

송사리수정란을 이용한 납의 내분비계장애에 관한 연구

박광식* · 최필선 · 이상협 · 이철우 · 류지성 · 최성수 · 류홍일 · 최덕일
국립환경연구원 환경위해성연구부

Endocrine Disrupting Effects of Lead on the Ontogeny of *Oryzias Latipes*

Kwang Sik Park*, Pil Son Choi, Sang Hyeop Lee, Chul Woo Lee, Ji Sung Rhu,
Sung-su Choi, Hong Il Rhu and Doug Il Choi

Department of Environmental Risk Research, National Institute of Environmental
Research, 613-2, Bulkwang-dong, Eunpyung-gu, Seoul, 122-040, Korea

(Received July 10, 1998)

(Accepted August 20, 1998)

ABSTRACT : Endocrine disruptor is an exogenous substance that changes endocrine function and causes adverse effects at the level of the organism, its progeny, and/or (sub)populations of the organisms. Purported adverse effects are cancers, declines in reproductive health, developmental learning disabilities in humans, and declining populations, altered morphology, physiology or behavior in wildlife. In these days, expert groups on chemicals in IPCS, IFCS and OECD are intensively discussing the identification of endocrine disruptors and the proper management of those chemicals. In this study, we screened the endocrine disrupting effects of lead using fertilized eggs of *Oryzias latipes*. In brief, the eggs were exposed to lead with different concentrations at Ringer's solution, and the mortality, the incidence of deformation, the body movement and the hatching success were determined after incubation. The histological analysis of normal and deformed larvae was also carried out. Compared to control, the mortality and the heart rate of eggs and/or larvae increased, but the hatching success and the tail movement decreased. The morphological observation showed the asymmetrical deformation of larvae and the distortion of spinal cord. The absorption of the liquid in yolk sac was hindered. The adverse effects of lead in the ontogeny of fertilized eggs of *Oryzias latipes* seemed to be stronger in pH 5.6 than in pH 7.5 solution. In summary, lead showed adverse effects on the ontogeny of fish fertilized eggs and plays critical role in regulating biological systems and controlling developmental processes as an endocrine disruptor.

Key Words : Endocrine disruptor, Lead, Ontogeny, *Oryzias latipes*

I. 서 론

일반적으로 내분비계장애물질(Endocrine Disruptor)이란 생체항상성과 발생에 중요한 역할을 하는 체내 호르몬의 합성, 저장, 방출, 이동, 대사, 결합 및 작용을 방해하는 외인성물질을 말한다.(Kavlock 등, 1996). 이들 물질은 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 화학물질로서 환경 중 배출된 화학물질이 체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용한다고 하여 일본에서는 환경호르몬으로 불리기도 하며 이들 물질에 대한 적절한 평

가와 관리대책마련 없이는 인간을 포함한 전세계 생물종에 위협을 줄 수 있다는 경고로 인하여 최근 국제적으로 높은 관심을 불러 일으키고 있다(Colborn 등, 1997). 내분비계장애물질은 가소제, 플라스틱용 화학물질, 농약, 음식물 첨가제, 천연에 존재하거나 호르몬과 구조가 유사한 합성물질 또는 중금속류 등이 포함될 수 있으며, 미국 EPA, 일본후생성(NIHS), 세계생태보전기금(WWF) 등에서는 각각 내분비계장애물질을 목록화하고 있다. 현재 OECD 화학물질관리그룹, EPA EDSTAC 등을 중심으로 내분비계장애물질에 대해 국제적으로 조화로운 시험방법을 개발하고자 노력중이며 저농도 만성노출에 의한 내분비계 악영향에 대한

*To whom correspondence should be addressed.

위해성평가와 적절한 관리방안에 대한 국제적 논의가 활발히 진행되고 있다.

