

어류생체지표를 이용한 내분비계장애 연구

구자민, 류지성, 정규혁¹, 이철우, 박응로, 박광식*

인천광역시 서구 경서동 환경연구단지내 국립환경연구원 환경위해성연구부,
¹성균관대학교 약학부

Studies on the Endocrine Disruption in Wildlife Fish

Jamin Koo, Jisung Ryu, Kyuhyuck Chung¹, Chulwoo Lee,
Eung-Roh Park and Kwangsik Park*

National Institute of Environmental Research, Gyeongseo-dong, Seo-gu, Incheon 404-170, Korea

¹College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Chunchun-dong 300, Jangan-gu, Suwon,
Gyeonggido 440-746, Korea

ABSTRACT

Endocrine disruption in crucian carp (*Carassius auratus*) living in the branch of Han River were examined. Vitellogenin level in plasma was measured using ELISA system and aromatase mRNA level in brain was observed using RT-PCR technique. In all female fish, vitellogenin levels were in the range of 20~40 µg/ml and aromatase mRNA expression could be detected on the agarose gel after RT-PCR. However, in case of males, vitellogenin level was elevated in only one fish, while vitellogenin was hardly detected in others. Aromatase was expressed in all males although the levels were relatively lower than the level in female fish. Testis-ova and any other histological changes of reproductive organ were not shown in both sexes.

Key words : Vitellogenin, Aromatase, RT-PCR, Crucian carp

서 론

외부물질에 의한 호르몬유사 작용의 사례가 최근들어 광범위하게 보고되고 있으며, 이러한 현상은 연구자들에게 뿐만 아니라 일반대중들에게도 큰 관심사로 떠오르고 있다. 최근 영국과 미국에서는 펄프공장의 폐수가 생태계에 방출되어 하천에서 서식하는 수컷어류의 혈장내 비텔로제닌수준을 상승시키는 것으로 보고된 바 있으며¹⁻⁴⁾ 이러한 현상을 총체적으로 내분비계장애현상, 이를

유발하는 물질을 내분비계장애물질이라 부르고 있다. 내분비계장애물질에 대한 확인과 평가는 *in vivo* 및 *in vitro* 두 가지 방법으로 연구되고 있다. *In vivo* 방법은 미성숙 암컷 렛트에서 자궁증식을 측정하는 방법과 vaginal cell cornification 방법 등이 있으며,⁵⁾ 어류를 이용한 시험법으로는 어류수정란 발생시험, 치어 성장시험 및 성분화 시험, 후세대검정 시험 등이 있고 종말점으로는 어류의 성장률, GSI, 이차성징의 변화, intersex 등 생식기관의 조직학적 변화,⁶⁻⁸⁾ 비텔로제닌 유도 및 아로마타제 발현⁹⁾ 등을 주요 측정인자로 고려하고 있다. *In vitro* 방법으로는 MCF세포주를 이용한 세포증식시험, 일차배양한 간세포를 이용한 비텔로

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: 032-560-7070, E-mail: envipark@hanmail.net

2. 비텔로제닌 정량

붕어의 비텔로제닌 측정을 위해 96well carp Vitellogenin ELISA kit을 사용하였다. 그 방법을 간단히 기술하면 우선 세척액 100 μ l를 well에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 방치한 후 세척액을 제거하고 비텔로제닌 표준용액 (1 μ g/ml의 2 \times , 4 \times , 8 \times , 16 \times , 32 \times , 64 \times 희석) 및 일정 비율로 희석한 시료 (2 \times , 4 \times , 16 \times , 32 \times , 64 \times , 128 \times)를 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 각 well의 용액을 제거하고 well당 300 μ l의 세척액을 사용하여 3차례 씻어낸 후 HRP-conjugated anti carp VTG antibody 100 μ l를 각 well에 분주하여 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 용액을 제거하고 well당 300 μ l의 세척액을 사용하여 3차례 씻어내고, OPD1, 2-phenylenediamine dihydrochloride가 첨가된 기질용액 100 μ l를 well에 첨가하여 실온에서 15분간 방치하였다. 최종적으로 50 μ l의 반응정지액을 첨가하여 실온에서 15분 이내에 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3. 아로마타제 측정

