

Estradiol-17 β 의 복강 주사에 따른 미성숙 조피볼락, *Sebastes schlegeli*의 혈장 VTG, ALPP, Ca, GPT 및 HSI의 일시적 변동

황운기[†] · 심정민 · 박승윤 · 지정훈* · 강주찬*

국립수산과학원 동해수산연구소

*부경대학교 수산생명의학과

Temporal Changes of Plasma Vitellogenin (VTG), Alkaline-Labile Protein Phosphorus (ALPP), Calcium (Ca), Glutamate Pyruvate Transaminase (GPT) and Hepatosomatic Index (HSI) in the Estradiol-17 β , Intraperitoneally Injected Immature Rockfish, *Sebastes schlegeli*

Un-Gi Hwang[†], Jung-Min Shim, Soung-Yoon Park, Jung-Hoon Jee* and Ju-Chan Kang*

National Fisheries Research and Development Institute, East Fisheries Research Institute,
Kangnung 210-861, Korea

*Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Temporal changes of plasma vitellogenin (VTG), alkaline-labile protein phosphorus (ALPP), calcium (Ca), glutamate pyruvate transaminase (GPT) and hepatosomatic index (HSI) were examined in the estradiol-17 β , (E₂)-administered immature rockfish, *Sebastes schlegeli*. Fish were intraperitoneally injected with E₂ (5 mg/kg B.W.) in 70% ethanol and then plasma were extracted at 0, 1, 3, 6, 9, 12 and 15 days. VTG band was detected at a molecular weight position of about 170 kDa on Day 3 in SDS-PAGE. This band became more distinct at 6 days but its was gradually thinned with time-course, and not detected at 15 days. Plasma ALPP and Ca increased suddenly at 1 day and the highest concentrations were detected at 6 days and then these concentrations decreased gradually with time-course. ALPP and Ca concentrations at 15 days after E₂ administration were very similar to that before E₂ administration. GPT was increased at 1 day and higher GPT was detected at 3 days. However, GPT was gradually decreased with time-course. GPT and HSI at 15 days after E₂ administration were also very similar to that before E₂ administration. HSI was also increased at 1 day and the highest value was detected at 3 days and then gradually decreased with time-course. These results suggest that plasma ALPP, Ca, GPT and HSI could be utilized as a biomarker of exogenous E₂ exposure in coastal ecosystem, because the changes of ALPP, Ca, GPT and HSI after E₂ administration are very similar to that of VTG.

Key words : Estradiol-17 β , Hepatosomatic index, Plasma values, *Sebastes schlegeli*, Vitellogenin

Vitellogenin (calcium-binding phospholipoglycoproteins, VTG)은 성숙한 암컷의 생식선 자극 호르몬 (gonadotropic hormones, GtH)에 의해 난소

에서 생합성 되어진 estrogen (estradiol-17 β , E₂)에 의해 간장에서 합성되는 단백질이다. 합성된 VTG는 혈액을 통해 난모세포로 이동해 (Hara et

[†]Corresponding Author : Un-Gi Hwang, Tel : 033-660-8541,
Fax : 033-660-8513, E-mail : ungi2222@yahoo.co.kr

al., 1993; Matsubara and Sawano, 1995) lipovitellin, phosvitin 및 β' -components로 분해되어 다른 난생 척추동물과 마찬가지로 어류에 있어서도 배와 유생의 발달시기에 중요한 영양원으로 이용되므로 (Hiramatsu and Hara, 1996) 빈약한 VTG의 축적은 어류의 난수 (Lee and Gerking, 1980)와 부화율 (Runn et al., 1977)을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 또한, VTG는 E_2 와 유사행동을 하는 내분비 장애물질 (endocrine disrupting compounds, EDCs)에 의해 미성숙어 및 수컷 어류에서도 합성되어 EDCs 노출에 대한 생물학적 지표로서 사용된다 (Sumpter and Jobling, 1995; Toppari et al., 1995).