화학물질에 의한 야생동물의 피해영향사례로는 Great Lake 지역의 펄프공장에서부터 방류된 폐수에 의해 생식선 무게 및 생식호르몬 수준이 저하된 물고기(와(Van Der Kraak 등, 1992; Herbst 등, 1971; Gill 등, 1979) 1980년대 초 DDT류의 농약이 다량 유출된 미국 Florida 호수에서 생식기의 크기가 비정상적으로 작은 수컷악어가 다량으로 발견된 것 등이 그 좋은 사례라 할 수 있다(Guillette 등, 1994; Guillette 등, 1995a). 일반적으로 내분비계장애현상은 주로 성호르몬과 관련되어 언급되고 있지만 그외에도 PCB등의 물질들은 갑상선호르몬의 작용에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, PCB가 포함된 모유를 먹은 유아의 학습장애가 보고되기도 하였다(Jacobson 등, 1990). 인간에 나타나는 대표적인 피해영향 사례로는 합성 estrogen인 diethylstilbestrol을 복용한 여성으로부터 출생한 자녀의 생식기이상 및 생리이상을 들 수 있다.

납(Pb)을 포함한 카드뮴, 수은 등의 중금속은 세계생태보전기구의 목록과 일본후생성의 내분비장애추정물질목록에도 포함되어 있으며 세포막에서 호르몬과 수용체의 결합 후 일어나는 칼슘(Ca^{2+})이온 의존성 세포내 신호전달의 변형 등의 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Dave 등, 1991; Cooper 등, 1987). 본 연구에서는 납을 포배기 단계의 개량송사리 수정란에 농도별로 처리하고 수정란의 부화, 치어의 기형 등 발생에 미치는 영향과 이때 기형어의 조직학적 관찰, 그리고 치사율, 심장박동율 및 꼬리운동성 관찰을 수행함으로써 납이 송사리수정란의 초기 발생과정에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질로는 $Pb(NO_3)_2$ 를 사용하였으며 일본의 Junsei Chemical Co.에서 구입하였다.

2. 시험종 및 사육조건

본 실험에 사용된 개량송사리(Japanese Medaka; *Oryzias latipes*)는 국립환경연구원 환경유해성실험실 사육실에서 사육하였으며 $60 \times 40 \times 40$ cm 크기의 수조에서 $25 \pm 1^\circ C$, pH 7.0~7.7, DO 7~8 mg/l 및 16시간 광주기조건으로 6개월 이상 성장한 건강한 것만을 골

라 실험에 이용하였다. 먹이로는 Tetra Bits(Tetra, Germany) 및 brine shrimp의 유생을 1일 1회 충분히 공급하였다. 6개월이 지난 암컷으로부터 수정란을 매일 채란하였으며, 이중 해부현미경하에서 포배기단계의 수정란만을 취하여 실험에 사용하였다.

3. 수정란배양

포배기단계의 수정란을 Ringer's solution(KCl 0.20 g/l, $NaHCO_3$ 0.02 g/l, $NaCl$ 7.50 g/l 및 $CaCl_2$ 0.20 g/l)에서 배양하였다. 플라스틱 페트리디쉬에 5ml의 배양액을 넣었으며 배양액은 24시간 간격으로 교환하였다. 배양은 $25 \pm 1^\circ C$ 및 16시간 광주기 조건으로 수행하였다.

4. 시험물질 조제 및 노출방법

플라스틱 페트리디쉬에 배양중인 수정란을 $Pb(NO_3)_2$ 가 용해된 Ringer's solution으로 배양하였으며 Pb로서 최종농도가 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8 $\mu mol/l$ 되도록 하였다. pH 변화에 따른 납의 내분비계장애효과를 비교하기 위해 배양배지의 pH를 0.01 M sulphuric acid와 0.01 M hydrogencarbonate를 이용하여 5.6 및 7.5로 조정하고 비교실험하였다. pH 측정은 pH meter(Model 720A, Orion)를 사용하였다.

5. 관찰항목

1) 부화율

부화율은 배양 8일 후부터 15일째에 이르기까지 1일 간격으로 부화된 치어의 수를 측정하므로 결정하였으며, 이때 부화기준은 배의 꼬리부분이 장막을 뚫고 나왔을 때로 하였다.

2) 심장박동율과 꼬리운동성

배양 8일 후에 부화직전의 배에서 1분당 심장박동수와 꼬리움직임을 측정하였다.

3) 치사율 및 기형발생율

수정란의 치사율은 배양후 1일 간격으로 측정하였으며 반투명이거나 흰색으로 변하였을 때 치사한 것으로 판단하였다. 치어의 치사율 및 기형어발생 정도는 부화 후 1일 간격으로 15일 동안 관찰하였다. 치사판정의 기준은 치어의 심장박동이 멈춘 상태로 하였고, 기형은 휘어진 척추와 흡수되지 않은 난황을 기준으로 하였다. 배양중 치사어는 발견되는대로 제거하였다.

