

내분비계 장애물질이 어류의 HPG, HPT, HPA 축에 미치는 연계영향

장솔* · 지경희**,**†

*용인대학교 일반대학원 환경보건학과

**용인대학교 환경과학대학 산업환경보건학과

A Review on the Effects of Endocrine Disruptors on the Interaction between HPG, HPT, and HPA Axes in Fish

Sol Jang* and Kyunghee Ji*,**†

*Department of Environmental Health, Graduate School of Yongin University

**Department of Occupational and Environmental Health, College of Environmental Sciences, Yongin University

ABSTRACT

Objectives: The objective of this review was to summarize the primary role of three representative endocrine axes in aquatic vertebrates and discuss the effects on endocrine systems and their interactions in teleost fish after exposure to environmental contaminants.

Methods: We summarized individual traits and mechanisms for hormonal and transcriptional interactions between the hypothalamic-pituitary-gonad (HPG), hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT), and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axes in fish. We also provided a brief discussion on the effects of nonylphenol-induced toxicity on endocrine systems and their interactions in fish as a demonstration of holistic explanation.

Results: Currently-available data showed that thyroid dysfunction is associated with reproductive toxicity due to changes in steroidogenic gene expressions and sex hormone levels as well as gonad glands in fish. As an example, we demonstrated that exposure to nonylphenol could induce estrogenicity in male fish by decreasing thyroid hormones, which contributes to increased aromatase expression. Although the mechanisms are complicated and involved in multiple ways, a number of studies have shown that sex steroids influence the HPT axis or the HPA axis in fish, indicating bi-directional crosstalk. Critically missing is information on the primary target or toxicity mechanisms of environmental contaminants among the three endocrine axes, so further studies are needed to explore those possibilities.

Conclusions: This review highlights the interactions between the HPG, HPT, and HPA axes in fish in order to better understand how these endocrine systems could interact with each other in situations of exposure to endocrine disrupting chemicals.

Key words: Interaction, endocrine disruption, HPG axis, HPT axis, HPA axis

I. 서 론

수서척추동물인 경골어류(teleost fish)는 육상척추

동물과 마찬가지로 생식선, 갑상선, 부신 내분비계가 각각 시상하부-뇌하수체-생식선 축(hypothalamus-pituitary-gonad axis; HPG axis), 시상하부-뇌하수체

Corresponding author: Department of Occupational and Environmental Health, College of Environmental Sciences, Yongin University, Yongin, Gyeonggi, 449-714, Republic of Korea, Tel: +82-31-8020-2747, Fax: +82-31-8020-2886, E-mail: kyungheej@yongin.ac.kr

Received: 4 May 2015, Revised: 24 June 2015, Accepted: 26 June 2015

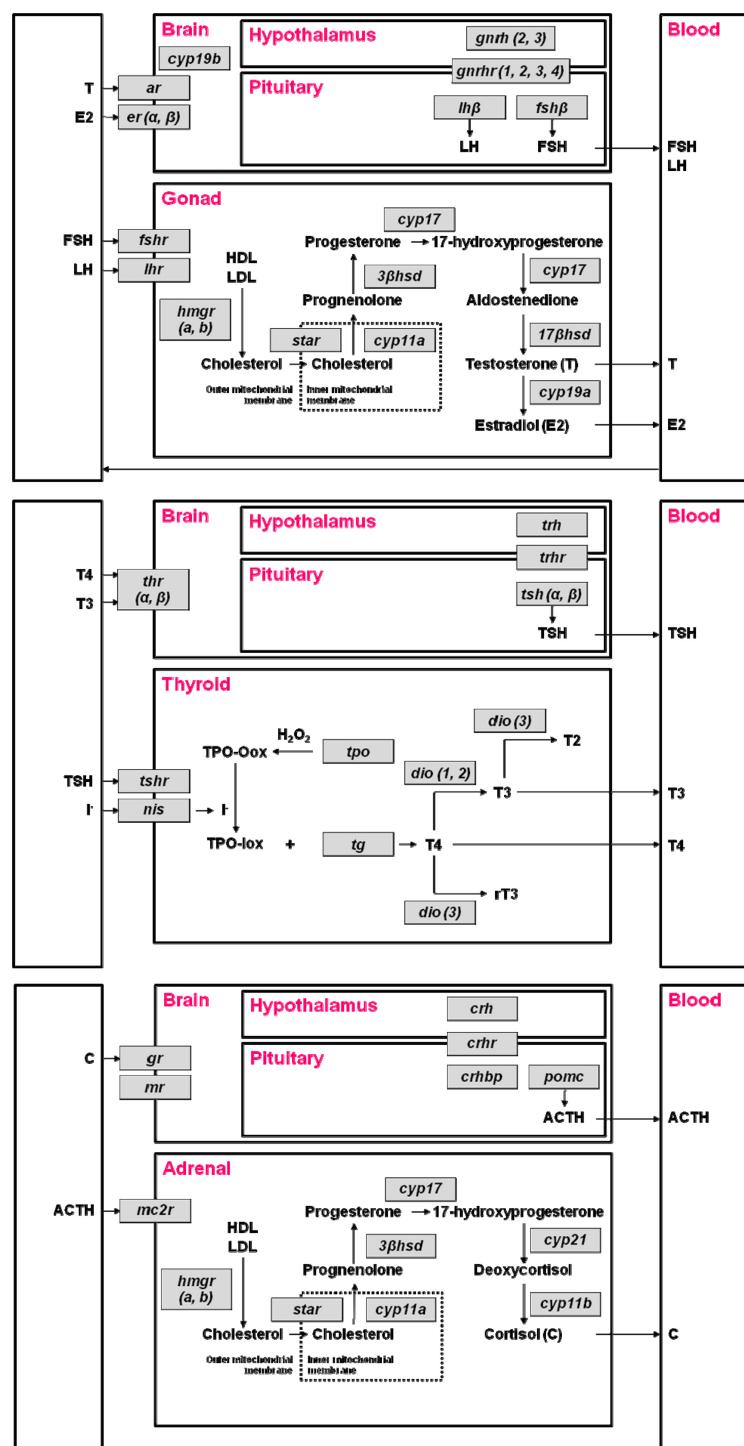


Fig. 1. The pathways of hypothalamic-pituitary-gonad (HPG), hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT), and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axes in fish. Abbreviations of genes and hormones are shown as italics and bold character, respectively. Gene acronyms are defined in Table 1.

-갑상선 축(hypothalamus-pituitary-thyroid axis; HPT axis), 시상하부-뇌하수체-부신 축(hypothalamus-pituitary-adrenal axis; HPA axis)에 의해 호르몬 분비가 조절된다.¹⁾ 이러한 내분비계에서 합성·분비되는 호르몬은 어류의 생식, 성장, 발달, 대사 등에 중요한 역할을 한다. 각각의 내분비계 축은 서로 상호작용하고 있어 하나의 내분비계 축이 영향을 받으면 다른 내분비계 축도 함께 영향을 받을 수 있다.¹⁻³⁾ 척추동물은 서식지(육상 또는 물)에 관계없이 비슷한 내분비계 축을 공유하고 있으며,⁴⁾ 환경오염물질로 인한 수서척추동물의 영향을 다각적으로 연구하는 것은 전일적(holistic)인 관점에서 내분비계 영향을 이해하는 데 도움을 줄 수 있다. 본 연구에서는 노닐페놀을 포함한 물환경 중 내분비계 장애물질에 노출되었을 때 경골어류의 생식선, 갑상선, 부신 내분비계 축의 다양한 호르몬, 유전자 발현에 미치는 영향과 축의 상호작용에 초점을 맞추어 논문들을 종합적으로 정리하고자 하며, 앞으로의 연구방향에 대해 제안하고자 한다.

