



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

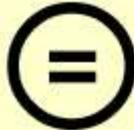
이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

쥐노래미, *Hexagrammos otakii*의 난소 내
성 스테로이드 활성화에 미치는 nonylphenol과
bisphenol A의 에스트로젠 효과



2007 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 생 물 학 과

황 인 준

이학석사 학위논문

쥐노래미, *Hexagrammos otakii*의 난소 내
성 스테로이드 활성화에 미치는 nonylphenol과
bisphenol A의 에스트로젠 효과

지도교수 백혜자

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2007년 2월

부경대학교 대학원

해양생물학과

황인준

황인준의 이학석사 학위논문을 인준함

2007 년 2 월 일



주 심 농학박사 유명숙 ㉠

위 원 이학박사 김현우 ㉠

위 원 이학박사 백혜자 ㉠

목 차

Abstract	I
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 실험어	3
2. 난소의 조직학적 관찰	3
3. 난모세포 배양	3
4. 스테로이드 호르몬 농도 측정	5
5. 스테로이드 호르몬 대사물질 분석 및 동정	6
6. 통계분석	9
III. 결과	10
1. 난소의 조직학적 관찰	10
2. 난모세포의 스테로이드 대사물질 분석	10
3. NP가 난황형성기 난소발달에 따른 스테로이드 호르몬 대사율에 미치는 영향	16
4. NP가 난황형성기에서의 스테로이드 호르몬 생성에 미치는 영향	18
5. NP와 BPA가 최종성숙과정에서의 스테로이드 호르몬 생성에 미치는 영향	21
IV. 고찰	26
V. 요약	30
VI. 참고문헌	31
VII. 감사의 글	38

Effects of nonylphenol and bisphenol A on sex steroid hormones activity
in ovarian development of *Hexagrammos otakii*

In-Joon Hwang

Department of Marine Biology, Graduate School,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract

In this study, vitellogenic (oocyte diameter of 0.70-0.74, 0.82-0.86 and 1.08-1.12 mm) and mature oocytes (oocyte diameter of 1.95-1.97 mm) from the greenling (*Hexagrammos otakii*) were exposed to *in vitro* xenoestrogens such as nonylphenol (NP) and bisphenol A (BPA). To investigate the effect of NP on steroid metabolism, vitellogenic oocytes were incubated with 10 ng/ml of NP in the presence of [³H]17 α -hydroxyprogesterone as precursor. The major metabolites produced *in vitro* are androgens [androstenedione (A₄) and testosterone (T)] and estrogens [estrone (E₁) and estradiol-17 β (E₂)]. NP showed no clear effects on steroid metabolism at vitellogenic oocytes. In the effect of NP on steroid production at vitellogenic stage, NP increased E₂/T ratio at 0.1, 1 and 10 ng/mL in the oocytes of 0.80-0.82 and 0.92-0.96 mm. In the oocytes of 1.08-1.12 mm, NP increased E₂/T ratio only at 100 ng/mL. Oocytes of 1.95-1.97 mm were exposed to NP and BPA with or without 50 IU HCG (human chorionic gonadotropin). NP increased E₂/T ratio at 0.1, 10 and 100 ng/mL without HCG and increased E₂/T ratio only at 100 ng/mL with HCG. Moreover, NP inhibited 17 α 20 β OH β production at every concentration without HCG. In BPA treatment, BPA increased E₂/T ratio at 0.1, 1 and 100 ng/mL regardless HCG. BPA inhibited 17 α 20 β OH β production only at 100 ng/mL without HCG although BPA stimulated 17 α 20 β OH β production at 1 ng/mL with HCG. Taken together, these results suggest that NP exhibited clearly estrogenic activity regardless ovarian development and BPA has weak estrogenic potency at final oocyte maturation stage of *H. otakii*.

I. 서론

어류의 난 성숙 과정은 여포층에서 생성·분비되는 성 스테로이드 호르몬에 의해 조절되고 있으며, 뇌하수체의 생식선자극호르몬 (gonadotropin)이 그 매개체 역할을 하고 있다. 난소에 난황이 축적되기 시작하는 난황형성기 (vitellogenesis)에는 estradiol-17 β (E₂)가 주요 스테로이드로 작용하며, 난황축적이 종료된 직후부터 배란시기까지는 progesterone의 유도체인 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α 20 β OHP)나 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α 20 β 21P)등이 주요 성 스테로이드 호르몬으로 알려져 있다 (Nagahama et al., 1994; Nagahama et al., 1985; Goetz et al., 1987). 특히 배란 전에 난핵포붕괴 (germinal vesicle breakdown, GVBD)를 포함하는 일련의 최종성숙 과정은 20 β -hydroxy group을 가지고 있는 스테로이드에 의해 유도된다고 알려져 있다.

최근에는 환경변화 및 오염이 어류에 미치는 영향에 대해 보고되고 있으며 특히 내분비계 장애물질에 의한 생식교란에 대한 연구도 많아지고 있다 (Mazzoldi and Rasotto, 2001; Baek et al., 2004; Mochida et al., 2004). 보고된 내분비계 장애물질 중 NP는 플라스틱, 살충제와 공업용 세정제의 원료로 쓰이는 nonylphenol ethoxylates의 분해산물로서 (Talmage, 1994), 많은 연구에서 어류에 있어 에스트로젠 효과를 나타낸다고 보고되고 있다. 어류에 대한 NP의 영향을 살펴보면, 혈장 스테로이드 호르몬, 난황전구단백질 (vitellogenin)과 난막 단백질 (zona radiata protein) 농도의 증가, 수컷 어류에서의 난정소 (ovotestis) 유도와 같은 생식소 이상 현상과 배우자생성과정 저해 등이 있다 (Jobling et al., 1996; Gray and Metcalfe, 1997; Ashfield et al., 1998; Arukwe et al., 1998; Kinnberg et al., 2000; Van Den Belt et al., 2002; Weber et al., 2003). 이러한 연구들은 NP가 에스트로젠과 유사한 작용을 하며 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor; ER)에 직접 결합하여 어류의 생식내분비계에 장애를 일으킬 수 있다

고 보고하고 있다. BPA는 플라스틱의 원료, 금속 코팅 재료로 사용되는 물질이며 치과용 의료도구에도 함유된 것으로 보고되고 있다 (Krishinan et al., 1993; Brotons et al., 1995; Olea et al., 1996). BPA가 어류의 생식에 미치는 영향으로는 미성숙 무지개송어에서 vitellogenin 합성 유도 (Christiansen et al., 1998), 수컷 잉어의 간세포에서 vitellogenin 분비 유도 (Smeets et al., 1999) 등이 있다.

실험어류인 쥐노래미는 양볼락목 쥐노래미과에 속하는 연안정착성 어류로서 우리나라 전 연안 및 중국 북부 연안 그리고 일본 연안의 암초지대에 분포하는 동계산란종이다 (Choi et al., 2002). Kang et al., (2003)은 쥐노래미의 난소는 비동시발달형으로서, 난소 내에 여러 단계의 난모세포들이 무리를 이루고 있으며, 한 개체가 산란기에 2회 이상 산란하는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 해산어류인 쥐노래미를 대상으로 난소발달에 따른 성 스테로이드 호르몬의 활성화에 미치는 내분비 장애물질의 영향을 알아보기 위해, 난경별로 분리한 난모세포를 이용하여 난황형성기에 해당하는 난모세포는 *in vitro* 상에서 NP에 노출시켜 주요 스테로이드 호르몬인 A4, T, E₂ 그리고 E₁으로의 대사율과 E₂와 T의 생성농도의 변화를 조사하였다. 또한 최종성숙과정에 해당하는 난모세포는 *in vitro* 상에서 NP와 함께 BPA에 각각 노출시켜 E₂, T 그리고 성숙유도호르몬인 17 α 20 β OHP의 생성농도의 변화를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

실험어인 쥐노래미는 산란기로 추정되는 11월~12월에 부산 오륙도 근해에서 채집한 성숙한 암컷을 대상으로 하였다. 실험어의 전장과 체장은 0.1 cm, 체중은 0.1 g까지 측정하였다. 실험어의 외부형태 측정치는 table 1과 같다.

2. 난소의 조직학적 관찰

난소발달의 조직학적 관찰을 위해 적출한 난소를 Bouin's 용액에 고정하여 파라핀으로 포매한 후 5-6 μm 두께의 절편을 만들어 Mayer's hematoxylin과 eosin으로 비교 염색하여 광학현미경하에서 조사하였다.

3. 난모세포 배양

실험어는 0.5 mL/L의 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 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.98 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.40 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.65 mM HEPES)으로 세척하였다. 절취된 난소는 가는 핀셋을 이용하여 난경별로 각각의 난모세포로 분리하였다. 각 실험어의 난소에서 난경별로 분리한 난모세포의 난경은 Table 1과 같다. 분리된 난모세포는 난경별로 24-well plate에 well당 Leibovitz L-15 (L-15) 배양액 (Gibco) 1mL에 20개의 난모세포를 각각 분주한 후 12°C에서 36시간 또는 48시간 배양하였다. balanced salt solution과 L-15 배양액의 pH는 7.9, 삼투농도는 360 milliosmol로 조절하였다.

난소발달에 따른 난소에서 생성되는 스테로이드 호르몬을 조사하기 위해 방사표지된 전구물질인 [^3H]17 α -hydroxyprogesterone (Amersham Life Science, England)을 난경 약 0.70 - 1.12 mm의 난모세포 배양초기에 10 ng/mL

Table 1. Characteristics of five greenling females used in this study. Oocyte diameter was presented as the major diameter among values

	Total length (cm)	Total weight (g)	Oocyte diameter (mm)
Fish 1	32.5	433.25	0.70-0.74
Fish 2	35.5	533.02	0.80-0.82
Fish 3	34.1	531.03	0.92-0.96
Fish 4	37.0	646.24	1.08-1.12
Fish 5	25.4	196.20	1.95-1.97



의 NP와 함께 첨가하였다. 또한 NP가 난소의 스테로이드 호르몬 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해, NP (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA)를 각 실험 농도구별로 첨가하였다. 난경 약 1.95-1.97 mm의 난모세포 배양에서는 NP와 BPA 외에 내분비 장애물질에 대한 난모세포의 반응효과를 높이기 위해 human chorionic gonadotropin (HCG, Sigma Chemicals, USA) 50 IU를 첨가한 실험구도 설정하였다.

