

말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 초기배아 발생과 glutathione S-transferase (GST)의 발현에 대한 bisphenol A의 영향

황운기 · 김대한 · 류향미 · 이주욱 · 박승윤 · 강한승*

국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터

Effect of Bisphenol A on Early Embryonic Development and the Expression of Glutathione S-transferase (GST) in the Sea Urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*)

Un-Ki Hwang, Dae-Han Kim, Hyang-Mi Ryu, Ju-Wook Lee,
Seung-Yoon Park and Han Seung Kang*

National Fisheries Research & Development Institute, West Sea Fisheries Research Institute,
Marine Ecological Risk Assessment Center, Incheon 400-420, Korea

Abstract - In this study, gametotoxicity and embryotoxicity experiments using *Hemicentrotus pulcherrimus* were carried out to investigate the ecotoxicological effects of bisphenol A (BPA). We examined the effects of BPA on fertilization and normal embryogenesis at various concentrations (0, 300, 500, 800, 1000, and 1500 ppb). The results demonstrated that the fertilization rates were not changed. The normal embryogenesis rates were gradually decreased in a dose-dependent manner, and were significantly lowered following 800 ppb BPA treatment ($EC_{50}=1056.1$ ppb, 95% CI=981.8~1163.9 ppb). The observed effective concentration and the lowest observed effective concentration of the normal embryogenesis rate were 500 ppb and 800 ppb, respectively. The embryos showed retarded development at each tested concentration, indicating the fact the embryonic development was delayed due to the increasing concentrations of BPA. Furthermore, we examined the expression of glutathione S-transferase (GST) mRNA at various concentrations of BPA in *H. pulcherrimus*. Interestingly, it was found that the expression level of GST mRNA was significantly increased in the experimental group exposed to BPA. Based on these results, we suggested that BPA at greater than 800 ppb has a toxic effect during the early embryonic stages of *H. pulcherrimus*, and GST mRNA may be used as a biomarker for risk assessment of BPA contamination.

Key words : *Hemicentrotus pulcherrimus*, gametotoxicity, embryotoxicity, bisphenol A, glutathione S-transferase

*Corresponding author: Han Seung Kang Tel. 032-745-0684,
Fax. 032-745-0686, E-mail. hanseungkang66@gmail.com

서 론

산업화 및 인간생활의 편의를 위해 개발 및 사용되는 다양한 화학물질들이 환경에 노출되어짐에 따라 인간 및 야생동물의 체내 및 내분비계에 직, 간접적으로 많은 영향을 미친다. Bisphenol A (BPA)는 캔의 코팅재료인 에폭시(epoxy), 음식용기 및 포장재로 쓰이는 폴리카보네이트(polycarbonate) 등의 플라스틱 제조의 원료로 사용되며, 화장품의 향균제 및 곰팡이 제거제, 젓병 및 치과치료용 봉합제로 사용된다(Brotons 1995; Tyl *et al.* 2002). BPA는 에스트로겐성 화합물로서 내분비계장애물질(Endocrine Disruptor Chemicals, EDCs)로 분류되며 에스트로겐 수용체에 대한 친화도가 높아 에스트로겐 수용체와의 결합을 통해 생체 내 에스트로겐과 유사한 생리학적 효과를 일으켜서 체내 내분비계 기관의 생리 작용을 교란시킨다는 보고가 있다. 특히 BPA의 노출에 따른 계속된 축적은 수컷 생식기계(reproductive system)의 여성화, 조기성숙 및 암컷의 조기 사춘기 도래 등을 일으킨다(Herman-Giddens *et al.* 1997; Paulozzi *et al.* 1997; Howdeshell *et al.* 1999). 우리나라 해양환경에서의 BPA 오염에 관한 연구 자료로 해양으로 유입되는 하천에 가까운 지점에서 BPA 농도가 높게 나타났으며 마산만에서 $2.7 \sim 50.3 \text{ ng g}^{-1}$ dry wt.의 농도가 조사되었으며, 광양만과 여수해만에서는 $0.46 \sim 24.59 \text{ ng g}^{-1}$ dry wt.가 조사되었다(Khim *et al.* 1999; Cho *et al.* 2004).

Glutathione S-transferase (GST)는 다양한 기능을 가진 단백질로서 모든 생물체에서 발견된다(Smith *et al.* 2004). GST는 비생체물질(xenobiotic), 중금속(heavy metal), 병원체(pathogen) 및 산화스트레스(oxidative stress) 등을 포함한 생물 및 비 생물적 스트레스로부터 세포를 보호하는 기능을 가진다(Kampranis *et al.* 2000; Mueller *et al.* 2000; Agrawal *et al.* 2002). GST는 해양환경에서의 지표 유전자로서 방향족탄화수소류(polycyclic aromatic hydrocarbos, PAHS), 에스트로겐성 화합물 및 중금속 등의 노출에 따른 산화스트레스와 GST와의 상관관계에 대한 연구에 많은 관심을 가지며 진행하고 있다(Koutsogiannaki *et al.* 2014; Luchmann *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014).