1) RNA 분리

-70°C에 동결보관된 뇌조직 약 50 mg을 균질화한 후, 조직내 총 RNA를 추출하였다. 냉동시킨 조직에 β -mercaptoethanol을 넣은 (10 μ l-ME/1 ml-RLT) RLT buffer 600 μ l를 300 μ l씩 나누어서 첨가하고 homogenizer를 이용하여 완전히 파쇄한 후 실온에서 5분간 방치하였다. 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하고, 상등액을 tube에 옮겨 70% ethanol 600 μ l를 첨가하여 섞은 후 spin-column에 700 μ l씩 넣고 10,000 rpm에서 30초 원심분리, RW1용액 700 μ l를 column에 가하고 10,000 rpm에서 다시 15~30초 원심분리 후, 여과액은 버렸다. Spin-column을 새로운 collection tube에 옮기고 column에 500 μ l의 RPE 용액을 첨가 10,000 rpm, 15~30초 2회 원심분리한 후 column을 collection tube로 옮기고 30 μ l의 RNase-free water를 membrane 중앙에 직접 떨어뜨린 후 10,000 rpm, 1분씩 2회 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 정제된 각 RNA 시료는 0.5 μ g/ μ l의 농도로 희석하여 RT-PCR 실시 전까지 -70°C에 보관하였다.

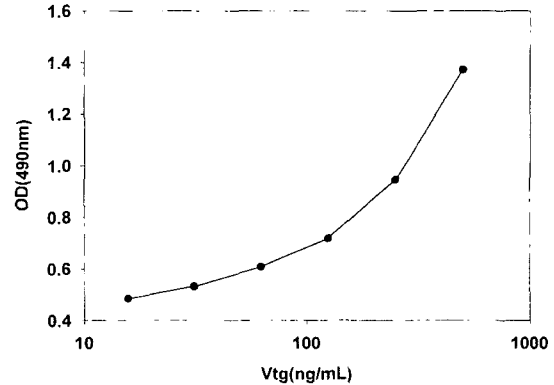


Fig. 2. Standard curve of carp vitellogenin is obtained by measurement of the serial dilution of standard carp vitellogenin solution with the kit.

2) RT-PCR (Reverse transcriptase-PCR)

아로마타제 발현 측정을 위한 RT-PCR은 다음과 같이 실시하였다. 역전사 반응은 RNA 주형 0.5 μ g/ μ l, 1 μ l의 AMV reverse transcriptase (34 units/ μ l), 1 μ l의 RNase inhibitor, 4 μ l의 10 mM dNTPs 및 1 μ l의 oligo dT primer를 총 20 μ l의 양으로 하여 42°C에서 30분 반응시킨 후 99°C에서 5분간 반응하여 역전사 효소를 불활성화시켰다. 역전사 반응 후 20 μ l 중 5 μ l를 45 μ l의 PCR 반응 혼합물 (dNTP, Taq polymerase, Taq polymerase buffer, primer)에 첨가하여 PCR을 실시하였다. PCR은 94°C에서 30초, 61°C에서 30초, 72°C에서 1분간 30회전 실시하였다. 프라이머는 제노텍사로부터 합성하여 사용하였으며, 아로마타제의 경우 전방향 프라이머로서 5'-aagtcctctgctggtatcat-3', 역방향 프라이머로서 5'-gtggttctgagcaaatatcag-3'를 사용하였다. 한편 대조 유전자로 β -actin의 RT-PCR의 경우 전방향 프라이머로서 5'-ttcaacagcctgcacgtacg-3' 및 역방향 프라이머로서 5'-ataccgagactccataccaa-3'를 사용하였다. RT-PCR 종료 후 각 반응시료에서 동일양을 1% agarose gel에서 전기영동하여 반응 결과를 관찰하였다.