4. 스테로이드 호르몬 농도 측정

배양 후 배양액은 혼합용매 (ethylacetate : cyclohexane = 50 : 50)로 2회 추출 후 E₂, T 또는 17 α 20 β OHP의 농도를 Aida et al. (1984)의 방법에 따라 방사면역측정법 (radioimmunoassay)으로 분석하였다. 난경이 약 0.70-1.12 mm인 난모세포 배양액에서는 E₂와 T의 농도를 측정하였고, 난경이 약 1.95-1.97 mm인 난모세포 배양액에서는 E₂, T 그리고 17 α 20 β OHP의 농도를 측정하였다.

실험에 사용된 항체는 모두 Cosmo-Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan)으로부터 얻었다. standard 호르몬들은 Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA)와 Sigma Chemical (St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 또한 방사표지된 [2,4,6,7-³H]-E₂와 [2,4,6,7-³H]-T은 Amersham Life Science (England)로부터 구입하였고, 방사표지된 17 α 20 β OHP는 Scott et al. (1983)의 방법에 의해서 [1,2,6,7-³H]-17 α -hydroxyprogesterone로부터 효소적 전환으로 얻은 후 TLC에 의해 분리한 것을 사용하였다.

E₂, T 그리고 17 α 20 β 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% 상대결합율에서 조사한 결과, E₂ RIA계에서는 3.4 (n=3)와 11.5% (n=6), T RIA계에서는 2.3 (n=3)와 12.5% (n=6), 17 α 20 β OHP RIA계에서는 3.2 (n=4)와 9.5% (n=8)였다.

5. 스테로이드 호르몬 대사물질 분석 및 동정

배양 후 난모세포와 배양액은 함께 80% ethanol로 균질화하여 원심분리한 후 상등액만을 모아 건조시킨 뒤 증류수 500 μ l에 용해시켜 dichloromethane으로 2번 추출하여 유리 스테로이드만을 얻었다.

스테로이드 추출물은 스테로이드 표준물질과 동시에 실리카겔을 입힌 얇은 막 지지체 (60F²⁵⁴, Merck)에 점적시킨 후 밀폐된 혼합용매 (benzene : acetone = 80 : 20 와 Benzene : ethylacetate = 80 : 20)속에서 전개시켰다. 전개 후 얇은 막을 건조시킨 뒤 대사물질들의 반점 중 E₁과 E₂는 요오드 증기로, 나머지 반점들은 254 nm의 자외선 하에서 확인하였다. 얇은 막에 나타난 대사물질들은 방사선 사진법 (autoradiography, Fuji Bas 3000)으로 재확인하였으며, 재확인된 반점에 해당되는 실리카겔 밴드를 잘라 5 mL의 혼합용매 (dichloromethane : methanol = 9:1)로 용리하였다. 용리된 대사물질은 HPLC (high performance liquid chromatography, Waters)를 이용하여 표준물질의 retention time과 일치하는 fraction만을 분리하였다. 분리된 fraction은 Liquid Scintillation Counter (PACKARD TR-CARB-2100T, USA)를 이용하여 radioactivity 측정 후 대사물질 별로 대사율을 계산하였으며, 분리된 대사물질은 HPLC-radiodetector로 확인하였다. HPLC 기기분석 조건은 Table 2와 같다. HPLC-radiodetector로 확인된 대사물질은 gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)로 동정하였고, GC/MS (GCMS-QP5050A, Shimadzu, Japan) 작동조건은 table 3과 같다.

Table 2. HPLC instruments and analysis conditions for separation of steroid metabolites

HPLC	Waters Alliance
Column	SunFire C ₁₈ , 4.6×150 mm
Mobile phase	20% methanol : acetonitrile = 60 : 40
Flow rate	1 mL/min
UV detector	Waters 2487 Multiwavelength Absorbance Detector
Radio detector	β-RAM Model 4-Radio-HPLC Detector (IN/US system, USA)
Injection volume	20 μ l
Ending time	15 min

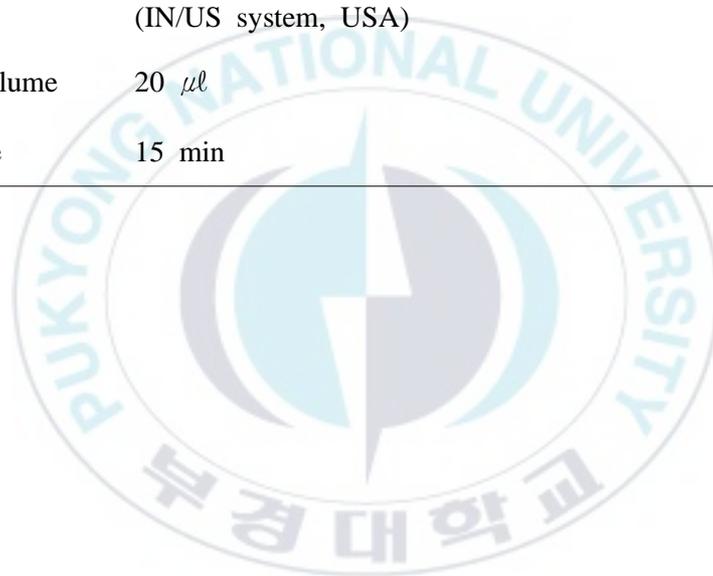
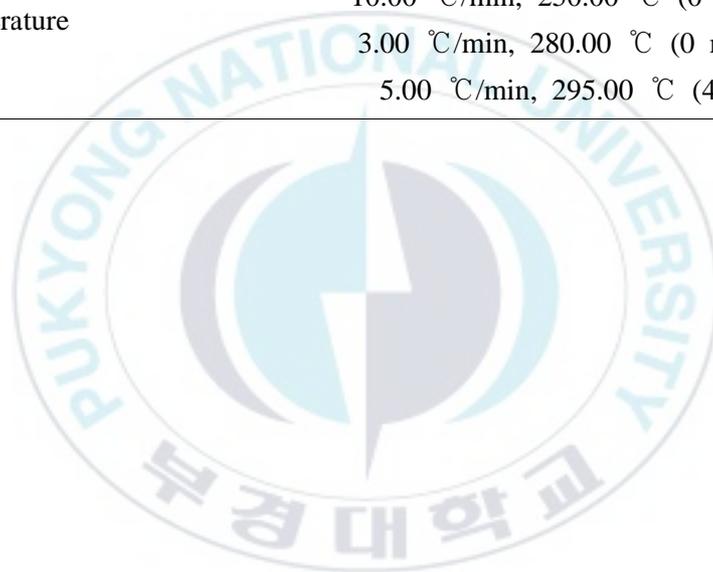


Table 3. Analytical conditions of GC/MS for identification of steroid metabolites

Instrument	GC/MS (Shimadzu 5050A)
Column	DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.2 μ m)
Flow rate (gas)	1 ml/min (He, 99.999 %)
Injection mode	Splitless mode
Injector temperature	275.00 °C
Detector temperature	280.00 °C
Oven temperature	80.00 °C (1.00 min) → 10.00 °C/min, 250.00 °C (0 min) → 3.00 °C/min, 280.00 °C (0 min) → 5.00 °C/min, 295.00 °C (4 min)



6. 통계분석

주요 스테로이드 호르몬 대사물질의 대사율 측정치와 RIA에 의한 배양액 내의 스테로이드 호르몬 농도의 측정치는 모두 평균±표준편차로 나타냈으며, one-way ANOVA test를 실시하여 Tuckey test를 통해 95% 신뢰수준에서 대조구와 실험구간의 성 스테로이드 호르몬 농도의 유의차 검정을 실시하였다.



III. 결 과

1. 난소의 조직학적 관찰

산란시기인 11월-12월에 채집된 쥐노래미의 난소 내 난모세포의 발달단계에 따른 조직학적 관찰은 Fig. 1과 같다. 평균 난경크기별 즉, 0.70-1.97 mm에 속하는 개체들의 난소내 난모세포들의 조직상을 보면 난경 약 0.70-0.74 mm의 난모세포에서는 난황포들이 세포질의 대부분을 차지하였다 (Fig. 1-A). 난경 약 0.80-0.82 mm와 0.92-0.96 mm의 난모세포에서는 핵 주변부로 난황과립이 축적되기 시작하였다 (Fig. 1-B, C). 난경 약 1.08-1.12 mm의 난모세포들로 구성된 난소 내에는 배란흔적이 관찰되었으며, 난황과립이 세포질 내에 충만하였다 (Fig. 1-D). 난경 약 1.95 mm의 난소 조직상에는 배란흔적과 함께 미방출된 성숙란들의 퇴화흡수도 관찰되었다 (Fig. 1-E).

2. 난모세포의 스테로이드 대사물질 분석

난경이 약 0.70-0.74 mm, 0.92-0.96 mm 그리고 1.08-1.12 mm인 난모세포에서 [³H]17 α -hydroxyprogesterone으로부터 생성된 스테로이드 대사물질들의 TLC상의 반점은 A₄, T, E₂ 그리고 E₁ 등의 표준물질과 일치하였다 (Fig. 2). 전구물질로부터 생성된 주요 대사물질들 즉, A₄, T, E₂ 그리고 E₁은 HPLC-radiodetector를 거쳐 GC-MS에 의해 동정되었다. (Fig. 3-5.)

