

성 성숙 억제 물질 투여에 따른 Zebrafish *Danio rerio*의 성호르몬 관련 유전자 발현 변화

김기혁 · 문혜나 · 여인규*

제주대학교 수산생명의학과

Changes in Sex Hormone-related Gene Expression in Zebrafish *Danio rerio* by the Administration of Sexual Maturation Inhibitors

Ki-hyuk Kim, Hye-na Moon and In-kyu Yeo*

Department of Aquatic Life Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

Successful reproduction in vertebrates necessitates complex interactions along the brain-pituitary-gonad axis, it is determined by gonadotropin releasing hormone produced in the hypothalamus of the brain, gonadotropin synthesized in the pituitary gland, and sex hormone secreted by the gonads. The goal of this study was to secure and test technology for controlling (inhibiting) sexual maturation hormones such as maturation hormones through hormone regulation. We studied the effect on sexual maturation of zebrafish *Danio rerio* by tamoxifen, anastrozole, exemestane and dopamine 4 kinds of sexual maturation inhibitors to feed and after administration. As a result, 4 kinds of sexual maturation inducing substances were mixed with zebrafish feed, it could be concluded that all of them were effective in inhibiting sexual maturation by reducing mRNA levels of genetic materials related to sexual maturation.

Keywords: Estrogen, Estrogen receptor, GnRH, Gth, Vitellogenin

서론

어류의 성전환은 미성숙 개체(juvenile)에 성 스테로이드를 처리함으로써 인위적으로 유도될 수 있다는 것이 medaka *Oryzias latipes*에서 최초로 밝혀졌으며(Yamamoto, 1958), 이후 연구가 활발히 진행되어왔다. 암컷에서 수컷으로의 성 전환은 estrogen의 감소 및 androgen의 증가와 관련이 있다(Nakamura et al., 2003). Estrogen은 cytochrome P450 aromatase (P450arom)에 의한 방향성 androgen의 전환에 의해 생성되며, P450arom의 작용은 어류 및 기타 척추동물의 성분화 및 난소 발달에 필수적인 역할을 담당하고(Desvages and Pieau, 1992), 이 작용은 oogenesis와 vitellogenesis를 포함하는 척추동물의 생리적 작용에 중요한 역할을 한다. 예를 들면, estrogen의 투여는 유대류, 조류, 파충류 및 어류 등 다양한 종들에 있어 표현형 수컷을 암컷으로 성 전환시킨다는 결과가 보고되었다(Guiguen et al., 2010). 이러한 estrogen의 활성은 estrogen receptor (ER)을 통

해 조절되며, alpha와 beta 두 개의 subtype으로 분류되고, 어류에서 ER은 뇌, 생식소 및 간에서 발현되는 것으로 알려져 있다(Kitano et al., 2007). Vitellogenin (VTG)은 난생 척추동물의 성숙한 암컷 혈중에 나타나는 성 특이성 단백질로써 난에서 분비된 estrogen은 간세포 내 ER과 결합하여 VTG 단백질을 합성하며, VTG는 난모세포 표면에 존재하는 VTG receptor와 결합하여 receptor-mediated endocytosis에 의해 세포내로 유입된다(Li et al., 2003). 성 성숙 억제 물질은 시상하부, 뇌하수체 및 생식소와 같은 성호르몬이 분비되는 기관에 작용하여 성 성숙을 지연 및 억제시키는 것으로 알려져 있다. 성 성숙 억제 물질로 알려진 anti-estrogen (AE)인 tamoxifen (Tam)은 estrogen과 경쟁하는 ER로 알려져 있으며, growth factor 인자를 포함하는 다양한 변수들에 의해 조절될 수 있는데, ER/tamoxifen 복합체는 co-repressors로 알려진 다른 단백질을 불러들여 DNA에 결합하여 유전자 발현을 조절하는 기능을 가진다(Shang et al., 2000). 또한, Tam은 일부 조직에서 estrogen의 작용제로 작용

*Corresponding author: Tel: +82. 10. 9487. 2579 Fax: +82. 61. 756. 3493

E-mail address: ikyeo99@jejunu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0017>

Korean J Fish Aquat Sci 55(1), 17-22, February 2022

Received 3 December 2021; Revised 23 January 2022; Accepted 17 February 2022

저자 직위: 김기혁(연구원), 문혜나(연구원), 여인규(교수)

할 뿐 아니라 다른 일부 조직에서는 길항제로 작용한다고 보고되었다(Cosman and Lindsay, 1999). 어류에서 Tam은 medaka *Oryzias latipes*, tilapia *Oreochromis niloticus* 그리고 zebrafish *Danio rerio* 등 몇몇의 어류에 연구되어 왔다(Lazier et al., 1996; Chikae et al., 2004; Ven et al., 2007).

