



무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* 배양 간세포에서 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid이 Vitellogenin 합성과 E₂-ER Binding affinity에 미치는 영향

황 운 기*

강릉대학교 해양생명공학부

Effect of 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid on Vitellogenin Synthesis and E₂-ER Binding Affinity of Hepatocytes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Un-Gi Hwang*

Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangnung 210-702, Korea

Effect of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) on vitellogenin (VTG) production and estrogen (E₂)-estrogen receptor (ER) binding affinity were examined in primary hepatocyte cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Hepatocytes were pre-cultured for 2 days; subsequently, E₂ (2×10^{-6} M) and 2,4-D ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ M) were simultaneously added to the incubation medium. They were cultured for more than 5 days. VTG and E₂-ER binding affinities were analyzed by SDS-PAGE and ELISA, respectively. 2,4-D concentration used had no appreciable effect on the morphology, viability, and DNA content of hepatocytes in culture. It had also no effect on VTG production. However, it interfered with E₂-ER binding affinity, which was reduced with increasing concentration of 2,4-D. The affinity was inhibited by 25 and 30 % at 10^{-7} M and 10^{-6} M of 2,4-D, respectively. This result suggested that although 2,4-D had no effect on VTG production, it acted as xeno-estrogenic contaminant in ER.

Key words: 2,4-D, VTG, E₂-ER binding affinity, ELISA, Xeno-estrogenic contaminant

서 론

Vitellogenin (VTG)는 성숙한 암컷의 생식선 자극 호르몬 (GTH)에 의해 난소에서 생합성되어진 estrogen (Estradiol-17 β , E₂)의 자극에 의해, 어류를 포함한 난생동물의 간에서 합성되는 단백질이다. 합성되어진 후 이 단백질은 혈액에 분비되어 난소에 존재하는 VTG 수용체를 통해 난세포내로 이동해 (Hara et al., 1993; Matsubara

et al., 1994) lipovitellin, phosvitin 및 β' -componets로 분해되어 축적된 후 배 발생시기의 중요한 영양원으로 사용된다 (Hiramatsu and Hara, 1996). 또한, VTG은 xeno-estrogenic contaminant에 의해 수컷에서도 합성이 가능하므로 (Mommssen and Walsh, 1998; Korsgaard, 1990) 수컷 어류에 있어 VTG의 합성은 xeno-estrogenic contaminant의 노출에 대한 생물학적 지표로 사용된다 (Sumpster and Jobling, 1995; Toppari et al., 1995).

*Corresponding author : ungi2222@yahoo.co.kr

최근에 인류가 환경 중에 배출한 화학물질 중에는 자성 호르몬인 E₂ 같은 작용을 하는 것으로 의심되어지는 물질들이 다수 보고 되어지고 있다 (Sumpster, 1995; Purdom et al., 1994). 이들 화학물질중에는 생물체내에 들어가 estrogen receptor (ER) 에 결합해 생물이 본래 가지고 있는 호르몬과 같은 행동으로 인해 생식행동이나 생식기 등의 이상이 보고 되었으며 (Fingerman et al., 1998), 실제로 nonylphenol을 포함하고 있는 하수처리수가 유입되는 하천에 서식하는 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* 수컷의 혈중 VTG 상승 (Harries et al., 1997)과 정소발육 저하 (Sumpster and Jobling, 1995)등이 보고 되고있다.

2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)는 1950년대에 농약으로 등록되어 현재에도 제초제로 사용되고 있으며, 가열하면 유독한 부패성 가스인 염화수소를 발생하며 수중에서도 많은 금속류를 부식시킨다. 또한, 쥐에 투여한 결과, 적혈구의 소형화 및 정소중량이 감소하는 것으로 보고되었다 (Charles et al., 1996). 현재, 2,4-D와 같은 합성화학물질이 ER 와 VTG 합성에 어떤 영향을 미치는가에 관한 연구는 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 무지개송어의 간세포를 이용해 2,4-D가 VTG 합성에 미치는 영향을 SDS-PAGE를 이용해 조사했으며 E₂-ER binding affinity에 미치는 영향은 ELISA를 이용해 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

옥외 사육수조에서 사육한 체중 110~420 g의 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*를 실험에 사용하였으며 실험 하루 전에는 담즙 생산의 감소를 위하여 사료 공급을 중단하였고, 성숙한 암컷은 실험에서 제외하였다.