II. 내분비계의 역할

수서척추동물의 HPG, HPT, HPA 축의 중요한 호르몬과 유전자 발현 경로를 Fig. 1에 도식화하였으며, 유전자의 약어를 Table 1에 제시하였다. 물고기 도 다른 육상척추동물과 같이 내분비계 축의 중요한 호르몬 수준이 증가하면 음성 되먹임(negative feedback) 과정을 통해 시상하부와 뇌하수체에서 발현되는 자극호르몬 수준을 감소시켜 항상성(homeostasis)을 유지한다.

1. HPG 축의 역할

수서척추동물의 생식세포 발달과 번식은 HPG 축의 다양한 스테로이드 호르몬과 비텔로제닌 합성을 위한 간의 상호작용에 의해 조절된다. HPG 축의 정점에 있는 시상하부에서는 성선자극호르몬방출호르몬(gonadotropin releasing hormone; GnRH)이 합성·분비되고 있으며, 이 신경호르몬은 10개의 아미노산이 연결된 중합체(decapeptide)로 구성되어 있다. GnRH는 모든 척추동물에서 발현되고 있으며, 생물군(taxa)에 따라 여러 가지 형태를 지니고 있다.⁵⁾ 예를 들어, 대부분의 포유류는 2가지 형태의 GnRH를 보유하고 있으나, 경골어류에서는 뇌의 서로 다른 부

Table 1. Gene acronyms of HPG, HPG, and HPA axes in fish

Abbreviation	Gene name
gnrh	Gonadotropin-releasing hormone
gnrhr	Gonadotropin-releasing hormone receptor
fshβ	Follicle stimulating hormone β
lhβ	Luteinizing hormone β
cyp19b	Cytochrome P450 19B
er	Estrogen receptor
ar	Androgen receptor
fshr	Follicle stimulating hormone receptor
lhr	Luteinizing hormone receptor
hmgr	Hydroxymethylglutaryl CoA reductase
star	Steroidogenic acute regulatory protein
cyp11a	Cytochrome P450 side-chain cleavage
3βhsd	3β-hydroxysteroid dehydrogenase
cyp17	Cytochrome P450 17
17βhsd	17β-hydroxysteroid dehydrogenase
cyp19a	Cytochrome P450 19A
trh	Thyrotropin-releasing hormone
trhr	Thyrotropin-releasing hormone receptor
tsh	Thyroid stimulating hormone
thr	Thyroid hormone receptor
tshr	Thyroid stimulating hormone receptor
nis	Sodium iodide symporter
tpo	Thyroperoxidase
tg	Thyroglobulin
dio	Deiodinase
crh	Corticotropin-releasing hormone
crhr	Corticotropin-releasing hormone receptor
crhbp	Corticotropin-releasing hormone binding protein
pomc	Proopiomelanocortin
gr	Glucocorticoid receptor
mr	Mineralocorticoid receptor
mc2r	Melanocortin 2 receptor
cyp21	Cytochrome P450 21
cyp11b	Cytochrome P450 11B

위에서 2개 또는 3개의 GnRH가 개별적인 기능을 담당하고 있다.⁶⁾ GnRH3 ({Trp⁷Leu⁸}-GnRH)는 어류에서만 발견되며, GnRH2 ({His⁵Trp⁷Tyr⁸}-GnRH)는 사람을 포함한 모든 척추동물에서 발견된다.⁴⁾

GnRH는 수용체(GnRH receptor; GnRHR)에 결합하여 뇌하수체에서 성선자극호르몬(gonadotropin hormone, GH)을 분비할 수 있도록 한다.

GH인 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone; FSH)과 황체형성호르몬(luteinizing hormone; LH)은 각각 난포자극호르몬 수용체(FSH receptor; FSHR)와 황체형성호르몬 수용체(LH receptor; LHR)에 결합하여 스테로이드 호르몬의 생합성(steroidogenesis)과 생식세포 형성(gametogenesis)에 영향을 준다. 암컷 어류에서 FSH는 주로 정자가 생성되는 초기단계에 정원세포(spermatogonia), 정모세포(spermatocyte), 정자세포(spermatid)에 이르는 생식세포가 성숙·분화할 수 있도록 조절하며, LH는 레이디히 세포(Leydig cell)에서 테스토스테론(testosterone; T)을 생성하고 운동성이 있는 성숙된 정자(spermatozoa)를 방출하는 데 중요한 역할을 한다.⁷⁾ 암컷 어류에서 FSH는 주로 비텔로제닌(vitellogenin; VTG) 합성을 조절하며, LH는 난자의 성숙과정을 조절한다.⁸⁾

성 스테로이드 호르몬인 T와 에스트로겐(17 β -estradiol; E2)은 GH의 자극을 받아 생식기에서 분비되며, 스테로이드 호르몬 생합성과 연관된 여러 효소와 유전자들의 발현에 의해 합성이 조절된다. 스테로이드급성조절단백질(Steroidogenic acute regulatory protein; StAR)은 신장의 앞쪽과 생식기에서 검출되고 있으며,⁹⁾ 막 외부의 콜레스테롤을 내부로 이송하는 역할을 한다. Cytochrome P450 (CYP) 11A 효소는 스테로이드 호르몬 생합성 시 속도결정단계(rate-limiting step)에서 촉매역할을 하며, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD)는 성 스테로이드 호르몬인 프로게스테론(progesterone; P) 형성에 필수적인 효소이다.¹⁰⁾ CYP17은 안드로겐 생합성을 촉진시키며, 아로마타제(aromatase, CYP19)는 T 호르몬을 E2 호르몬으로 변환시켜주는 중요한 효소이다.¹¹⁾ E2 호르몬은 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)와 결합하여 암컷 어류의 간에서 난황단백 전구체인 VTG를 형성할 수 있도록 한다.¹²⁾

2. HPT 축의 역할

갑상선은 물고기의 발달, 성장, 대사에서 중요한 역할을 담당한다. HPT 축의 시상하부에서는 갑상선 자극호르몬방출호르몬(thyrotropin-releasing hormone; TRH)을 방출하고, 이 호르몬은 수용체(TRH receptor;

TRHR)에 결합하여 갑상선자극호르몬(thyroid-stimulating hormone; TSH)을 뇌하수체에서 분비하도록 한다. TSH는 갑상선호르몬(thyroid hormone; TH) 합성과 분비를 조절하는 역할을 하며, 2개(TSH α , TSH β)의 아단위(subunits)를 가지고 있다. 물고기에서 TH는 갑상선호르몬수용체(TH receptor; THR)에 부착되어 호르몬 활동이 조절된다.¹³⁾ 어류에서는 2 가지 종류의 THR (THR α , THR β)이 존재한다고 알려졌으며, 배아(embryo)-치어(larvae)-유어(juvenile fish)에 이르는 초기 성장 단계의 서로 다른 시기에 발현되어 발달과 성장을 촉진시킨다.¹⁴⁾ THR α 는 TH의 목표조직에서 더 많이 발현되며, THR β 는 주로 시상하부와 뇌하수체에서 발현되어 HPT축을 조절하는 역할을 한다.¹⁵⁾

수서척추동물에서 탈요오드화 과정(deiodination)은 TH의 활성을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 어류에 존재하는 탈요오드화 효소(deiodinase; DIO)는 티록신(thyroxine, T4)을 생체 내에서 활성을 가지는 트리요오드티로닌(triiodothyronine; T3)으로 변환시켜 주거나, 불활성을 띠는 대사체인 역트리요오드티로닌(reverse T3; rT3) 또는 디요오드티로닌(3,3'-diiodothyronine; T2)으로 바꾸어주는 역할을 한다.¹⁶⁾ 현재까지 물고기에서는 3가지 종류의 DIO 효소(type I, type II, type III)가 발견되었으며, DIO2는 T4 호르몬을 T3 호르몬으로 변환시키는 역할을 한다.