4) 병리조직관찰

배양 후 8일부터 15일까지 부화된 치어를 대조군과 처리군으로 각각 정상과 기형을 선별하여 FAA(10% formaldehyde, 5% glacial acetic acid, 35% ethyl alcohol)에 24시간 이상 고정하였다. 고정된 시료는 부탄올 시리즈로 탈수하여 파라핀포매하였다. 조직절편은 약 5 μm 두께로 연속절편을 만들어 0.5% hematoxylin과 1% eosin으로 염색한 후 광학 현미경하에서 관찰하였다.

이상의 모든 각 실험은 15개의 포배기상태의 수정란을 한 단위로 하여 3반복하였다.

III. 결과 및 고찰

1) 부화율

개량송사리로부터 포배기의 수정란을 채란하여 사육수로 배양하였다. 배양 1일 후에 두부체질(myotomes stage)이 형성되었으며, 2~4일 후에는 눈의 형태 및 두부의 모양이 뚜렷해지면서 배의 형태를 갖추었다. 약 5~6일 후에는 심실과 심방이 형성되어 심장박동이 시작되었고, 눈과 몸에 색소가 뚜렷해지기 시작하였다. 7~8일 후에는 부화직전의 성숙한 배가 형성되었으며, 9일 후부터는 배의 꼬리부분이 먼저 장막을 뚫고 부화되기 시작하여 15일 정도에 모두 치어로 발생되었다. 배양 9일째부터 매일 부화율을 조사한 결과 9일째에는 대조군과 저농도(0.1~0.2 μmol/l Pb) 처리군에서부터 부화하기 시작하였으나, 고농도(0.8 μmol/l Pb) 처리군에서는 1~2일 늦게 부화하기 시작했다. Fig. 1과 2에서 보는 바와 같이 배양 15일 후에 대조군에서는 모두

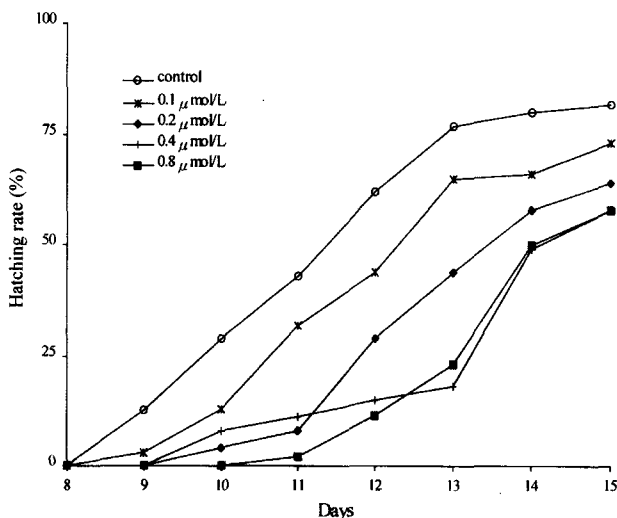


Fig. 1. Hatching success of *Oryzias latipes* fertilized eggs treated with $Pb(NO_3)_2$ at pH 7.5.

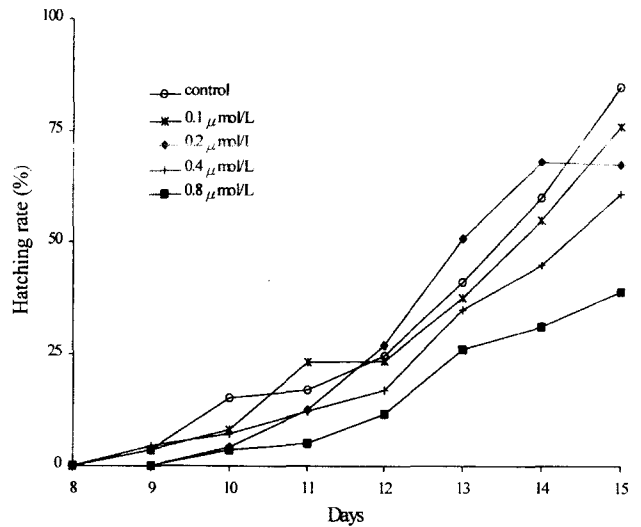


Fig. 2. Hatching success of *Oryzias latipes* fertilized eggs treated with $Pb(NO_3)_2$ at pH 5.6.