간세포의 분리와 배양

간세포는 Hayashi and Ooshiro (1975)의 방법을 수정한 Kwon et al. (1993) 방법에 의해 분리하였으며, 분리된 세포의 양과 생존력을 trypan blue test에 의하여 결정하였다 (Hwang et al., 2000).

세포는 positive charge 된 60 mm plastic dish (Falcon) 에 0.3~0.8×10⁶ 개의 밀도로 넣어서 배양했으며 0.2 μM bovine insulin (Sigma), streptomycin (100 μg/ml) 및 penicillin (70 μg/ml)을 첨가한 William's medium E (Life

Technologies, Inc.) 배지를 사용했다. 모든 배양은 15°C, 5% CO₂ 의 조건하에서 배양액 3 ml를 넣어서 행하였으며 실험 전에는 2일간의 사전 배양을 해 세포가 dish에 정착된 안정한 상태에서 실험을 행하였다. 실험기간동안 배양액은 매일 교환하였다.

Estradiol-17β 및 2,4-D의 첨가

① Estradiol-17β 첨가

2일간 전 배양한 간세포에 95% 에탄올에 용해한 estradiol-17β (E₂, 2×10⁻⁶ M; Sigma)를 첨가했다. 첨가한 에탄올 양은 배지 3 ml당 3 μl였으며 대조군에는 동량의 에탄올만이 첨가 되었다.

② 2,4-D의 첨가

실험에 사용한 2,4-D를 95% 에탄올에 용해해 10⁻² M의 원액을 만들어 최종 배지에 첨가한 양은 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ M로 했으며 첨가한 에탄올 양은 배지 3 ml당 3 μl를 첨가해 5일간 실험을 행하였다.

세포의 형태

2일간 전 배양한 후 E₂ (2×10⁻⁶ M) 및 2,4-D (10⁻⁶ M)을 dish에 첨가해 5일간 배양한 후 세포의 형태를 광학현미경 (Nikon)으로 관찰하였다.

세포의 생존율

E₂ (2×10⁻⁶ M) 또는 2,4-D (10⁻⁶ M)을 첨가하여 5일간 배양한 후 0.03% EDTA를 포함하고 있는 인산 완충액 (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.09 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄)을 첨가해 배양 dish로부터 분리시킨 후 0.05 % crystal violet가 포함된 0.1 M citric acid로 2시간 동안 핵을 염색하여 혈구 계산판을 이용하여 측정하였다. 세포의 생존율은 E₂ 첨가 전의 생존 세포 수에 대한 퍼센트로 나타내었다.

DNA 함량

E₂ (2×10⁻⁶ M) 또는 2,4-D (10⁻⁶ M)을 첨가하여 0일 및 5일간 배양한 간세포로부터 Munro and Fleck (1966)에 의해 수정된 Schmidt-Thannhauser의 방법에 의해 DNA 함량이 조사되었다. DNA는 0.3 N NaOH를 75분간 처리한 후에 2 N perchloric acid으로 37°C에서 60분간 처리하여 추출하였다. DNA함량은 Wilder and Stanley (1983)의

방법에 따라 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{DNA (mg/ } \ell) = 0.0227A_{260} - 0.0018A_{232}$$

A_{260} 과 A_{232} 는 파장 260 nm와 232 nm에서의 흡광도를 나타낸다.

2,4-D가 VTG 합성에 미치는 영향

E_2 (2×10^{-6} M) 또는 2,4-D ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ M)를 배지에 첨가해 5일간 배양한 후 배지를 회수하여 SDS-PAGE를 이용하여 E_2 첨가 실험군의 VTG 합성율과 2,4-D 단독 실험군의 합성율을 비교하였다.

2,4-D가 E_2 -ER binding affinity에 미치는 영향

2,4-D가 E_2 -ER binding affinity에 미치는 영향을 ER α 경쟁 screening kit (Wako)를 이용한 ELISA microplates로 측정하였다. 이 plates에는 human ER α (hER α)가 코딩되어 있으며, 형광 레벨된 E_2 를 시약으로 포함시켰다.