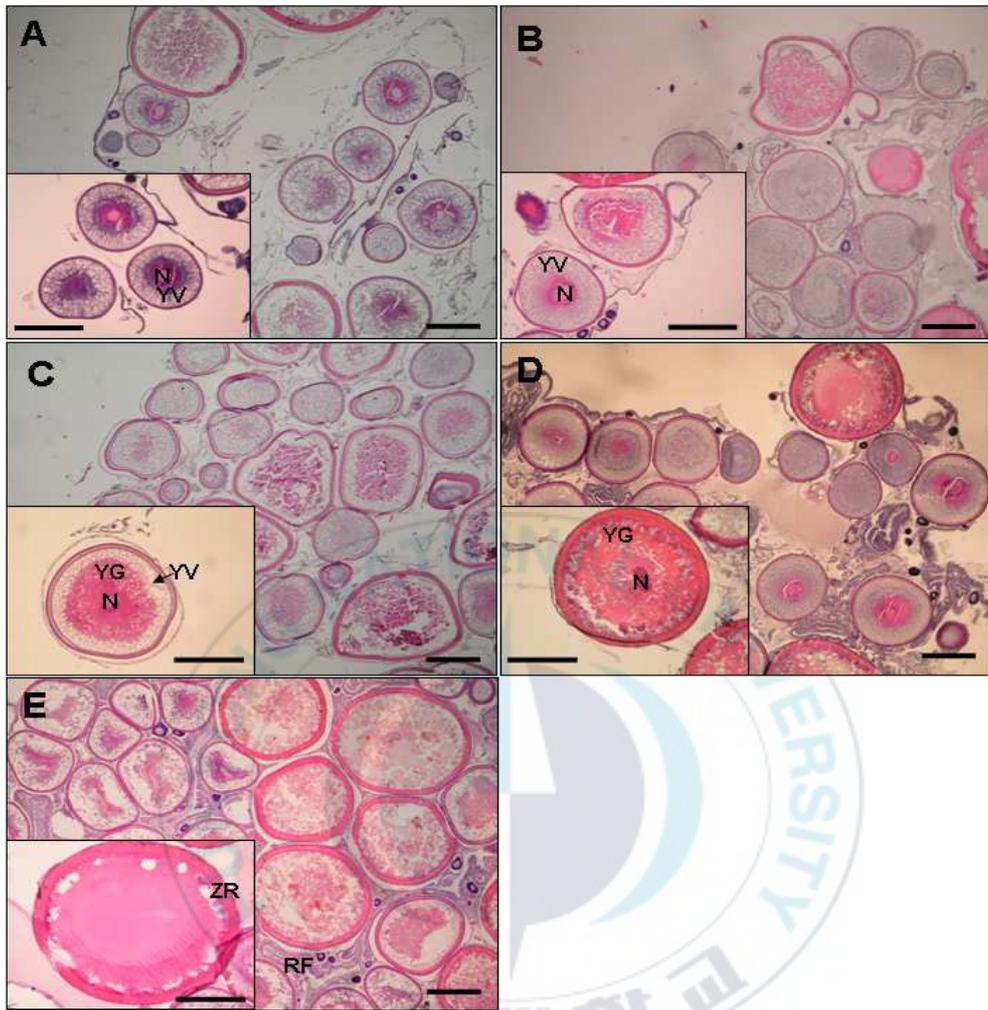


Fig. 1. Histological observation of ovary in greenling, *Hexagrammos otakii*. A; Ovary with oocytes of 0.70-0.74 mm diameter. Yolk vesicles were shown in ooplasm. B; Ovary with oocytes of 0.80-0.82 mm diameter. Yolk granules were shown near the nucleus. C; Ovary with oocytes of 0.92-0.96 mm diameter. Yolk granules were accumulated into ooplasm. D; Ovary with oocytes of 1.08-1.12 mm diameter. Fully vitellogenic oocytes and residual follicles were shown in the ovary. E; Ovary with oocytes of 1.95-1.97 mm diameter. Ripe oocytes which has well-developed zona radiata were shown in the ovary. Scale bars indicate 500 μ m. N, nucleus; RF, residual follicle; YG, yolk granule; YV, yolk vesicle; ZR, zona radiata.

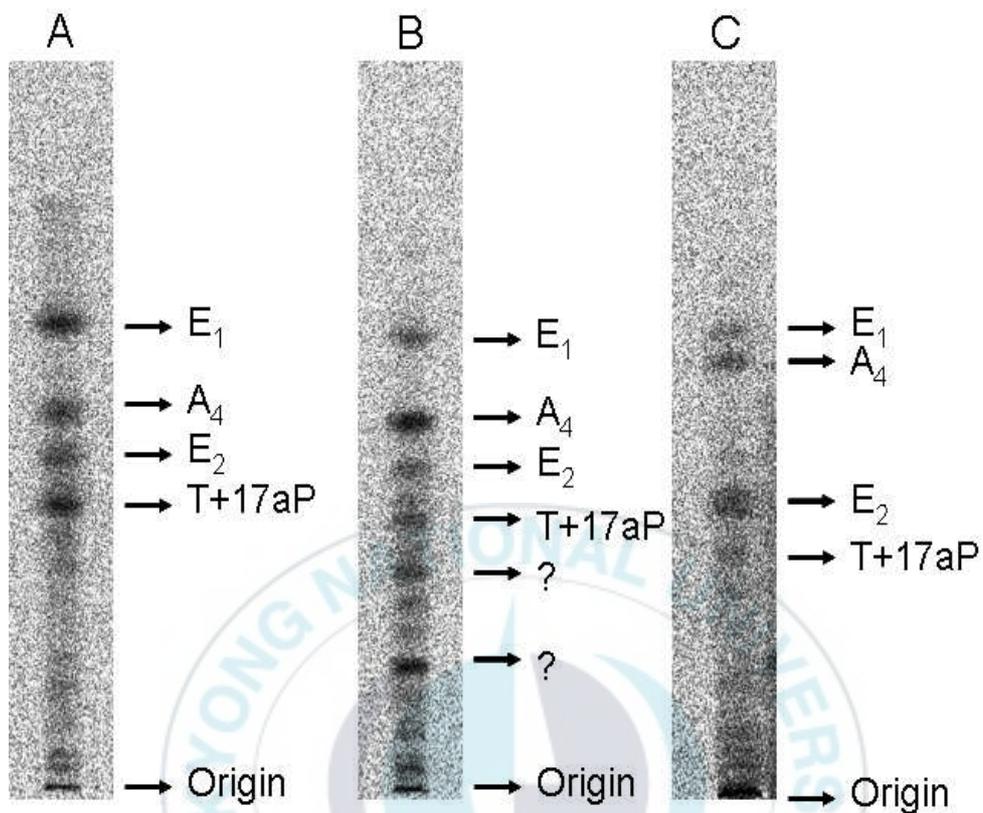


Fig. 2. Autoradiograms of steroid metabolites incubated with [³H]17 α -hydroxyprogesterone from greenling ovarian follicles at three different oocyte diameter. Four metabolites were separated by thin layer chromatography developed with a benzene:acetone (4:1) and benzene:ethyl acetate (4:1) solvent system. A; Oocytes of 0.70-0.74 mm diameter. B; Oocytes of 0.92-0.96 mm diameter. C; Oocytes of 1.08-1.12 mm diameter. A₄, androstenedione; E₁, estrone; E₂, estradiol-17 β ; T, testosterone.

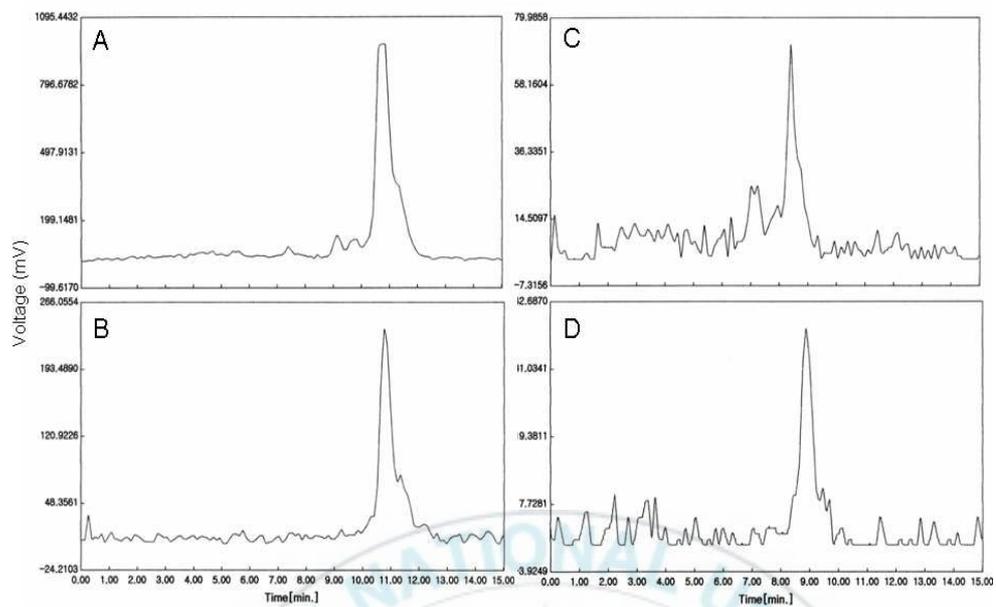


Fig. 3. HPLC elution profile of the radioactive standard steroid and metabolites. A, authentic A4; B, metabolized A4; C, authentic T; D, metabolized T.