EDCs의 영향을 판단하기 위한 VTG 측정 방법에는 방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA) (Campbell and Idler, 1980), 면역전기영동법 (immunoelectrophoresis) (Chen et al., 1986), 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (Mylchreest et al., 2003) 및 면역확산법 (immunodiffusion) (Ueda et al., 1984) 등이 이용되고 있으나 대부분의 연구가 사육이나 관리가 손쉬운 담수산 어류를 대상으로 이루어졌을 뿐만 아니라, 종 특이성에 따른 항체 작성의 어려움 때문에 해산 어류에 대한 직접적인 영향을 조사하는데 많은 어려움이 있다.

연안해역으로 유입되는 대량의 산업폐수와 생활하수에는 다량의 EDCs가 존재해 연안 정착성 어류의 생식기능에 많은 영향을 미칠 것으로 판단되므로 EDCs 노출에 따른 해산어류의 생식기능 변화를 좀더 손쉽게 판단할 수 있는 생물학적 지표 개발이 아쉬운 실정이다.

따라서 본 연구에서는 연안 암반에 서식하는 정착성 어류인 조피볼락, *Sebastes schlegeli*을 인위적으로 E_2 에 노출시켜 혈장 내 VTG와 더불어 alkaline-labile protein phosphorus (ALPP), calcium (Ca), glutamate pyruvate transaminase (GPT) 및 간중량지수 (hepatosomatic index, HSI)의 변화를 살펴서 EDCs 노출에 대한 생물학적 지표로서의 사용 가능성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

실험에 사용된 조피볼락, *Sebastes schlegeli*은 부경대학교 수산과학연구소에서 사육해 온 체중 약 50 g의 미성숙어로 외관상 질병에 대한 증세가 없는 건강한 개체를 사용하였다. 실험기간 동안 약 18°C의 수온을 유지하는 유수식 사육수조 내에서 실험이 행하여 졌으며 주사 후 사료는 공급하지 않았다.

E_2 의 투여 및 혈장분리

실험어의 복강에 70%의 에탄올, 1 ml에 녹여진 E_2 (5 mg/kg B.W.)를 주사한 후 0, 1, 3, 6, 9, 12 및 15일에 혈액을 채취하였다. 혈액은 2-phenoxethanol에 마취시킨 어류의 꼬리혈관에서 heparin-Na (25,000 I.U., 중의제약)을 처리한 1회용 주사기를 사용하여 채취하였다. 채취된 혈액은 1시간 동안 실온에 보관한 후 4°C에서 2시간 방치시킨 다음 6,000 rpm에서 5분간 원심 분리를 통해 혈장을 분리하였으며 분리된 혈장은 -20°C에서 냉동보관 후 3일 이내에 VTG, ALPP, Ca 및 GPT의 변화를 조사하였다.

단백질의 정량 및 전기영동

혈장 내 단백질 양은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 coomassie brilliant blue (CBB) G-250을 사용한 Bradford (1976)의 방법으로 측정하였다. 혈장 내 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 의해 5~20% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 이용하여 분석하였다. 혈장 0.5 μ l (단백질 16~25 μ g)를 sample buffer (0.175 M tris-HCl, 8 M urea, 1% SDS 및 0.5% 2-mercaptoethanol, pH 7.4) 5 μ l에 혼합한 후 100°C에서 3분간 가열해 용해시켜 SDS-PAGE를 이용하여 30 mA의 속도로 분리한 후 0.25% coomassie brilliant blue G-250으로 1시간 동안 염색하였다.

VTG를 판별하기 위하여 사용된 표준 단백질 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)을 사용하였다.

E₂ 투여에 의한 VTG, ALPP, Ca, GPT 및 HSI의 변화

E₂를 투여한 후 0, 1, 3, 6, 9, 12 및 15일 된 조피볼락의 VTG, ALPP, Ca, GPT 및 HSI를 측정하였다. VTG는 전술한 방법에 의해 암컷특이 단백질인 약 170 kDa의 밴드를 조사하였다.

혈장 ALPP 농도의 변화는 phosphomolybdate colorimetric assay 법을 이용한 측정용 kit (Sigma, 670-A)를 사용하였다. 10 μ l의 혈장과 표준액에 측정액 1 ml를 첨가해 실온에서 15분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다 (HACA, DR/4000). ALPP는 혈장 흡광도/표준액 흡광도 \times 5 식에 의해 계산되었으며 대조로 증류수를 첨가한 실험구의 흡광도도 함께 측정되었다.

