서류 간세포에서 estrogen 수용체와 결합할 뿐 아니라 vitellogenin 등의 marker gene의 발현을 증가시키며 transthyretin 및 thyroid hormone receptor beta와 결합하는 특성을 보여 thyroid 작용을 교란하는 등의 내분비계 장애효과를 갖는다 (Lutz and Kloas, 1999; Kloas et al., 1999; Yamauchi et al., 2003). 그러나 현재까지 노닐페놀에 관한 특정 조직에서 단백질 발현의 변화는 대표적인 estrogen biomarker인 vitellogenin 발현의 변화를 제외하고 대량검색 (high throughput screening)을 통한 proteome 분석 및 이를 통한 새로운 biomarker의 개발은 시도되지 않았다.

본 연구는 대표적인 담수환경 내 오염원의 하나로 수서 동물에서 다양한 독성 효과를 갖는 NP가 국내 양서류에 미치는 독성을 평가하고, NP 노출 여부를 판단하기 위한 수단을 개발하고자 하였다. 이를 위해 전국적으로 분포하는 한국산 무당개구리를 모델로 NP 노출에 따른 간 조직 내 단백질 발현의 변화를 2차원 전기영동법으로 분석하였다.

재료 및 방법

1. 동물재료

2002년 10월 경기도 가평군 가평천 일대로부터 한국산 무당개구리 (*Bombina orientalis*)를 채집하였다 (Fig. 1). 채집된 개체는 실험실로 운반하여 18°C의 항온 배양기에서 지렁이를 먹이로 2주간 사육을 통해 순치시켰다. 체중이 비슷한 (10±0.1 g) 수컷을 선발하여 대조군과 실험군 별로 8마리씩 분리하였고 NP 투여 후 각각 다른 cage에 사육하였다.

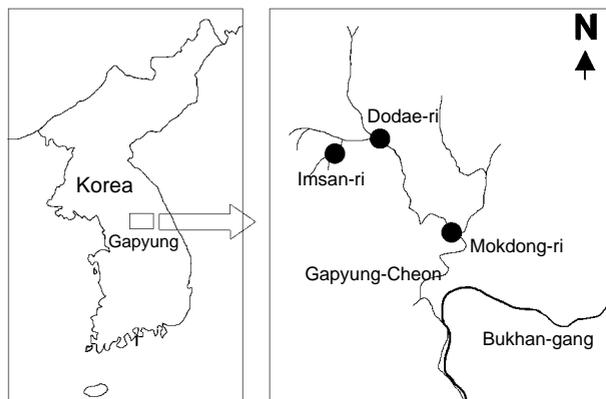


Fig. 1. Map of the sampling site. Adult male *Bombina orientalis* were captured in the sites marked with solid spots.

2. Nonylphenol 투여

100 μ l의 sesame 오일에 NP 100 μ g을 녹여 10 mg/kg 체중 농도로 복강 내로 주사하였다. 대조군은 100 μ l의 sesame oil을 복강 내로 주사하였다.

3. 조직채취 및 단백질 분석

NP 주사 후 48 및 96시간에 간을 절취하여 액체 질소에 동결하고 막자사발을 이용하여 분쇄하였다. 4°C cold lysis buffer (6 M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% carrier ampholytes, 0.4% DTT)를 첨가하여 10분간 진탕한 후 13,000 g, 0°C에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분취하였다. 이차원 전기영동을 위해 단백질을 1 μ g/ μ l 농도로 조절한 후 1차원 등전점 전기영동 (IEF)을 수행하였다. 1차 전기영동을 위해 pH 3~10까지의 17 cm IPG (immobilized pH gradient) strip (Amersham) 위에 단백질을 300 μ g을 전개하였다. 2차원 전기영동은 4~20% acrylamide 농도구배의 gel상에서 SDS-PAGE를 수행하였다 (O'Farrell, 1975; Culter *et al.*, 1999). 영동이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue (CBB)로 염색한 후 탈염색 과정을 거친 후 image analysis system (Vilber Lourmat, France)으로 spots을 동정하였다. 변화된 각각의 단백질 spots은 등전점 (pI)와 분자량 (kDa)을 산출하여 database화하였다.