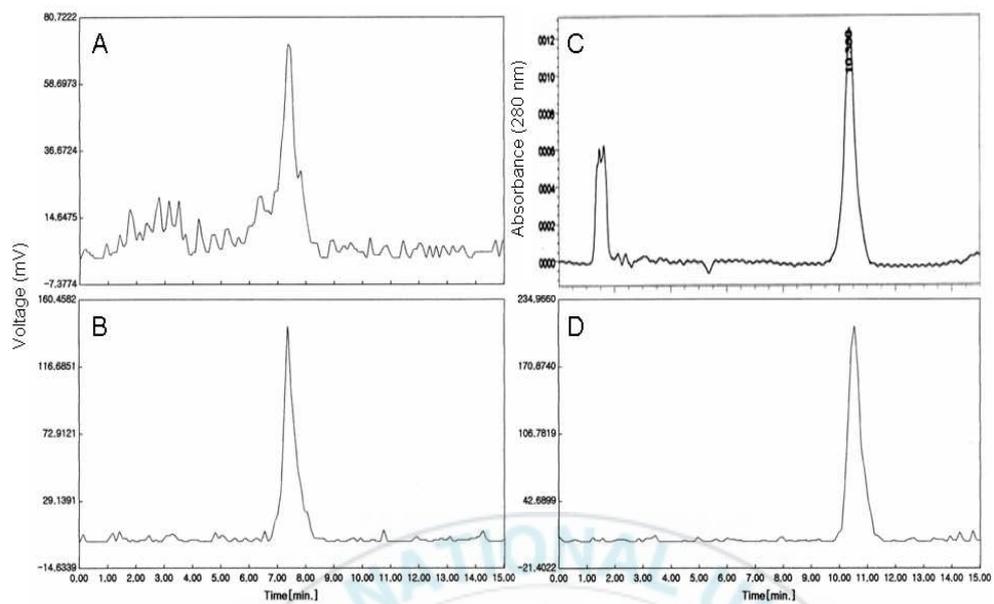


Fig. 4. HPLC elution profile of the radioactive standard steroid and metabolites. A, authentic E2; B, metabolized E2; C, authentic E1; D, metabolized E1.

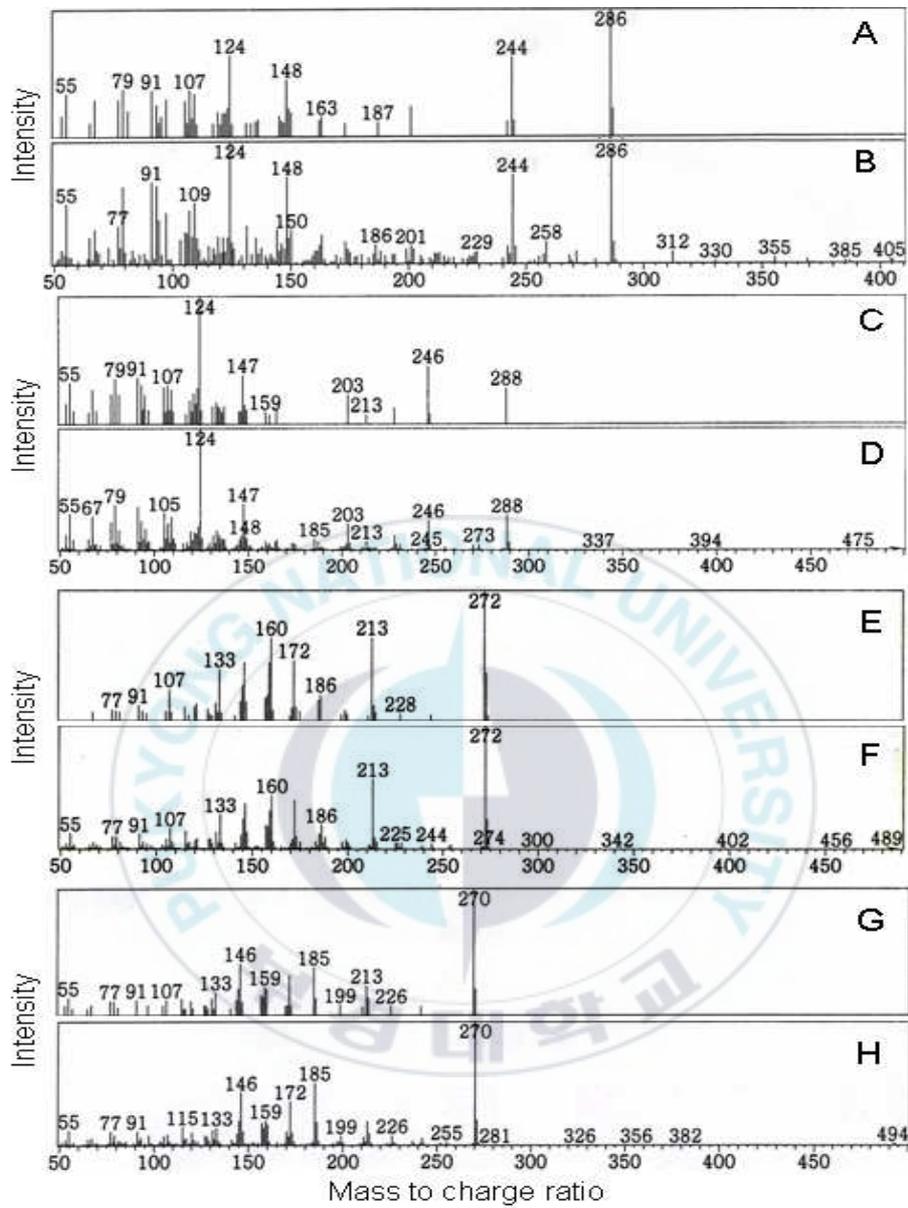


Fig. 5. Mass spectra of steroid metabolized by greenling oocytes identified as androstenedione (A₄), testosterone (T), estradiol-17 β (E₂) and estrone (E₁). A, authentic A₄; B, metabolized A₄; C, authentic T; D, metabolized T; E, authentic E₂; F, metabolized E₂; G, authentic E₁; H, metabolized E₁. Analytical conditions are summarized in table 3.

3. NP가 난황형성기 난소발달에 따른 스테로이드 호르몬 대사율에 미치는 영향

NP가 난황형성기의 난모세포 스테로이드 호르몬 대사율에 미치는 영향은 Fig. 6과 같다. 난경 약 0.70-0.74, 0.80-0.82 그리고 1.08-1.12 mm인 3그룹의 난모세포에서 NP는 T로의 대사율을 대조구에 비해 증가시켰으나, 유의한 차이는 나타나지 않았다. 또한 NP가 E₂로의 대사율을 대조구에 비해 저해시켰으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. A₄와 E₁으로의 대사율에 미치는 NP의 영향도 뚜렷하게 나타나지 않았다.



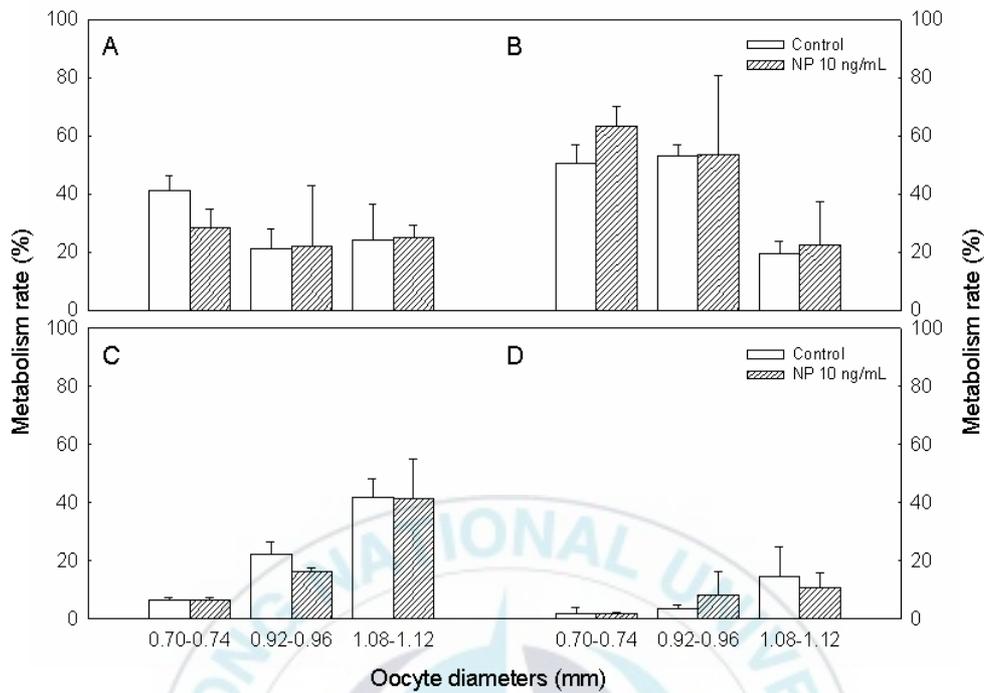


Fig. 6. Effects of NP (10 ng/mL) on steroid metabolism from [³H]17α-hydroxyprogesterone of isolated greenling oocytes. The percentage of radioactivity associated with each isolated steroid was calculated to the percentage of total steroid recovered from initial TLC. Values are mean±SE of each metabolism rate. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tuckey test. There were not any significant differences compared to controls. A, androstenedione (A₄); B, testosterone (T); C, estradiol-17β (E₂); D, estrone (E₁).