갑상선글로불린(thyroglobulin; TG)은 T4 호르몬과 T3 호르몬을 합성하는 단백질이며,¹⁷⁾ 갑상선 과산화효소(thyroid peroxidase; TPO)는 TG의 타이로신 잔기(tyrosyl residues)를 요오드화하여 T4 호르몬을 형성하도록 촉매작용을 한다.¹⁸⁾ 나트륨-요오드 공동운반체(sodium iodide symporter; NIS)는 갑상선 소포세포(follicular cells) 안으로 요오드를 능동수송 시켜주는 혈장 막 단백질이다.¹⁹⁾

3. HPA 축의 역할

물고기의 HPA 축은 스트레스에 대한 반응과 대사, 면역, 생식 시스템 등의 많은 신체 과정을 조절하는 역할을 한다. HPA 축의 시상하부에서는 부신피질자극호르몬방출호르몬(corticotropin-releasing hormone; CRH)이 방출되어 뇌하수체의 부신피질자극호르몬(adrenocorticotropic hormone; ACTH)을 분비하도록 한다. 프로오피오멜라노코르틴(proopiomelanocortin;

POMC) 단백질은 ACTH 호르몬이 합성되는 데 관여하며,²⁰⁾ ACTH는 멜라노코르틴 수용체(melanocortin 2 receptor; MC2R)와 결합하여 코티졸(cortisol; C)을 합성하고 방출할 수 있도록 한다.

물고기의 부신/신간 조직(adrenal/interrenal tissue)에서는 스테로이드 호르몬 생합성과 연관된 효소들(StAR, CYP11A, CYP17, CYP19)이 일부 발현된다. CYP11B는 11-데옥시코티솔(11-deoxycortisol)을 C 호르몬으로 변환하여 주는 효소로, C 호르몬 생합성 단계에서 마지막으로 작용하여 생산량을 조절하는 역할을 한다.²¹⁾ 11 β 수산화스테로이드탈수소효소2(11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2; 11 β HSD2)는 C 호르몬을 비활성 대사체인 코티손(cortisone)으로 산화시키는 효소로, 물고기의 배아발달 시기에는 과도한 C 호르몬의 분비로 인한 성장 억제 및 세포 자멸사유발(pro-apoptotic) 영향을 방지해 준다.^{21,22)}

III. HPG, HPT, HPA 축의 상호작용

예전에는 생식기, 갑상선, 부신이 각각 고유의 분리된 역할을 담당하고 있다고 생각하였으나, 최근 여러 연구들에서 내분비계 축이 서로 상호작용하고 있음이 제안되고 있다. 아래에는 경골어류의 HPG 축과 HPT 축의 상호작용, HPG 축과 HPA 축의 상호작용, HPT 축과 HPA 축의 상호작용을 설명하는 연구들을 각각 정리하였다(Table 2, Fig. 2).

1. HPG, HPT axes

물고기의 HPG 축에 관련된 호르몬은 TH의 활성을 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 경골어류(노랑가자미(barfin founder), 산천어(masu salmon), 금붕어, 잉어(carps))에 외인성 GnRH를 노출하였을 때 혈중 T4 호르몬 수준이 증가되었다.^{23,24)} GnRH는 직접반응으로²⁴⁾ 또는 뇌하수체의 TSH, GH 영향에 대한 간접반응으로 혈중 T4 호르몬 수준에 영향을 미칠 수 있다.²⁵⁾ 외인성 FSH, LH도 물고기의 혈장 T4 호르몬 수준을 증가시킬 수 있다.^{25,26)} 이러한 연구 결과는 수서척추동물의 시상하부와 뇌하수체에서 분비되는 생식 내분비계 호르몬이 TH 활성을 증가시킴을 뒷받침한다.

물고기의 갑상선 기능이 항진(hyperthyroidism)되거나 저하(hypothyroidism)되었을 경우 HPG 축의

유전자 발현과 호르몬 활성을 변화시켜 궁극적으로 번식에 영향을 미칠 수 있다.²⁷⁾ 예를 들어, 외인성 T3 호르몬에 노출된 금붕어(goldfish)에서는 뇌하수체의 *fsh β , lh β* 유전자와 생식기의 *cyp19a, er α , er β 1, er β 2* 유전자 발현이 감소되어 E2 호르몬의 합성과 분비가 저해되었다.^{28,29)} 외인성 T4 호르몬에 노출된 물고기(*Clarias gariepinus*)는 아로마타제 활성이 억제되어 혈청 E2 호르몬의 농도가 감소되었다.³⁰⁾ T3 호르몬과 TSH가 함께 투여된 제브라피쉬 정소에서는 생물학적 활성이 강한 안드로겐인 11-케토테스테론(11-ketotestosterone; 11-KT) 호르몬 방출이 증가되었고, androgen receptor (*ar*), *cyp17a1* 유전자 발현도 증가되었다.³¹⁾ 일반적으로 외인성 T3, T4 호르몬을 투여하였을 때에는 TH의 증가와 함께 여성 호르몬(E2)의 감소와 남성 호르몬(11-KT)의 증가가 관찰되었다.

이와 반대로 TH가 저하될 경우에는 여성 호르몬의 증가와 남성 호르몬의 감소패턴이 관찰되었다. 예를 들어, 갑상선 활성을 억제하는 티오요소(thiourea)에 노출된 수컷 공기호흡메기(air-breathing catfish)는 혈청 11-KT 호르몬과 T 호르몬의 농도가 줄어들었으며,³²⁾ 남성 호르몬 생산에 관여하는 11 β hsd 유전자 발현도 감소하였다.³³⁾ 6-propyl-2-thiouracil은 TPO 활동을 방해하여 갑상선 활성을 억제하는 물질로, 이 물질에 노출된 암컷 제브라피쉬에서는 혈장 T4, T3 호르몬의 감소와 함께 FSH, LH의 증가가 관찰되었다.¹⁾ TH의 음성 되먹임 작용은 뇌에서 분비되는 GnRH, FSH, LH와 연관되어 있어 TH의 분비가 줄어들 경우 번식에도 영향을 미칠 수 있다.³⁴⁾

TH는 성분화(gonadal differentiation) 뿐만 아니라 생식세포 성숙(gonadal maturation)에도 영향을 줄 수 있다. T3 호르몬을 수컷 fathead minnow (*Pimephales promelas*)에 10일간 투여하였을 때, 성숙된 정자 생산이 증가되었다.³⁵⁾ 또한 암컷 rainbow trout에서는 T3가 높아졌을 때 난소 성장이 증진되었다.³⁶⁾ 일부 연구에서는 외인성 T4를 투여하였을 때 성숙된 정자와 정자세포의 수가 감소되었다고 보고하였으나,³⁷⁾ 대부분의 경우에는 수컷화가 유발되었다. 예를 들어, 갑상선 기능 저하를 유발하는 페클로레이트(perchlorate)와 메티마졸(methimazole)에 노출된 제브라피쉬 치어는 정자 생산이 억제되었으나, T4 호르몬과 함께 노출되었을 때에는 방향성이