혈장 Ca 농도의 변화는 o-cresolphthalein-complexon 법을 이용한 Ca 측정용 kit (Asan Pharm. Co.)를 사용하여 분석하였다. 50 μ l의 혈장 및 표준액 I 과 II에 정색시액 0.5 ml를 첨가해 실온에서 잘 혼합한 후 측정용액을 각각 5 ml를 첨가했다. 첨가 후 90분 동안 반응시켜 575 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액 I 과 II의 결과로 얻어진 검량선으로부터 Ca농도를 결정하였으며 증류수를 첨가한 실험구가 대조로 사용되었다.

혈장 내 GPT는 reitman-frankel의 방법을 이용한 kit (Asan Pharm. Co.)로 측정하였다. 기질액 1 ml를 37°C에서 5분간 방치한 후 E₂를 투여한 조피볼락의 혈장 0.2 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 방치하고, 정색시액 1 ml 첨가해 잘 혼합한다. 20분 후에 0.4N NaOH 10 ml를 첨가하여 10분간 방치한 다음 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도를 측정 (DR/4000, HACH)한 후 표준곡선용 시액으로부터 작성된 표준곡선을 이용하여 GPT 농도를 측정하였다.

HSI의 변화를 살펴보기 위하여 E₂를 투여한 후 0, 1, 3, 6, 9, 12 및 15일에 어체중과 간의 무게를 측정하였다. HSI는 간무게/어체중 \times 100 식을 이용해 나타내었다.

통계처리는 평균 \pm 표준오차로 나타냈으며 SPSS (V. 10.0)를 사용하여 one-way ANOVA를 실시하여 95% 신뢰구간에서 유의차를 검정하였다.

결 과

VTG

E₂를 투여한 조피볼락의 혈장에서 투여 전인 0일과 투여 후 1일째에는 암컷 특이 단백질인 VTG 밴드가 관찰되지 않았으나 투여 후 3일째 약 170 kDa의 위치에서 강한 CBB 염색성을 가진 VTG 밴드가 관찰되었다. VTG 밴드는 6일째 염색성이 더욱 진하게 나타나 6일째까지는 시간의 경과에 따라 증가하는 양상을 나타내었으나 투여 후 9일과 12일째부터는 밴드의 염색성이 흐려져 시간의 경과와 더불어 밴드가 점점 감소해 15일째에는 밴드가 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

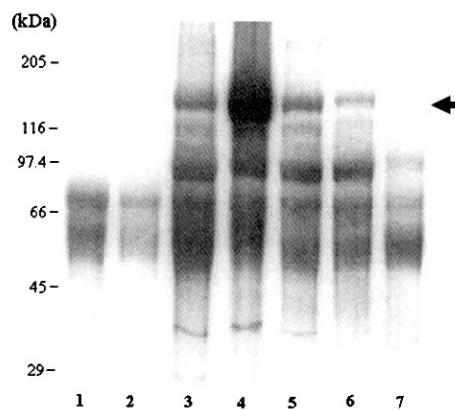


Fig. 1. SDS-PAGE of plasma in E₂-administered juvenile rockfish, showing the expression of VTG bands (arrowhead). Lane 1: control ; Lane 2: 1 days after administration ; Lane 3: 3days after administration ; Lane 4: 6 days after administration ; Lane 5: 9 days after administration ; Lane 6: 12 days after administration ; Lane 7: 15 days after administration.

ALPP 농도

조피볼락의 혈장 내 ALPP 농도는 E₂ 투여 전인 0일에 94.90±3.70 µg/ml를 나타냈으나 투여 후 1일째에는 177.03±5.53 µg/ml로 급격히 증가하였다. ALPP는 시간의 경과와 더불어 증가하는 양상을 나타내 투여 3일째 205±6.85 µg/ml를 나타냈으며 6일째에는 252.10±5.94 µg/ml로 최고치를 나타내었다. 하지만, 9와 12일째 점점 감소해 217.87±6.53 µg/ml와 196.60±6.33 µg/ml를 나타냈으며 15일째는 100±2.40 µg/ml로 E₂ 투여 전과 비슷한 수치를 나타내었다 (Fig. 2).