Aromatase inhibitor (AI)는 P450arom activity를 block하여 aromatase enzyme 활성을 억제하여 androgen으로부터 estrogen의 생성 능력을 불활성화 시키는 작용을 하며, 인간에게는 폐경 전 여성의 ovarian aromatase가 상당량의 circulating estrogen을 담당하고 luteinizing hormone (LH)의 변화에 굉장히 민감성을 나타낸다(Fabian, 2007). AI의 기능을 하는 약품으로는 anastrozole (Ana), exemestane (Exe), fadrozole, letrozole 및 vorozole이 알려져 있으며, 이들은 aromatase enzyme의 활성 억제를 통하여 androgen으로부터 estrogen의 생성을 억제한다. 또한, AI는 steroid 및 non-steroid 두 계열로 나뉘어지며, 대표적인 steroid 물질은 Exe, non-steroid 물질은 Ana로 알려져 있다. Dopamine (Da)은 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)의 gonadotropin (Gth) 방출효과를 억제하여 그 이후의 과정, 즉 생식선의 발달과 성스테로이드의 분비를 억제하게 된다(Dufour et al., 2005). 또한, 번식기능에 있어서 중요한 역할을 하는 신경전달물질로, 특히 성선자극호르몬의 변화를 조절함으로써 계절번식 동물에서의 번식 주기를 유지하는 데 결정적 역할을 한다(Han, 2005). 또한, 혈류를 따라 뇌하수체전엽으로 이동되어 성선자극호르몬분비세포(gonadotropes)에 작용하여 Gth인 luteinizing hormone (LH) 및 follicle stimulating hormone (FSH)의 분비를 촉진하고, 이들 성선자극호르몬은 성선으로부터 estrogen, progesterone 및 testosterone 등과 같은 성호르몬 분비를 촉진하고, 이들 성호르몬은 시상하부에 존재하는 GnRH 신경세포의 활성을 조절한다.

오늘날 양식의 주 목적으로 종 보존 및 고급 어종을 계획적으로 종묘를 생산하기 위해 인위적으로 성 성숙 및 배란을 유도하는 연구가 주를 이루었으며, 인위적으로 성 성숙 및 배란을 유도하는 방법에는 대표적으로 수온 조절과 광주기 조절에 의한 조피볼락 *Sebastes inermis*의 성 스테로이드 호르몬 농도 변화 및 가리비 *Pectinidae*의 수온 자극에 의한 조기 성 성숙 유도 연구되었다(Jang et al., 2001; Lim and Han, 2012; Kim et al., 2014). 이와 같이 성 성숙 유도 및 제어에 관한 연구가 보고되었지만 확실한 효과는 검증되지 않았다. 일반적으로 어류의 암컷은 성 성숙이 시작되는 시기가 되면 알을 생산하기 위한 생리학적 변화로 인한 스트레스로 면역력의 감소 및 성장의 둔화 문제를 유발시키며(Lim and Han, 2012), 화학적 요인들을 어류 체내에 투여하여 단순히 호르몬 발현량을 알아본 연구들은 많지만, 성 제어에 관한 보고는 이루어지지 않았다. 본 연구는 앞서 언급한 4가지 화학적 성 성숙 억제물질을 사료에 첨가하여 zebrafish에 투여 후 성 성숙 호르몬 관련 유전자 mRNA level 변화를 관찰하여 어류의 성호르몬 억제에 관한 기초자료로 사용하고자 연

구하였다.

