

## Bisphenol A와 Nonylphenol이 노래미, *Hexagrammos agrammus* 성숙기 난모세포의 스테로이드 생성과정에 미치는 영향

황인준 · 김형배<sup>1</sup> · 백혜자<sup>†</sup>

부경대학교 자원생물학과, <sup>1</sup>강원도립대학 해양생물자원개발과

## Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on *In Vitro* Steroid Production in Matured Oocyte of Greenlings, *Hexagrammos agrammus*

In Joon Hwang, Hyung Bae Kim and Hea Ja Baek<sup>†</sup>

Dept. of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Marine Bio-resources, Gangwon Provincial University, Gangnung 210-804, Korea

**ABSTRACT** : Endocrine disrupting chemicals (EDCs) such as bisphenol A (BPA) and nonylphenol (NP) have estrogenic activity and can alter reproduction in fish. In the present study, the effects of BPA and NP on *in vitro* steroid production from oocytes of maturation stage (oocyte diameter=1.88 mm) from the greenling (*Hexagrammos agrammus*) were evaluated. Oocytes were incubated with different concentrations of BPA and NP (0.1, 1, 10, 100 and 1,000 ng/ml) in the presence or absence of 50 IU human chorionic gonadotropin (HCG) for 48 hours. After incubation, levels of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP), estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) and testosterone (T) from incubated media were quantified by radioimmunoassay (RIA). In BPA treatment, 100 ng/ml of BPA stimulated E<sub>2</sub> production regardless HCG supplement. Every concentration of BPA inhibited T production without HCG although 0.1 ng/ml of BPA stimulated T production with HCG. In NP treatment, 10 ng/ml of NP stimulated 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP and T production without HCG. 1 ng/ml of NP inhibited E<sub>2</sub> production. Taken together, these results suggest that BPA might have weak estrogen-agonistic effect and NP has estrogen-antagonistic effect at final oocyte maturation stage of *H. agrammus*.

**Key words** : Bisphenol A, Greenling, Nonylphenol, Oocyte maturation, Steroid, 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, Estradiol-17 $\beta$ .

요 약 : 본 연구에서는 해산어를 이용하여 bisphenol A(BPA)와 nonylphenol(NP)이 난모세포 성숙 과정에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위해 성숙단계에 있는 노래미(*Hexagrammos agrammus*) 난모세포(난경 약 1.88 mm)를 대상으로 *in vitro* 에서 BPA와 NP 처리에 의한 난모세포의 성스테로이드 생성농도를 조사하였다. 난모세포에 BPA와 NP를 농도구별(0.1, 1, 10, 100, 1,000 ng/ml)로 첨가하고, 50 IU의 human chorionic gonadotropin(HCG)를 농도구별 BPA 또는 NP와 함께 첨가 하거나 하지 않고 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액 내의 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one(17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP), estradiol-17 $\beta$ (E<sub>2</sub>) 그리고 testosterone(T)의 농도를 방사면역측정법(RIA)을 통해 정량하였다. BPA 처리구에서는 100 ng/ml의 농도구에서 HCG 처리 유무에 상관없이 E<sub>2</sub> 생성이 촉진되었다. HCG 처리하에서 0.1 ng/ml의 농도구에서 T 생성은 촉진 되었으나, HCG를 처리하지 않은 실험구의 모든 농도구에서 T 생성은 저해되었다. NP 처리구에서는 HCG를 처리하지 않은 실험구의 10 ng/ml의 농도구에서 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP와 T 생성이 촉진되었고, 1 ng/ml의 농도구에서는 E<sub>2</sub> 생성이 억제되었다. 이상의 결과를 종합하면, 노래미의 성숙단계의 난모세포에서 BPA는 약한 estrogen-agonistic 효과를, NP는 estrogen-antagonistic 효과를 지니는 것으로 사료된다.