측정은 kit의 사용순서에 의해 행하였으며, 형광 레벨된 E_2 를 포함한 반응용액을 E_2 또는 2,4-D와 혼합한 후 microplates의 각 well에 첨가한다. microplate는 실온에서 2시간 배양한 후, 측정액을 첨가해 microplate photometer (MTP-22, Corona)로 490 nm (excitation)과 530 nm (emission)에서 형광 밀도를 측정했다. 첨가되어진 2,4-D와 E_2 의 농도는 $0 \sim 10^{-6}$ M 이었다. 첨가 물질의 농도는 DMSO 로 조절하였으며, 대조구는 반응액과 DMSO만을 첨가해 배양했다.

SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

전기영동은 Mugiya and Tanahashi (1998)와 Hwang et al. (2000)에서 사용된 방법으로 행하였다. 간략히 설명하면, cold trichloroacetic acid에 의해 배지로부터 침전된 단백질을 sample buffer (0.175 M Tris-HCl, 8 M urea, 1% SDS, and 0.5% 2-mercaptoethanol, pH 7.4)로 용해시켜 SDS-PAGE로 분리하여 0.25% coomassie brilliant blue R-250으로 1시간 동안 염색하였다. VTG를 측정하기 위하여 사용된 표준 단백질의 분자량은 carbonic anhydrase (MW 29,000), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,000), phosphorylase *b* (97,400), β -galactosidase (116,000) 및 myosin (205,000)이었다.

VTG 합성량의 분석

VTG의 판별은 Kwon et al. (1993)에 의한 면역 전기 영

동법에 의해 VTG의 주 밴드로 밝혀진 분자량 175 kDa의 결과를 따랐다. SDS-PAGE후 VTG 밴드는 Bio Image (Millipore)를 이용해 총 단백질에 대한 VTG의 Intergrated Optical Density (IOD)값을 퍼센트로 나타내었다. 전기영동 각 lane의 VTG 양 (100~1600 ng/ml)과 IOD와는 우수한 상관관계 ($r=0.99$)가 보고 되었다 (Yeo and Mugiya, 1997).

통계분석

실험결과는 one-way ANOVA (Fisher PLSD test)를 실시하여 Fisher's γ -test를 행하였으며 $P < 0.05$ 에서 통계적 유의성을 판단하였다. 퍼센트 결과는 arcsine의 수치로 전환한 후 통계적 분석을 행하였다.

결 과

2,4-D가 세포의 형태에 미치는 영향

무지개송어의 간세포는 2일간의 전 배양한 후 5~10개 정도의 세포가 융합하고 있는 것을 볼 수 있으며 (Fig. 1, a) E_2 를 첨가한 후 5일간 배양한 간세포에서는 이들 융합이 더욱 커지는 것을 볼 수 있다 (Fig. 1, b). 또한, 2,4-D를 첨가해 5일간 배양한 간세포에 있어서도 융합이 더욱 크게 형성되는 것을 알 수 있으며 이들 융합이 E_2 첨가 세포와 비교해 차이가 없음을 알 수 있다 (Fig. 1, c).

2,4-D가 세포의 생존율과 DNA 합성에 미치는 영향

2,4-D를 첨가하기 전 세포생존율을 100%으로 보았을 때 5일간 2,4-D를 첨가한 세포의 생존율은 74~87%를 나타냈다. 2,4-D를 첨가하지 않은 실험군의 세포 생존율이 78%를 나타내 5일간 배양한 간세포에서 2,4-D에 의한 영향은 없었다 (Table 1). 또한, DNA 함량에 있어서도 E_2 를 첨가한 실험군이 81%, 2,4-D를 첨가한 실험군이 77%를 나타내 (Fig. 2) 생존율과 더불어 DNA 함량에 있어서도 2,4-D의 영향은 없는 것으로 나타났다.