재료 및 방법

실험어 및 사육관리

실험에 사용된 어류는 연구실에서 사육하던 zebrafish를 사용하여 각 수조마다 각 암컷 및 수컷 각각 15마리 총 30마리를 4개의 수조에 120마리를 사용하여 실험환경에 적응시키기 위해 시판용 사료를 공급하였으며, 암수 구분은 지느러미의 모양으로 구분하여 해부에 사용하였다. 실험 시작 전과 후 수온 27-28°C, 광주기 light (L):dark (D)=14:10로 유지하였다.

실험사료 제작 및 투여

화학물질은 17 beta estradiol (Abcam, Boston, MA, USA), tamoxifen (Sigma, St. Louis, MA, USA), anastrozole (Sigma), exemestane (Tocris, Seongnam, Korea), dopamine (Abcam)를 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹여 시판되는 zebrafish 사료에 100 µg/g의 농도로 분사하였으며, 대조구로는 DMSO를 분사하여 건열기에 건조하여 화학물질 사료를 준비하였다. 준비된 사료를 하루 두 번, 총 15일간 공급하였다.

샘플 수집 및 real time PCR

화학물질 사료 투입 후, 7일 및 15일 째 각 그룹 암컷 및 수컷 각각 5마리의 총 10마리 실험어를 얼음 위에서 마취하여 대조구 및 Da 투여 실험어는 GnRH 및 Gth mRNA level 분석을 위하여 두개골을 절단하여 뇌를 분리 후, 뇌의 하단 부위로부터 뇌하수체를 분리하였으며, 시상하부는 뇌와 연결되어 뇌를 그대로 사용하였다. 또한, AE 및 AI 투여 실험어는 ER 및 VTG mRNA level 분석을 위하여 생식소 및 간을 추출하였다. 추출한 장기들은 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출 후, TaKaRa사의 1st synthesis cDNA kit를 이용하여 cDNA로 합성하여 quantitative PCR(qPCR)의 template로 사용하였다. Quantitative PCR (qPCR)은 TOPreal™ qPCR 2 x PreMIX (SYBR

Table 1. Oligonucleotide primers used for quantitative PCR (qPCR)

Gene	Nucleotide sequence (5'→3')
GADPH F	CTGGTGACCCGTGCTGCTT
GADPH R	TTTGCCGCCTTCTGCCTTA
VTG F	AACGAACAGCGAGAAAGAGATTG
VTG R	GATGGGAACAGCGACAGGA
ER F	AGTCAGAGATACATCAGTGAGAG
ER R	GCGCTGTGCTCCTCCTTAG
GnRH F	ATGGTGCTGGTCTGCAGGCTG
GnRH R	GTAGGAACTGCTGCAAATGGGT
Gth 1F	CGAGCTGTCTTCCCATCCA
Gth 1R	TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG

Green with low ROX; Enzymomics Inc., Daejeon, Korea)를 이용하여 수행하였으며, 사용된 primer는 reference gene으로 GAPDH를 사용 및 호르몬 관련 유전자 primer는 기존 연구에 사용된 primer로 Table 1에 나타내었다. qPCR 조건은 95°C에서 3분간 pre denaturation 후 총 40 cycle로 95°C에서 10초, 58°C에서 30초 반응 후, 95°C에서 10초 반응하였으며, melting curve를 수행하였다. 각 mRNA level의 발현 결과는 Livar (2^{-ΔΔCT}) 방법(Livak and Schmittgen, 2001)을 통해 나타내었으며, Thermal cycle DICE Real Time System (TP800; TaKaRa, Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다.