## 서론

<sup>†</sup> 교신저자: 부산광역시 남구 대연 3동 599-1, 부경대학교 자원생물학과, (우) 608-737, (전) +82-51-629-5924, (팩) +82-51-629-5924, E-mail: hjbaek@pknu.ac.kr

경골어류의 난 성숙 과정은 시상하부-뇌하수체-생식소로 구성되는 일련의 축을 따라 여포층에서 생성·분비되는 성

스테로이드 호르몬에 의해 조절되며, 뇌하수체의 생식선자극호르몬(gonadotropin)이 그 매개체 역할을 하고 있다. 난소에 난황이 축적되기 시작하는 난황형성기(vitellogenesis)에는 estradiol-17 $\beta$ (E<sub>2</sub>)가 주요 스테로이드로 작용하며, 난황축적이 종료된 직후부터 배란시기까지는 progesterone의 유도체인 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one(17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP)나 17,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one(17 $\alpha$ 20 $\beta$ 21P) 등이 주요 성 스테로이드 호르몬으로 알려져 있다(Nagahama et al., 1994; Goetz et al., 1987). 특히 배란 전에 난핵포붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)를 포함하는 일련의 최종성숙 과정은 20 $\beta$ -hydroxy group을 가지고 있는 스테로이드에 의해 유도된다고 알려져 있다(Yoshizaki et al., 2001; Patino et al., 2003).

최근에는 환경변화 및 오염이 어류의 재생산력에 미치는 영향에 대해 보고되고 있으며, 특히 내분비계 장애물질에 의한 생식교란에 대한 연구도 많아지고 있다(Mazzoldi & Rastotto, 2001; Baek et al., 2004; Mochida et al., 2004). 내분비계 장애물질 중 Bisphenol A(BPA)는 플라스틱의 원료, 금속 코팅 재료로 사용되는 물질이며 치과용 의료도구에도 함유된 것으로 보고되고 있다(Brotons et al., 1995; Olea et al., 1996). BPA가 어류의 생식에 미치는 영향으로는 미성숙 무지개송어에서 vitellogenin 합성 유도, 수컷 잉어의 간세포에서 난황전구단백질(vitellogenin) 분비 유도, 점막독 성숙난모세포에서의 에스트로젠과 프로제스틴으로의 대사 억제, 그리고 송사리의 산란량과 부화율의 저해 등이 있다(Christiansen et al., 1998; Smeets et al., 1999; Na et al., 2000; Baek et al., 2004).

Nonylphenol(NP)은 플라스틱 제품, 살충제와 공업용 세정제의 원료로 쓰이는 nonylphenol ethoxylates의 분해산물의 일종이다(Metcalf et al., 2001). 어류에 대한 NP의 영향을 살펴보면, 혈장 스테로이드 호르몬, vitellogenin과 난막단백질(zona radiata protein) 농도의 증가, 수컷 어류에서의 난정소(ovotestis) 유도와 같은 생식소 이상 현상과 배우자생성과정 저해 등(Arukwe et al., 1998; Kinnberg et al., 2000; Van Den Belt et al., 2002; Weber et al., 2003)으로, NP가 에스트로젠과 유사한 작용을 하며 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)에 직접 결합하여 어류의 생식내분비계에 장애를 일으킬 수 있음을 보고하고 있다.

BPA와 NP를 비롯한 내분비 교란 물질이 어류의 생식에

미치는 연구들은 주로 담수어를 대상으로 한 난황형성기에 국한되어 있으며, 소수의 연구만이 해산어를 대상으로 한 최종성숙기에 이들 물질이 미치는 영향에 대해 보고되어 있다(Tokumoto et al., 2004; Baek et al., 2007; Hwang et al., 2008). 본 연구는 BPA와 NP가 연안정착성 어종인 노래미의 난모세포 성숙기에 중요한 역할을 하는 성 스테로이드 호르몬 생성과정에 미치는 영향을 알아보기 위해 성숙과정에 해당하는 난모세포를 *in vitro* 상에서 NP와 BPA에 각각 노출시켜 E<sub>2</sub>, T 그리고 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP의 생성농도의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어 및 난모세포 배양