2,4-D가 VTG 합성에 미치는 영향

E_2 (2×10^{-6} M) 또는 2,4-D ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ M)를 첨가해 무지개송어의 간세포를 5일간 배양한 후 VTG 분석을 위해 배지를 SDS-PAGE로 분석 한 결과, E_2 를 첨가한 실험군에서 175 kDa의 위치에 VTG 밴드가 형성되었으나 2,4-D 첨가 실험 군에서는 같은 밴드가 보이지 않으며, 다른 단백질

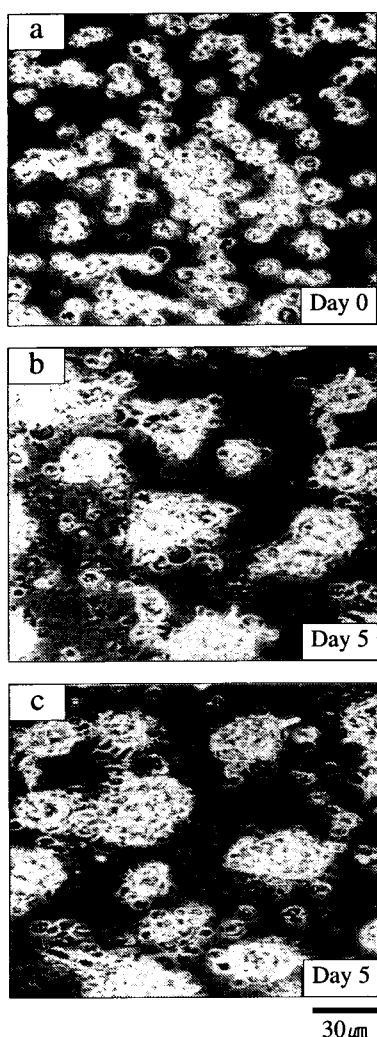


Fig. 1. Phase contrast micrographs of hepatocytes cultured in William's Medium E with E₂ (2×10^{-6} M, b) or 2,4-D (10^{-6} M, c) for 5 days.

Table 1. Effects of 2,4-D on survival of hepatocytes on day 5 after 2,4-D addition in cultures.

2,4-D Concentration (M)	Survival (%) [*]
0	78.2 ± 6.7
10 ⁻⁹	81.3 ± 9.3
10 ⁻⁸	74.3 ± 11.1
10 ⁻⁷	86.7 ± 10.3
10 ⁻⁶	80.6 ± 4.8

*Percentage of the number of living cells on day 5 to the number of living cells just before 2,4-D addition (mean ± SE for three individuals).

밴드는 전혀 차이가 없었다 (Fig. 3).

IOD에 의한 VTG의 상대적 양을 측정하면 E₂ 첨가 실

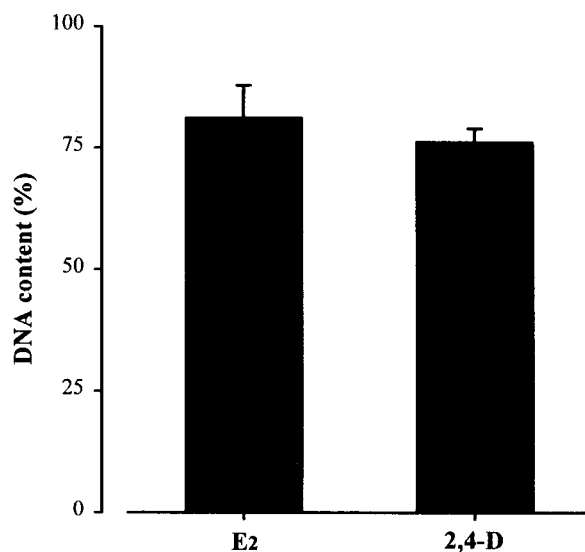


Fig. 2. Effects of E₂ (2×10^{-6} M) and 2,4-D (10^{-6} M) on hepatocytes DNA content (%) on day 5 in culture, compared with that of day 0. Vertical bars represent the average (mean ± SE) percentage of three experiments.