통계 처리

본 실험의 모든 결과는 SPSS version 21 (SPSS Inc., Chicago, IL USA)을 활용하여 One-way ANOVA-test로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 실시하여 측정하였으며, P<0.05에서 유의성을 판단하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 tamoxifen (Tam), anastrozole (Ana), exemestane (Exe) 및 dopamine (Da) 총 4개의 다른 화학 물질을 사료에 섞어 zebrafish에 15일 간 투여 후, 성 성숙 호르몬의 변화를 관찰하였다. Tam은 어류에서 ER의 길항제로 효과를 나타내며, E2가 존재하는 곳에서 VTG 생성 억제를 나타낸다고 보고되었다(Leaños-Castañeda and Kraak, 2007). Zebrafish의 사료에 Tam을 섞어 투여 후, 생식소 ER mRNA level 및 간 VTG mRNA level은 대조구에 비해 전반적으로 감소를 나타내었다(Fig. 1). 하지만, 간에서 ER mRNA level은 Tam의 투여 시간이 지남에 따라 감소를 나타낸 반면, 대조구와 비교하였을 때, 오히려 증가를 나타내었다(Fig. 1B). Tam은 estrogen과 ER의 binding을 차단하는 물질로 estrogen의 기능 차단 및 ER과 결합하여 성 성숙을 억제시키는 역할을 한다고 보고되었다(Massarweh et al., 2008). 따라서, Tam이 간에서 estrogen과의 경쟁적 결합에 크게 작용하여 간에서 ER mRNA level의 증가를 나타낸 것으로 알 수 있었으며, 생식소에서의 ER mRNA level 감소로 인하여 간에서 VTG mRNA level이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1A, 1C). 또한, Tam/ER 복합체는 E2/ER 복합체와는 다르게 여성호르몬 반응 부위(estrogen response element, ERE)의 N 말단에 위치한 activating function-1 (AF-1) 및 ligand binding domain (LBD)의 activating function-2 (AF-2)에 변화를 유발시킨다(Ring and Dowsett, 2004). E2/ER 복합체는 LBD 내에서 결합하여 나선형으로 밀봉시켜 AF-2를 활성화시키는 반면, Tam/ER 복합체는 LBD와 비결합으로 인해 밀봉을 방지시켜 AF-2의 활성화를 억제하여 AF-2 영역에 길항제로서의 역할을 한다(Shiau et al., 1998). 이와 같이 Tam은 ER과의 결합으로 인한 유전적인 요인에 있어 형태적 및 기능적으로 변

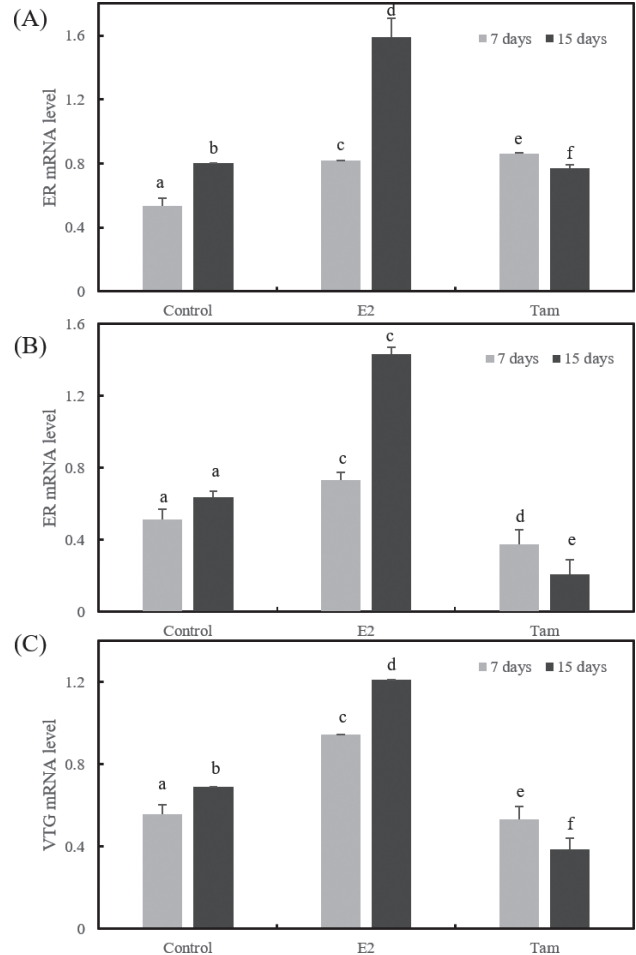


Fig. 1. Expression of ER and VTG mRNA level in the liver and gonad of zebrafish *Danio rerio* treated tamoxifen. A, Gonad ER mRNA level; B, Liver ER mRNA level; C, Liver VTG mRNA level. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values (P<0.05 by one-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

화를 유발하여 estrogen과의 결합을 방해 및 ER의 감소를 유발시켜 성 성숙의 억제를 유도하는 것으로 판단된다.