실험어는 산란기로 추정되는 11~12월에 부산 오륙도 근해에서 채집한 성숙한 암컷을 대상으로 하였다. 실험어는 0.5 ml/l 의 2-phenoxyethanol로 마취시켜 전 채혈한 후 무균상태에서 난소를 절취하여 ice-cold balanced salt solution (132.96 mM NaCl, 3.09 mM KCl, 0.28 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.98 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 3.40 mM CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 3.65 mM HEPES)으로 세척하였다. 절취된 난소는 가는 핀셋을 이용하여 난경별로 각각의 난모세포로 분리하였다. 분리된 난모세포는 영상분석장치(Image-Pro, Media Cybernetics, USA)를 이용하여 난경 측정 후 난경 약 1.88 mm에 해당하는 성숙단계의 난모세포만을 배양에 사용하였다. 분리된 난모세포는 24-well plate에 well당 Leibovitz L-15(L-15) 배양액(Gibco, USA) 1 ml에 20개의 난모세포를 각각 분주한 후 12°C에서 48시간 배양하였다. Balanced salt solution과 L-15 배양액의 pH는 7.9, 삼투질농도는 360 milliosmol로 조절하였다. BPA와 NP가 난소의 성 스테로이드 호르몬 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해, BPA와 NP(Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA)를 배양초기의 난모세포에 농도별(0.1, 1, 10, 100, 1,000 ng/ml)로 첨가하였다. NP와 BPA 외에 내분비 장애물질에 대한 난모세포의 성숙 유도 효과를 높이기 위해 human chorionic gonadotropin(HCG, Sigma Chemicals, USA) 50 IU를 첨가한 실험구도 설정하였다.

### 2. 스테로이드 호르몬 농도 측정

난모세포 배양 후 배양액 내의 E<sub>2</sub>, T 그리고 17 $\alpha$ 20 $\beta$

OHP의 농도는 방사면역측정법(RIA, radioimmunoassay)으로 분석하였다. 스테로이드 추출은 배양액에 혼합용매(ethylacetate : cyclohexane = 50 : 50)를 첨가하여 혼합 후 5~10 분간  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 수층을 결빙시켰다. 상층의 유기용매층(free steroids)만을 시험관에 옮겨 원심농축기로 완전건조시켰으며, 위의 추출과정을 2회 반복하였다. 각각의 추출물은 1 ml의 0.1% gel-PBS 완충용액(pH=7.5)에 재용해되어 정량할 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관되었다.

RIA에 의한 스테로이드 호르몬 측정은 Kobayashi et al. (1988)의 방법을 수정하여 측정하였다. 실험에 사용된 항체는 모두 Cosmo-Bio Co. Ltd.(Tokyo, Japan)로부터 얻었다. Standard 호르몬들은 Steraloids Inc.(Wilton, NH, USA)와 Sigma Chemical(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 또한, 방사표지된  $[2,4,6,7-^3\text{H}]\text{-E}_2$ 와  $[2,4,6,7-^3\text{H}]\text{-T}$ 은 Amersham Life Science (England)로부터 구입하였고, 방사표지된  $17\alpha 20\beta$  OHP는 Scott et al.(1983)의 방법에 의해서  $[1,2,6,7-^3\text{H}]\text{-}17\alpha$ -hydroxyprogesterone을 전구물질로 효소적 전환으로 얻은 후 분리, 정제한 것을 사용하였다.

$\text{E}_2$ , T 그리고  $17\alpha 20\beta$  OHP RIA계에 있어서 최소 검출량은 각각 12.5 pg/ml, 10 pg/ml, 10 pg/ml이었고, assay 내(intra-assay)와 assay 간(inter-assay) 변동계수를 50% 상대 결합율에서 조사한 결과,  $\text{E}_2$  RIA계에서는 3.4(n=3)와 11.5%(n=6), T RIA계에서는 2.3(n=3)와 12.5%(n=6),  $17\alpha 20\beta$  OHP RIA계에서는 3.2(n=4)와 9.5%(n=8)였다.