4. NP가 난황형성기에서의 스테로이드 호르몬 생성에 미치는 영향

난황형성기에 해당하는 난경 약 0.80-0.82 mm, 0.92-0.96 mm 그리고 1.08-1.12 mm 인 난모세포를 대상으로 NP를 각각 0.1, 1, 10, 100 ng/mL의 농도에 노출시킨 성 스테로이드 호르몬 생성결과는 Fig. 7과 같다. 난경이 약 0.80-0.82 mm인 난모세포에서는 NP 0.1, 1 그리고 10 ng/mL에서 T 생성을 대조구에 비해 유의하게 저해시켰으나 ($P < 0.05$), E_2 생성에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 난경이 약 0.92-0.96 mm인 난모세포에서는 NP 0.1, 1 그리고 10 ng/mL에서 T 생성을 대조구에 비해 유의하게 저해하였으며 ($P < 0.05$), NP 처리 농도에 비례하여 T 생성이 감소되는 경향을 보였다. NP 0.1 ng/mL에서는 E_2 생성을 유의하게 증가시켰다 ($P < 0.05$). 난경이 약 1.08-1.12 mm인 난모세포에서는 NP가 T와 E_2 생성에 뚜렷한 영향을 미치지 않았다. 특히, T 농도는 NP 처리 농도에 비례하여 감소하는 경향을 보였으나 대조구와 유의한 차이는 나타나지 않았다.

측정된 T와 E_2 의 농도는 E_2/T 의 비율로 환산하였다 (Fig. 8). E_2/T 비율은 성 스테로이드 호르몬 농도 변화에 따른 내분비 교란의 지표로 이용되고 있다 (Bevans et al., 1996; Folmar et al., 1996). NP 0.1, 1 그리고 10 ng/mL는 난경이 약 0.80-0.82와 0.92-0.96 mm인 난모세포에서 E_2/T 비율을 대조구에 비해 유의하게 증가시켰다 ($P < 0.05$). 난경 약 1.08-1.12 mm인 난모세포에서는 NP 100 ng/mL에서만 E_2/T 비율을 유의하게 증가시켰다 ($P < 0.05$).

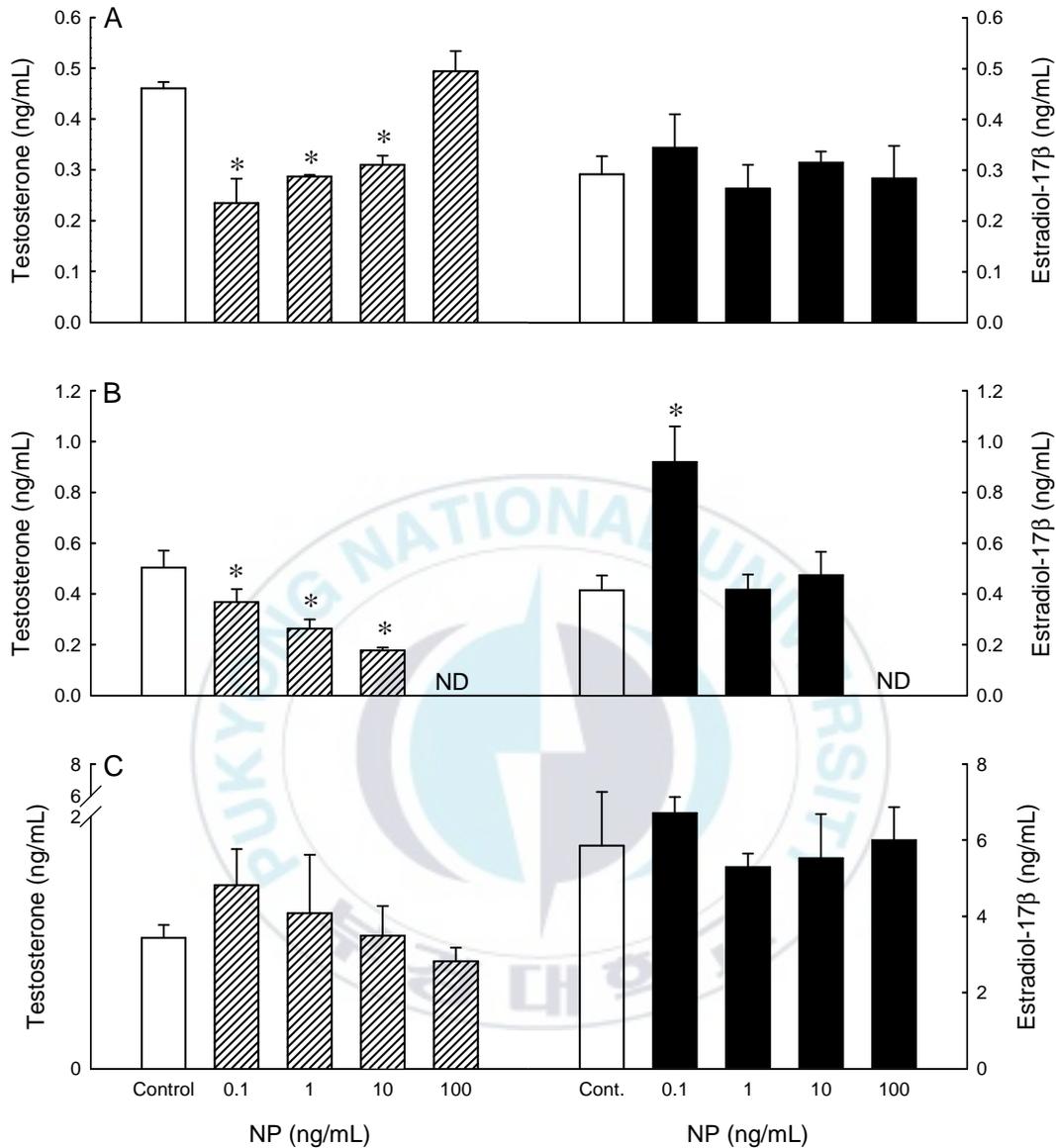


Fig. 7. Effects of different NP concentrations on *in vitro* testosterone and estradiol-17β production in greenling oocytes after a 36-h incubation. (A) oocyte of 0.80-0.82 mm (B) oocyte of 0.90-0.94 mm (C) oocyte of 1.08-1.12 mm. Values are mean ± SE of the concentrations of each steroid in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tuckey test. Asterisk shows significant differences from controls (P < 0.05).

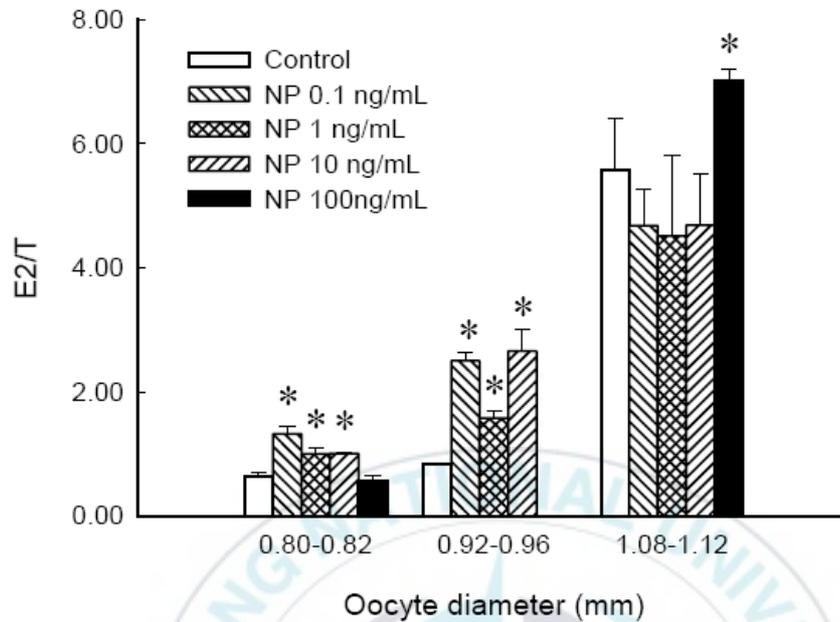


Fig. 8. Effects of different NP concentrations on *in vitro* E₂/T ratio in greenling oocytes (oocyte diameters = 0.80-0.82, 0.92-0.96 and 1.08-1.12 mm) after a 36-h incubation. Values are mean ± SE of the ratios of each steroid in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tuckey test. Asterisk shows significant differences from controls (P < 0.05).

5. NP와 BPA가 최종성숙과정에서의 스테로이드 생성에 미치는 영향

최종성숙기에 해당하는 난경 약 1.95-1.97 mm인 난모세포를 대상으로 NP와 BPA를 각각 0.1, 1, 10 그리고 100 ng/mL의 농도로 첨가한 후 성 스테로이드 호르몬 생성결과를 비교해 보면 Fig. 9, 10과 같다.

NP 실험구에서는 -HCG 하에서 T의 생성농도는 NP 1 ng/mL에서, E₂의 생성농도는 NP 10과 100 ng/mL에서 유의하게 증가하였다 (P<0.05). 17α20βOHP의 생성농도는 모든 NP 처리 농도구에서 유의하게 감소하였다 (P<0.05). +HCG 하에서 T의 생성농도는 NP 0.1 ng/mL에서 가장 높았으나 대조구에 비해 유의한 차이는 나타나지 않았다. E₂의 생성농도는 NP 100 ng/mL에서만 유의하게 증가하였으며, 17α20βOHP의 생성농도는 NP 1 ng/mL에서만 유의하게 증가하였다 (P<0.05). E₂/T 비율을 살펴보면 (Fig. 11), -HCG 하에서 NP 0.1, 10, 100 ng/mL에서 E₂/T 비율을 대조구에 비해 유의하게 증가시켰으며, +HCG 하에서 NP 100 ng/mL에서만 E₂/T 비율을 유의하게 증가시켰다 (P<0.05).