생식소에서 aromatase의 estrogen 전환을 억제시키는 Exe 및 Ana 두 화학물질을 사료에 섞어 투여 후, zebrafish 생식소 및 간에서 ER mRNA level은 모두 대조구에 비해 낮은 발현을 나타내었다(Fig. 2, Fig. 3). 두 화학물질이 첨가된 사료를 투여한 실험구에서 7일 및 15일 차이를 비교한 결과에서는 지속적인 투여로 인한 감소를 나타내었다. 또한, Exe와 Ana는 같은 AI에 작용하는 물질인 반면, steroid 및 non-steroid의 차이를 나타내 비교하고자 하였으나, 차이를 나타내지 않았으며, 유사한 mRNA level의 수치를 나타내었다. 잉어(*Cyprinus carpio*)의 연구에서는 Ana를 사료에 첨가시켜 굵이 시킨 후, testosterone의 혈장

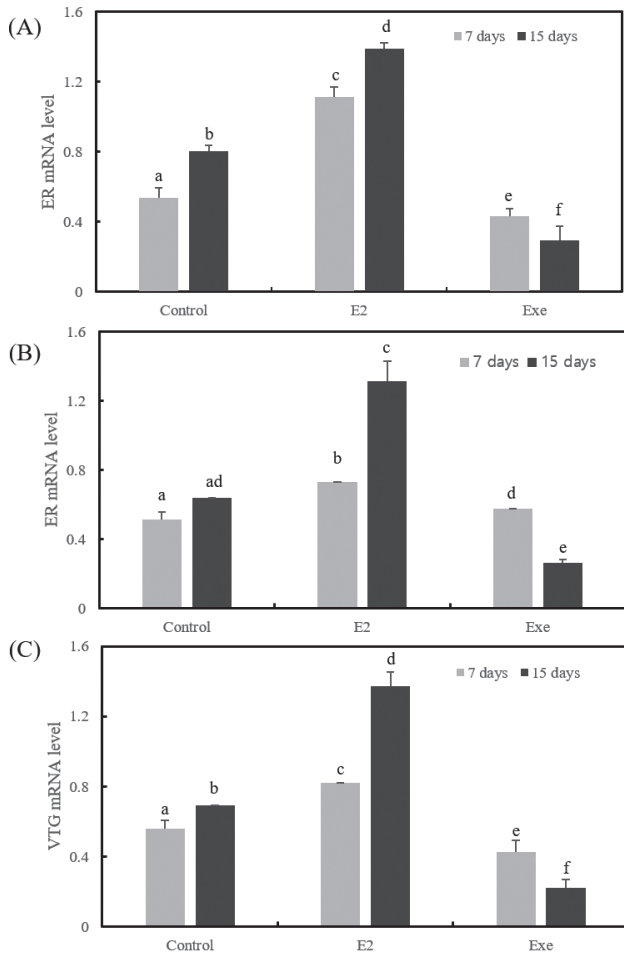


Fig. 2. Expression of ER and VTG mRNA level in the liver and gonad of zebrafish *Danio rerio* treated exemestane. A, Gonad ER mRNA level; B, Liver ER mRNA level; C, Liver VTG mRNA level. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by one-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

농도가 증가하였으며, 이는 testosterone이 estrogen으로 전환을 차단하였다고 보고되었다(Singh and Singh, 2013). 틸라피아에 Exe를 급이 시켰을 때 연구 결과에서 estrogen의 수치를 비교한 결과 Exe가 생식선에서 testosterone이 estrogen으로 전환을 차단하여 미분화된 생식선을 정소로 변형시켰다고 보고되었다(Ruksana et al., 2010). 또한, black sea bass *Centropomus striatus*를 Exe에 노출 후, 초기 sex change와 gonadal gene expression의 연구에서는 생식선의 female gonad development function을 가지는 *cyp19a1a* gene은 암컷에서 감소하였으나 대조구와 유의적인 차이는 나타내지 않았으며, estrogen response의 기능을 가지는 *esr2b* gene 그리고 egg envelope component의 function을 가지는 *zpc2* gene 역시 대조구와 큰 차이는 나타내지 않았으나 감소하였다고 보고되었다(Breton et al., 2019).