4. 생식기관 조직관찰

현장에서 적출하여 picric acid saturated solution, formalin, glacial acetic acid를 75 : 25 : 5로 혼합한 Bouin액에 고정된 생식기는 새로운 Bouin액에 24

시간 동안 다시 고정하고, 조직의 비결합수 제거와 급속한 조직의 위축을 방지하기 위하여 에탄올 시리즈(알콜시리즈; 70% 2h, 80% 2h, 90% 2h, 95% 2h, 100% 2h)로 단계별로 탈수한 후, 파라핀의 침투를 용이하게 하기 위하여 자이렌을 1회 30분씩 3회로 투명작업을 하였으며, 박절시 세포 및 조직의 공간적 구성이 변형되지 않도록 포매제인 파라핀을 60°C 건조기 내에서 24시간 동안 조직 내로 침투시킨 후 박절이 용이하도록 포매하였다. 포매된 블록은 회전식 초절편박절기로 약 5 μm 두께의 조직절편을 만들고, 박절된 조직은 50%에탄올에 묻혀 슬라이드글라스에 조직을 편상대로 올려놓고 45°C 물에 조직을 넣어 완전히 편 후 slidewarmer에 12시간 건조시켰으며 다음으로 핵염색을 위한 0.5% 헤마톡실린(hematoxylin)과 세포질 염색을 위한 1% 에오신(eosin) 염색액으로 이중염색 후 광학현미경하에서 관찰하였다. 생식기관외에 하천에 서식하는 어류의 건강성을 파악하고자 간 및 신장조직도 생식기관과 동일한 방법으로 관찰하였다.

결 과

1. 비텔로제닌 정량

분자생물학적 생체지표로서 외인성에스트로젠의 특이적으로 수컷어류에서도 유도되는 것으로 알려진 비텔로제닌을 ELISA (enzyme-linked

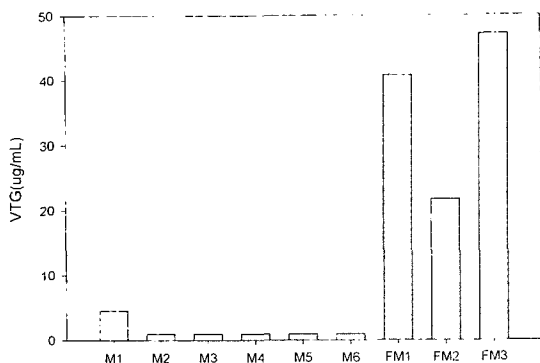


Fig. 3. Concentration of plasma vitellogenin (VTG) in crucian carp captured from Gyeongan stream (M : male, FM : female).

immunosorbent assay) 방법을 이용하여 측정된 결과 (Fig. 3), 경안천에서 채집한 붕어 암컷 3마리에서는 21.8 $\mu\text{g/ml}$, 40.9 $\mu\text{g/ml}$, 47.2 $\mu\text{g/ml}$ 로 범위로 비텔로제닌이 정량되었다. 한편 수컷 5마리는 0.3~0.4 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 비텔로제닌이 측정되었으며, 수컷 1마리에서만 4.6 $\mu\text{g/ml}$ 로 다른 수컷에 비해 높은 농도를 나타내었다.

2. 아로마타제 (Aromatase)

RT-PCR을 이용한 붕어 뇌에서의 아로마타제 발현량을 측정된 결과 수컷 5마리, 암컷 2마리에서 모두 아로마타제 발현이 관찰되었다. (Fig. 4) 암컷인 lane 7-8과 수컷인 lane 2-6를 비교한 결과 암컷인 경우 밴드의 밝기가 수컷보다 뚜렷이 관찰되었다. 비텔로제닌이 높은 양으로 검출된 수컷인 lane 2의 경우 비텔로제닌이 다량으로 검출되었음에도 불구하고 아로마타제 발현은 높지 않았다.

3. 생식기관 조직관찰

채집한 붕어 12마리 중 암컷 5마리의 난소를 관찰하였다. 그 결과 난모세포의 발달과정을 난원세포기 (oogonial stage), 난황형성전기 (previtellogenic stage), 난황형성개시기 (initial vitellogenic stage), 난황형성활성기 (active vitellogenic stage), 성숙기 (maturation stage), 산란전기 (prehydrated stage)로