BPA 실험구에서는 -HCG 하에서 BPA 1 ng/mL에서만 T의 생성농도를 증가시켰다 (P<0.05). E₂의 생성농도는 BPA 0.1, 1 그리고 100 ng/mL에서 유의하게 증가하였다 (P<0.05). 17α20βOHP의 생성농도는 BPA 100 ng/mL에서 유의한 저해효과를 보였다 (P<0.05). +HCG 하에서 BPA는 T의 생성농도에 뚜렷한 효과를 보이지 않았다. E₂의 생성농도는 BPA 0.1, 1 그리고 100 ng/mL에서 유의하게 증가하였으며, 17α20βOHP의 생성농도는 BPA 1 ng/mL에서만 유의하게 증가하였다 (P<0.05). E₂/T 비율을 살펴보면 (Fig. 12), -HCG 하에서 BPA 0.1, 1 그리고 100 ng/mL에서 E₂/T 비율을 대조구에 비해 유의하게 증가시켰으며, +HCG 하에서 BPA 0.1, 1 그리고 100 ng/mL에서 유의하게 증가시켰다 (P<0.05).

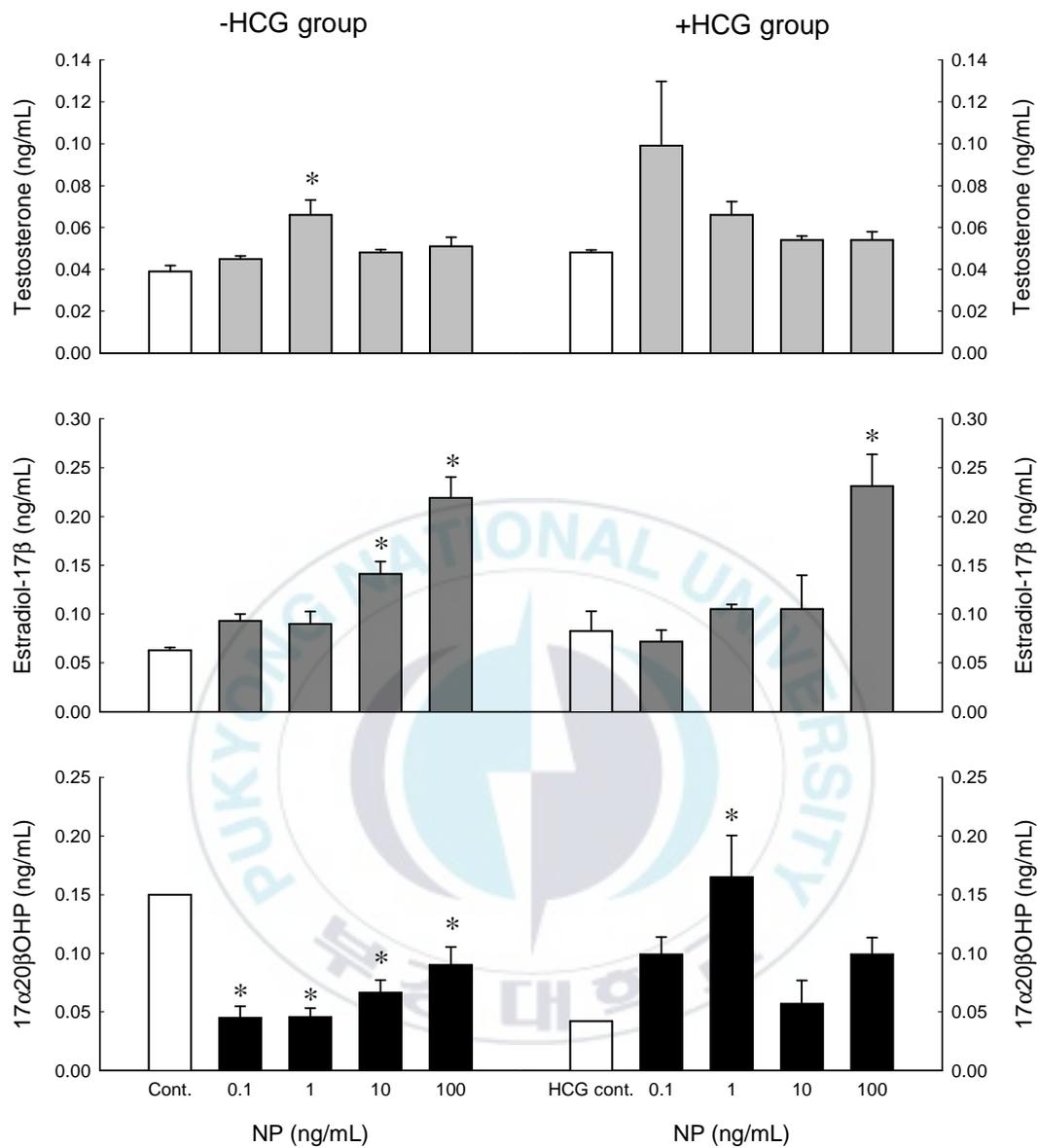


Fig. 9. Effects of different NP concentrations on *in vitro* testosterone, estradiol-17 β and 17 α 20 β OHP production in greenling oocytes in the presence or absence of 50 IU hCG after a 48-h incubation. Values are mean \pm SE of the concentrations of each steroid in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tuckey test. Asterisk shows significant differences from controls ($P < 0.05$).

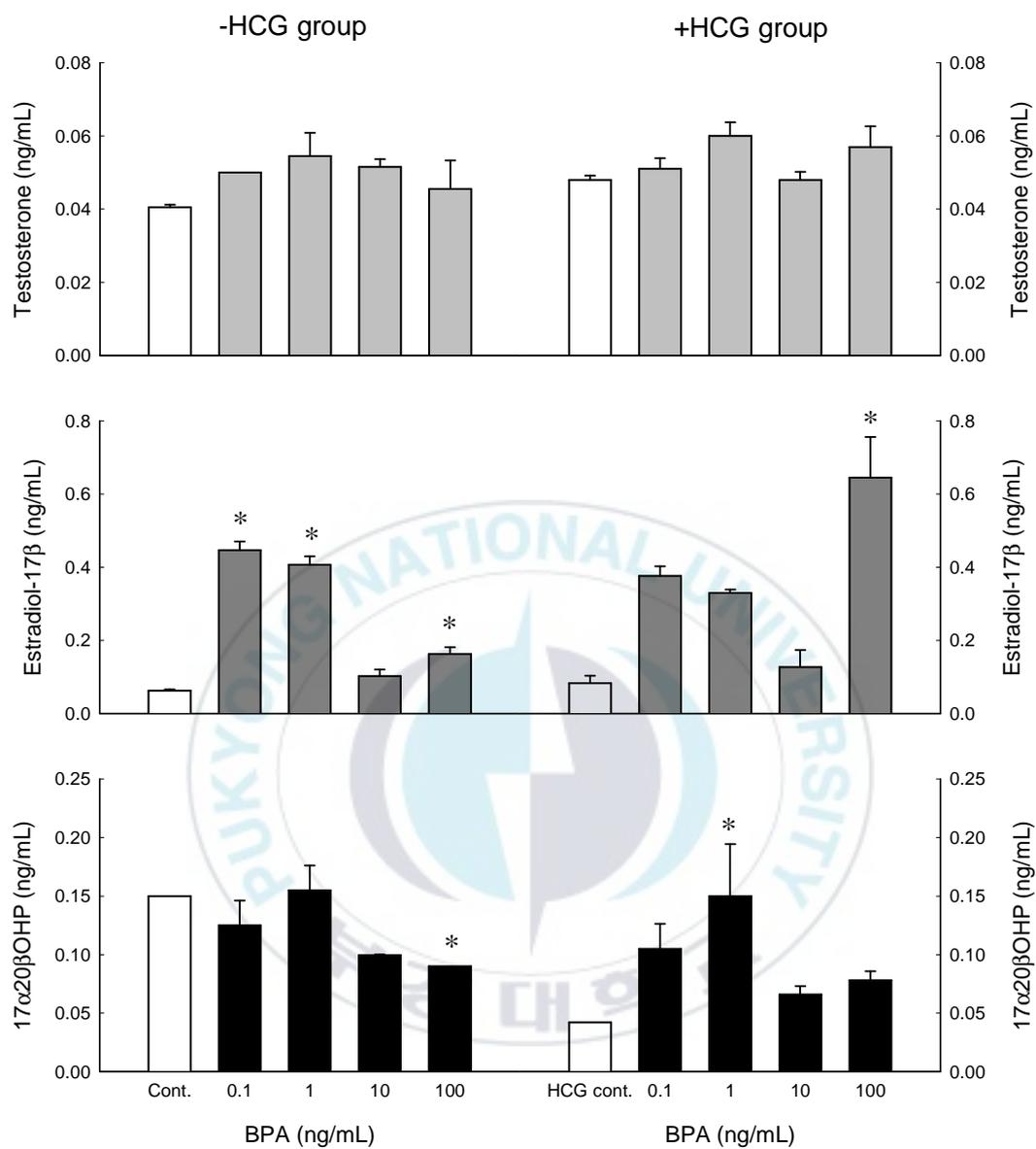


Fig. 10. Effects of different BPA concentrations on *in vitro* testosterone, estradiol-17β and 17α20βOHP production in greenling oocytes in the presence or absence of 50 IU hCG after a 48-h incubation. Values are mean ± SE of the concentrations of each steroid in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tuckey test. Asterisk shows significant differences from controls (P < 0.05).