시험생물로서의 성게는 다른 시험생물에 비해 실험실에서 생식세포의 획득 및 인공수정을 통한 배아생성이 가능하고, 배양기에서의 배양이 가능하여 배아의 발달을 쉽게 관찰할 수 있다. 이러한 시험생물로서 성게의 특징은 발생학 및 환경 독성학 연구의 시험생물로서 장점이기 때문에 연구에 많이 사용된다(Kobayashi 1973, 1977, 1981; Greenwood 1983; Monroy 1986; Wui *et al.* 1992;

Davidson *et al.* 1998; Yu 1998; Hwang *et al.* 2012).

본 연구는 BPA의 오염이 해양생태계에 미치는 영향을 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)를 이용하여 정상적인 수정률 및 배아 발생률을 이용하여 평가하며, 또한 생체지표유전자로서 GST 유전자를 선택하여 GST의 상대적인 발현 양상을 관찰하여 평가하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시험생물

시험생물 말뚝성게(*H. pulcherrimus*)는 2014년 3월에 전라북도 부안군에 위치한 격포리 인근 해안에서 채집하였다. 채집한 시험생물은 저온상태에서 이송하여 본 연구소 해양생물배양실에서 1주간 순치한 후에 평가연구에 사용하였다. 시험생물을 수용한 수조환경 및 수온은 자연채광 상태의 유수식 환경이며 $9 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도를 설정하였다.

2. 생식세포 수집

말뚝성게(*H. pulcherrimus*)의 표면을 멸균해수로 세척하여 성게표면의 이물질을 제거한 후, 실험에 이용하였다. 성게는 암컷 및 수컷 각 6개체로 크기는 대략 직경 3.5 cm 이상을 선별하여 사용하였다. 배양액은 자연해수를 membrane filter (pore size $0.45 \mu\text{m}$)로 여과한 후에 멸균하여 사용하였다. 생식세포의 방란 및 방정 유도는 성게의 체강 내에 0.5 M KCl 용액 1 mL을 주입시킨 후, 배양액이 담긴 100 mL 용량의 비이커에 성게를 담겼다. 이때 생식공은 배양액에 충분히 잠기게 하였다. 수집한 생식세포 중에서 정자는 1회, 난자는 3회 세정한 후에 실험에 이용하였다.

3. BPA 노출

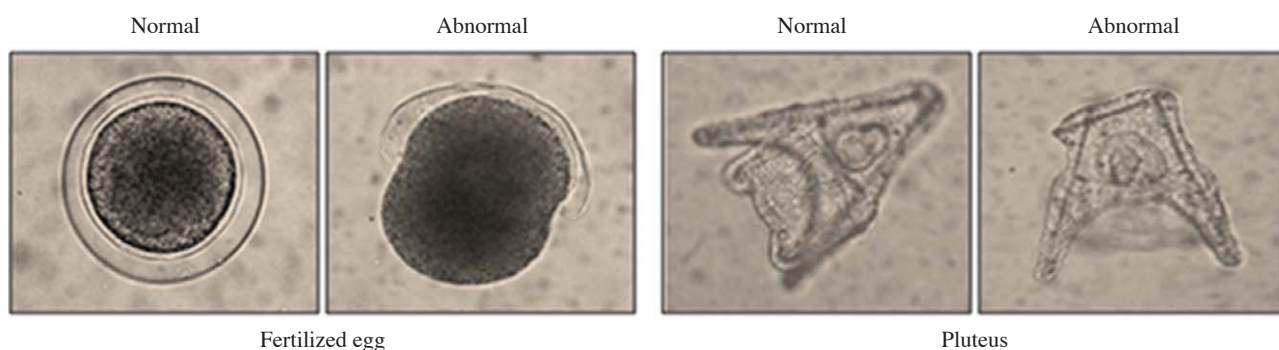
BPA (Bisphenol A; 4,4'-isopropylidenediphenol)는 Sigma (St. Louis, MO) 제품을 사용하였으며, 멸균해수를 이용하여 stock solution (1 ppm)을 준비하여 사용하였다. 말뚝성게(*H. pulcherrimus*)의 정상적인 수정률 및 배아 발생률을 조사하기 위한 실험 농도는 각각 BPA 농도(0, 300, 500, 800, 1000, 1500 ppb)로 설정하여 노출시켰다.

4. 배양조건

인공수정을 통해 생성시킨 수정란은 배양액 1 mL에

Table 1. Culture conditions in sea urchin, *H. pulcherrimus*

Test parameters	Conditions
Culture type	Static non-renewal 10 min ~ 64 h toxicity test
Photoperiod	Ambient light condition and 8L : 16D periods
Temperature	16±0.5°C
pH	7.8~8.2
Salinity	32±1.0 psu
Culture dish	6 well plate culture dish
Solution	Filtered (0.45 µm) and sterilized seawater
Solution exchange	None
Experiment period	10 min ~ 64 hr
Investigation item	Fertilization, larval development rates
Acceptability criterion	> 90% fertilized eggs and pluteus larvae at control

**Fig. 1.** Normal and abnormal patterns in fertil egg and pluteus of *H. pulcherrimus*.

수정란을 대략 1,500개 정도를 넣었으며, 배양액의 pH는 7.8~8.2, 배양 온도는 16±0.5°C를 설정하였다. 배양의 상태는 Table 1에 명시하였다.