80% 이상의 부화율을 보인 반면 납처리군에서는 납의 농도가 증가함에 따라 부화율이 감소하였다. 이러한 결과는 배양액 속에 Pb^{2+} 이온이 수정란 장막에 결합함으로써 수정란 발생과정에 필요한 Ca^{2+} 이온공급이 차단되었거나(Reader 등, 1989; Bansal 등, 1985), 외막분해효소(chorionase)가 활성이 감소되었기 때문으로 생각된다(Hagenmayer, 1974).

2) 심장박동율과 꼬리운동성

배양 후 8일째 부화직전의 발생송사리에 대해 심장박동율과 꼬리운동성을 측정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 1분간 심장박동수는 납의 농도가 증가함에 따라 증가하였으며 pH 7.5에서는 141.3에서 151.1로, pH 5.6에서는 140.5에서 156.7로 증가하였다. 꼬리운동성은 심장박동율과는 반대로 두 pH 조건에서 모두 납의 농도가 증가할수록 약간씩 감소하는 경향을 보였으나 이 역시 pH에 따른 차이는 보이지 않았다 (Table 1).

Table 1. Heart Rate and Tail Movement of *Oryzias Latipes* Larvae Treated with $Pb(NO_3)_2$

[Pb] μmol/L	Heart Rate (beats/min)		Tail movements (beats/min)	
	pH 7.5	pH 5.6	pH 7.5	pH 5.6
Control	141.3±8.7	140.5±5.3	10.5±0.7	9.7±1.8
0.1	147.9±4.9	143.6±9.9	9.7±2.1	8.7±2.5
0.2	147.3±5.5	149.3±9.9	9.3±2.8	8.3±1.5
0.4	148.8±5.2	151.9±11.0	9.4±3.3	8.1±2.9
0.8	151.1±5.7	156.7±14.5	8.7±3.7	8.1±2.4

^aHeart rate and tail movement were measured 8 days after $Pb(NO_3)_2$ treatment.

^bMean ± S.E.

3) 치사율 및 기형발생율

배양 후 15일째에 수정란과 치어의 치사율을 조사한 결과, 수정란과 치어 공히 낱의 농도가 증가함에 따라 치사율이 점차 증가하였다(Table 2). 특히 pH 5.6에서 0.8 $\mu\text{mol/l}$ 의 낱을 처리한 군은 다른 처리군에서 보다 가장 높은 치사율(수정란 : 25.1%, 치어 : 34.1%)을 나타내었으며 또한 기형어 발생빈도를 관찰한 결과 낱의 농도가 증가할수록 기형어발생이 증가하여 pH 5.6의 0.8 $\mu\text{mol/l}$ Pb 처리군에서는 100%의 기형어발생율을 나타내었다(Table 3). pH 7.5에서 보다 pH 5.6에서 치사율과 기형어발생율이 높게 나타났다. 기형의 형태로는 척추변형어(Fig. 3b-3e)와 난황미흡수어(Fig. 3f) 두 가지로 나타났는데 척추변형의 경우 등 또는 몸전체가 휘어지거나 뒤틀려 있었다. 이는 초기발달단계에 있어서 낱이 정상적인 뼈형성에 장애를 일으켰기 때문으로 추정된다. 일반적으로 사람에게 있어서 정상적인 뼈형성에 필요한 Ca^{2+} 이온은 vitamin D와 내분비계에 의해 항상성이 조절되는데, 낱 등 중금속은 이러한 vitamin D의 작용을 방해하거나 칼슘대사에 관여하는 호르몬계를 교란함으로써 세포성장 및 뼈의 발달을 저해할 가능성이 있는 것으로 알려져 있다(Goyer, 1996). 이러한 기형어의 행동은 정상어에 비해 움직임이 없거

Table 2. Mortality of *Oryzias Latipes* Eggs and Larvae Treated with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

[Pb] $\mu\text{mol/L}$	^a Mortality of Eggs (%)		^a Mortality of Larvae (%)	
	pH 7.5	pH 5.6	pH 7.5	pH 5.6
Control	^b 5.3 \pm 5.3	9.4 \pm 4.9	4.2 \pm 4.2	0.0 \pm 0.0
0.1	7.3 \pm 4.7	13.7 \pm 0.7	7.6 \pm 5.9	9.6 \pm 3.4
0.2	8.0 \pm 8.0	16.9 \pm 5.2	6.9 \pm 5.3	14.7 \pm 5.0
0.4	14.1 \pm 7.8	14.7 \pm 14.7	12.8 \pm 5.4	20.1 \pm 6.7
0.8	20.7 \pm 13.7	25.1 \pm 13.8	11.1 \pm 4.2	34.1 \pm 3.7

^aMortality was measured for 15 days after $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment.
^bMean \pm S.E.