Table 2. Summary of studies that shows the interaction between the hypothalamic-pituitary-gonad and thyroid gland axes (HPG/HPT), -gonad and -adrenal axes (HPG/HPA), and -thyroid gland and -adrenal axes (HPT/HPA) after exogenous hormone and chemical treatment

Species	Treatment	Stage	Exposure duration	HPG axis response	HPT axis response	HPA axis response	Reference
<i>Verasper moseri</i>							
<i>Oncorhynchus masou</i>	Synthetic GnRH	Synthetic seabream GnRH	In vivo adult	1 h		↑ plasma T4	23
<i>Carassius auratus</i>							
<i>Catla catla</i>	Salmon GnRH	In vivo adult	3 h		↑ serum T4		24
<i>Gillichthys mirabilis</i>	Sea turtle LH Bullfrog LH Ostrich LH, FSH	In vivo adult male	18 h		↑ plasma T4		25
<i>Porcine</i>	FSH, ovine LH	In vivo adult	24 h		↑ plasma T4		
<i>Salmo gairdneri</i>	Ovine TSH	In vivo adult	24 h 8 h		↑ plasma T3 ↑ plasma T4		26
<i>Carassius auratus</i>	T3	In vivo adult male	3 d	↓ <i>era, erβ1</i> gene (testis)	↓ <i>dio2</i> gene (liver) ↓ <i>dio3</i> gene (liver, telecephalon)		28
<i>Danio rerio</i>	T3+FSH	Ex vivo testis explants	1 d or 4 d	↑ <i>ifg3</i> gene (proliferation of Sertoli cells)			31
<i>Carassius auratus</i>	T3	Ex vivo testis explants	1 d		↑ 11-KT release ↑ <i>cyp17a1</i> gene		
<i>Salmo gairdneri</i> T3		In vivo female & female	24 h or 36 h		↓ <i>erα, erβ1, erβ2, cyp19a</i> gene (testis or ovary) ↓ <i>fishβ, lhβ</i> gene (pituitary)		29
<i>Clarias gariepinus</i>	Synthetic T4	In vivo adult male	21 d		↓ plasma T ↓ number of spermatozoa/ spermadis		36 37

Table 2. Continued

Species	Treatment	Stage	Exposure duration	HPG axis response	HPT axis response	HPA axis response	Reference
<i>Clarias gariepinus</i>	T4	<i>In vivo</i> juvenile, immature, mature	21 d	↑ rapid oocyte growth ↓ aromatase immunoreactivity			
		female		↓ serum E2			
					↑ plasma T3		
					↑ <i>thrα, thrβ</i> gene (brain, liver)		
<i>Pimephales promelas</i>	T3	<i>In vivo</i> adult male	10 d	↑ mature spermatozoa		↑ plasma T3	
		<i>In vivo</i> adult female	10 d	↓ cortical alveola		↑ <i>thrα, thrβ</i> gene (brain, liver)	
					↑ plasma T4		
					↓ <i>tshβ</i> gene (pituitary)		
					↑ plasma T4		
					↑ <i>tshβ</i> gene (pituitary)		
<i>Methimazole (goitrogen)</i>		<i>In vivo</i> adult male	10 d	↑ mature spermatozoa			
		<i>In vivo</i> adult female	10 d	↑ cortical alveola			
					↑ altered sex ratios (masculinize)		
<i>Danio rerio</i>	T4	<i>In vivo</i> larvae	30 d				
	Perchlorate, Methimazole (goitrogen)	<i>In vivo</i> larvae	30 d		altered sex ratios (feminize)		
						38	
<i>Danio rerio</i>	Perchlorate-T4	Larvae	30 d		altered sex ratios (masculinize)		
					advancing the onset of spermatogenesis		
					↓ <i>l1β1, l1β1sd</i> gene (testis)		
					↑ <i>cyp19a1</i> gene (ovary)		
<i>Clarias gariepinus</i>	Thiourea (goitrogen)	<i>In vivo</i> adult	21 d				
					↓ serum 11-KT, T		
					↓ immunoreactivity of GnRH (brain) and LH (pituitary)		
<i>Clarias gariepinus</i>	Thiourea (goitrogen)	<i>In vivo</i> adult male	21 d				
					↑ plasma FSH, LH, T		
					↓ <i>lhr, star, 3βhsd, 17βhsd</i> gene (gonad)		
					- <i>ar, cyp19a2, era, erβ</i> gene (brain)		
<i>Danio rerio</i>	Propylthiouracil (anti-thyroid agent)	<i>In vivo</i> adult female	48 h		↑ <i>tg</i> gene (thyroid)		
					↓ plasma T4, T3		
					no significant effect on C	1	

Table 2. Continued

Species	Treatment	Stage	Exposure duration	HPG axis response	HPT axis response	HPA axis response	Reference
				HPG/HPA			
<i>Salmo salar</i>	E2	<i>In vivo</i> juvenile	21 d	↑ plasma VTG (♂)	↓ plasma T3 no significant effect on T4	↑ plasma C	41
<i>Odontesthes bonariensis</i>	Cortisol	<i>In vitro</i> testicular explants	up to 6 wph	↑ masculinization ↑ 11-KT (testis explants) ↑ <i>11ßtsd2</i> gene			43
<i>Odontesthes bonariensis</i>	Cortisol	<i>In vivo</i> larvae	up to 7 wph	↑ masculinization ↑ 11-KT, T (whole body) ↓ <i>cyp19a1</i> gene			42
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Cortisol	<i>In vivo</i> juvenile	70 d	↑ masculinization ↓ <i>cyp19a1</i> gene			46
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Cortisol	<i>In vitro</i> gonadal organ culture	14 d	↑ masculinization ↓ <i>cyp26b1</i> gene			45
				HPT/HPA			
<i>Cyprinus carpio</i> T4		<i>In vivo</i> adult	14 d		↓ plasma C ↑ <i>crlhb</i> gene (hypothalamus)	49	
6-Propyl-2-thiouracil (anti-thyroid agent)	<i>In vivo</i> embryo	5 dpf		↑ <i>nis, tg</i> gene (thyroid)	↑ <i>hmgra,</i> <i>cyp11b</i> gene (internal)		
<i>Danio rerio</i>	Metylrapone (cyp11b enzyme inhibitor)	<i>In vivo</i> embryo	5 dpf		↑ <i>tshβ, dio1, dio2</i> gene (thyroid)	↑ <i>pomc, mc2r,</i> <i>hmgra, hmgb,</i> <i>star, cyp11a,</i> <i>3ßtsd, cyp17</i> gene (internal)	48

Gene acronyms are shown in Table 1. Other Abbreviation: C – cortisol, dpf – day post fertilization, igf3 – insulin-like growth factor 3, T – testosterone, T3 – triiodothyronine, T4 – thyroxine, E2 – 17 β -estradiol, FSH – follicle stimulating hormone, LH – luteinizing hormone, wph – weeks post hatching Effect (↑ significant increase, ↓ significant decrease) and target are indicated.