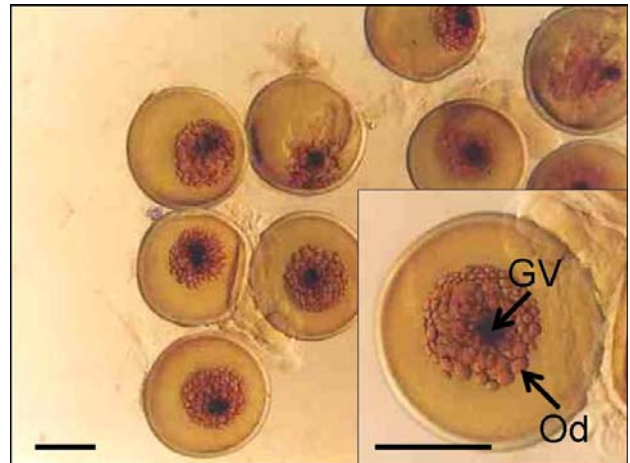
### 3. 통계분석

3개의 반복 실험구에서 측정된 스테로이드 생성농도는 모두 평균±표준오차로 나타내었으며, 95% 신뢰수준에서 one way ANOVA 및 Tukey test를 통해 대조구와 실험구간의 통계적 유의성을 검정하였다( $p<0.05$ ).

## 결 과

### 1. BPA가 성숙기 난모세포의 스테로이드 생성에 미치는 영향

노래미의 난소 내 난경 약 1.88 mm에 해당하는 난모세포는 배란 직전의 성숙기에 해당하는 난모세포로, 핵이 동물극으로 이동 중이고 세포질 내에 많은 유구가 한 쪽으로 몰려 있는 것이 관찰되었다(Fig. 1).



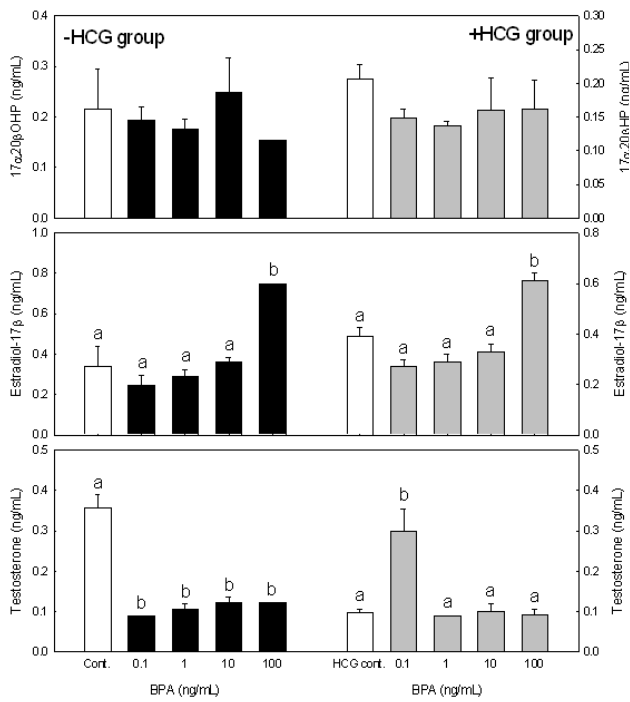
**Fig. 1. Morphology of oocytes from *Hexagrammos agrannus* (Oocyte diameter=1.88 mm).** Oocytes of final oocyte maturation stage showing migrated germinal vesicles (GV) and numerous oil droplets (Od). Scale bars indicate 1,000  $\mu\text{m}$ . GV, germinal vesicle; Od, oil droplet.