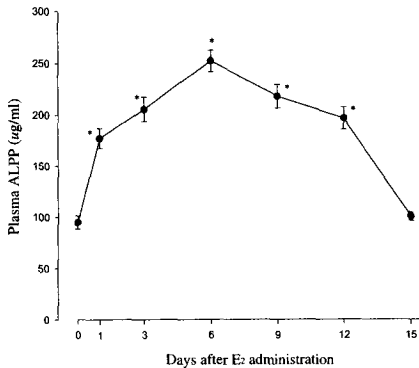


Fig. 2. Temporal changes of ALPP in the plasma of E₂-administered juvenile rockfish. Each point represents the mean ± SE of five fish. *P<0.05 for control (0 days after E₂ administration)

Ca 농도

혈장 내 Ca 농도는 E₂ 투여 전인 0일에 71.33 ±6.66 µg/ml를 나타냈으나 투여 1일째 급격히 증가하여 115.17±4.31 µg/ml로 급격히 증가하였다. 또한, 시간의 경과와 더불어 증가해 3일째 154±4.88 µg/ml, 6일째 177.33±4.91 µg/ml로 최고치를 나타내었으나 9일째와 12일째는 145±4.91 µg/ml, 114.47±3.30 µg/ml로 감소하였으며 15일째는 96.67±5.78 µg/ml로 급격히 감소하는 양상을 나타내었다 (Fig. 3).

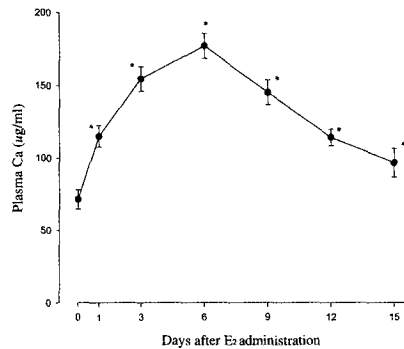


Fig. 3. Temporal changes of Ca in the plasma of E₂-administered juvenile rockfish. Each point represents the mean ± SE of five fish. *P<0.05 for control (0 days after E₂ administration)

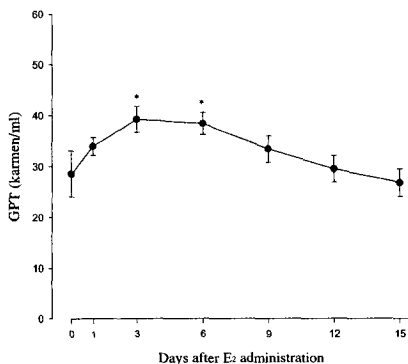


Fig. 4. Temporal changes of GPT in the plasma of E₂-administered juvenile rockfish. Point represent the mean ± SE of five fish. *P<0.05 for control (0 days after E₂ administration)

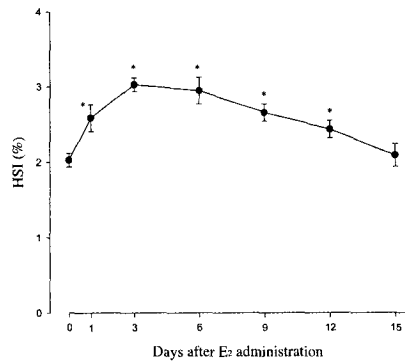


Fig. 5. Temporal changes of HSI in E₂-administered juvenile rockfish. Each point represents the mean ± SE of three fish. *P<0.05 for control (0 days after E₂ administration)

GPT 농도

GPT는 투여 전인 0일째에 28.50 ± 2.61 karmen/ml를 나타냈으나 투여 1일째에는 33.96 ± 1.02 karmen/ml로 급격히 증가하였다. 3일째는 39.28 ± 1.46 karmen/ml로 최고치를 나타냈으나 시간이 경과할수록 점점 감소해 12일째 29.51 ± 1.50 karmen/ml, 15일째는 26.78 ± 1.56 karmen/ml로 E₂ 투여 전 만큼 감소했다 (Fig. 4).

HSI

조피볼락의 HSI는 E₂ 주사 전에 $2.02 \pm 0.05\%$ 를 나타냈지만, 투여 후 점점 증가해 1일째 $2.58 \pm 0.10\%$ 로 증가하였으며 3일째에는 $3.02 \pm 0.05\%$ 로 최고치를 나타내었다. 3일 이후 HSI는 시간의 경과와 더불어 점점 감소해 12일째에 $2.43 \pm 0.07\%$ 를 나타내었으며, 15일째는 $2.08 \pm 0.09\%$ 로 E₂ 투여 전과 비슷한 수치만큼 감소했다 (Fig. 5).