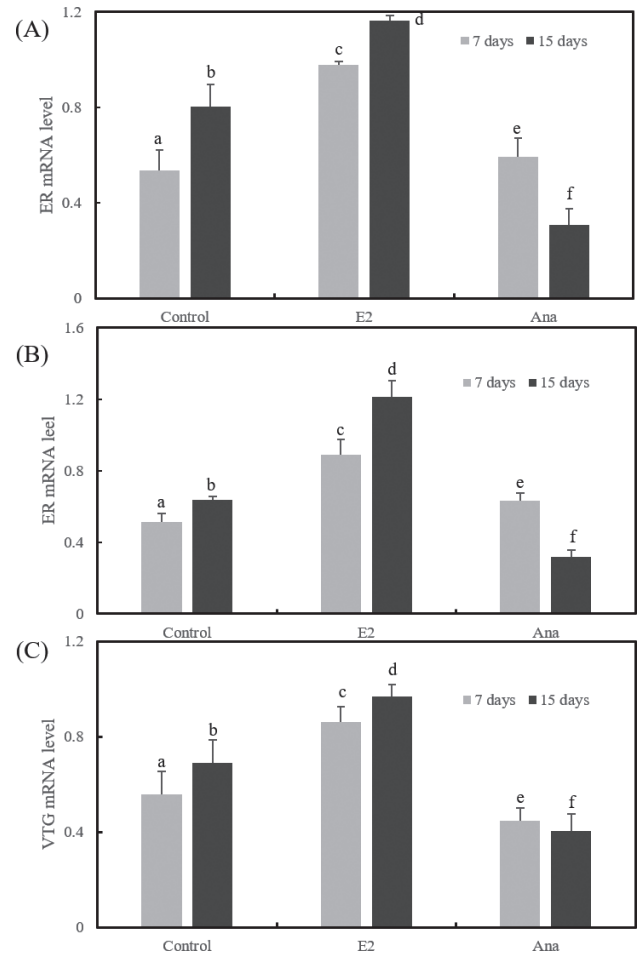


Fig. 3. Expression of ER and VTG mRNA level in the liver and gonad of zebrafish *Danio rerio* treated anastrozole. A, Gonad ER mRNA level; B, Liver ER mRNA level; C, Liver VTG mRNA level. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by one-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

따라서, Exe 및 Ana 두 화학물질은 zebrafish의 생식소에서 ER mRNA level의 감소를 유발하여 성 성숙 억제 효능을 가질 수 있다고 판단된다.

어류의 Gth I (FSH) 및 Gth II (LH) 분비는 여러 시상하부 작용제에 의해 자극되며, GnRH는 중심 자극제로 작용하며, Da는 중심 억제제로 작용한다(Yaron and Levavi-Sivan, 2006). 본 연구에서 Da를 사료에 섞어 투여 후, zebrafish의 시상하부 및 뇌하수체에서 작용하는 GnRH, Gth I 및 ER mRNA level의 변화를 관찰하였다. 시상하부에서 GnRH mRNA level은 대조구에 비해 7일째 점차 감소하여 15일째 지속적인 감소를 나타내었다(Fig. 4A). 뇌하수체에서 Gth I mRNA level은 7일째 대조구에 비해 증가를 나타낸 후, 지속적인 감소를 나타내었으며(Fig. 4B), ER mRNA level 역시 Gth I mRNA level과 유사하게 발