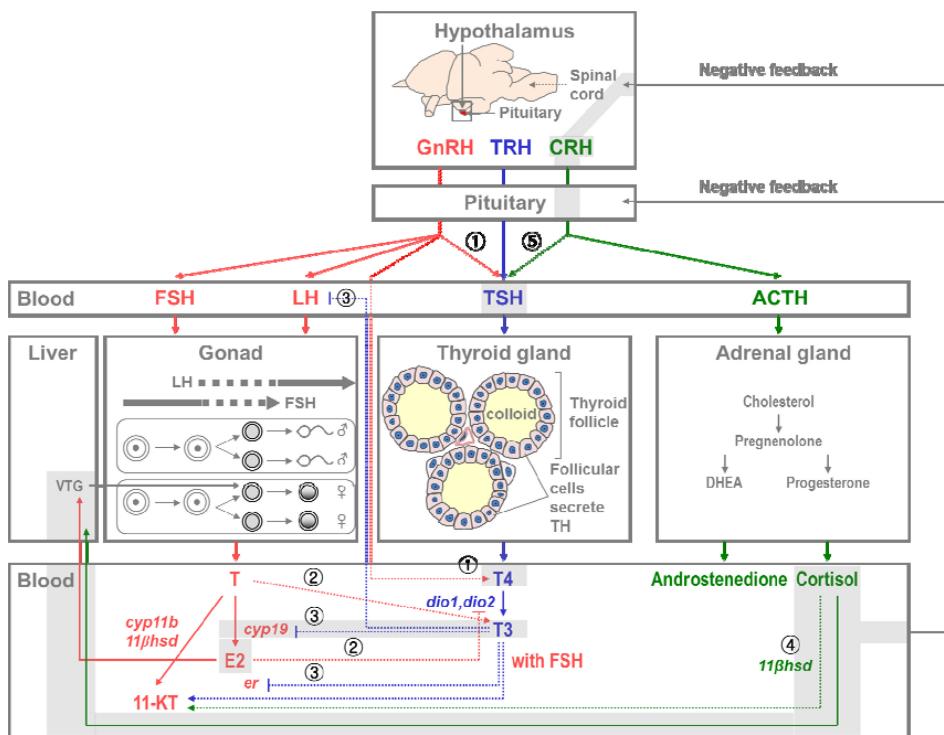


Fig. 2. Schematic representation of hypothalamic-pituitary-gonad (red), -thyroid (blue), and -adrenal (green) axes interaction. Dashed arrows represent the points of interaction between the different axes highlighted in this review. Shadowed areas show the bi-directional interaction of nonylphenol effects.

- ① GnRH could increase plasma T4 levels in fish.^{23,24)}
- ② E2 contributes to the depression in plasma T3 by modifying several aspects of the peripheral metabolism of TH and inhibiting *dio2* converting T4 to T3. T and other androgens tend to enhance T3 formation and thyroidal status.²⁾
- ③ Action of TH diminish the reproductive axis by 1) inhibiting pituitary LH expression and steroidogenesis,¹²⁾ 2) reducing gonadal aromatase expression which contributes to reduced estrogen synthesis,^{12,30,27)} and 3) diminishing estrogen responsiveness by reducing the ER subtypes expression.^{27,28)}
- ④ Cortisol could increase the androgen-related machinery and subsequent masculinization in fish.^{42,43,45,46)}
- ⑤ Corticotropin-releasing hormone (CRH) could induce the thyroid stimulating hormone (TSH) in pituitary in fish.⁴⁷⁾

바뀌어 수컷화가 진행되었다.³⁸⁾ 또한 외인성 T4 호르몬과 퍼클로레이트에 함께 노출된 제브리피쉬에서는 정자세포 발생과정이 촉진되어 수컷화가 진행되었다.³⁹⁾ 즉, TH 분비가 많아지면 물고기의 수컷화를 유발할 수 있으며, 정자생성 초기 단계와 비텔로제닌 소포세포 성장에 영향을 줄 수 있다.²⁾

2. HPG, HPA axes

수서 척추동물에서는 뇌(brain)와 부신 조직(adrenal/interregional tissue)에서 부분적으로 스테로이드 호르몬 생합성과 연관된 경로(*star*, *cyp11a*, *cyp17* and

cyp19)를 공유하기 때문에, HPG 축과 HPA 축의 호르몬들이 상호작용할 수 있다. 성호르몬인 E2 호르몬 농도가 증가하면 HPA 축의 CRH가 증가하고, 이로 인하여 부신피질자극호르몬(adrenocorticotropic hormone; ACTH)과 글루코코르티코이드 호르몬(gluticorticoid hormone)의 농도가 변화하게 된다.^{1,40)} 한 연구에서는 성호르몬인 E2에 노출된 연어(Atlantic salmon)에게서 C 호르몬 농도의 증가가 관찰되었다.⁴¹⁾

또한 스트레스가 유발되면 HPA 축을 통해 성호르몬의 합성과 방출뿐만 아니라 성분화에 영향을 미칠 수 있다. 최근의 연구들에서는 따뜻한 수온에서 물고

기의 C 호르몬 농도가 높아지면 pejerrey,^{42,43)} medaka,⁴⁴⁾ Japanese flounder^{45,46)}의 수컷화(masculinization)를 유발한다고 보고하였다. 성어에서는 HPG 축과 HPA 축에서 글루코코르티코이드 호르몬의 합성과 대사를 관장하는 *cyp11β*와 11-oxygenates androgens의 합성을 관장하는 11 β hsd2를 공유하고 있다. 글루코코르티코이드 호르몬(스트레스)과 안드로겐 호르몬(수컷화)은 성분화 시기에 상호작용할 수 있으며, C 호르몬은 11-KT 호르몬 생산을 증진시켜 정자세포 형성을 증진시킬 수 있다.⁴³⁾

3. HPT, HPA axes

수서척추동물의 CRH는 갑상선, 부신 내분비계 축을 모두 조절할 수 있는 신경조절제(neuroregulator)이며, HPT 축과 HPA 축을 연결시키는 중요한 연결고리로 작용한다. 즉, 시상하부에서 분비되는 CRH는 HPA 축을 조절하는 동시에 TSH를 자극하기도 한다(Fig. 2).⁴⁷⁾ 예를 들어, CYP11B 효소 억제제인 metyrapone에 노출되었을 때에는 갑상선 조직의 *tshβ*, *dio1*, *dio2* 유전자 발현이 증가되었는데,⁴⁸⁾ C 호르몬 농도 저하에 대한 보상작용으로 CRH가 증가되고 이에 따라 갑상선 내분비계의 유전자 발현도 증가되었다고 설명하고 있다. CRH가 갑상선 축의 여러 호르몬을 조절, 억제, 자극하는 것은 물고기의 생애주기에 따라 다를 수 있다.

TH 역시 HPA 축의 호르몬 분비에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 갑상선 기능 항진증(hyperthyroidism)이 유발된 잉어(*Cyprinus carpio*)에서는 혈장 C 호르몬 수준이 감소하였다.⁴⁹⁾ 대표적인 항갑상선 약물인 6-propyl-2-thiouracil에 노출된 제브라피쉬 배아/치어는 부신 조직의 *hmgra*, *cyp11b* 유전자 발현이 증가하였다.⁴⁸⁾ 이 연구에서는 6-propyl-2-thiouracil 노출이 제브라피쉬의 TH 농도를 감소시키고, 음성 되먹임 작용으로 CRH의 민감도를 증가시켜 *hmgra*, *cyp11b* 유전자 발현이 증가되었다고 설명하고 있다.