고 찰

외인성 E₂ 노출에 의한 인위적인 VTG 유발은 성 성숙 시기뿐만 아니라 연중 VTG 합성을 조절할 수 있어서 vitellogenesis와 관련된 내분비적 기능과 EDCs의 영향을 판단하기 위하여 널리 사용되어왔다 (Flouriot *et al.*, 1996; Pakdel *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1998). 어류에 대한 EDCs의 노출은 크게 사육수, 사료 및 주사에 의한 방법이 이용되고 있으나 자연생태계 내에서 노출될 수 있는 상황을 고려해 지금까지는 사육수 (Kramer *et al.*, 1998)와 사료 (Rice and Xiang, 2000)에 E₂를 첨가해 일정기간 사육함으로써 영향을 조사하였다. 그러나, 최근에는 어체 내 투입된 외인성 E₂의 양을 쉽게 파악할 수 있을 뿐만 아니라 오염된 사육수의 양을 줄일 수 있는 주사를 통한 노출방법을 선택하여 많은 조사가 이루어지고 있다 (Hwang and Kang, 2002; Yadetie and Male, 2002). 따라서, 본 연구에서도 일시

적으로 VTG 합성을 증가시킬 수 있는 방법으로 E₂ 주사에 의한 방법을 선택하여 혈장 내 ALPP, Ca, GPT 및 HSI의 변동을 VTG와 비교 분석하였다.

VTG는 calcium-binding phospholipoglyco 단백질로서 담수산 어류인 무지개송어, *Salmo gairdneri*의 경우에 ALPP와 Ca이 VTG의 0.6% (Campbell and Idler, 1980)와 0.5% (Sumpter, 1985)를 차지하고 있어 VTG 증가와 더불어 ALPP와 Ca이 증가하는 것으로 알려져 (Nagler *et al.*, 1987) VTG 측정을 위한 간접적인 방법으로 사용될 뿐만 아니라 EDCs에 대한 영향을 평가하는 하나의 지표로서 제시되고 있다 (Nagler *et al.*, 1987; Kramer *et al.*, 1998). 본 실험에 있어서도 해산어인 조피볼락의 혈장 내 ALPP와 Ca 양은 E₂ 노출 후에 VTG와 더불어 급격히 증가해 전기 영동상에서 VTG 밴드의 염색성이 가장 강한 6일째 최고치를 나타냈으며 VTG 밴드가 관찰되지 않는 15일에 ALPP와 Ca 농도가 급격히 감소하는 유사한 경향을 나타내었다.

VTG를 측정하는 방법에는 여러 가지가 있지만 VTG를 정량 분석하기 위해서는 어중에 따라 특이성을 나타내는 항체 작성이 필요 불가결하다. 따라서, 간단히 수치화시킬 수 있는 혈청 내 ALPP와 Ca이 EDCs 노출에 대한 생물학적 지표로서 이용한다면 연안정착성 어류의 영향의 정도를 좀더 간단하게 구명할 수 있을 것으로 판단되어진다.

E₂와 화학구조식이 비슷한 4-nonylphenol이 수컷 European flounder (*Platichthys flesus*)에서 난막 단백질과 VTG 합성을 유발할때 간세포를 손상시켜 혈장 내 GPT가 일시적으로 급격히 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Christensen *et al.*, 1999). 본 연구에서도 E₂를 투여한 조피볼락에서 VTG와 GPT가 일시적으로 급격히 증가하는 비슷한 양상을 나타내 체내에서 합성되지 않은 외인성 E₂ 노출에 따른 vitellogenesis 작용은 간세포에 독성으로 영향을 미쳤을 것이다. 따라서, GPT와 같은 혈장 전위효소도 ALPP 및 Ca과 함