Table 3. Deformity of *Oryzias Latipes* Larvae Treated with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

[Pb] $\mu\text{mol/L}$	^a Deformation (%) of Larvae	
	pH 7.5	pH 5.6
Control	^b 2.5 \pm 2.5	12.9 \pm 0.4
0.1	32.0 \pm 1.0	54.2 \pm 0.8
0.2	56.2 \pm 8.8	81.7 \pm 1.7
0.4	75.8 \pm 9.2	100.0 \pm 0.0
0.8	92.9 \pm 7.2	100.0 \pm 0.0

^aDeformity was measured 15 days after $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment.
^bMean \pm S.E.

나 한지점에서 원을 그리는 등 불규칙한 행위를 나타내었다.

일반적으로 낮은 pH에서 낱의 독성이 높게 나타나

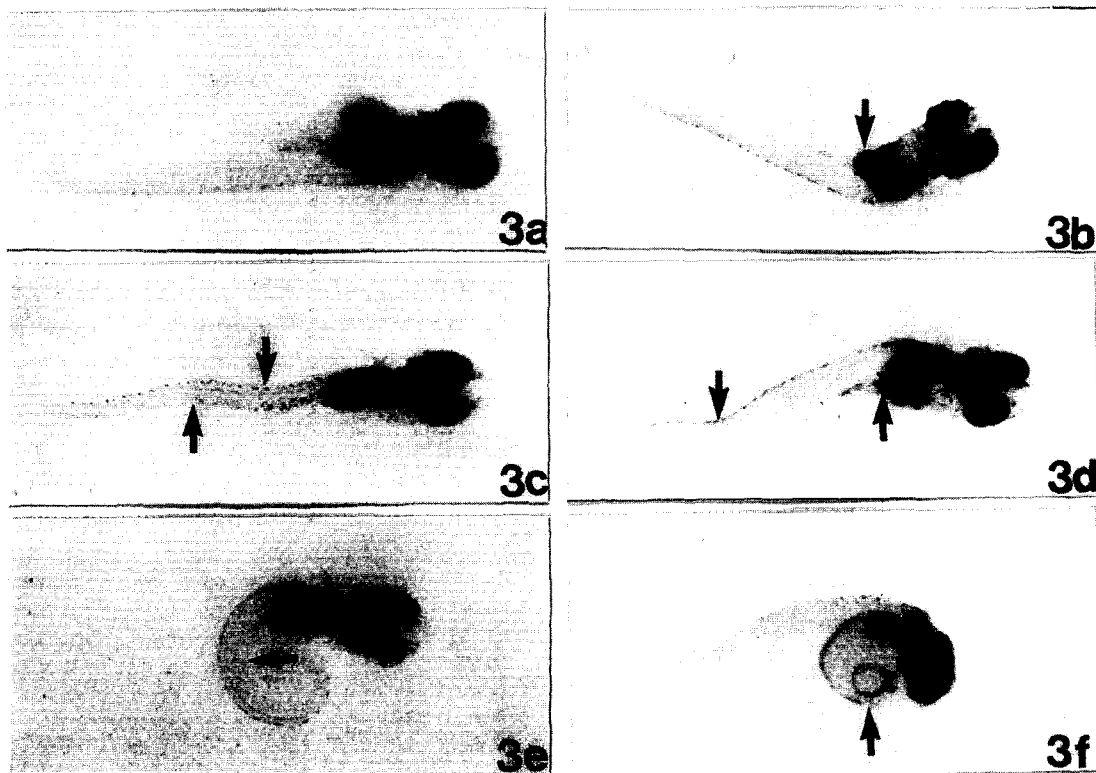


Fig. 3. Deformation of *Oryzias latipes* larvae treated with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0.8 $\mu\text{mol/L}$ as Pb) at pH 5.6 for 15 days. 3a: untreated larvae ($\times 12$), 3b-3f: treated larvae ($\times 12$).