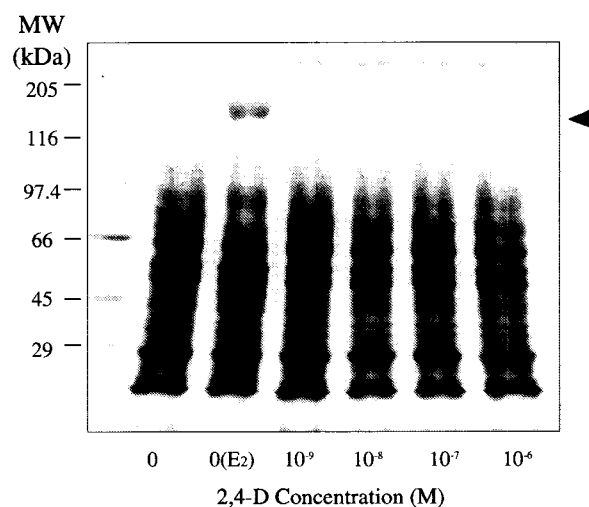


Fig. 3. Gradient SDS-PAGE showing induction of VTG (arrowhead) by 2,4-D in hepatocyte cultures in rainbow trout, compared with that by E₂. Spent media were analyzed on day 5 after 2,4-D or E₂ addition. CBB stain.

험군에서 전체 단백질의 5.6%를 나타냈다. 그러나, 2,4-D를 첨가한 모든 실험군은 E₂를 첨가하지 않은 실험군과 대부분 비슷한 0.2%를 나타내었다 (Fig. 4).

2,4-D가 E₂-ER binding affinity에 미치는 영향

E₂ 또는 2,4-D를 첨가하여 2시간 배양한 후 각 well의

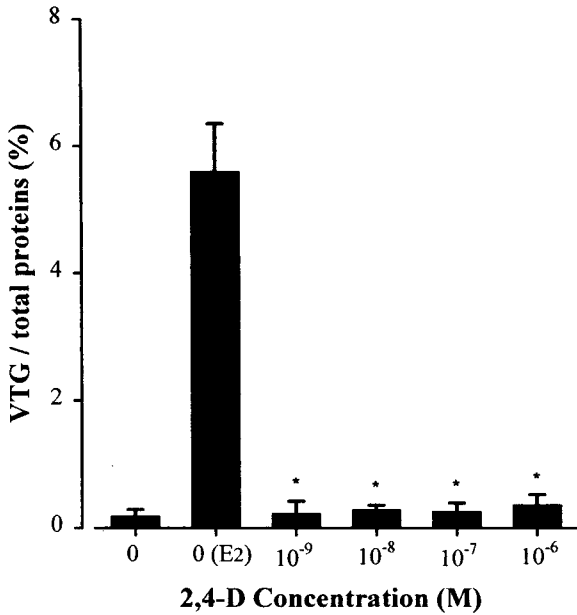


Fig. 4. Induction of VTG by 2,4-D in hepatocyte cultures in rainbow trout. The activity of VTG was estimated as a percentage of VTG to total proteins after SDS-PAGE on day 5 after 2,4-D addition. Vertical bars represent the SE of the mean for three individuals. *, $P < 0.01$ for control (0 M 2,4-D + E₂).

형광밀도가 측정되었다. E₂의 경우에는 농도가 증가할수록 binding affinity에 미치는 영향이 증가하여 10⁻⁸ M에서는 70%의 저해를 나타냈으며 이 저해는 10⁻⁷ M과 10⁻⁶ M에 있어서는 85%와 96%까지 증가하였다 (Fig. 5). 또한, E₂가 binding affinity에 미치는 저해는 converse sigmoid 형태를 나타내었다. 2,4-D의 경우에는 E₂ 만큼 저해 영향이 급격하지는 않지만 농도의 증가에 따라 binding affinity가 저해되는 것을 볼 수가 있으며, 10⁻⁸ M에서는 20%의 저해를 보였으며, 10⁻⁷ M과 10⁻⁶ M에서 25%와 30%까지 억제되었다 (Fig. 5).