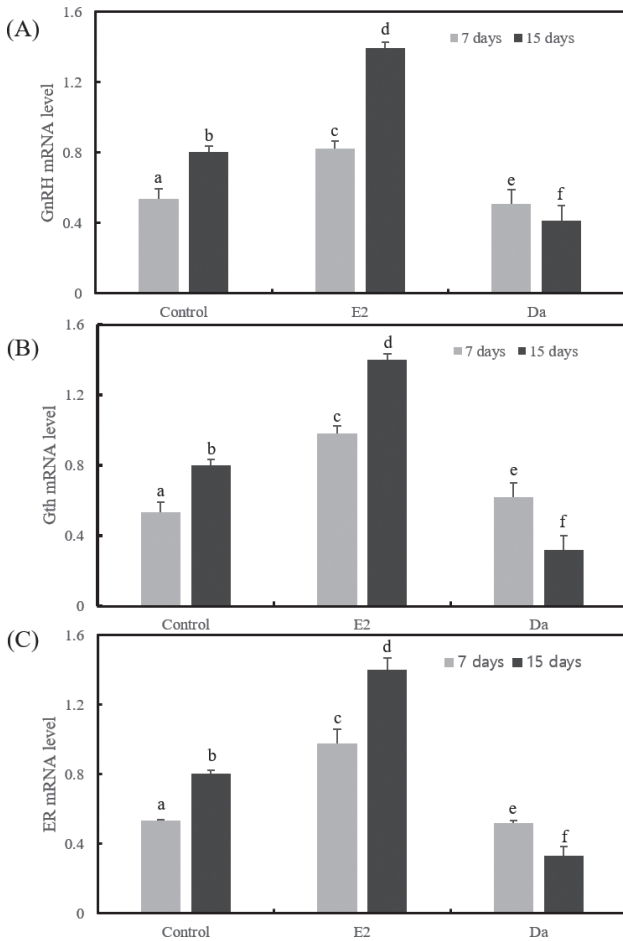


Fig. 4. Expression of GnRH, Gth and ER mRNA level in the hypothalamus and pituitary of zebrafish *Danio rerio* treated dopamine. A, Hypothalamus GnRH mRNA level; B, Pituitary Gth I mRNA level; C, Hypothalamus ER mRNA level. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by one-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

현을 나타내었다(Fig. 4C). Da는 GnRH에 의한 Gth 방출효과를 억제하여 그 이후의 과정, 즉 생식선의 발달과 성스테로이드의 분비를 억제하게 된다(Dufour et al., 2005). 일반적으로 Da는 GnRH에서 Gth로의 경로에 관여 후, 합성을 억제시킬 것으로 생각되었는데, 이번 연구에서 Da 투여 7일 후, zebrafish 뇌하수체에서 Gth I 및 ER mRNA의 증가는 시상하부에서 Da가 시상하부에 직접적인 영향을 나타내 GnRH mRNA 합성을 억제하여 뇌하수체에서 Gth I의 분비를 억제할 뿐 아니라, 시상하부 내 ER mRNA 합성도 억제하는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 Tam, Exe, Ana 및 Da 4가지 성 성숙 억제 유도물질들을 zebrafish의 사료에 섞어 투여한 결과 모두 성 성숙에 관련하는 유전 물질들의 mRNA level 감소로 성 성숙 억제에 효능이 있

을 것으로 판단된다.

본 실험에 앞서 해양 어류인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 4가지 화학물질을 복강 주사하여 성 성숙 관련 유전자의 변화량과 유사한 경향을 나타내었으며, 생식소의 변화에서 정모세포 및 정원세포가 관찰되어 성 전환 초기 단계임을 관찰하여 성 성숙 억제에 효능이 있음을 역시 확인하였다(Kim et al., 2022). 하지만, 넙치에서는 성숙 시기 및 미성숙 시기의 차이를 구분하여 4가지 화학물질의 차이를 알 수 있었던 반면, zebrafish의 성 성숙 시기 및 미성숙 시기에서의 차이점은 구분하지 못하여 이후, 성숙 시기 및 미성숙 시기의 차이를 위한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 또한, 본 연구는 화학물질들의 사료 첨가 투여가 정확히 이뤄졌다는 가정하에 진행되어 보다 명확한 연구를 위해 역시 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

사 사

이 연구는 교육부 2017R1A2B4003441 지원 한국연구재단(NRF) 사업의 지원을 받았습니다.

References

Breton TS, Kenter LW, Greenlaw K, Montgomery J, Goetz GW, Berlinsky DL and Luckenbach JA. 2019. Initiation of sex change and gonadal gene expression in black sea bass (*Centropristis striata*) exposed to exemestane, an aromatase inhibitor. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 228, 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.024>.

Bhandari RK, Komuro H, Nakamura S, Higa M and Nakamura M. 2003. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Zool Sci* 20, 1399-1404. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.1399>.

Chang YJ, Lim HK and Kwon JY. 2001. Changes in plasma steroid hormone level in rockfish (*Sebastes inermis*) by the controlled water temperature and photoperiod. *J Korean Fish Soc* 34, 13-16. <https://doi.org/10.5657/fas.2004.7.1.016>.