BPA는 노래미의 성숙 난모세포에서 HCG 처리 유무에 상관없이  $17\alpha 20\beta$  OHP의 생성에 뚜렷한 영향을 미치지 않았다(Fig. 2). 그러나 BPA 100 ng/ml 농도로 처리한 실험구에서  $\text{E}_2$  농도( $0.750\pm 0.001$  ng/ml)가 대조구( $0.340\pm 0.047$  ng/ml)에 비해 증가하였다( $p<0.05$ ). HCG와 함께 처리한 경우에도 최고 농도구에서 대조구( $0.389\pm 0.018$  ng/ml)에 비해  $\text{E}_2$  생성을 증가시켰다( $0.609\pm 0.014$  ng/ml,  $p<0.05$ ).

BPA가 T 생성에 미치는 변화를 살펴보면, BPA는 모든 농도구에서 T 생성이 대조구( $0.356\pm 0.012$  ng/ml)에 비해 감소한 반면( $p<0.05$ ), HCG와 함께 처리한 경우에는 0.1 ng/ml 처리구에서 T 생성을 대조구( $0.099\pm 0.001$  ng/ml)에 비해 유의하게 증가시켰다( $0.300\pm 0.026$  ng/ml,  $p<0.05$ ).

### 2. NP가 성숙기 난모세포의 스테로이드 생성에 미치는 영향

HCG 무처리구에서 NP 10 ng/ml 처리시  $17\alpha 20\beta$  OHP량이 가장 높은 수준( $1.767\pm 0.593$  ng/ml)을 나타내었다. 한편,  $\text{E}_2$ 의 생성은 대조구보다 감소되었으나, HCG 처리시 대조구보다 높은 값을 보여 상반된 결과를 나타냈다. 또한, HCG 무처리구에서 NP 10 ng/ml의 농도는 T의 생성을 대조구( $0.099\pm 0.002$  ng/ml)에 비해 유의하게 증가시켰다( $0.165\pm 0.024$  ng/ml,  $p<0.05$ ). HCG와 함께 처리한 경우 NP는 이들 성 스테

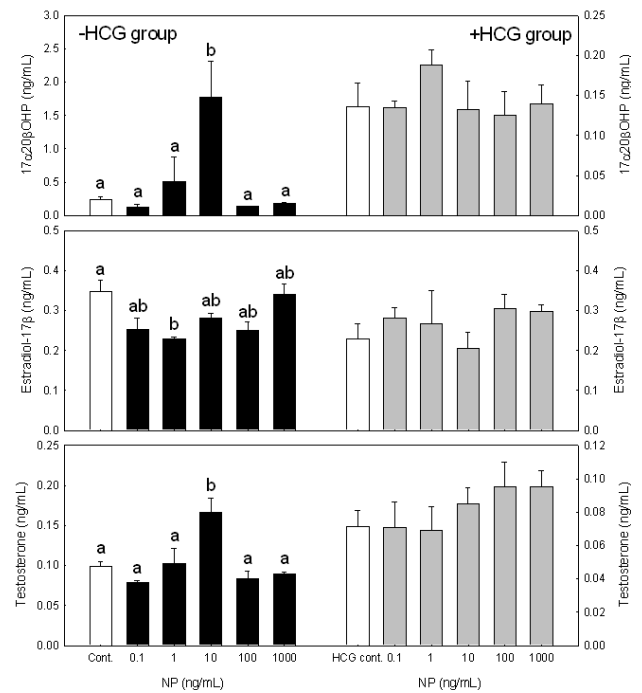


**Fig. 2.** Effects of different BPA concentrations on *in vitro* 17 $\alpha$ 20 $\beta$  OHP, E<sub>2</sub> and T production in greenling oocytes (oocyte diameter $\approx$ 1.88 mm) in the presence or absence of 50 IU hCG after a 48 h incubation. Values are mean $\pm$ SE of the each steroid in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tukey test. Bars with different superscripts are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

로이드 호르몬 생성에 미치는 뚜렷한 영향은 관찰되지 않았다.