는 원인으로서는 pH 6 이하에서는 첨가된 납의 99% 이상이 생물체에 이용가능한 Pb^{2+} 이온형태로 존재하기 때문에(Turner 등, 1981; McComish 등, 1988) Pb^{2+} 이온이 수정란의 장막과 배의 세포막을 구성하고 있는 산성단백질과 쉽게 결합할 수 있고(Peterson 등, 1986), 난황액은 대부분 음이온 콜로이드물질로 구성되어 있어서 장막외부에 존재하는 양이온인 Pb^{2+} 가 막의 수동 수송과정에 의해 쉽게 수정란내부로 들어갈 수 있어(Eddy 등, 1985) 수정란과 치어에 보다 쉽게 영향을 미치는 것으로 사료된다.

4) 병리조직관찰

난황액이 흡수되지 않은 기형어를 대상으로 조직학적 관찰을 하였을 때 Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 난황막내부에 많은 단백질이 응집되어 배로 흡수되지 못하고 그대로 난황막내부에 존재하고 있는 것을 볼 수 있었으며, 소화기관이나 간 등의 기관은 난황의 압력을 받아 찌그러진 모양을 보였다. 이는 Stouthart 등(1996)이 $0.8 \mu\text{mol/l}$ Cu용액(pH 6.3)에서 잉어수정란을 발생시켰을 때와 마찬가지로 결과였다. 또한 부레의 크기는 대조군에 비하여 훨씬 작아져서 하나의 커다란 대식세포처럼 보여지기도 하였다.

결론적으로 송사리수정란을 이용하여 납의 내분비계장애효과를 관찰하기 위하여 납을 0.1, 0.2, 0.4 및 $0.8 \mu\text{mol/l}$ 농도로 처리하고 치사율, 부화율, 심장박동율, 꼬리운동성, 기형발생에 대해 시험하고 조직학적 관찰을 실시한 결과 부화율 및 꼬리운동성은 감소하였으며, 심장박동율, 치사율 및 기형발생빈도는 증가함이 관찰되었다. 이러한 결과로 보아 납은 송사리 수정란

의 발생에 관여하는 내분비계를 교란시키는 것으로 보이며 보다 명확한 교란작용의 이해를 위해서는 향후 납의 급성 및 만성노출에 의한 성호르몬 수준, vitellogenin 유도, 번식행위, 체색의 변화, 천 산란시각의 변화 및 정소, 난소의 병변 등 생식기관의 조직병리학적 조사를 수행할 필요가 있을 것이다.

참고문헌

- Bansal, S.K., Murthy, R.C. and Chandra, S.V. (1985): The effect of some divalent metals on cardiac and branchial Ca^{2+} -ATPase in a fresh water fish *Saccobranchus fossilis*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **9**, 373-377.
- Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J.P. (1997): *Our Stolen Future, Are We Threatening Our Fertility, Interlligence, and Survival?* Plume, N.Y.
- Cooper, R.L., Goldman, J.M., Rehnberg, G.L., McElroy, W.K. and Hein, J.F. (1987): Effects of metal cations on pituitary hormone secretions in vitro, *J. Biochem. Toxicol.*, **2**, 241-249.
- Dave, G. and Xiu, R. (1991): Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 126-134.
- Eddy, F.B. and Talbot, C. (1985): Sodium balance in eggs and dechlorinated embryos of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) exposed to zinc aluminium and acid waters, *Comp. Biochem. Physiol.*, **81C**, 259-266.
- Gill, W.H., Schumacher, F.B., Bibbo, M., Straus, F.H. and Schoenberg, H.W. (1979): Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism,