5. 수정 및 배아발생 관찰

각각의 BPA 농도에 30분간 노출시킨 정자와 정상 난자를 인공수정을 시켰다. 인공수정 10분 경과 후 수정률을 관찰하였으며, 배아발생은 인공수정 후 pluteus 유생 시기인 64시간째에 관찰하였다 (Pagono *et al.* 1985a, b) (Fig. 1).

6. Total RNA 추출 및 역전사-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)

대조구 및 각 실험구의 수정 후 64시간째인 pluteus 유생을 RNAiso Plus (TaKaRa Co.)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출 방법은 제조사의 방법에 따라 시행하였다. 추출한 total RNA는 spectrophotometer (NanoVue, GE Healthcare)를 이용하여 정량 하였다. cDNA 합성을 위한 역전사 반응 (Reverse Transcription, RT)은 1 µg의 total RNA, oligodT₁₈ (0.5 µg)와 AccuPower RT premix (Bioneer

Co.)를 이용하여 최종 반응용액 20 µL로 42°C에서 1시간 시행하였다. 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)은 RT를 통해 얻은 cDNA 1 µL와 GST프라이머 forward (5'-TTCGTGGCTGAGGTATTTGC-3'), reverse (5'-TTGATATTTCTGCGCAG-3') SpZ12-1 프라이머 forward (5'-AAAATGACACAGGCGATGGA-3'), reverse (5'-TAATGTTTCTCGCTCCCCCT-3') 및 AccuPower HotStart PCR premix (Bioneer Co.)를 이용하여 최종 반응용액 20 µL로 시행하였다. GST의 PCR 반응조건은 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초를 28회 반복하였으며, internal control인 SpZ12-1의 PCR 반응조건은 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초를 25회 반복하였다. RT-PCR은 제조사인 바이오니아의 방법에 따라 시행하였다. RT-PCR 산물은 2% 아가로스겔 전기영동을 통해 확인하였으며 band intensity는 Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad)을 이용하여 분석하였다.

7. 통계학적 분석

모든 실험은 100개 이상의 배아를 3회 반복 계수하여, 전체배아에서 정상배아 수의 백분율을 산출하였으며, 이

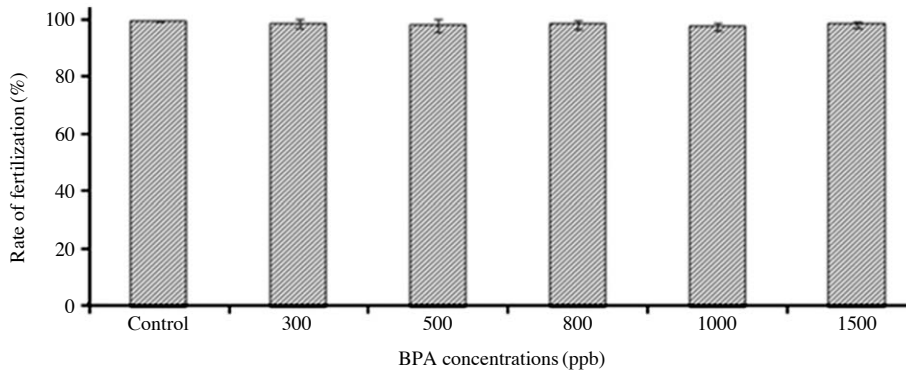


Fig. 2. Rate of fertilization of *H. pulcherrimus* eggs exposed to BPA.

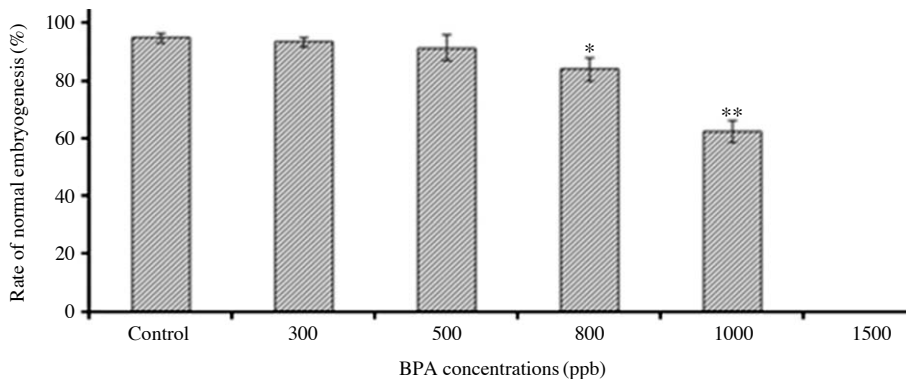


Fig. 3. Rate of normal embryogenesis of *H. pulcherrimus* embryos exposed to BPA. All the points showed a statistically significant difference from the control group according to Student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