IV. 노닐페놀 노출로 인한 경골어류 내분비계의 영향

노닐페놀은 계면활성제, 애피시 수지, 페인트 첨가제 등으로 널리 사용되고 있으며, 물환경 중으로 유입되어 오염이 되면 환경과 생태계에 축적되어 인간

과 환경에 영향을 줄 수 있는 대표적인 내분비계 장애물질이다. 2013년 9월부터는 어린이용품의 관리를 강화하기 위해 함량기준이 설정되었으며, 최근 「유해화학물질 관리법」의 취급제한 물질로 지정되었다. 본 연구에서는 상대적으로 연구자료가 풍부하고 대표적인 내분비계 장애물질로 알려진 노닐페놀의 독성을 정리하였고, 물고기의 번식, 갑상선, 부신 내분비계에 미치는 영향을 전일적으로 설명하여 추후 연구들의 방향에 대해 제시하고자 하였다(Table 3).

노닐페놀의 생식선 내분비계 독성영향은 성별로 다르게 나타났으며, 주로 수컷 물고기의 암컷화가 관찰되었다. 노닐페놀에 노출된 수컷 물고기에서 여성호르몬인 E2⁵⁰⁻⁵³⁾와 비텔로제닌이 증가하였고,^{41,51,54-62)} 스테로이드 호르몬 생합성과 연관된 경로의 여러 유전자들(*cyp17*, *cyp19a*, *cyp19b* 등)의 발현이 변화하였다.⁵¹⁾ 이러한 영향은 조직학적인 수준에서 생식소중량지수(gonadosomatic index)의 감소와도 연관이 있다.^{50,57)}

노닐페놀은 갑상선 내분비계의 영향에 대한 간접적인 반응으로 생식선에 영향을 미칠 수 있다. 즉, 수컷 물고기의 혈장 T4와 T3가 감소함^{50,52,53,56,63)}으로 인해 T에서 E2로 전환시켜주는 *cyp19* 효소가 증가⁵¹⁾하여 궁극적으로 E2가 증가될 수 있다(Fig. 2의 ②③). 예를 들어, 노닐페놀에 14일간 노출된 수컷 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서는 혈장 T4와 T3가 감소하였고, 이러한 결과가 생식선 내분비계의 혈장 E2를 증가시키고 T를 감소시키는 데 영향을 미칠 수 있다.⁵²⁾

수서척추동물에서 CRH는 다른 내분비계 축과 연결하는 중요한 고리로 작용한다. 노닐페놀에 노출된 수컷 물고기에서는 C 호르몬이 증가^{41,52,64,65)}하였고, 혈장 TSH, T4, T3가 감소되었다.⁵⁰⁾ C 호르몬이 증가되었을 때 음성되먹임 작용으로 시상하부의 CRH가 감소될 수 있으며, 이는 TSH와 TH의 감소로 이어질 수 있다(Fig. 2의 ⑤). 또한 혈장 C 호르몬이 증가할 경우 HPG 축과 연결된 비텔로제닌도 증가할 수 있다.⁴¹⁾ 그러나 노닐페놀이 HPG, HPT, HPA 축의 어느 축에 먼저 영향을 주는지 선후관계가 밝혀지지는 않았다.

V. 결 론

본 연구에서는 물환경 중 내분비계 장애물질이

Table 3. Summary of studies that shows the interaction between the hypothalamic-pituitary-gonad (HPG), -thyroid (HPT), and -adrenal (HPA) axes after nonylphenol exposure

Species	Stage	Exposure duration	HPG axis response	HPT axis response	HPA axis response	Reference
<i>Acanthopagrus latus</i>	<i>In vivo</i> immature male	14 d	↑ plasma VTG (♂)			58
<i>Carassius auratus</i>	<i>In vivo</i> adult male	28 d	↑ plasma E2, T (♂) ↓ <i>erα, erβ, vtg</i> gene (♂ liver) ↓ <i>cyp17</i> gene (♂ testis) ↑ <i>cyp19a, cyp19b</i> gene (♂ brain)			51
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>In vivo</i> adult male	7 d	↑ plasma VTG (♂) gonadosomatic index (♂)			57
<i>Danio rerio</i>	<i>In vivo</i> adult male	21 d	↑ <i>vgl1, vtg2</i> gene (♂ liver) ↑ <i>erα, erβ</i> gene (♂ liver)			59
<i>Gobiocypris rarus</i>	<i>In vivo</i> adult	21 d	↑ plasma VTG (♂)			62
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	<i>In vivo</i> juvenile	125 d		no significant effect on plasma T4, T3		66
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>In vivo</i> juvenile	14 d			no significant effect on plasma C	67
<i>Oryzias latipes</i>	<i>In vivo</i> adult	21 d	↑ plasma VTG (♂)			60
<i>Oryzias latipes</i>	<i>In vivo</i> embryo	4 hpf	↓ <i>gnrh1, gnrh2, gnrh3</i> gene (whole body) ↑ <i>erα</i> gene (whole body)			68
<i>Sebastes schlegeli</i>	<i>In vivo</i> adult male	14 d	↑ plasma VTG (♂) no significant effect on plasma E2, T			61
<i>Clarias gariepinus</i>	<i>In vivo</i> adult	7 d		↑ serum C		65

Table 3. Continued

Species	Stage	Exposure duration	HPG axis response	HPT axis response	HPA axis response	Reference
<i>Sparus auratus</i>	<i>In vivo</i> adult male	10 d	↑ plasma E2 (♂) no significant effect on plasma T (♂)	↑ plasma T4 (♂) ↓ plasma T3 (♂)	↑ plasma C	64
<i>Acanthopagrus latus</i>	<i>In vivo</i> immature male	14 d	↑ plasma E2 (♂)	↑ plasma T4 (♂)	53	
<i>Carassius auratus</i>	<i>In vivo</i> adult male	28 d	↑ plasma VTG	↓ plasma T4 no significant effect on plasma T3	54	
<i>Clarias gariepinus</i>	<i>In vivo</i> adult	15 d	↓ gonadosomatic index ↑ plasma E2, LH (♂, ♀) ↓ plasma FSH, T (♂, ♀)	↓ plasma TSH, T4, T3 (♂, ♀)	50	
<i>Salmo salar</i>	<i>In vivo</i> smolts	7 d		↓ plasma T3 no significant effect on plasma T4	53	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>In vivo</i> adult	14 d	↑ plasma E2(♂) ↑ plasma T(♀)	↓ plasma T4, T3 (♂, ♀) ↑ plasma C (♂, ♀)	52	
<i>Salmo salar</i>	<i>In vivo</i> 1 yr old smolts	4 d	↑ vtg gene (whole body)	no significant effect on plasma T4, no significant effect on plasma C	55	
<i>Salmo salar</i>	<i>In vivo</i> juvenile	14 d	↑ plasma VTG	↓ plasma T4, T3 no significant effect on plasma C	56	
<i>Salmo salar</i>	<i>In vivo</i> juvenile	21 d	↑ plasma VTG	no significant effect on plasma T4, ↑ plasma C T3	41	

Gene acronyms are shown in Table 1. Other abbreviation: C – cortisol, T – testosterone, T3 – triiodothyronine, T4 – thyroxine, E2 - 17 β -estradiol, FSH – follicle stimulating hormone, LH – luteinizing hormone, VTG – vitellogenin, dpf – day post fertilization. Effect (↑ significant increase, ↓ significant decrease) and target are indicated.