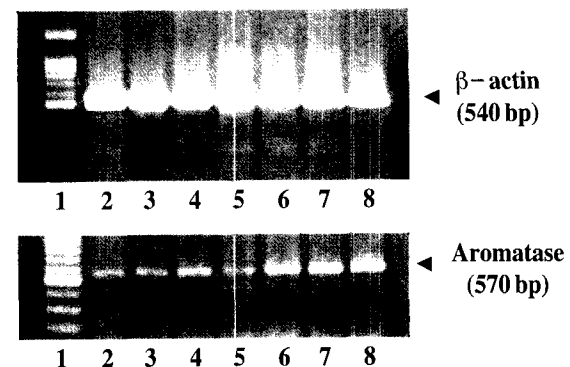


Fig. 4. Aromatase gene expression in brain. Gene expression of actin and aromatase was analyzed with RT-PCR (lane 1 : size marker 100 bp, lane 2-6 : male, lane 7-8 : female).

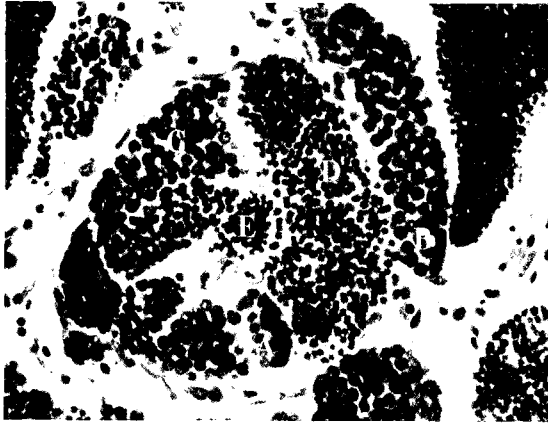


Fig. 5. Testis of the crucian carp captured from Gyeongan stream ($\times 200$). The highest proportion of spermatozoa was shown and no histological abnormality was shown. A : spermatogonia stage, B : primary spermatocyte stage, C : secondary spermatocyte stage, D : spermatid stage, E : spermatozoa stage.



Fig. 6. Ovary of the crucian carp captured from Gyeongan stream ($\times 200$). The highest proportion of prehydrated stage was shown and no histological abnormality was shown. A : previtellogenic stage, B : active vitellogenic stage, C : maturation stage, D : prehydrated stage

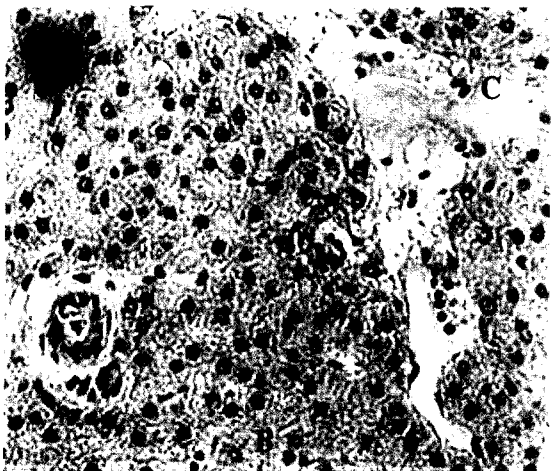


Fig. 7. Liver of the crucian carp captured from Gyeongan stream ($\times 200$). No histological abnormality was shown. A : bile duct, B : hepatocyte, C : hepatic vein.

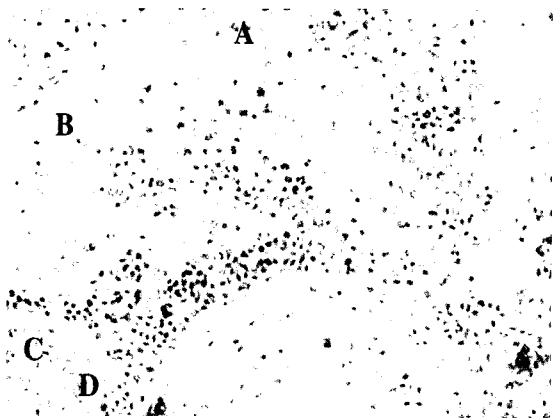


Fig. 8. Kidney of the crucian carp captured from Gyeongan stream ($\times 200$). No histological abnormality was shown. A : distal convoluted tubule, B : proximal convoluted tubule, C : glomerulus, D : Bouman's capsule.