### 고찰

BPA와 NP는 에스트로겐 활성을 나타낸다고 알려져 있으며(Nichols et al., 2001; Sohoni et al., 2001), 이들 물질이 어류의 생식에 미치는 영향은 주로 난황형성기의 담수어를 대상으로 한 연구가 대부분이며, 소수의 연구만이 해산어를 대상으로 한 최종 성숙 유도에 이들 물질이 미치는 영향에 대해 보고되어 있다(Baek et al., 2003; Jobling et al., 2003; Hwang et al., 2008). 노래미는 주산란기가 11~12월인 동계 산란어종으로 난소는 비동시발달형으로서 난소 내에 발달단계가 다른 난모세포들이 혼재해 있으며, 한 산란기에 2회 이



**Fig. 3.** Effects of different NP concentrations on *in vitro* 17 $\alpha$ 20 $\beta$  OHP, E<sub>2</sub> and T production in greenling oocytes (oocyte diameter $\approx$ 1.88 mm) in the presence or absence of 50 IU hCG after a 48 h incubation. Values are mean $\pm$ SE of the each steroid in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tukey test. Bars with different superscripts are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

상 산란하는 어종이다(Chung & Kim, 1994).

점망둑의 난황형성 완료 직후의 난모세포에서 NP(100 ng/ml)는 E<sub>1</sub>과 E<sub>2</sub>로의 대사율을 촉진시켰다(Baek et al., 2003). 그러나, 문질망둑의 난황형성후기의 난모세포에서 NP는 T와 E<sub>2</sub>의 생성에 있어 뚜렷한 영향을 미치지 않았다(Park, 2004). 일반적으로 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP와 같은 progestogens의 농도는 최종성숙 과정에서 E<sub>2</sub> 농도가 감소하면서 T 농도의 증가와 함께 증가한다고 알려져 있다(Aida, 1988; Nagahama et al., 1994). 또한, Lin & Schuetz(1983)의 연구에 의하면 *in vitro* 상에서 estrogen이 gonadotropin에 의해 유도된 성숙을 억제한다고 보고하였고, Pickford & Morris(2003)에 의하면 살충제의 일종인 methoxychlor가 양서류인 *Xenopus laevis*의 성숙한 난모세포 스테로이드 생성에 있어 에스트로겐으로의 대사율을 증가시키고, 프로게스테론의 생성능도를 저해시킨

다고 보고하였다. 노래미와 생식생리학적 특성이 유사한 쥐 노래미, *Hexagrammos otakii*에서도 성숙기에 해당하는 난모세포에서 NP는  $17\alpha 20\beta\text{OHP}$ 의 생성을 저해하고  $\text{E}_2$ 의 생성을 촉진하는 estrogen agonist로 작용한다고 보고되었다 (Hwang et al., 2008). 그러나 본 연구에서 NP는 노래미의 난모세포 최종성숙과정에서 1 ng/ml의 농도에서  $\text{E}_2$  생성을 억제시켰다. 또한, 10 ng/ml의 농도구에서 T와 성숙유도호르몬인  $17\alpha 20\beta\text{OHP}$ 의 생성을 촉진하는 것으로 보아 최소한 이 농도구에서 NP는 최종성숙에 있어 estrogen antagonist로 작용하는 것으로 생각된다. 그러나 다른 농도구에서 통계적 유의차는 없으나 대조구에 비해  $17\alpha 20\beta\text{OHP}$ 의 생성이 낮은 부분에 대해서는 GVBD assay와 steroid receptor에 관한 앞으로의 연구가 필요하다.