고 찰

무지개송어의 간세포 배양은 vitellogenesis의 기작을 규명하기 위하여 관련된 호르몬의 역할 (Kwon et al., 1993; Yeo and Mugiya, 1997)과 관련 유전자 (Pakdel et al., 1997; Flouriot et al., 1996)를 밝히기 위한 연구에 많이 사용되어 왔지만 최근에 와서는 오염물질이 E₂ 작용에 미치는 영향을 조사하기 위해 이용되고 있다 (White et al., 1994; Hwang et al., 2000). 간세포 배양은 직접 E₂와 오염물질을 첨가해 배양함으로써 E₂의 작용에 직접적으로

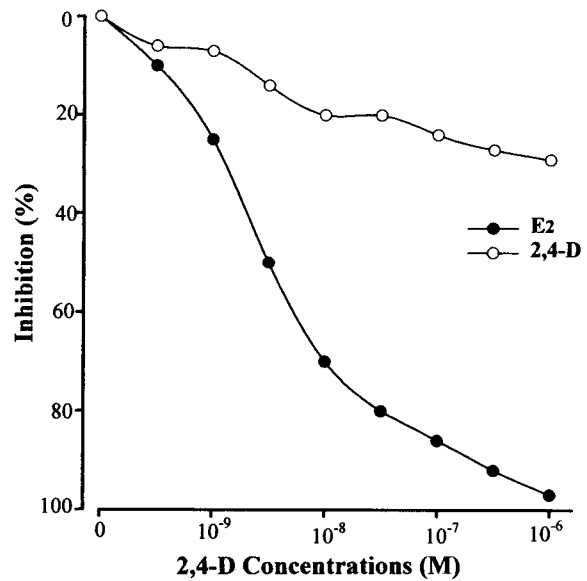


Fig. 5. Inhibitory effects of E₂ and 2,4-D on the binding of fluorescence E₂ to ER α coated on a microplate. Each point represents the mean of five experiments. Error bars are omitted.

오염물질이 어떻게 작용하는 가를 밝힐 수 있을 뿐만 아니라, 짧은 시간과 대량 배양으로 한번에 얻어진 간세포로부터 여러 가지 오염물질이 E₂ 작용에 미치는 영향을 파악 할 수 있다. 그러나, 오염물질의 E₂ 작용에 대한 영향보다도 우선 반드시 고려해야 할 것은 오염물질의 독성이 세포 활성에 미치는 영향이다. 따라서 본 실험에서는 2,4-D가 세포의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 세포의 형태, 생존율 및 DNA 함량을 조사하여 사용된 농도에 있어서는 영향이 없음을 확인하였으며 또한, Fig. 3의 SDS-PAGE에서도 2,4-D의 독성으로부터 발생하는 단백질의 변화는 전혀 없는 것을 알 수 있었다.

본 실험의 Fig. 3에서는 2,4-D의 첨가로 VTG 합성이 관찰되지 않았으며, 정량화 한 VTG도 거의 0%를 나타내었다 (Fig. 4). 그러나, Fig. 5에서 2,4-D는 E₂와 비슷한 행동으로 ER에 결합해 농도가 증가할수록 ER에 대한 E₂의 binding affinity를 억제했으며, 실험에 사용된 가장 고 농도인 10⁻⁶ M에서는 30%까지 억제하였다. 오늘날 가장 대표적인 합성 화학물질인 nonylphenol은 무지개송어의 간세포 배양에서 VTG의 합성을 유발했으며, VTG 합성은 첨가되어진 nonylphenol의 양과 비례하여 증가하는 것으로 나타났다 (Jobling and Sumpter, 1993). 또한, 뱀장어에 nonylphenol을 주사 한 후에 VTG양은 급속히 증가한 반

면 정소의 중량지수는 급격히 감소했다고 보고하였다 (Christiansen et al., 1998). 수컷의 넙치 (Christensen et al., 1995)와 연어 (Madsen et al., 1997)에 있어서도 nonylphenol에 의해 혈청 VTG의 양이 증가했다는 보고가 있다. Jobling and Sumpter (1993)과 White et al. (1994)는 포유류, 새 및 어류에 있어 nonylphenol이 VTG 합성을 유발하는 것은 간세포 내에서 E₂와 같이 ER에 결합하기 때문이라고 보고하였다. 현재의 연구에서도 2,4-D는 VTG의 합성을 촉진시키지 못했지만 E₂와 같은 행동으로 ER에 결합해 ER에 대한 E₂의 binding affinity를 억제하는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서 human ER (hER) α 가 코팅되어 있는 plate를 사용해 ER를 조사했으나 이것은 문제가 되지 않을 것으로 생각되어진다. 무지개송어의 ER (rtER) 유전자는 hER의 유전자와 매우 많이 닮아 있으며 (Ponglikitmongkol et al., 1988), 또한, E₂에 대한 rtER의 반응은 새, 개구리 및 포유류에 있어서 대단히 비슷하기 때문에 (Lazier and MacKay, 1993) 2,4-D가 ER-E₂의 binding affinity에 미치는 영향은 hER와 rtER이 같을 것으로 사료된다.