나누어볼 때 대부분이 산란전기단계 (prehydrated stage)의 형태를 나타내고 있었으며 그 다음으로 성숙기 (maturation stage)를 가진 것이 많았다.²²⁻²³⁾ 수컷에서도 생식주기를 분열증식 및 성장기 (multiplicative and growing stage), 성숙기 (maturation), 완숙 및 방정기 (ripe and spent stage), 회복기 (reco-

very), 휴지기 (resting stage)로 나누어 보았을 때 수컷 대부분이 분열증식 및 성장기를 나타내고 있었다. 내분비계장애현상의 특징이라 할 수 있는 intersex는 관찰되지 않았으며, 간과 신장조직에서는 조직학적인 이상을 발견할 수 없었다(Figs. 5-8).

고 찰

1980년대 후반 영국각지에서 암수 구분이 어려운 물고기가 대량 발견되었는데 그 원인을 조사하기 위해 서식지역의 수질을 분석해 본 결과, 합성세제와 유화제의 성분인 비이온성계면활성제의 분해물인 알킬페놀이 다량으로 검출되어 이들 물질이 어류의 성을 교란시킨 것으로 추측하게 되었다. 그 후 무지개송어를 키우는 수조에 이 알킬페놀을 투여하여 실험한 결과, 수컷의 정소발달이 방해받는다라는 사실이 실험적으로 밝혀졌으며,¹³⁾ 원래 암컷의 간에서만 만들어지는 난황단백질(vitellogenin)이 수컷에서도 생산된다는 사실이 발견되었다. 또한, 영국에서는 주변 공장들로부터 약 28종류의 폐수가 처리, 배출되는 지점에 송어를 약 3주간 서식시킨 결과 수컷의 혈액에서 정상 수컷보다 최고 10만배 이상의 난황단백질이 검출된 사례가 발표되기도 하였다.¹⁴⁾ 캐나다 겔프대학의 연구보고에 의하면, 오대호에 서식하는 2~4년 생 연어의 상당수에서 비정상적인 갑상선비대가 관찰되었는데, 이러한 현상을 오염물질이 농축된 먹이섭취에 의한 것이거나 또는 오대호내의 오염물질 등에 의한 내분비계장애에 기인한 것으로 추측하고 있다. 일본에서도 1996년에서 1997년에 걸쳐 도쿄의 다마강과 쓰미다강에서 ppt 농도로 알킬페놀이 검출되었으며, 이와 동시에 수컷 잉어의 비율이 현저히 낮아졌다는 사실이 보고되어졌다. 그 밖에 펄프공장 하류에 서식하는 농어(*Perca fluviatilis*)에서 성숙지연, 생식기의 퇴축, 성징결여 등이 관찰되었으며, 오염지역의 강이나 호수 등에 서식하는 물고기들의 수컷 생식능 저하, 혈장중의 성선자극호르몬 또는 스테로이드의 저하, 2차성징의 미숙 등 지금까지 환경오염물질에 의한 내분비계장애의 다양한 사례가 보고되고 있다.

이러한 다양한 사례보고에도 불구하고 환경오염물질에 의한 내분비계장애를 평가하기 위한 방법은 아직까지 전 세계적으로 확립되어 있지 않다. 또한 실험실내에서 내분비계장애물질에 의한 영향을 평가하는 것이 실제적으로 현장에서의 외적인 요인 기온, 바람, 일조량 등의 계절적 변화 등을 고려하지 않은 상황이기 때문에 생체내호르몬

의 조절 및 생식기관들이 이러한 요인들에 의하여 매우 복잡하고 다양하게 반응한다는 것을 고려해 볼 때^{20-24), 26-27)} 환경오염물질에 의한 내분비계장애효과로 오인될 수 있는 경우가 발생할 수도 있다.