린 실험과정을 3회 반복 실시하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 probit 통계법을 이용하여 반수영향농도 (50% Effective Concentration, EC_{50}) 및 95% 신뢰구간 (95% Confidence Limit, 95% CI)을 분석하였다. 또한, Dunnett's test 분석법을 이용하여 무영향농도 (No Observed Effective Concentration, NOEC)와 최소영향농도 (Lowest Observed Effective Concentration, LOEC)를 분석하였다. 연구결과 유의성 검정은 Student's *t*-test로 하였으며, p 가 0.05 이하인 것을 유의한 것으로 결정하였다.

결 과

1. BPA 처리와 수정율의 변화

정상 난자와 각각의 BPA (0, 300, 500, 800, 1000, 1500 ppb) 농도에 노출된 정자와의 인공수정 시 수정율은 정자에 처리한 BPA의 처리 농도에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 2).

2. BPA 처리와 정상 배아 발생률

정상 난자와 각각의 BPA (0, 300, 500, 800, 1000, 1500 ppb) 농도에 노출된 정자와의 인공수정 시 pluteus 유생 시기에 나타난 정상적인 배아의 발생률은 대조군 및 각각의 처리 농도군 300, 500, 800, 1000, 1500 ppb에서 각각 95%, 94%, 92%, 84%, 63% 및 0%를 나타내었으며, BPA 처리농도가 높을수록 정상배아발생율은 유의적으로 낮아지는 경향을 나타냈다. 특히 1500 ppb의 고농도에서는 모든 배아가 치사하였다 (Fig. 3). BPA를 처리한 후 배아의 발생에서 특이한 점은 고농도의 BPA에 노출된 배아에서의 발생이 대조구나 저농도에 비해 느려지는 현상이 발견되었다. 800 및 1000 ppb 농도에서는 pluteus 유생의 전단계인 프리즘 단계의 배아가 존재하였다 (Fig. 4).

3. 수정 및 배아 발생률을 이용한 독성평가

정상배아 발생률은 BPA 농도 증가에 따라 표준독성반응으로 잘 알려진 S자형 곡선을 나타냈다 (Fig. 5). 연구

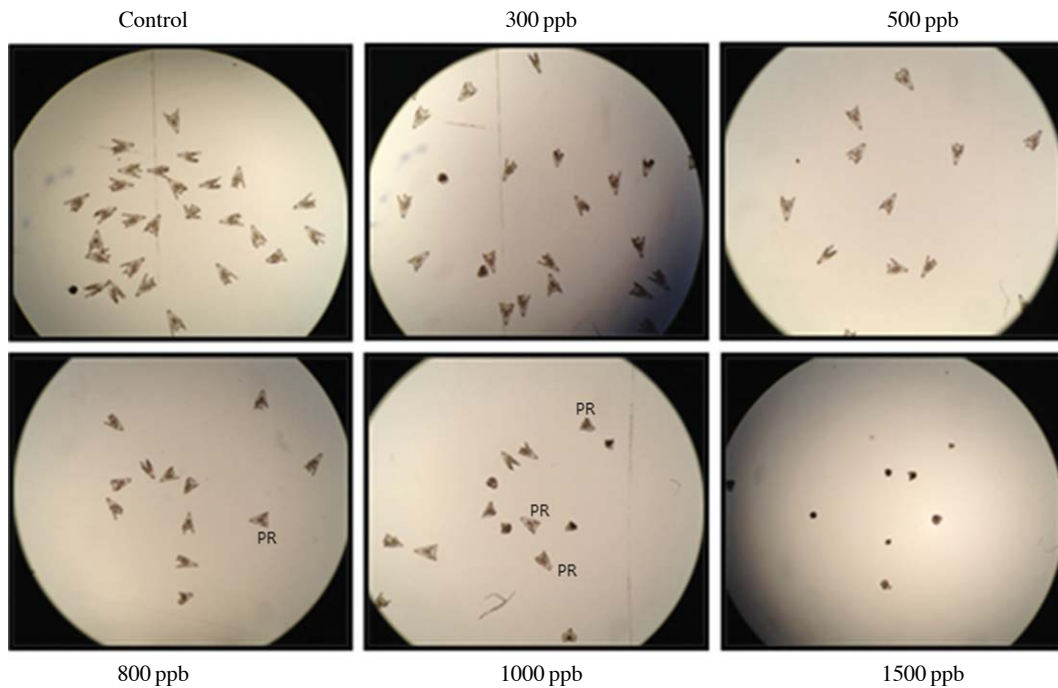


Fig. 4. Embryogenesis of *H. pulcherrimus* embryos exposed to BPA. Prism: PR.