결과 및 고찰

수컷 무당개구리의 간조직에서 50~60종의 protein

Table 1. The number of induced and repressed protein spots for stressor.

Hours after NP inj.	Specific induction	Specific repression
48	8	12
96	10	8

The number of protein spots found induced (present) and repressed (absent) for stressor (nonylphenol; 10 mg/kg body weight) by time in male relative to control animals held under ambient condition.

Total number of spots on 2D gels ranged from 50 to 60.

Table 2. The estimated pI value and molecular weight (M.W.) of protein spots changed following exposure to nonylphenol in male *B. orientalis*.

Groups	Spot No.	pI value	M.W. (kDa)	Remarks
Repressed spot at 48 h	1	7.9	318	◇ in Fig. 2A
Repressed spot at 48 h	2	4.5	268	"
Repressed spot at 48 h	3	9.2	205	"
Repressed spot at 48 h	4	4.7	192	"
Repressed spot at 48 h	5	5.6	112	"
Repressed spot at 48 h	6	7.8	46	"
Repressed spot at 48 h	7	5.5	44	"
Repressed spot at 48 h	8	7.4	43	"
Repressed spot at 48 h	9	6.4	27	"
Repressed spot at 48 h	10	3.0	23	"
Repressed spot at 48 h	11	4.4	22	"
Repressed spot at 48 h	12	7.4	21	"
Repressed spot at 96 h	1	7.9	318	△ in Fig. 2A
Repressed spot at 96 h	2	9.2	205	"
Repressed spot at 96 h	3	8.5	108	"
Repressed spot at 96 h	4	4.7	42	"
Repressed spot at 96 h	5	7.2	23	"
Repressed spot at 96 h	6	4.4	22	"
Repressed spot at 96 h	7	4.8	14	"
Repressed spot at 96 h	8	9.7	13	"
Induced spot at 48 h	1	9.1	223	○ in Fig. 2B
Induced spot at 48 h	2	8.1	121	"
Induced spot at 48 h	3	5.7	108	"
Induced spot at 48 h	4	4.3	78	"
Induced spot at 48 h	5	5.6	72	"
Induced spot at 48 h	6	6.0	40	"
Induced spot at 48 h	7	6.1	29	"
Induced spot at 48 h	8	6.2	28	"
Induced spot at 96 h	1	6.8	172	□ in Fig. 2C
Induced spot at 96 h	2	6.2	123	"
Induced spot at 96 h	3	7.5	44	"
Induced spot at 96 h	4	7.2	39	"
Induced spot at 96 h	5	6.7	37	"
Induced spot at 96 h	6	7.8	31	"
Induced spot at 96 h	7	7.1	29	"
Induced spot at 96 h	8	6.8	23	"
Induced spot at 96 h	9	6.6	21	"
Induced spot at 96 h	10	8.0	15	"