BPA는 GVBD가 시작된 점망둑의 성숙 난모세포에서  $\text{E}_2$ 와  $17\alpha 20\beta\text{OHP}$ 로의 대사율을 모두 저해하였고, 이는 BPA가 estrogen 활성과 antiestrogen 활성을 동시에 가지며, GVBD를 촉진하는 효과에 의한 것으로 판단된다(Baek et al., 2004, 2007). 또한, Tokumoto et al.(2004)에 의하면 BPA는 DES와 화학구조가 유사하여 어류의 난모세포 성숙을 촉진시킬 것이라고 보고하였다. 그러나 BPA는 송사리의 산란수를 감소시키고 수정란의 부화율을 감소시켰다(Na et al., 2000). 본 연구에서도 BPA는 HCG 처리와 상관없이  $17\alpha 20\beta\text{OHP}$  생성에는 뚜렷한 영향을 미치지 않았으나, 고농도에서  $\text{E}_2$ 의 생성을 촉진하였다. 또한, BPA는 모든 처리 농도구에서 T의 생성을 저해하였으나 HCG 첨가와 함께 저농도의 BPA는 T 생성을 촉진시켰다. 이상을 미루어 볼 때 BPA는 노래미의 최종성숙과정을 저해시킬 수 있는 약한 에스트로젠 활성을 지니는 것으로 생각된다.

본 연구결과, 노래미의 성숙단계 난모세포에서 NP는 estrogen antagonist로, BPA는 약한 estrogen agonist로 작용하는 것으로 나타났으나, 어류의 최종성숙, 즉 GVBD에 연이어 일어나는 일련의 과정인 배란까지의 짧은 기간 동안의 내분비 기작에 관한 연구는 극히 드문 실정이다. 이 시기에 유해물질에 한번 노출된 경우 산란량과 난질의 정도 그리고 수정률 및 부화율에도 영향을 미칠 가능성을 배제할 수는 없다고 생각된다. 따라서 앞으로 이와 관련된 연속연구가 필요하며, 이러한 결과를 기초로 노래미를 포함한 해산어류의 재생산 기작이 내분비 장애물질에 의해 어떻게 교란되는지 확인하기 위해서는 *in vivo* 실험을 수반한 향후 연구가 필요하다.

## 인용문헌

- Aida K (1988) A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture* 74:11-21.
- Arukwe A, Celius T, Walther BT, Goksøyr A (1998) Plasma levels of vitellogenin and eggshell zona radiata proteins in 4-nonylphenol and o,p'-DDT treated juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar Environ Res* 46: 133-136.
- Baek HJ, Park MH, Lee YD, Kim HB (2003) Effect of *in vitro* xenoestrogens on steroidogenesis in mature female fish, *Chasmichthys dolichognathus*. *Fish Physiol Biochem* 28:413-414.
- Baek HJ, Park MH, Lee YD, Kim HB, Kim JW, Yoo MS (2004) Effect of bisphenol A on ovarian steroidogenesis in longchin goby (*Chasmichthys dolichognathus*). *J Kor Fish Soc* 37:192-196.
- Baek HJ, Hwang IJ, Kim KS, Lee YD, Kim HB, Yoo MS (2007) Effects of BPA and DES on longchin goby (*Chasmichthys dolichognathus*) *in vitro* during the oocyte maturation. *Mar Environ Res* 64:79-86.
- Brotons JA, Olea-Serrano F, Villalobos M, Pedraza V, Olea N (1995) Xenoestrogens released from lacquer coatings in food can. *Environ Health Perspect* 103:608-612.
- Christiansen LB, Pedersen KL, Korsgaard B, Bjerregaard P (1998) Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *in vivo* synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Mar Environ Res* 46:137-140.
- Chung EY, Kim SY (1994) On the maturity and spawning of the greenling, *Hexagrammos agrammus* (Temminck et Schlegel). *Korean J Ichthyol* 6(2):222-236.
- Goetz FW, Fostier A, Breton Y, Jalabert B (1987) Hormonal changes during meiotic maturation and ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiol Biochem* 3(4):203-211.
- Hwang IJ, Lee YD, HB Kim, Baek HJ (2008) Estrogenic activity of nonylphenol in marine fish, *Hexagrammos otakii*, during oocyte development by evaluating sex