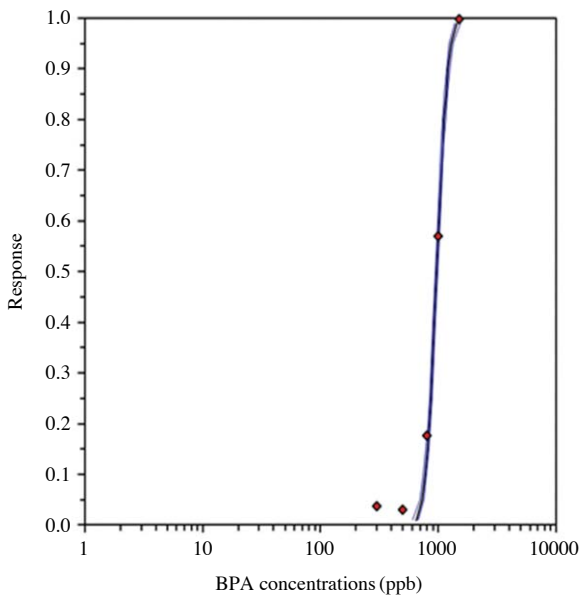


Fig. 5. Concentration-response by BPA treatment.

결과를 바탕으로 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 배아 발생률에 대한 BPA의 독성값을 살펴보면 EC_{50} 는 1056.1 ppb를 나타냈고, EC_{50} 에 대한 95% CI는 981.8~1163.9 ppb를 나타냈다. 정상배아 발생률에 대한 NOEC는 500 ppb로 나타났고, LOEC는 800 ppb로 나타났다 (Table 2).

Table 2. Toxicological estimation using the form of a fertilization membrane and normal pluteus in the *H. pulcherrimus* exposed to BPA.

Items	Toxicity (End-points)	BPA (ppb)
EC_{50}	Normal pluteus	1056.1
95% CI	Normal pluteus	981.8~1163.9
NOEC	Normal pluteus	500
LOEC	Normal pluteus	800

EC_{50} : 50% Effective concentration, 95% CI: 95% Confidence limit, NOEC: No observed effective concentration, LOEC: Lowest observed effective concentration.

4. GST 유전자 발현

BPA에 노출된 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 pluteus 유생에서의 GST 유전자의 발현은 대조구에 비해 농도가 높을수록 GST 유전자의 발현은 유의적으로 높게 발현되었다. BPA 처리 농도간의 발현 양상은 300 ppb에서 1000 ppb 농도까지는 800 ppb에서 상대적으로 조금 낮은 발현 양상을 보였다. 1500 ppb에서는 300 ppb에서 1000 ppb 처리 농도에 비해 높은 발현 양상을 보였다 (Fig. 6).

고 찰

산업화와 도시화가 가속화 되면서 각종 화학물질이나

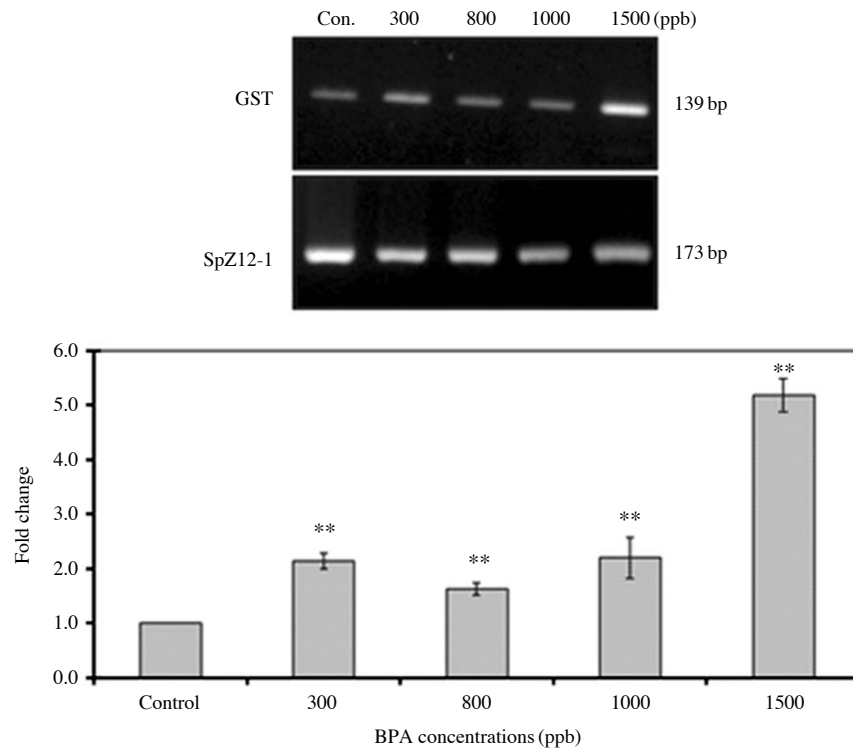


Fig. 6. Fold changes of GST by RT-PCR in pluteus exposed to BPA. *Significant different from vehicle control by Fisher's exact test (** $p < 0.01$).