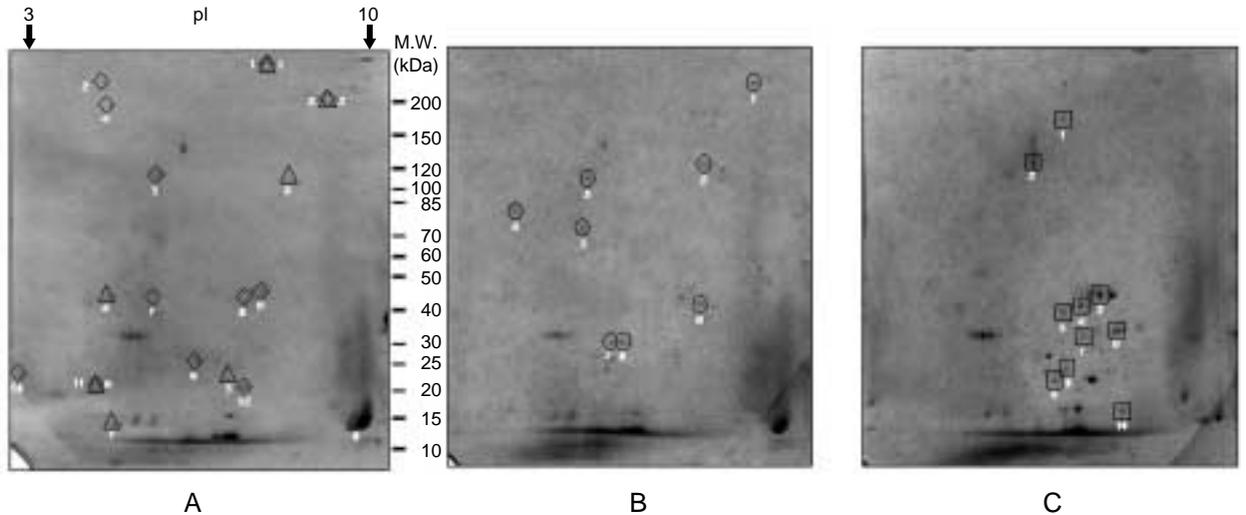


Fig. 2. Two-dimensional gel electrophoresis of whole liver homogenate proteins from male *Bombina orientalis* injected with nonylphenol (10 mg/kg body weight) or vehicle (sesame oil). At 0, 48, and 96 h after single injection of NP the liver tissues were isolated. Major proteins repressed (present in control but absent in NP treated group) are denoted by diamond shape (48 h) and triangle (96 h). Proteins induced (absent in control but present in NP treated group) are denoted with circle (48 h) and squares (96 h). (A) control (100 µl of sesame oil). (B) NP 48 h. (C) NP 96 h.

spots의 발현을 확인하였다. NP를 처리한 2D gel image 상에는 상당한 변화가 관찰되었다. 이 중에서 대조군과 비교하여, NP 투여 48시간 후에는 8개의 spots이 증가된 반면 12개의 spots이 감소되었으며, 96시간 후에는 10개의 spots이 증가되었고 8개의 spots이 감소되었다 (Table 1). NP 투여 후 2D/E gel 상에 양적으로 증가 또는 감소된 단백질을 서로 다른 모양으로 표시하였다 (Table 2 and Fig. 2A-C). 동그라미로 표시된 spots들은 NP 투여 48시간 후 2D/E gel 상에서 확인되지만 대조군에는 없는, 즉 NP에 의해 발현이 유도 (induced)된 단백질 spots을 나타낸다. 네모로 표시된 단백질 spots들은 NP 투여 96시간 후 gel 상에서 확인되지만 대조군에는 없는 단백질을 나타내며 역시 NP에 의해 유도된 단백질이다. 반면, 다이아몬드로 표시된 단백질 spots들은 대조군에는 확인되지만 NP 투여 48시간 후 gel 상에는 확인되지 않아 NP에 의해 발현이 감소 또는 억제된 단백질 spots를 나타낸다. 세모로 표시된 단백질 spots은 대조군에서는 확인되지만 NP 투여 96시간 후 gel 상에서 확인되지 않아 NP에 의해 발현이 감소 또는 억제된 단백질 spots들을 나타낸다. NP 투여 후 48시간에서는 증가된 단백질 spots 보다는 감소된 단백질 spots이 더 많았다. 이는 간에서 일어나는 단백질 합성 및 대사 활성이 NP에 의해 일시적으로 저해됨을 추측할 수 있다. 반면, NP 투여 후 96시간에는 감소된 단백질 spots

수 보다 증가된 단백질 spots 수가 더 많았다. 이 증가된 단백질은 NP에 대한 저항성 또는 독성 저감에 필요한 단백질로 추측되며 NP의 영향을 확인할 수 있는 biomarker 후보로 발굴할 가능성이 높다. 단백질의 수 (종류)적인 측면 뿐 아니라 전체 단백질의 밀도를 계산하면 양적인 측면에서도 NP 투여 후 96시간 후에는 증가하는 것으로 나타나 NP 투여 후 간조직에서 단백질 생산이 일시적으로 감소한 후 다시 새로운 단백질의 생성이 유도되는 것으로 추정된다. 전체적으로는 NP에 의해 무당개구리 간조직 내에 약 20%의 단백질 변화가 확인되어 상당한 양적 변화가 있음을 의미한다. 기본적으로 단백질 합성 자체가 전사 및 번역 후 단계에서 다양한 조절 하에 놓여 있으므로 NP에 따른 단백질 합성 및 안정성 등 동태 및 기작에 관한 연구는 매우 흥미 있는 연구가 될 것이다.