Chikae M, Hatano Y, Ikeda R, Morita Y, Hasan Q and Tamiya E. 2004. Effects of bis (2-ethylhexyl) phthalate and benzo [a] pyrene on the embryos of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Pharmacol* 16, 141-145. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2003.11.007>.

Cosman F and Lindsay R. 1999. Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum. *Endocr Rev* 20, 418-434. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0371>.

Desvages G and Pieau C. 1992. Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41, 851-853. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90437-N](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90437-N).

Dufour S, Weltzien FA, Sebert ME, Le Belle N, Vidal B, Vernier P and Pasqualini C. 2005. Dopaminergic inhibition of re-

- production in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann N Y Acad Sci* 1040, 9-21. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.002>.
- Fabian CJ. 2007. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *Int J Clin* 61, 2051-2063. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01587.x>.
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F and Chang CF. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165, 352-366. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.002>.
- Han SK. 2005. Effects of dopamine on the gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons. *J Korean Endocrinol Soc* 20, 488-495. <https://doi.org/10.3803/jkes.2005.20.5.488>.
- Jang SI, Lee WO, Lee JY and Son SJ. 1998. Induced ovulation in the mandarin fish, *Siniperca scherzeri* by sex-maturation hormones. *J Aquac* 11, 513-519.
- Kim KH, Moon HN and Yeo IK. 2022. Development of sexual maturation inhibition technique by using exemestane and tamoxifen in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquat Sci, Inflex*.
- Kim YD, Lee C, Min BH, Kim MK, Kim GS, Choi JS, An WG and Nam MM. 2014. Early sexual maturation through temperature stimulation and development of *Patinopecten yessoensis*. *J Korean Malacol* 30, 311-319. <https://doi.org/10.9710/kjm.2014.30.4.311>.
- Kitano T, Yoshinaga N, Shiraiishi, Koyanagi T and Abe SI. 2007. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Reprod Dev* 74, 1171-1177. <https://doi.org/10.1002/mrd.20603>.
- Lazier CB, Langley S, Ramsey NB and Wright JM. 1996. Androgen inhibition of vitellogenin gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 104, 321-329. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0177>.
- Li A, Sadasivam M and Ding JL. 2003. Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VtgR) and vitellogenin (Vtg), implications on low density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E: the first three ligand-binding repeats of VtgR interact with the amino-terminal region of Vtg. *J Biochem* 278, 2799-2806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205067200>.
- Lim SG and Han CH. 2012. Effect of water temperatures and photoperiods on gonadal development in banded catfish *Pseudobagrus fulvidraco*. *J Fish Mar Sci Edu* 24, 854-861. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2012.24.6.854>.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Leaños-Castañeda O and Van Der Kraak G. 2007. Functional characterization of estrogen receptor subtypes, ER α and ER β , mediating vitellogenin production in the liver of rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol* 224, 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.06.017>.
- Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, Weiss H, Rimawi M and Schiff R. 2008. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res* 68, 826-833. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
- Nakamura M, Bhandari RK and Higa M. 2003. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiol Biochem* 28, 113-117. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030495.99487.17>.
- Ring A and Dowsett M. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* 11, 643-658. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00776>.
- Ruksana S, Pandit NP and Nakamura M. 2010. Efficacy of exemestane, a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 152, 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.014>.
- Singh AK and Singh R. 2013. *In vivo* response of melatonin, gonadal activity and biochemical changes during CYP19 inhibited sex reversal in common carp *Cyprinus carpio* (L). *Anim Reprod Sci* 136, 317-325. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.11.004>.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA and Brown M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103, 843-852. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00188-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00188-4).
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA and Greene GL. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81717-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81717-1).
- Van der Ven LT, Van den Brandhof EJ, Vos JH and Wester PW. 2007. Effects of the estrogen agonist 17 β -estradiol and antagonist tamoxifen in a partial life-cycle assay with zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 26, 92-99. <https://doi.org/10.1897/06-092R1.1>.
- Yamamoto T. 1958. Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J Exp Zool* 137, 227-263. <https://doi.org/10.1002/jez.1401370203>.
- Yaron Z and Levavi-Sivan B. 2006. Fish reproduction. In: *Physiology of fishes*. CRC Press, New York, NY, U.S.A., 345-388.