산업 및 생활 폐수의 연안유입이 증가하여 해양생태계를 오염시키고 있다. 특히, 폐놀계 화합물질은 해양생물의 내분비계를 교란하여 생물의 번식을 교란시킬 뿐만 아니라 초기생활사 단계에 독성을 나타내어 생물자원의 감소를 초래하여 연안 생태계 파괴를 가중시킨다 (Kim 1997). BPA는 알킬-페놀계 독성 화합물로서 발생, 성장 및 생식기관에 영향을 미치며 혈중 vitellogenin의 농도 증가 및 혈중 칼슘 농도의 변화를 유발하여 체내 내분비기관의 기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Yokota *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2003; Kim *et al.* 2005). BPA의 독성영향에 대한 여러 연구자들의 보고에 의하면 조류 (algae), 갑각류 (crustaceans) 및 어류에서는 급성 중간독성이 나타나고, 박테리아에서는 약한 독성 및 양서류에 있어서는 매우 저독성으로 나타나며 LC₅₀의 범위는 2.5 ~ 6900 ppm으로 보고되었다 (Groshart *et al.* 2001; Ozlem and Hatice 2008). 또한 담수 및 해수에 서식하는 녹조류 (*Selenastrum copricornutum*), 물벼룩 (*Daphnia magna*) 및 새우 등의 무척추동물과 어류 등에서의 LC₅₀ 범위는 1 ~ 20 ppm 정도로 나타나며 이 중에서 *D. magna*의 경우 3.9 ~ 20 ppm, *S. copricornutum*은 2.5 ~ 3.1 ppm으로 나타났다 (Staples *et al.* 1998; Staples *et al.* 2002; Ozlem and Hatice

2008).

따라서 BPA 오염이 해양생태계에 미치는 영향 및 서식 생물에게 미치는 위해 정도의 판단에 관한 연구는 매우 중요하다고 생각된다. 현재 전 세계적으로 해양생태계의 위해성을 판단하기 위해 해양생물 종을 이용한 생물 반응 연구가 최근 광범위하게 활발히 진행되고 있다. 성게는 생태독성학적 연구에 적합한 시험생물로서 많이 이용되고 있다 (Pagano *et al.* 1986). 본 연구에서는 성게 중에서 우리해역에 많이 서식하는 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)를 시험종으로 선정하였다.

본 연구 결과 BPA에 노출시킨 정자와 노출시키지 않은 난자와의 인공수정 시 수정률은 대조구와 비교하여 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 2). 그러나 정상배아 발생률은 BPA 농도가 높을수록 정상배아 발생은 유의적으로 낮아지는 결과를 나타냈다 (Fig. 3). 연구 결과 BPA는 성게 배아의 발생과정에 민감하게 반응하여 정상적인 배아 발생을 저해시키는 것을 알 수 있다. 본 연구 결과와 유사한 이전의 연구 보고는 성게 (*Paracentrotus lividus*)를 이용한 연구 결과이다 (Ozlem and Hatice 2008). 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 배아 발생률에 대한 BPA의 독성값은 EC₅₀의 경우 1056.1 ppb를 나타냈고,

EC₅₀에 대한 95% CI는 981.8~1163.9 ppb를 나타냈다. 배아 발생률에 대한 NOEC는 <500 ppb로 나타났고, LOEC는 800 ppb로 나타났다 (Table 2). Ozlem과 Hatice (2008)가 보고한 성게 (*P. lividus*)의 배아독성에서 EC₅₀은 710 ppb, 95% CI는 650~765 ppb를 보여주었다. Ozlem과 Hatice (2008)의 연구와 본 연구에서 BPA는 정상적인 배아의 발생을 저해하는 동일한 결과를 보였으나 EC₅₀과 같은 독성치는 다르게 나타났다. 이와 같은 결과는 종의 차이에서 기인한다고 볼 수 있으며 또한 BPA에 대한 민감도와 반응이 개체발생시 변경하는 것으로 생각된다. 또한 고농도의 BPA에 노출된 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)는 배아 발생이 지연되는 현상을 보였다. 이러한 현상은 미성어 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에서도 보고되었는데 BPA에 노출된 무지개송어 (*O. mykiss*) 난은 부화를 지연시키고, 성장을 억제시키는데 이와 같은 이유는 성장자극 축 (somatotrophic axis)이 초기 배아발생단계에서 BPA에 영향을 받기 때문으로 알려져 있다 (Aluru *et al.* 2010). 따라서 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 배아도 초기 배아발생단계에서 성장자극 축이 BPA에 영향을 받아 발생이 지연되리라 생각된다. BPA는 수생생물의 항산화 방어와 산화 스트레스를 유도한다고 알려져 있으며 물벼룩 (*D. magna*)이 BPA에 노출되면 GST의 수준이 높아지는 결과를 보인다 (Jemec *et al.* 2012). 본 연구 결과에서 BPA 농도 300 ppb에서부터 GST 유전자의 유의적인 증가를 볼 수 있다. 따라서 BPA는 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*) 유생에 산화 스트레스를 유발하고 이에 항산화방어를 위해 체내 GST의 수준을 증가시키는 것으로 사료된다. 이전 연구 보고에 의하면 방오도료로 많이 사용했던 TBT (tributyltin chloride) 등의 내분비계장애물질이 해양생물에 노출되면 생체는 약물대사효소들에 의한 대사과정을 통해 체외로 제거시키는데 이들 약물대사효소들은 유해물질의 대사뿐만 아니라 활성산소종 (active oxygen species) 생산과 산화스트레스와도 관련이 있다는 보고가 있다 (Lemaire *et al.* 1994). 따라서 내분비계장애물질의 위해성 평가 시에 GST와 약물대사와 관련된 효소를 함께 평가하는 것이 필요하다고 생각된다.