본 실험에서는 경안천에서 채집한 붕어(암컷 5미, 수컷 7미)에 대한 내분비계장애현상을 조사하였다. 비텔로제닌의 경우 수컷보다 암컷에서 20~40배 가량 높게 나타났으며, 이는 기존에 보고된 암컷의 비텔로제닌 수치와 비슷한 양상을 보였다.³¹⁾ 비텔로제닌의 수치는 계절적 변화에 따른 산란주기와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으므로 계절적 변화에 대한 비텔로제닌의 함량변화를 측정하여야 하나 본 연구에서는 일장기간이 최대인 6월 단회 채집한 개체로서 붕어의 채집시기에 따라 비텔로제닌의 함량을 예측할 수는 없었다. 다만, 이번 조사지역인 경안천지역은 중북부지방에 위치한 지역으로 채집한 암컷붕어의 경우 성숙기와 산란전기의 단계를 나타내고 있었으므로 비텔로제닌이 최대로 증가한 후 감소하기 시작하는 시점으로 판단된다. 대부분의 암컷개체는 산란대를 지니고 있었다. RT-PCR을 이용한 아로마타제의 발현(수컷 5, 암컷 2)을 측정한 결과(Fig. 4) 수컷과 암컷 모두 아로마타제 활성이 보였으며 수컷보다는 암컷에서 밴드가 더 뚜렷이 나타났다. 이를 비텔로제닌 검량수치와 비교 상관성을 본 결과 1번 수컷에서 다른 수컷보다 상당히 많은 양의 비텔로제닌이 검량되었으나 밴드의 양상을 비교해볼 때는 유의적인 차가 나타나지 않았다. 이러한 결과만으로 아로마타제와 비텔로제닌의 상관성을 정확히 설명할 수는 없으며 이를 위해서는 보다 많은 개체에 대한 광범위한 연구가 수반되어야 할 것으로 판단되었다. 또한 아로마타제 mRNA 발현이 높은 개체의 생식기관에서 intersex 등의 징후가 나타나지 않았다. 수컷붕어의 경우 미성숙정자와 성숙된 정자가 고루 분포하고 분열증식 및 성장기 단계를 거치고 있는 것으로 추정되어졌다. 암컷에서도 산란전기단계와 성숙기단계가 고루 나타나는 것으로 관찰되었다.

본 연구에서는 일장이 최대인 6월경 국내 하천에 서식하는 암·수 붕어를 채집하여 비텔로제닌, 아로마타제 및 생식기관 조직변화의 상관성을 보고자 시도되었다. 그러나 각 내분비계장애의

endpoint 변화의 상관성을 명확히 판단하기 위해서는 향후 보다 많은 개체에 대한 조사와 계절적 요인 등 환경변화를 고려한 체계적인 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Ho SM, Danko D, Callard IP. Effect of exogenous estradiol-17 β on plasma vitellogenin levels in male and female *Chrysemys* and its modulation by testosterone and progesterone. *Gen. comp. Endocrinol* 1981; 43 : 413-421.
2. Donohoe RM and Curtis LR. Estrogenic activity of chlordecone, o, p'-DDT and o, p'-DDE in juvenile rainbow trout : induction of vitellogenesis and interaction with hepatic estrogen binding sites. *Aquatic toxicology* 1996; 36 : 31-52.
3. Kime DE, Kime JP, Nash AP, Scott. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics., *Aquaculture* 1999; 177 : 345-352.
4. Sumpter JP. Xenoendocrine disrupters environmental impacts., *Toxicology letters* 1998; 102-103 : 332-342.
5. Dorfman RI and Dorfman AS. Estrogen assays using the rat uterus. *Endocrinology* 1954; 55 : 65-69.
6. Harshbarger JC, Coffey MJ and Young MY. Intersex in Mississippi River shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis Missouri, U.S.A. *Marine environmental research* 2000; 50 : 247-250.
7. Simpson MG, Parry M, Kleinkauf A, Swarbreck D, Walker P and Leah RT. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Marine environmental research* 2000; 50 : 283-287.
8. Vigano L, Arillo S, Bottero A, Massari A and Mandich. First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *The science of the total environment* 2001; 269 : 189-194.
9. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarnah B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR and Bulun SE. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Review* 1994; 15 : 342-355.
10. Bitman J and Cecil HC. Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J Argic food chem* 1970; 18 : 1108-1112.
11. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG and Sumpter JP. A Varitey of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers are weakly estrogenic. *Environ. health perspect* 1995; 103 : 582-587.
12. 국립환경연구원, 1992, 한강유역을 중심으로 한 환경관리기술개발.
13. Jobling S, Sheahan D, Osborn JA, Matthiessen P and Sumpter JP. 1995. Inhibition of testicular growth in rainbow trout exposed to estrogenic alkylphenolic chemical. *Environ. Toxicol. chem in press.*
14. Purdon CE, Hardiman PA, Byc VJ. ENO NC, Tyler CR and Sumpter JP. Estrogenic effects of effluents from sewage-treatment works. *Chem. Ecol.* 1994; 8 : 275-285.
15. Mouchel N, Trichet V, Betz A, Le Pennec JP and Wolff J. *Characterization of vitellogenin from rainbowtrout (Oncorhynchus mykiss).*, *Gene* 1996; 174(1) : 59-64.
16. Hirai M, Watanabe D, Kiyota A and Chinzei Y. Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug (*Riptortus clavatus*); analysis of processing in the fat body and ovary., *Insect Biochem Molbio* 1988; 28 : 537-547.
17. Shiv H and Kirsten L. Complete nucleotide arrangement of the subunit encoding regions., *Insect Biochem Mol Biol*, 1997; 27 : 27-35.
18. Sherry J, Gambel A, Fielden M, Hodson P, Burnison B and Solomon K. An ELISA for brown trout (*salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. *the science of the total Environment* 1999; 225 : 13-31.
19. Tchoudakova A and Callard GV. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* 1998; 139 : 2179-2189.
20. Mitsuyo K, Megan McLellan, Jason A and Callard GV. Estrogen and xenoestrogen upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*) *Comparative biochemistry and physiology part* 2001; B129 : 261-268.
21. Martina F, Ronny van Aerle SB, Charles RT and Helmut S. Development and validation of homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comparative biochemistry and physiology part* 2001; C129 : 217-232.
22. Shimizu A and Hanyu I. Environmental regulation of annual reproductive cycle in a spring-spawning bitterling *Acheilognathustabira*. *Bull. Jap. soc. sci. fish.* 1982; 48 : 1563-1568.
23. Shimizu A and Hanyu I. *Environmental regulation of*