- steroid levels. *Cybiurn* 32:251-252.
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR (2003) Comparative responses of mollusks and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol* 65:205-220.
- Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P, Jespersen A (2000) Effects of nonylphenol and 17 $\beta$ -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *J Exp Biol* 203:171-181.
- Kobayashi M, Aida K, Hanyu I (1988) Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 69:301-307.
- Lin YW, Schuetz AW (1983) *In vitro* estrogen modulation of pituitary and progesterone-induced oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J Exp Zool* 226:281-291.
- Mazzoldi C, Rasotto MB (2001) Extended breeding season in the marbled goby, *Pomatoschistus marmoratus* (Teleostei: Gobidae), in the Venetian Lagoon. *Environ Biol Fish* 61:175-183.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T (2001) Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 20:297-308.
- Mochida K, Ohkubo N, Matsubara T, Ito K, Kakuno A, Fujii K (2004) Effects of endocrine-disrupting chemicals on expression of ubiquitin C-terminal hydrolase mRNA in testis and brain of the Japanese common goby. *Aquat Toxicol* 70:123-136.
- Na OS, Oh SR, Lee YD, Baek HJ, Kim HB (2000) Effects of bisphenol A on the hatching of fertilized eggs and spawning of adult fish in Songsari, *Oryzias latipes*. *J Kor Fish Soc* 33:378-382.
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, Tanaka M (1994) Regulation of oocyte maturation in fish. In: Sherwood NM and CL Hew. (ed.), *Fish Physiology*. V13. Molecular Endocrinology of Fish. Academic Press, London, pp 393-439.
- Nichols KM, Snyder EM, Snyder SA, Pierens SL, Miles-Richardson SR, Giesy JP (2001) Effects of nonylphenol ethoxylate exposure on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows *Pimephales promelas*. *Environ Toxicol Chem* 20:510-522.
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillofertil A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104:298-305.
- Patiño R, Thomas P, Yoshizaki G (2003) Ovarian follicle maturation and ovulation: an integrated perspective. *Fish Physiol Biochem* 28:305-308.
- Park MH (2004) *In vitro* effect of endocrine disrupting chemicals on oocytes maturation of yelloefin goby, *Acanthogobius flavimanus*. MS Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Pickford DM, Morris ID (2003) Inhibition of gonadotropin-induced oviposition and ovarian steroidogenesis in the African clawed frog (*Xenopus laevis*) by the pesticide methoxychlor. *Aquat Toxicol* 62:179-194.
- Sato N, Kawazoe I, Suzuki Y, Aida K (1998) Release of salmon gonadotropin and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone from lipophilized gelatin emulsion at 10, 20 and 30 $^{\circ}$ C in the Japanese eel. *Biotech Tech* 12:797-800.
- Scott AP, Sheldrick EL, Flint APF (1983) Measurement of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in plasma of trout (*Salmo gairdneri* Richardson): Seasonal changes and response to salmon pituitary extract. *Gen Comp Endocrin* 49:128-134.
- Smeets JS, Holsteijin I, Giesy JP, Seinen W, Van Den Berg M (1999) Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. *Toxicol Sci* 50:206-213.
- Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Heteridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M, Sumpter JP (2001) Reproductive effects of long-term

- exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Sci Tech 35:2917-2925.
- Tokumoto T, Tokumoto M, Horiguchi R, Ishkawa K, Nagahama Y (2004) Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation. Proc Natl Acad Sci 101:3686-3690.
- Van Den Belt K, Wester PW, Van Der Ven LTM, Verheyen R, Witters H (2002) Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. Environ Toxicol Chem 21:767-775.
- Weber LP, Hill RL, Janz DM (2003) Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Banjo rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. Aquat Toxicol 63:431-446.
- Yoshizaki G, Shusa M, Takeuchi T, Patiño R (2001) The induction of oocyte maturational competence by gonadotropin in Nibe, *Nibea mitsukurii* (Teleostei, Sciaenidae) requires activation of the protein kinase A pathway, and RNA and protein synthesis. Fish Physiol Biochem 25:201-208.
- 
- (received 18 October 2008, received in revised form 18 November 2008; accepted 18 November 2008)