본 연구결과 BPA가 연안 해역에 유입되어 말뚝성게

(*H. pulcherrimus*)의 유생에게 미치는 최소영향농도 800 ppb를 초과할 경우 연안 생태계 내에 서식하는 다른 해양생물의 서식 및 자손의 정상적인 생산에 있어서도 악영향을 미칠 수 있으며, 이러한 환경의 개선이 이루어지지 않으면 해양생태계내의 종 및 개체수의 감소를 초래할 수 있다. 또한 해양생태계 위해성 평가의 시험생물

로 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)는 유용하다고 판단되며, GST 유전자는 생체지표유전자로서 내분비계장애물질인 BPA의 오염정도를 판단하는 데 유용하게 이용할 수 있다고 생각된다.

적 요

본 연구는 시험생물로서 말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)를 이용하여 내분비계장애물질인 bisphenol A (BPA)의 독성 및 시험생물로서의 적합성 등을 조사하였다. 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 수정 및 정상 배아발생에 미치는 BPA의 독성을 보기 위하여 농도 (0, 300, 500, 800, 1000, 1500 ppb)에서 조사하였다. BPA 노출 시 수정률은 시험구간 내의 BPA 처리농도와 관계없이 유의적인 변화가 없었다. 정상 배아발생률은 BPA 농도가 높을수록 유의적인 감소를 나타냈으며, 800 ppb 농도부터 유의적인 감소를 보였다. 정상배아발생에 대한 독성값은 반수영향농도 (EC₅₀) 1056.1 ppb, 95% CI 981.8~1163.9 ppb로 나타났다. 또한 무영향농도 (NOEC)와 최소영향농도 (LOEC)는 500 ppb 및 800 ppb로 나타났다. BPA에 노출된 배아는 농도가 증가함에 따라 발생이 정체되는 현상이 나타났다. BPA에 노출된 pluteus 유생을 이용한 glutathione-S-transferase (GST) 유전자의 발현을 비교해본 결과 GST 유전자의 발현은 농도가 증가함에 따라 발현이 증가하였다.

본 연구 결과, 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 초기 배아 발생 과정 중 800 ppb 이상에서 독성을 나타냈으며 GST 유전자는 BPA 노출에 따른 위해성 평가에 생체지표유전자로 유용하게 이용될 수 있다고 생각된다.

사 사

본 연구는 2014년도 국립수산과학원 경상과제연구비 지원으로 국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터에서 수행하였다.

REFERENCES

- Agrawal GK, NS Jwa and R Rakwal. 2002. A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases. *Plant Sci.* 163:1153-1160.