VTG의 합성은 ER와 VTG mRNA의 축적이 필요하며 (Pakdel et al., 1997), 실제로 무지개송어의 간세포 배양에 있어서도 E₂의 첨가로 VTG 합성 전에 ER와 VTG mRNA의 출현이 이루어지는 것으로 보고되었다 (Flouriot et al., 1996). 또한, 무지개송어의 간세포 배양에서 10⁻⁸ M의 E₂를 첨가 했을때 1일 후에 ER와 VTG mRNA가 발현되는 것으로 보고되고 (Flouriot et al., 1996) 있으나 VTG의 경우에는 고농도인 10⁻⁶ M을 첨가 후 2~3일은 지나야 SDS-PAGE에서 밴드를 확인 할 수 있었다 (Kwon et al., 1993). 현재의 연구에서 2,4-D를 첨가한 5일간의 배양에서 VTG의 합성이 유발되지 않는 것으로 보아 본 실험에서 사용한 2,4-D의 최고 농도인 10⁻⁶ M도 5일간의 배양에서는 VTG 합성을 유발시킬 정도로 강한 E₂ 작용은 하지 않는 것을 알 수 있다. VTG 합성의 전 단계이며 적은 양의 E₂에 의해서도 유발되어지는 ER와 VTG mRNA에 xeno-estrogenic contaminant가 미치는 영향에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 본 실험에 앞서 10⁻⁶ M 보다 강한 농도를 첨가해 세포 배양을 하였으나 세포의 생존율이나 DNA양에 영향을 미쳐 10⁻⁶ M을 최대한의 농도로 설정했다. 2,4-D는 ER-E₂의 binding affinity를 10⁻⁶ M에서 30%까지 억제시킴으로 xeno-estrogenic contaminant임이 확인되었다. 혈청이나 배지 내에서 VTG의 합성이

보이지 않는다고 해서 xeno-estrogenic contaminant에 안전 한 것이 아니며 오염물질의 E₂ 행동이 약할 수 있으므로 좀더 상세한 연구를 위해서는 상위단계인 ER와 VTG mRNA의 조사가 반드시 필요할 것으로 사료된다.

현재의 연구에서 2,4-D는 VTG의 합성을 유발하지는 않았지만 E₂와 같이 ER에 결합하여 E₂의 결합을 방해함으로써 xeno-estrogenic contaminant로서 행동하는 것을 알 수 있었다.

요 약

이 연구는 무지개송어, *O. mykiss* 간세포 배양을 이용해 합성화학물질인 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)가 vitellogenin (VTG) 합성과 estrogen (E₂) - estrogen receptor (ER) binding affinity에 미치는 영향을 조사하였다. 간세포는 2일간 전 배양한 후에 E₂ (2×10⁻⁶ M) 또는 2,4-D (10⁻⁹~10⁻⁶ M)를 배지에 첨가해 5일간 배양한 후, VTG와 E₂-ER binding affinity를 SDS-PAGE와 ELISA를 이용해 각각 조사하였다. 사용된 2,4-D의 농도는 세포의 형태, 생존력 및 DNA 함량에는 영향을 미치지 않았다. 또한, 2,4-D는 VTG의 합성에도 어떠한 영향도 미치지 않았으나 E₂-ER binding affinity를 억제하였다. 이 binding affinity는 2,4-D의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 나타내어 10⁻⁷과 10⁻⁶ M에서 25%와 30%를 각각 억제하였다. 이 결과들은 비록 2,4-D가 VTG의 합성에는 영향을 미치지 않지만, ER에서 xeno-estrogenic contaminant로서 행동하는 것을 제시하였다.