계 비교한다면 EDCs 노출의 생물학적 지표로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

Vitellogenesis 동안 간장의 고영양화에 따른 수분함량 증가로 인해 HSI가 증가하는 것처럼 (Kramer *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 1999) 현 연구에서도 조피볼락의 HSI는 E₂ 노출 후 급격히 증가해 간장에서 vitellogenesis가 활발하게 진행되고 있는 것을 알 수 있었다. 하지만 ALPP, Ca 및 VTG가 6일째 최고치를 나타냈지만 GPT와 HSI는 3일째에 최고치를 나타내어 시간에 따른 증·감의 차이를 나타내었다. 간세포 내에서 E₂에 의한 VTG 합성은 수용체, 전사 및 번역 단계를 거쳐서 이루어짐으로 간 내에서 vitellogenesis가 이루어지는 시간과 합성된 VTG이 혈액 내 분비되기까지는 시간차이가 있을 것으로 판단된다. 하지만 VTG은 합성을 시작해서 분비되는 데 까지 3일이 걸린다는 것을 의미하는 것은 아니다. 실험방법상 3일의 간격을 두었기 때문으로 E₂ 노출 후 4일이나 5일까지도 GPT 및 HSI가 증가할 것으로 사료된다. Hwang (2001)은 무지개송어의 간세포 배양에서 전사 단계를 나타내는 VTG mRNA은 E₂ 노출 1일째부터 관찰되며 VTG 밴드는 전기 영동상에서 2일째부터 흐리게 나타나 vitellogenesis과정에 따른 시간 차이를 설명하였다.

VTG 출현과 양은 E₂ 투여 양과 횟수에 따라 다소의 차이를 나타낸다. 본 실험의 어종과는 다르지만 E₂를 첨가한 무지개송어의 간세포배양에서는 5~7일까지 VTG 밴드가 증가하는 것으로 알려져 있듯이 (Kwon *et al.*, 1993; Yeo and Mugiya, 1997; Hwang *et al.*, 2000), 현 연구에서도 유사하게 6일째에 강한 VTG 밴드가 관찰되어 E₂와 EDCs의 영향을 조사할 때 실험방법상 같은 조건이라면 6일 전후가 시간상 적당하다.

이상의 결과로부터 조피볼락의 혈장 내 ALPP, Ca, GPT 및 HSI는 VTG와 더불어 연안 생태계 내에서 EDCs 노출에 대한 어류의 내분비 변동을 파악할 수 있는 생물학적 지표로서 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

Estradiol-17 β (E₂)에 노출된 미성숙 조피볼락의 혈장 내 vitellogenin (VTG), alkaline-labile protein phosphorus (ALPP), calcium (Ca), glutamate pyruvate transaminase (GPT) 및 hepatosomatic index (HSI)의 일시적인 변화가 조사되었다. 70% 에탄올에 녹여진 E₂ (5 mg/kg B.W.)를 조피볼락 치어의 복강에 주사한 후 0, 1, 3, 6, 9, 12 및 15일에 혈장이 수집되었다. 전기 영동상에서 주사 후, 3일째 약 170 kDa의 위치에 염색성을 나타내는 VTG 밴드가 검출되었다. 밴드의 염색성은 6일째 더욱 강하게 나타났지만, 시간의 경과와 더불어 흐려져 15일째에는 노출 전 처럼 VTG 밴드가 관찰되지 않았다. 혈장 내 ALPP와 Ca는 1일째부터 급격히 증가했으며 VTG 변동과 유사하게 6일째 가장 높은 농도를 나타낸 후, 시간의 경과와 더불어 점점 감소해 15일째는 노출 전과 유사한 값을 나타내었다. GPT는 투여 1일부터 급격히 증가해 3일에 최고치를 나타낸 이후 시간의 경과와 더불어 감소하는 경향을 나타냈으며 HSI의 경우도 1일째부터 증가해 3일째에 가장 높은 수치를 나타낸 후, 점점 감소해 E₂ 투여전과 유사한 수치를 나타내었다. 이들 결과로 E₂에 노출된 이후 조피볼락의 혈장 내 ALPP, Ca, GPT 및 HSI는 혈장 VTG와 유사한 증·감을 나타내는 것을 알 수 있었다.

따라서, ALPP, Ca, GPT 및 HSI는 VTG와 더불어 연안 생태계 내에서 외인성 E₂ 노출에 대한 생물학적 지표로서 사용 가능할 것으로 판단되어진다.