본 연구에서 사용한 NP의 투여량과 관련하여 발생중인 양서류 배아 및 포유동물의 성체의 조직을 대상으로 한 선행 연구들에서는 NP의 estrogenic activity에 관련된 반응이 표현되기 위해 필요한 최소한의 농도는 구강 주입의 경우 약 $40 \text{ mg}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (Chapin *et al.*, 1999), 복강 주사는 최소 약 $18 \text{ mg}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 으로 측정된 바 있다 (Lee and Lee, 1996). *Bufo marinus*, *Xenopus laevis*, *Crinia insignifera*, *Heleioporus eyrei*, *Limnodynastes dorsalis*, *Litoria moorei* 유생에서 확인된 바에 따르면

48시간에서 계면활성제의 일종인 nonylphenol-ethoxylate (NPE)에 대한 EC₅₀ 값은 1.1 mg/l로 약한 혼수상태 (narcosis)를 유발하고 12.1 mg/l 농도에서는 강한 혼수상태를 유발한다 (Mann and Bidwell, 2001). 본 연구결과 체중 약 10g의 수컷 무당개구리에게 10 mg/kg 체중 농도의 NP 투여시 혼수상태는 확인되지 않았으나 육안 관찰 시 표피의 분비물이 증가하여 스트레스에 대한 반응이 유도되고 있음을 알 수 있었다 (data not presented). 그러나 간에서는 뚜렷한 단백질 발현의 변화가 유도되는 것이 2D/E를 통해 확인되므로 단백질 수준의 분석이 훨씬 더 민감한 변화의 지표로 이용될 수 있음을 알 수 있다.

본 연구에서는 2D/E 분석 이후 MALDI-TOF 또는 SELDI-TOF에 의한 단백질 분자구조 분석기술 및 이들을 지원하는 생물정보학 (bioinformatics)을 이용을 고려하여 CBB 염색을 시행하였기 때문에 비교적 적은 수의 단백질 spots에 대한 정보만을 획득하였다. 도은 염색을 시행할 경우 본 실험에서 확인된 것 보다 10~30 배 더 많은 단백질 spots을 확인할 수 있지만 전체적인 단백질 변화의 동태는 CBB 염색 결과와 일치할 것으로 예상된다. 착염색을 통해 나타날 수 있는 단백질의 spot들을 대상으로도 MALDI-TOF나 SELDI-TOF를 통해 단백질 동정이 가능하지만 단백질 양의 검출 오차 범위가 대폭 증가하는 단점이 있다. 따라서 CBB 염색 상태의 protein spot들을 대상으로 biomarker를 개발하는 노력이 실질적이다. 변화된 각각의 단백질은 pI값과 분자량은 database 자료화하였고 이 자료는 향후 무당개구리를 모델로 하는 환경프로테오믹스의 연구에서 단백질 동정에 이용할 수 있을 것이다. 차 후 다양한 수환경 오염원에 일어나는 변화에 대한 proteome 연구를 통해 수환경 오염을 추적할 수 있는 양서류 biomarker 개발이 가능할 것이다.

적 요

내분비계장애물질 (환경호르몬)의 일종인 노닐페놀 (nonylphenol, NP)에 의한 수서 환경 내 생태독성 평가의 일환으로 한국에 서식하는 무당개구리 (*Bombina orientalis*) 수컷에서 NP에 의한 간조직 내 발현 단백질의 변화를 추적하였다. 체중 10±0.1 g의 수컷 무당개구리에 NP를 10 mg/kg 농도로 복강 주사한 후 48 및 96시간 후에 간을 절취 한 뒤 마쇄하여 2차원 전기영동을 수행하였다. Coomassie brilliant blue로 염색한 gel 상에