참 고 문 헌

- Charles, J. M., H. C. Cunny, R. D. Wilson and J. S. Bus, 1996. Comparative subchronic studies in 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, amine, and ester in rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 33 : 161-165.
- Christiansen, T., B. Korsgaard and P. Bjerregaard, 1995. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus* (L.). (in) *Proceedings from the fifth SETAC Europe Congress, Copenhagen*. 164 pp.
- Christiansen, T., B. Korsgaard and A. Jespersen, 1998. Effects of nonylphenol and 17 β -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. *J. Exp. Biol.*, 201 : 179-192.

- Fingerman, M., N. C. Jackson and R. Nagabhushanam, 1998. Hormonally-regulated function in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120C : 343-350.
- Flouriot, G., F. Pakdel and Y. Valotaire, 1996. Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 124 : 173-183.
- Hara, A., C. V. Sullivan and W. W. Dickhoff, 1993. Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.*, 10 : 245-256.
- Harries, J. E., D. A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, J. P. Sumpter and N. Zaman, 1997. Estrogenic activity in five united kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 : 534-542.
- Hayashi, S. and Z. Ooshiro, 1975. Gluconeogenesis and glycolysis in isolated perfused liver of the eel. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 41 : 201-208.
- Hiramatsu, N. and A. Hara, 1996. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in sakhalin taimen, *Hucho perryi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A : 243-251.
- Hwang, U. G., N. Kagawa and Y. Mugiya, 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 119 : 69-76.
- Jobling, S. and J. P. Sumpter, 1993. Detergent components in sewage effluents are weakly oestrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, 27 : 361-372.
- Korsgaard, B., 1990. Estrogen treatment and its influence on protein synthesis and amino acid metabolism in *Zoarces viviparus* (L.) males. *Fish Physiol. Biochem.*, 8 : 121-127.
- Kwon, H. C., S. Hayashi and Y. Mugiya, 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B : 381-386.
- Lazier, C. B. and M. E. MacKay, 1993. Vitellogenin gene expression in teleost fish. pp. 391-405. (*in*) *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, (eds.) P. W. Hochachka and T. P. Mommsen. Elsevier, Amsterdam.
- Madsen, S. S., A. B. Mathiesen and B. Korsgaard, 1997. Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on smoltification and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 17 : 211-216.
- Matsubara, T., T. Wada and A. Hara, 1994. Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese Sardine (*Sardinops melanostictus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B : 545-551.
- Mugiya, Y. and A. Tanahashi, 1998. Inhibitory effects of aluminium on vitellogenin induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 109 : 37-43.
- Munro, H. N. and A. Fleck, 1966. Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. *Analyst*, 91 : 78-88.
- Pakdel, F., F. Delaunay, B. Ducouret, G. Flouriot, L. Kern, G. Lazennec, Y. Le Drean, F. Petit, G. Salbert, D. Saligaut, M. Tujague and Y. Valotaire, 1997. Regulation of gene expression and biological activity of rainbow trout estrogen receptor. *Fish Physiol. Biochem.*, 17 : 123-133.
- Ponglikitmongkol, M., S. Green and P. Chambon, 1988. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *Embo J.*, 7 : 3385-3388.
- Purdom, C. E., P. A. Hardiman, V. J. Bye and C. R. Tyler, 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, 8 : 275-285.
- Sumpter J. P., 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol. Lett.*, 82/83 : 737-742.
- Sumpter, J. P. and S. Jobling, 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp.*, 103 : 173-178.
- Toppiari, J., J. C. Larsen and P. Christiansen, 1995. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Miljøprojekt 290, Copenhagen: Ministry of the environment and energy, Danish Environmental Protection Agency. 166 pp.
- White, R., S. Jobling, S. A. Hoare, J. P. Sumpter and M. G. Parker, 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol.* 135 : 175-182.
- Wilder, I. B. and J. G. Stanley, 1983. RNA-DNA ratio as an index to growth in salmonid fishes in the laboratory and in streams contaminated by carbaryl. *J. Fish Biol.*, 22 : 162-172.
- Yeo, I. Y. and Y. Mugiya, 1997. Effects of extracellular calcium concentration and calcium antagonists on vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 105 : 294-301.

(접수 : 2001년 12월 17일, 수리 : 2002년 1월 8일)