참고 문헌

- Bradford, M.M. : A rapid and sensitive methods of the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analy. Biochem.*, 72 : 248-254, 1976.
- Campbell, C.M. and Idler, D.R. : Characterization

- of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross-reactivity to ovarian yolk fractions. *Biol. Reprod.*, 22 : 605-617, 1980.
- Chen, T.C., Reid, P.C., van Beneden, R. and Sonstegard, R.A. : Effect of aroclor 1254 and mirex on estradiol-induced vitellogenin production in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43 : 169-173, 1986.
- Christensen, L.J., Korsgaard, B. and Bjerregaard, P. : The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder, *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.*, 46 : 211-219, 1999.
- Flouriot G., Pakdel, F. and Valotaire, Y. : Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 124 : 173-183, 1996.
- Hara, A. Sullivan, C.V. and Dickhoff, W.W. : Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.*, 10 : 245-256, 1993
- Hiramatsu, N. and Hara, A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen, *Hucho perryi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A : 243-251, 1996.
- Hwang, U.G. : Vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish. Sci. Tech.*, 4(4) : 186-191, 2001.
- Hwang, U.G. and Kang, J.C. : Effect of nonylphenol on plasma glutamate xaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) in the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J. Fish. Sci. Tech.*, 5(4) : 359-361, 2002.
- Hwang, U.G., Kagawa, N. and Mugiya, Y. : 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, 2000.
- Kramer, V.J., Miles-Richardson, S., Pierens, S.L. and Giesy, J.P. : Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 β -estradiol. *Aquat. Toxicol.*, 40 : 335-360, 1998.
- Kwon, H.C., Hayashi, S. and Mugiya, Y. : Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B : 381-386, 1993.
- Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685, 1970.
- Lee, R.M. and Gerking, S.D. Survival and reproductive performance of the desert pupfish, *Cyprinodon n. nevadensis* (Eigenmann and Eigenmann), in acid water. *J. Fish Biol.*, 17 : 507-515, 1980.
- Matsubara, T. and Sawano, K. : Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *J. Exp. Zool.*, 272:34-45, 1995.
- Mylchreest, E. Snajdr, S., Korte, J.J. and Ankley, G.T. : Comparison of ELISAs for detecting vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 134C : 251-257, 2003.
- Nglar, J.J., Ruby, S. Idier, D.R. and So, Y.P. : Serum phosphoprotein phosphorous and calcium

- levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Zool.*, 65 : 2421-2425, 1987.
- Pakdel, F., Delaunay, F., Ducouret, B., Flouriot, G., Kern, L., Lazennec, G., Le Drean, Y., Petit, F., Salbert, G., Saligaut, D., Tujague, M. and Valotaire, Y. : Regulation of gene expression and biological activity of rainbow trout estrogen receptor. *Fish Physiol. Biochem.*, 17 : 123-133, 1997.
- Rice, C.D. and Xiang, Y. : Immune function, hepatic CYP1A and reproductive biomarker responses in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during dietary exposures to endocrine disrupters. *Mar. Environ. Res.*, 50 : 163-168, 2000.
- Runn, P., Johansson, N. and Milbrink, G. : Some effects of low pH on the hatchability of eggs of perch, *Perca fluviatilis*. *Zoon*, 5 : 115-125, 1977.
- Sumpter, J.P. : The purification, radioimmunoassay and plasma levels of vitellogenin from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. In current trends in comparative endocrinology. Vol. 1. Edited by B. Lofts and W. N. Holmes. Hong Kong University Press, Hong Kong, pp.355-357, 1985.
- Sumpter, J.P. and Jobling, S. : Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp.*, 103 : 173-178, 1995.
- Toppari, J., Larsen, J.C. and Christiansen, P. : Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Academic Press, pp.166, 1995.
- Ueda, H., Hiroi, O., Hara, A., Yamauchi K. and Nagahama, Y. : Changes in serum concentrations of steroid hormones, thyroxin and vitellogenin during spring maturation of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 53 : 203-211, 1984.
- Yadete, F. and Male, R. : Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aqua. Toxicol.*, 58 : 113-129, 2002.
- Yeo, I.Y. and Mugiya, Y. : 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, 1997.

Manuscript Received : September 01, 2004

Revision Accepted : October 29, 2004

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Chung
(Pukyong Univ.)