서 전체적으로 50~60개 정도의 protein spots을 확인할 수 있었으며 단백질 spots의 변화를 비교 분석한 결과 NP 처리 48시간 후 8개의 spots이 증가한 반면 12개의 spots이 감소하였다. 96시간 후에는 10개의 spots이 증가되었고 8개의 spots이 감소하였다. 전체적으로는 약 20% 정도의 단백질의 변화가 있었다. 단백질 발현의 동태는 투여 후 2일까지는 단백질 생산이 일시적으로 감소하지만 다시 새로운 단백질을 생성하는 것으로 사료된다. NP 노출에 따른 무당개구리 간조직 내 단백질 발현의 변화는 한국의 수서환경에서 내분비계 장애물질의 위해성 평가에 요구되는 단백질 biomarker의 개발에 이용 할 수 있을 것이다.

사 사

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

인 용 문 헌

- 김호승, 계명찬. 2003. 프로테오믹스를 이용한 내분비계교란물질 환경독성 연구. 환경생물학회지 **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.
- Bevan, C.L., D.M. Porter, A. Prasad, M.J. Howard and L.P. Henderson. 2003. Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis*. *Environ. Health Perspect.* **111**: 88-96.
- Blackstock, W.P. and M.P. Weir. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends. Biotechnol.* **17**: 121-127.
- Blom, A., W. Harder and A. Matin. 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 331-4.
- Blaustein, A.R. and D.B. Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Sci. Am.* **272**: 52-57.
- Bradley, B.P., D.C. Brown, T.N. Lamonte, S.M. Boyd and M.C. O'Neill. 1996. Protein patterns and toxicity identification. pp.79-94. *In: Aquatic Toxicology and Risk Assessment* (Henschel, D. and D. Bengston, eds.) ASTM, Philadelphia.
- Carey, C. and C.J. Bryant. 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian develop-

- ment, and decline of amphibian populations. *Environ. Health Perspect.* **103** Suppl. 4: 13–17.
- Chapin, R.E., J. Delaney, Y. Wang, L. Lanning, B. Davis, B. Collins, N. Mintz and G. Wolfe. 1999. The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicol. Sci.* **52**: 80–91.
- Cutler, P., D.J. Bell, H.C. Birrell, J.C. Connelly, S.C. Connor, E. Holmes, B.C. Mitchell, S.Y. Monte, B.A. Neville, R. Pickford, S. Polley, K. Schneider and J.M. Skehel. 1999. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis* **20**: 3647–3658.
- Cutler, P., H. Birrell, M. Haran, W. Man, B. Neville, S. Rosier, M. Skehel and I. White. 1999. Proteomics in pharmaceutical research and development. *Biochem. Soc. Trans.* **27**: 555–559.
- Gilbert, S.F. 2001. Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world. *Dev. Biol.* **233**: 1–12.
- Gonzalez, C.R.M. and B.P. Bradley. 1994. Salinity stress proteins in *Eurytemora affinis*. *Hydrobiologia* **292/293**: 462–468.
- Jellum, E., A.K. Thorsrud and F.W. Karasek. 1983. Two-dimensional electrophoresis for determining toxicity of environmental substances. *Anal. Chem.* **55**: 2340–2344.
- 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.
- 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, P.C. and W. Lee. 1996. In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**: 341–348.
- 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, R.M. and J.R. 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, R.M. and J.R. Bidwell. 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environ. Pollut.* **114**: 195–205.
- Mosconi, G., O. Carnevali, M.F. Franzoni, E. Cottone, I. Lutz, W. Kloas, K. Yamamoto, S. Kikuyama and A.M. Polzonetti-Magni. 2002. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* **126**: 125–129.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007–4021.
- 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.
- Shepard, J.L., B. Olsson, M. Tedengren and B.P. Bradley. 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar. Environ. Res.* **50**: 337–340.
- van Wyk, J.H., E.J. Pool and A.J. 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.
- William, K.L. and D.F. Hochstrasser. 1997. Introduction to the proteome. pp. 1–30. *In: Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics* (Wilkins, M.R., K.L. Williams, R.D. Appel and D.F. Hochstrasser, eds.) Springer-Verlag, Berlin.
- 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.

(Manuscript received 10 May 2003,
Revision accepted 10 August 2003)