- spawning period in an autumn-spawning bitterling *pseudoperilampus typhus* bull. Jap. soc. sci. fish., 1988; 49: 895-900.
24. Pasmanik M, Barney AS and Callard GV. *in vivo* steroid regulation of aromatase and 5 α -reductase in goldfish brain and pituitary. General and comparative endocrinology 1988; 71: 175-182.
25. Scholz S and Gutzeit HO. 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic toxicology 2000; 50: 363-373.
26. Gelinias D, Pitoc GA and Callard GV. Isolation of goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA : mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. Mol. Cell. Endocrinol. 1998; 138: 81-93.
27. Pasmanik M and Callard GV. A high abundance androgen receptor in goldfish brain : characteristic and seasonal changes. 1988; Endocrinology 123(2): 1162-1171.
28. Pasmanik M and Callard GV. Changes in brain aromatase and 5 α -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish. Endocrinology 1988; 122(4): 1349-1356.
29. Gelinias D, Pitoc GA and Callard GV. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA : mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. Mol Cell Endocrinol 1998; 138(1-2): 81-93.
30. Fry DM and Toone TK. DDT-induced feminization of gull embryos. Science 1981; 213: 922-924.
31. John PS. Feminized responses in fish to environmental estrogens., Toxicology letters 1995; 82/83: 737-742.
32. Lisa KI, Sandra G and Eva O. vitellogenin induction in painted turtle (*chrysemys picta*), as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. Aquatic Toxicology 2001; 55: 49-60.
33. Kokokiris L, Le Menn F, Kentouri M and Kagara M. Seasonal cycle of gonadal development and serum levels of vitellogenin of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei : Sparidae) Marine biology 2001; 139: 549-559.
34. Den Besten PJ. 1998. Concepts for the implementation of Biomarker in environmental Monitoring Marine environmental research (46) NO. 1-5 253-256.
35. Elorduy-garay JF and Pamirez-Luna S. Gonadal development and spawning of female ocean white fish. *caulatilus princeps* (Pisces Branchiostegidae) in the Bay of La Paz, B.C.S., Mexico. J. Fish Biol 1994; 44: 553-566.
36. Sumpter JS and Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of aquatic environment. Environ. Health Perspect. in press.