- Aluru N, JF Leatherland and MM Vijayan. 2010. Bisphenol A in oocyte leads to growth suppression and altered stress performance in juvenile rainbow trout. *PLoS One* 5:e10741.
- Brotons JA, MF Olea-Serrano, M Villalobos, V Pedraza and N Olea. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Persp.* 103:608-612.
- Cho HS, YO Kim, TS Shin and T Horiguchi. 2004. A study on the pollution of bisphenol A in surface sediment around Gwangyang bay. *Journal of the Korean Society for Marine Environment & Energy* 7:104-110.
- Davidson EH, RA Cameron and A Ransick. 1998. Specification of cell fate in the sea urchin embryo: Summary and some proposed mechanisms. *Development* 125:3269-3290.
- Greenwood PJ. 1983. The influence of an oil dispersant chem-serve OSE-DH on the viability of sea urchin gametes. Combined effects of temperature, concentration and exposure time on fertilization. *Aquat. Toxicol.* 4:15-29.
- Groshart CP, PC Okkerman and AMCM Pijnenburg. 2001. Chemical study on bisphenol A, Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ. Report: RIKZ/2001.027. pp.65-70.
- Herman-Giddens ME, EJ Slora, RC Wasserman, CJ Bourdony, MV Bhopkar, GG Koch and CM Hasemeier. 1997. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the pediatric research in office settings network. *Pediatrics* 99:505-512.
- Howdeshell KL, AK Hotchkiss, KA Thayer, JG Vandenberg and FS vom Saal. 1999. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401:763-764.
- Hwang UK, JS Park, JN Kwon, S Heo, Y Oshima and HS Kang. 2012. Effect of nickel on embryo development and expression of metallothionein gene in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 57:145-149.
- Jemec A, T Tisler, B Erjavec and A Pintar. 2012. Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 86:213-218.
- Kampranis SC, R Damianova, M Atallah, G Toby, G Kondi, PN Tsihliis and AM Makris. 2000. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *J. Biol. Chem.* 275:29207-29216.
- Khim JS, DL Villeneuve, K Kannan, KT Lee, SA Snyder, CH Koh and JP Giesy. 1999. "Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan bay, Korea. 1. Instrumental analysis". *Environ. Sci. Technol.* 33: 4199-4205.
- Kim HY. 1997. Toxic effects of phenol on survival and oxygen consumption of the abalone juvenile, *Haliotis discus hannai*. *J. Korean Fish. Soc.* 30:496-504.
- Kim EK, J Ryu, SY Park, HM Kim, KS Choi, JG Na and C Lee. Endocrine disrupting effects of bisphenol A on the early life-stage of medaka (*Oryzias latipes*). *J. Environ. Toxicol.* 20:13-21.
- Kobayashi N. 1973. Studies on the effects of some agents on fertilized sea urchin eggs, as a part of the bases for marine pollution bioassay I. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 21:109-114.
- Kobayashi N. 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 24:9-21.
- Kobayashi N. 1981. Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersant to Canadian and Japanese sea urchin eggs. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 27:76-84.
- Koutsogiannaki S, S Franzellitti, E Fabbri and M Kaloyianni. 2014. Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17 beta estradiol on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. The role of signaling molecules. *Aquat. Toxicol.* 146:186-195.
- Lemaire P, A Matthews, L Forlin and DR Livingstone. 1994. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26:191-200.
- Luchmann K, AL Dafre, R Trevisan, JA Craft, X Meng, JJ Mattos, FL Zacchi, TS Dorrington, DC Schroeder and ACD Bairy. 2014. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 152: 324-334.
- Monroy A. 1986. A centennial debt of developmental biology to the sea urchin. *Biol. Bull.* 171:509-519.
- Mueller LA, CD Goodman, RA Silady and V Walbot. 2000. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123:1561-1570.
- Ozlem CA and P Hatice. 2008. Effects of bisphenol A on the embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Environ. Toxicol.* 23:387-392.
- Pagano G, M Cipollaro, G Corsale, A Esposito, E Ragucciand and GG Giordano. 1985a. Ph-induced changes in mitotic and development patterns in sea urchin embryogenesis, I. Exposure of embryos. *Teratogen. Carcin. Mut.* 5: 101-112.
- Pagano G, M Cipollaro, G Corsale, A Esposito, E Ragucciand and GG Giordano. 1985b. Ph-induced changes in mitotic and development patterns in sea urchin embryogenesis, II. Exposure of sperm. *Teratogen. Carcin. Mut.* 5:113-121.
- Pagano G, M Cipollaro, G Corsale, A Esposito, E Ragucci, GG Giordano and NM Trief. 1986. The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants.

- pp.66-92. In Community Toxicity Testing, ASTM STP 920. (Cairns J Jr ed.) Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Paulozzi LJ, JD Erickson and RJ Jackson. 1997. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 100:831-834.
- Smith AP, BP DeRidder, WJ Guo, EH Seeley, FE Regnier and PB Goldsbrough. 2004. Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione *S*-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings. *J. Biol. Chem.* 279:26098-26104.
- Staples CA, PB Dorn, GM Klecka, ST Oblock and LR Haris. 1998. A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36:2149-2173.
- Staples CA, K Woodburn, N Caspers, AT Hall and GM Klecka. 2002. A weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of bisphenol A. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8:1083-1105.
- Suzuki N, A Kambegawa and A Hattori. 2003. Bisphenol A influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in goldfish. *Zool. Sci.* 20:745-748.
- Tyl RW, CB Myers, MC Marr, BF Thomas, AR Keimowitz, DR Brine, MM Veselica, PA Fail, TY Chang, JC Seely, RL Joiner, JH Butala, SS Diamond, SZ Cagen, RN Shiotsuka, GD Stropp and JM Waechter. 2002. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 68:121-146.
- Wui IS, JB Lee and SH Yoo. 1992. Bioassay on marine sediment pollution by using sea urchin embryo culture in the south-west inland sea of Korean. *J. Environ. Biol.* 10:92-99.
- Yokota H, Y Tsuruda, M Maeda, Y Oshima, H Tadokoro, A Nakazono, T Honjo and K Kobayashi. 2000. Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19:1925-1930.
- Yu CM. 1998. A study on the effect of heavy metals on embryos formation of sea urchins. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* 24:6-10.
- Zhang H, L Pan and Y Tao. 2014. Toxicity assessment of environmental pollutant phenanthrene in clam *Venerupis philippinarum* using oxidative stress biomarkers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37:697-704.

Received: 13 June 2014

Revised: 11 September 2014

Revision accepted: 12 September 2014