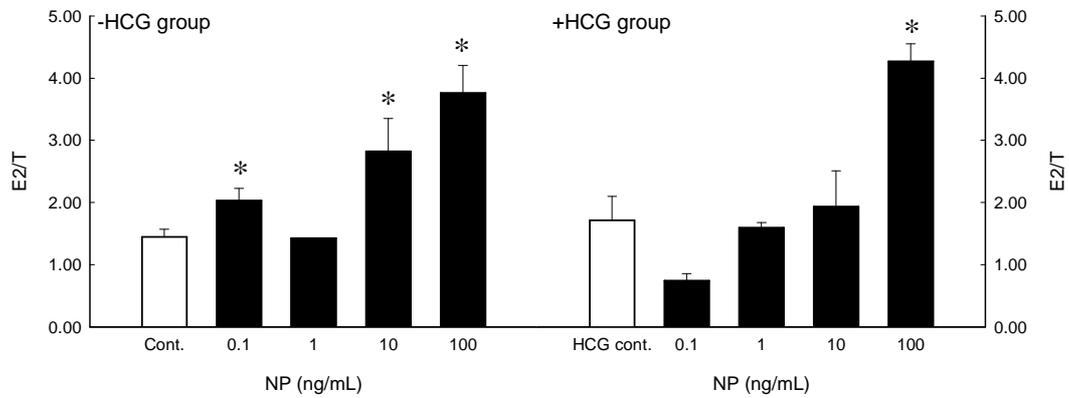
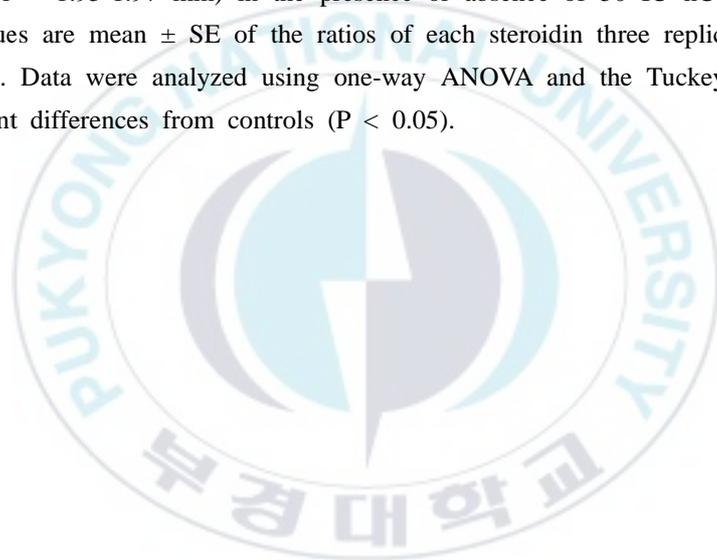


Fig. 11. Effects of different NP concentrations on *in vitro* E₂/T ratio in greenling oocytes (oocyte diameter = 1.95-1.97 mm) in the presence or absence of 50 IU hCG after a 48-h incubation. Values are mean ± SE of the ratios of each steroid in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tuckey test. Asterisk shows significant differences from controls (P < 0.05).



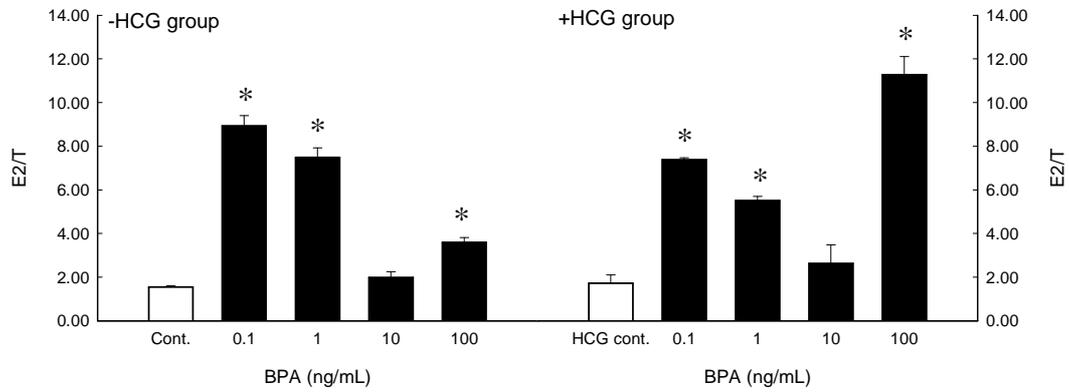
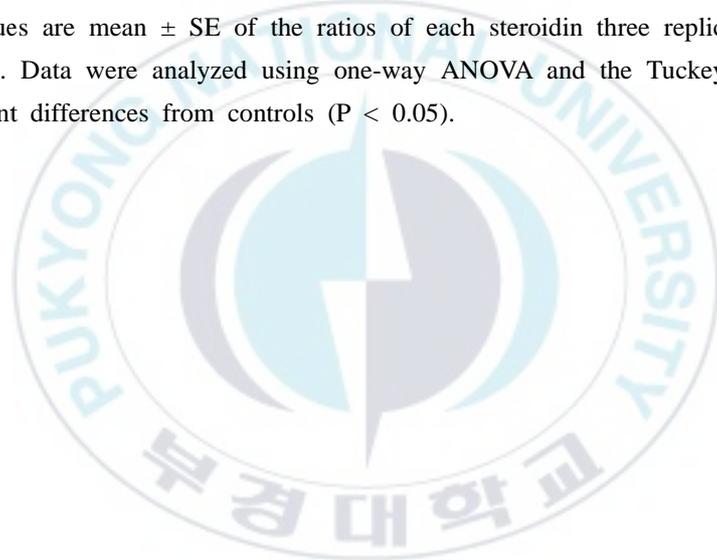


Fig. 12. Effects of different BPA concentrations on *in vitro* E₂/T ratio in greenling oocytes (oocyte diameter = 1.95-1.97 mm) in the presence or absence of 50 IU hCG after a 48-h incubation. Values are mean ± SE of the ratios of each steroid in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using one-way ANOVA and the Tuckey test. Asterisk shows significant differences from controls (P < 0.05).



IV. 고 찰

쥐노래미는 주산란기가 11-12월인 동계산란어종으로 난소는 비동시발달형으로서 난소 내에 발달단계가 다른 난모세포들이 혼재해 있으며 한 산란기에 2회 이상 산란하는 어종이다 (Sekigawa et al., 2003; Kang et al., 2004). 본 연구에 사용된 난모세포는 난경별로 분리하여 난경 약 0.70-0.74 mm, 0.80-0.82 mm, 0.92-0.96 mm, 1.08-1.12 mm 그리고 1.95-1.97 mm에 해당하는 난모세포들을 대상으로 하였다. Kang et al., (2004)에 의하면 쥐노래미의 난소 내 난경 약 450-800 μm 의 난모세포는 난황과립을 함유하고 있으며, 난경 약 950-1050 μm 의 난모세포는 세포질 내에 다량의 난황이 축적된 난모세포들과 배포이동기에 속하는 성숙난모세포라고 보고하였다. 또한 난경 약 1,100-1,400 μm 전후의 난모세포는 완숙란으로 난황과립은 균질화되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 산란시기의 쥐노래미 난소 내 난모세포의 조직학적 관찰결과, 난경이 약 1.08-1.12 mm에 이르면 세포질 내에 난황과립이 충만하였으며, 이 시기의 난소 내에 잔존하는 여포세포가 관찰되는 것을 미루어 보아 난경이 약 1.08-1.12 mm 이상으로 성장하면 배란에 참여하는 것으로 생각된다. 또한 TLC에 의한 스테로이드 대사물질 분리 결과 (Fig. 2), 이 시기에는 progestogens이 대사되지 않는 점을 미루어 보아, 난경이 약 1.08-1.12 mm인 난모세포는 fully vitellogenic stage로 사료된다. 난경이 약 1.95-1.97 mm인 난모세포를 포함하는 산란시기에 이른 쥐노래미의 난소 내에는 초기성장기의 난모세포를 제외한 다양한 발달단계를 가진 난모세포들로 구성되어 있었다. 따라서, 쥐노래미는 한 산란기에 적어도 2~3회 이상의 산란을 하는 것을 확인하였다.

본 연구에 사용된 내분비 장애물질인 NP와 BPA는 에스트로젠 활성을 지닌 물질로서 이전의 많은 연구에서 담수어류를 대상으로 연구되었다. 그러나 해수 중 NP와 BPA는 담수에 비해 희석률이 높아 저농도로 존재할 것으로 생각

된다. 보고에 의하면 해수 중 감지되는 NP의 농도는 영국의 Tees estuary에서 0.09-5.2 ug/L, 북해에서 0.3-63 ng/L (Bester et al., 2001; Heemken et al., 2001) 그리고 독일의 Rhine estuary에서 31-147 ng/L (Jonkers et al., 2003)의 범위로 보고되었다. BPA의 농도는 북해에서 6.0 ng/L 이하, 싱가포르 연안에서 0.01-2.47 ng/mL 등으로 보고되어 있다 (Heekman et al., 2001; Basheer et al., 2004). 따라서 본 연구에서 설정한 농도인 0.1-100 ng/mL은 *in vitro* 상에서 내분비 교란 효과를 알아보기 위한 적정 농도라고 생각된다.