HPG, HPT, HPA 축의 다양한 유전자와 호르몬에 미치는 영향을 조사하였으며, 이러한 결과를 종합적으로 연계하여 해석하고자 하였다. 또한 비교적 자료가 풍부하고 대표적인 물환경 내분비계 장애물질인 노닐페놀의 주요 내분비계 축의 다양한 분자생물학적 지표들이 어떠한 상호작용으로 영향을 미치는지 전일적으로 해석하고자 하였다. 현재까지의 연구들은 내분비계 장애물질이 주요 3가지 내분비계 축의 어느 조직에 먼저 독성을 일으키는지 또는 독성기전들이 어떻게 연관되어 해석되는지의 정보가 부족하다. 앞으로의 연구에서 환경오염물질이 물고기의 HPG, HPT, HPA 축의 다양한 호르몬과 유전자에 미치는 영향을 함께 관찰한다면 통합적으로 이해하는 데 도움이 될 것이다.

Acknowledgement

This study was supported by National Research Foundation of Korea (NRF; Project no. 2013R1A1A1061684).

References

- Liu C, Zhang X, Deng J, Hecker M, Al-Khedairy A, Giesy JP, Zhou B. Effects of prochloraz or propylthiouracil on the cross-talk between the HPG, HPA, and HPT axes in zebrafish. Environ Sci Technol. 2011; 45(2): 769-775.
- Cyr DG, Eales JG. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. Rev Fish Biol Fisher. 1996; 6: 165-200.
- Leatherland JF, Li M, Barkataki S. Stressors, glucocorticoids and ovarian function in teleosts. J Fish Biol. 2010; 76: 86-111.
- Maruska KP, Fernald RD. Social regulation of gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Physiology. 2011; 26: 412-423.
- Chen CC, Fernald RD. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. J Fish Biol. 2008; 73: 1099-1120.
- Somoza GM, Miranda LA, Strobl-Mazzulla P, Guigur LG. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. Cell Mol Neurobiol. 2002; 22: 589-609.
- Schulz RW, de França LR, Lareyre JJ, Le Gac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T. Spermatogenesis in fish. Gen Comp Endocrinol. 2010; 165: 390-411.
- Clelland E, Peng C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. Mol Cell Endocrinol. 2009; 312: 42-52.
- Nunez BS, Evans AN. Hormonal regulation of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in gonadal tissues of the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). Gen Comp Endocrinol. 2007; 150: 495-504.
- Wang RL, Bencic D, Lazorchak J, Villeneuve D, Ankley GT. Transcriptional regulatory dynamics of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and its peripheral pathways as impacted by the 3-beta HSD inhibitor trilostane in zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicol Environ Saf. 2011; 74: 1461-1470.
- Uno T, Ishizuka M, Itakura T. Cytochrome P450 (CYP) in fish. Environ Toxicol Pharmacol. 2012; 34: 1-13.
- Nelson ER, Habibi HR. Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. Endocrinology. 2010; 151: 1668-1676.
- Marchand O, Safi R, Escrivá H, Van Rompaey E, Prunet P, Laudet V. Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. J Mol Endocrinol. 2001; 26: 51-65.
- Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Bjornsson BT, Einarsdottir IE, Canario AV, Sweeney GE. Thyroid hormones in growth and development of fish. Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol. 2001; 130: 447-459.
- Harvey CB, Bassett JH, Maruvada P, Yen PM, Williams GR. The rat thyroid hormone receptor (TR) Deltabeta3 displays cell-, TR isoform-, and thyroid hormone response element-specific actions. Endocrinology. 2007; 148: 1764-1773.
- Orozco A, Valverde RC. Thyroid hormone deiodination in fish. Thyroid. 2005; 15: 799-813.
- Chan WK, Chan KM. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. Aquat Toxicol. 2012; 108: 106-111.
- Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. Thyroid. 2001; 11: 407-414.
- Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. Endocr Rev. 2003; 24: 48-77.

20. Alsop D, Vijayan MM. The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *Gen Comp Endocrinol.* 2009; 161: 62-66.
21. Wilson KS, Matrone G, Livingstone DE, Al-Dujaili EA, Mullins JJ, Tucker CS, Hadoke PW, Kenyon CJ, Denvir MA. Physiological roles of glucocorticoids during early embryonic development of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Physiol.* 2013; 591: 6209-6220.
22. Alsop D, Vijayan MM. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294: R711-R719.
23. Chiba H, Amano M, Yamada H, Fujimoto Y, Ojima D, Okuzawa K, Yamanome T, Yamamori K, Iwata M. Involvement of gonadotropin-releasing hormone in thyroxine release in three different forms of teleost fish: barfin founder, masu salmon and goldfish. *Fish Physiol Biochem.* 2004; 30: 267-273.
24. Roy P, Datta M, Dasgupta S, Bhattacharya S. Gonadotropin-releasing hormone stimulates thyroid activity in a freshwater murrel, *Channa gachua* (Ham.), and carps, *Catla catla* (Ham.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *Gen Comp Endocrinol.* 2000; 117: 456-463.
25. MacKenzie DS. Stimulation of the thyroid gland of a teleost fish, *Gillichthys mirabilis*, by tetrapod pituitary glycoprotein hormones. *Comp Biochem Physiol.* 1982; A72: 477-482.
26. Milne R, Leatherland J. Changes in plasma thyroid hormones following administration of exogenous pituitary hormones and steroid hormones to rainbow trout. *Comp Biochem Physiol.* 1980; A66: 679-686.
27. Habibi HR, Nelson ER, Allan ER. New insights into thyroid hormone function and modulation of reproduction in goldfish. *Gen Comp Endocrinol.* 2012; 175: 19-26.
28. Marlatt VL, Gerrie E, Wiens S, Jackson F, Moon TW, Trudeau VL. Estradiol and triiodothyronine differentially modulate reproductive and thyroidal genes in male goldfish. *Fish Physiol Biochem.* 2012; 38: 283-296.
29. Nelson ER, Habibi HR. Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. *Endocrinology.* 2010; 151: 1668-1676.
30. Supriya A, Raghuvir K, Swapna I, Rasheeda MK, Kobayashi T, Nagahama Y, Gupta AD, Majumdar KC, Senthilkumar B. Thyroid hormone modulation of ovarian recrudescence of air-breathing catfish *Clarias gariepinus*. *Fish Physiol Biochem.* 2005; 31: 267-270.
31. Morais RD, Nóbrega RH, Gómez-González NE, Schmidt R, Bogerd J, França LR, Schulz RW. Thyroid hormone stimulates the proliferation of sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Endocrinology.* 2013; 154: 4365-4376.
32. Swapna I, Rajasekhar M, Supriya A, Raghuvir K, Sreenivasulu G, Rasheeda MK, Majumdar KC, Kagawa H, Tanaka H, Dutta-Gupta A, Senthilkumar B. Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2006; 144: 1-10.
33. Rasheeda MK, Sreenivasulu G, Swapna I, Raghuvir K, Wang DS, Thangaraj K, Gupta AD, Senthilkumar B. Thiourea-induced alteration in the expression patterns of some steroidogenic enzymes in the air-breathing catfish *Clarias gariepinus*. *Fish Physiol Biochem.* 2005; 31: 275-279.
34. Swapna I, Senthilkumar B. Thyroid hormones modulate the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis in teleosts: molecular insights. *Fish Physiol Biochem.* 2007; 33: 335-345.
35. Lema SC, Dickey JT, Schultz IR, Swanson P. Thyroid hormone regulation of mRNAs encoding thyrotropin β -subunit, glycoprotein α -subunit, and thyroid hormone receptors α and β in brain, pituitary gland, liver, and gonads of an adult teleost, *Pimephales promelas*. *J Endocrinol.* 2009; 202: 43-54.
36. Cyr DG, Eales JG. Influence of thyroidal status on ovarian function in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Exp Zool.* 1988; 248: 81-87.
37. Jacob TN, Pandey JP, Raghuvir K, Sreenivasulu G, Gupta AD, Yoshikuni M, Jagota A, Senthilkumar B. Thyroxine-induced alterations in the testis and seminal vesicles of air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Fish Physiol Biochem.* 2005; 31: 271-274.
38. Sharma P, Patiño R. Regulation of gonadal sex ratios and pubertal development by the thyroid endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*). *Gen Comp Endocrinol.* 2013; 111-119.
39. Mukhi S, Torres L, Patiño R. Effects of larval-juvenile treatment with perchlorate and co-treatment with thyroxine on zebrafish sex ratios. *Gen Comp Endocrinol.* 2007; 150: 486-494.
40. Ochedalski T, Subburaju S, Wynn PC, Aguilera G. Interaction between oestrogen and oxytocin on

- hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol.* 2007; 19: 189-197.
41. Lerner DT, Björnsson BT, McCormick SD. Aqueous exposure to 4-nonylphenol and 17 β -estradiol increases stress sensitivity and disrupts ion regulatory ability of juvenile Atlantic salmon. *Environ Toxicol Chem.* 2007; 26: 1433-1440.
 42. Hattori RS, Fernandino JI, Kishii A, Kumura H, Kinno T, Oura M, Somoza GM, Yokota M, Strüssmann CA, Watanabe S. Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS One.* 2009; 4: e6548.
 43. Fernandino JI, Hattori RS, Kishi A, Strüssmann CA, Somoza GM. The cortisol and androgen pathways cross talk in high-temperature induced masculinization: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology.* 2012; 153: 6003-6011.
 44. Hayashi Y, Kobira H, Yamaguchi T, Shiraishi E, Yazawa T, Hirai T, Kamei Y, Kitano T. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol Reprod Dev.* 2010; 77: 679-686.
 45. Yamaguchi T, Kitano T. High temperature induces cyp26b1 mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 419: 287-292.
 46. Yamaguchi T, Yoshinaga N, Yazawa T, Gen K, Kitano T. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology.* 2010; 151: 3900-3908.
 47. Larsen DA, Swanson P, Dickey JT, Rivier J, Dickhoff WW. In vitro thyrotropin-releasing activity of corticotropin-releasing hormone-family peptides in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol.* 1998; 109: 276-285.
 48. Liu C, Yu H, Zhang X. Zebrafish embryos/larvae for rapid determination of effects on hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) and hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis: mRNA expression. *Chemosphere.* 2013; 93: 2327-2332.
 49. Geven EJW, Verhaar F, Flik G, Klaren PHM. Experimental hyperthyroidism and central mediators of stress axis and thyroid axis activity in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *J Mol Endocrinol.* 2006; 37: 443-452.
 50. Sayed Ael-D, Mahmoud UM, Mekkawy IA. Reproductive biomarkers to identify endocrine disruption in *Clarias gariepinus* exposed to 4-nonylphenol. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012; 78: 310-319.
 51. Wu F, Lin L, Q JW, Chen H, Weng Sm Luan T. Complex effects of two presumably antagonistic endocrine disrupting compounds on the goldfish (*Carassius auratus*): A comprehensive study with multiple toxicological endpoints. *Aquat Toxicol.* 2014; 155: 43-51.
 52. Naderi M, Zargham D, Asadi A, Bashti T, Kamayi K. 2012. Short-term responses of selected endocrine parameters in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 4-nonylphenol. *Toxicol Ind Health.* 2012; DOI: 10.1177/0748233713491806.
 53. Naderi M, Mousavi SM, Safahieh A, Ghatrami ER, Zargham D. Effects of 4-nonylphenol on balance of steroid and thyroid hormones in sexually immature male yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Environ Toxicol.* 2014; 29: 459-465.
 54. Zaccaroni A, Gamberoni M, Mandrioli L, Sirri R, Mordini O, Scaravelli D, Sarli G, Parmeggiani A. Thyroid hormones as a potential early biomarker of exposure to 4-nonylphenol in adult male shubunkins (*Carassius auratus*). *Sci Total Environ.* 2009; 407: 3301-3306.
 55. Duffy TA, Iwanowicz LR, McCormick SD. Comparative responses to endocrine disrupting compounds in early life stages of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquat Toxicol.* 2014; 152: 1-10.
 56. McCormick SD, O'Dea MF, Moeckel AM, Lerner DT, Björnsson BT. Endocrine disruption of parr-smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol and 17 β -estradiol. *Gen Comp Endocrinol.* 2005; 142: 280-288.
 57. Song WT, Wang ZJ, Liu HC. Effects of individual and binary mixtures of estrogens n male goldfish (*Carassius auratus*). *Fish Physiol Biochem.* 2014; 40: 1927-1935.
 58. Naderi M, Safahieh A, Madiseh SD, Zolgharnein H, Ghatrami ER. Induction of vitellogenin synthesis in immature male yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) exposed to 4-nonylphenol and 17 β -estradiol. *Toxicol Ind Health.* 2015; 31: 209-220.
 59. Jin Y, Shu L, Sun L, Liu W, Fu Z. Temperature and photoperiod affect the endocrine disruption effects of ethinylestradiol, nonylphenol and their binary mixture in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol.* 2010, 151: 258-263.
 60. Ishibashi H, Hirano M, Matsumura N, Watanabe N, Takao Y, Arizono K. Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere.* 2006; 65: 1019-1026.

61. Jung JH, Shim WJ, Addison RF, Baek JM, Han CH. Protein and gene expression of VTG in response to 4-nonylphenol in rockfish (*Sebastodes schlegeli*). *Comp Biochem Physiol*. 2006; 143: 162-170.
62. Zha J, Suna L, Spear PA, Wang Z. Comparison of ethinyl estradiol and nonylphenol effects on reproduction of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Ecotoxicol. Env. Saf.* 2008; 71: 390-399.
63. Robertson LS, McCormick SD. The effect of nonylphenol on gene expression in Atlantic salmon smolts. *Aquat Toxicol.* 2012; 122-123:36-43.
64. Carrera EP, García-López A, Río M, Martínez-Rodríguez G, Solé M, Mancera JM. Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Comp Biochem Physiol*. 2007; 145: 210-217.
65. Kumaran SS, Kavitha C, Ramesh M, Grummt T. Toxicity studies of nonylphenol and octylphenol: hormonal, hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*. *J Appl Toxicol.* 2011; 31:752-761.
66. Keen PL, Higgs DA, Hall KJ, Ikonomou M. Effects of dietary exposure of 4-nonylphenol on growth and smoltification of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Sci Total Env.* 2005; 34 :81-94.
67. Shelley LK, Ross PS, Miller KM, Kaukinen KH, Kennedy CJ. Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on general health, disease susceptibility and gene expression. *Aquat Toxicol.* 2012; 124-125: 217-226.
68. Lee W, Kang CW, Su CK, Okubo K, Nagahama Y. Screening estrogenic activity of environmental contaminants and water samples using a transgenic medaka embryo bioassay. *Chemosphere.* 2012; 88: 945-952.