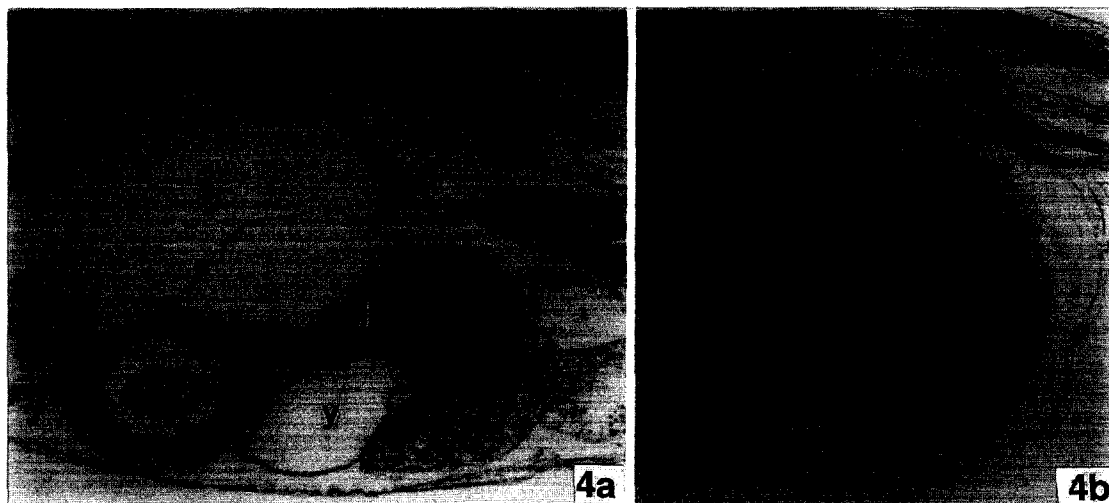


Fig. 4. Thin section of yolk sac of *Oryzias latipes* larvae treated with $Pb(NO_3)_2$ ($0.8 \mu\text{mol/L}$ as Pb) at pH 5.6 for 15 days. 4a: untreated larvae ($\times 200$), 4b: treated yolk sac ($\times 200$). i: intestine, l: liver, s: swim bladder, y: yolk sac.

- testicular hypoplasia and semen abnormalities, *J. Urol.*, **122**, 36-39.
- Goyer, R.A. (1996): Toxic effects on metals in *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Klaassen, C.D. ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 691-736.
- Guillette, L.J.Jr., Gross, T.S., Gross, D.A., Rooney, A. A. and Percival, H.F. (1995a): Gonadal steroidogenesis *in vitro* from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes, *Environ. Health Perspect.*, **103**(Suppl 4), 31-36.
- Guillette, L.J.Jr., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F. and Woodward, A.R. (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida, *Environ. Health Perspect.*, **102**, 680-688.
- Hagenmayer, H.E. (1974): The hatching process of fish embryos-IV, the enzymological properties of a highly purified enzyme(chorionase) from the hatching fluid of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., *Comp. Biochem. Physiol.*, **49B**, 313-324.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H. and Poskanzer, D.C. (1971): Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal diethylstilbestrol therapy with tumor appearance in young women, *N. Engl. J. Med.*, **284**, 878-881.
- Jacobson, J.L., Jacobson, S.W. and Humphrey, H.B. (1990): Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children, *Neurotoxicol. Teratol.*, **12**, 319-326.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T. and Tilson, H.A. (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop, *Environ. Health Perspect.*, **104**(Suppl 4), 715-740.
- McComish, M.F. and Ong, J.H. (1988): Trace metals in *Environmental Inorganic Chemistry* (Bodek, I., Lyman, W.J., Reehl, W.F. and Rosenblatt, D.H. Ed.), Pergamon, New York.
- Peterson, R.H. and Martin-Robichaud, D.J. (1986): Perivitelline and vitelline potentials in teleost eggs as influenced by ambient ionic strength, natal salinity, and electrolyte; and the influence of these potentials on cadmium dynamics within the egg, *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **43**, 1445-1450.
- Reader, J.P., Everall, N.C., Sayer, M.D.J. and Morris, R. (1989): The effects of eight trace metals in acid soft water on survival, mineral uptake and skeletal calcium deposition in yolk-sac fry of brown trout, *Salmo trutta* L., *J. Fish Biol.*, **35**, 187-198.
- Stouthart, A.J.H.X., Haans, J.L.M., Lock, R.A.C. and Wendelaar Bonga, S.E. (1996): Effects of water pH on copper toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*), *Environ. Toxic. Chem.*, **15**, 376-383.
- Turner, D.R., Whitefield, M. and Dickson, A.G. (1981): The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 25°C and 1 atm, *Geochem. Cosmochim. Acta.*, **45**, 855-881.
- Van Der Kraak, G.J., Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B. and Chang, J.P. (1992): Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of the white sucker at multiple sites, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **115**, 224-233.