난황형성기의 쥐노래미 난소에서 합성되는 주요 성 스테로이드 호르몬은 A₄, T, E₂ 그리고 E₁으로 확인되었다 (Fig. 5). Baek et al. (2003)에 의하면, NP는 100 ng/mL의 농도에서 점망독의 난황형성 완료 직후의 난모세포에서 E₁과 E₂로의 대사율을 촉진시킨다고 보고하였다. 또한 난황형성이 한창 진행 중인 점망독의 난모세포가 100 ng/mL의 BPA에 노출되었을 때, E₁과 E₂로의 대사율이 저해되었고, 난황형성 말기의 난모세포에서도 E₁과 E₂로의 대사율이 저해됨이 보고되었다 (Baek et al., 2004). 그러나 본 연구에서는 NP는 10 ng/mL의 농도에서 난황형성기에 주요 스테로이드 호르몬인 A₄, T, E₂ 그리고 E₁으로의 대사율에 뚜렷한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

본 연구에서 NP는 쥐노래미의 난황형성기의 난모세포에서 E₂/T 비율을 증가시키는 estrogenic effect를 나타냈다. E₂/T 비율은 스테로이드 호르몬 농도 변화에 따른 내분비 교란의 지표로 이용되고 있다 (Bevans et al., 1996; Folmar et al., 1996). 문절망독의 난황형성후기의 난모세포에서 NP는 T와 E₂의 생성에 있어 뚜렷한 영향을 미치지 않는다고 알려져있다 (Park, 2004). NP 이외의 다른 내분비교란 물질인 PCB153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl)은 androgens을 estrogens로 전환시키는 aromatase의 활성을 변화시켜 조피볼락의 혈중 E₂ 농도를 증가시킨다고 보고되었다 (Jung et al., 2005). 한편, NP와 함께 estrogenic effect를 가지는 다른 내분비 장애물질, PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons)

는 가자미류인 *Platichthys flesus*의 난황형성후기에 해당하는 난모세포에서 스테로이드 효소에 직접적인 저해제로 작용하여 T와 E₂의 생성을 저해한다고 알려져있다 (Monterio et al., 1997). 쥐노래미의 경우에도 난경이 증가함에 따라 T로의 대사율이 감소하고 E₂로의 대사율이 증가하는 점을 미루어 볼 때 (Fig. 6), aromatase에 의한 대사작용으로 생각되며, NP는 aromatase와 같은 스테로이드 효소에 직접적인 영향을 미치는 것으로 생각된다.

NP와 BPA는 쥐노래미의 최종성숙과정의 난모세포에서 HCG 첨가에 상관없이 E₂ 생성을 촉진하는 경향을 보였다. 그러나 17 α 20 β OHP의 생성에서는 NP와 BPA 모두 -HCG 하에서는 억제효과를 보였으나 +HCG 하에서는 촉진효과를 보였다. 일반적으로 17 α 20 β OHP와 같은 progestogens의 농도는 최종성숙 과정에 있어 E₂ 농도가 감소하면서 증가한다고 알려져 있다 (Aida, 1988; Nagahama, 1994). 또한 Lin and Schuetz (1983)의 연구에 의하면 *in vitro* 상에서 estrogen이 gonadotropin에 의해 유도된 성숙을 억제한다고 보고하였고, Pickford and Morris (2003)에 의하면 살충제의 일종인 methoxychlor가 양서류인 *Xenopus laevis*의 성숙한 난모세포 스테로이드 생성에 있어 E₂/T 비율을 증가시켰으며 progesterone의 생성농도를 저해시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 NP와 BPA는 estrogen agonist로 작용하여 17 α 20 β OHP의 생성 농도를 감소시켜 최종성숙 과정을 억제하는 것으로 생각된다. 이외에도 Villeneuve et al. (1998)에 의하면 NP는 direct-acting mechanism을 통해 ER (estrogen receptor)에 결합하여 vitellogenin 발현을 촉진한다고 보고하였다. 다른 연구에서도 NP 노출은 ER의 농도를 증가시킨다고 보고하였다 (White et al., 1994; Nimrod and Benson, 1997). 이와는 상반되게 Giesy et al. (2000)에 의하면 NP는 산란기 때 송사리 암수 모두에서 혈중 E₂ 농도를 증가시켰으며 이는 NP의 직접적인 영향이 아닌 증가된 혈중 vitellogenin 농도에 따른 것이며, NP는 direct mechanism을 통한 estrogen agonist가 아니라고 보고하였다. 본 연구에서도 최종성숙 과정의 난

모세포에서 NP가 E₂ 생성을 촉진하는 경향을 보였으나 정확한 기작 구명을 위해서는 steroid receptor에 관한 앞으로의 연구가 요구된다.

BPA는 GVBD가 시작된 점망독의 난모세포에서 E₂와 17α20βOHP로의 대사율을 모두 저해하였으며, 이는 BPA가 estrogen 활성화와 antiestrogen 활성을 동시에 가진다고 보고하였다 (Baek et al., 2004). 또한 Tokumoto et al., (2004)에 의하면 BPA는 DES와 화학구조가 유사하여 어류의 난모세포 성숙을 촉진시킬 것이라고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 BPA는 E₂ 생성을 촉진하고 17α20βOHP 생성을 저해하여 쥐노래미의 최종성숙과정을 저해시키는 estrogen 활성을 지니는 것으로 생각된다.

어류는 생식에 있어 생리학적 그리고 행동학적 다양성을 나타낸다. 또한 성스테로이드 호르몬은 어류의 생식내분비계에 있어 중요한 역할을 하고 있으며 내분비 장애물질을 포함한 외부의 환경 인자에 다양하게 반응하는 특성을 나타낸다 (Kime, 1998). 이전까지 보고된 내분비장애물질에 관한 대부분의 연구들은 난황전구물질인 vitellogenin의 농도 증가, 난정소 (Ovotestis)의 발달 촉진 그리고 생식소 크기의 변화 등을 조사하였다 (Jobling et al., 1996; Arcand-Hoy and Benson, 1998). 또한 Lech et al. (1996)과 Ren et al. (1996)은 NP와 같은 내분비장애물질이 estrogen 수용체와 결합하여 vitellogenin mRNA의 전사를 촉진시키며 estrogen agonist로 작용한다고 보고하였다.

본 연구에서도 NP는 쥐노래미의 난소발달 단계에 상관없이 estrogen agonist로 작용하는 것으로 나타났다. BPA 역시 성숙란을 대상으로 한 이전의 다른 연구와는 달리 쥐노래미의 최종성숙과정에서 NP와 같이 estrogen agonist로 작용하는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 기초로 쥐노래미를 포함한 해산어류의 생식기작이 내분비 장애물질에 의해 어떻게 교란되는지 확인하기 위해서는 *in vivo* 실험을 수반한 세부 연구가 요구된다.

V. 요약

쥐노래미의 난황형성기에 해당하는 난경 약 0.70-0.74, 0.92-0.96 그리고 1.08-1.12 mm인 난모세포를 대상으로 전구물질, [³H]17 α -hydroxyprogesterone에서 생성되는 스테로이드 대사물질은 androgens인 androstenedione (A₄)와 testosterone (T)으로, estrogens인 estrone (E₁) 그리고 estradiol-17 β (E₂)로 확인되었다. NP가 스테로이드 대사물질의 대사율에 미치는 영향은 뚜렷한 효과가 나타나지 않았다. 0.1, 1 그리고 10 ng/mL의 NP는 난경이 약 0.80-0.82 그리고 0.92-0.96 mm인 난모세포에서 E₂/T 비율을 증가시켰다. 최종성숙기에 해당하는 난경 약 1.95-1.97 mm인 난모세포에서는, -HCG 하에서 NP가 0.1, 10 and 100 ng/mL의 농도에서 E₂/T 비율을 증가시켰으며, +HCG 하에서 100 ng/mL의 농도에서만 E₂/T 비율을 증가시켰다. 또한, 17 α 20 β OHP 생성은 -HCG 하에서 모든 NP 처리 농도구에서 저해되었다. BPA는 HCG처리에 관계없이 0.1, 1 그리고 100 ng/mL의 농도에서 E₂/T 비율을 증가시켰다. BPA는 +HCG 하에서 17 α 20 β OHP 생성 촉진 효과가 있었으나, -HCG 하에서는 고농도의 BPA가 17 α 20 β OHP 생성을 억제하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, NP는 쥐노래미의 난소 발달 단계에서 에스트로젠 유사작용을, BPA는 최종성숙단계에서 약한 에스트로젠 유사작용을 함을 나타낸다.

VII. 참 고 문 헌

- Aida, K., T. Kato and M. Awaji. 1984. Effects of castration on the smoltification of precocious male masu salmon, *Oncorhynchus masou*. Bull. Jap. Soc. Fish., 50, 565-571.
- Aida, K. 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. Aquaculture, 74, 11-21.
- Arcand-Hoy, L.D. and W.H. Benson. 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. Environ. Toxicol. Chem., 17, 49-57.
- Arukwe, A., T. Celius, B.T. Walther and A. Goksoyr. 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(1-5), 133-136.
- Ashfield, L.A., T.G. Pottinger and J.P. Sumpter. 1998. Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. Environ. Toxicol. Chem., 17(3), 679-686.
- Baek, H.J., M.H. Park, Y.D. Lee and H.B. Kim. 2003. Effect of *in vitro* xenoestrogens on steroidogenesis in mature female fish, *Chasmichthys dolichognathus*. Fish Physiol. Biochem., 28, 413-414.
- Baek, H.J., M.H. Park, Y.D. Lee, H.B. Kim J.W. Kim and M.S. Yoo. 2004. Effect of bisphenol A on ovarian steroidogenesis in longchin goby (*Chasmichthys dolichognathus*). J. Kor. Fish. Soc., 37(3), 192-196.

- Basheer, C., H.K. Lee and K.S. Tan. 2004. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Mar. Pollut. Bull.*, 48, 1145-1167.
- Bester, K., N. Theobald and H.F. Schroeder. 2001. Nonylphenols nonylphenoethoxylates, linear alkylbenzene sulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere*, 45, 817-826.
- Brotons, J.A., F. Olea-Serrano, M. Villalobos, V. Pedraza and N. Olea. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food can. *Environ. Health Perspect.*, 103, 608-612.
- Choi, Y., J.H. Kim and J.Y. Park. 2002. *Marine Fishes of Korea*. Kyo-Hak Publish, Seoul.
- Christiansen, L.B., K.L. Pedersen, B. Korsgaard and P. Bjerregaard. 1998. Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *in vivo* synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Mar. Environ. Res.*, 46, 137-140.
- Giesy, J.P., S.L. Pierens, E.M. Snyder, S.M. Richardson, V.J. Kramer, S.A. Snyder, K.M. Nichols and D.A. Villeneuve. 2000. Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(5), 1368-1377.
- Goetz, F.W., Fostier, A.Y., Breton, B., Jalabert, B., 1987. Hormonal changes during meiotic maturation and ovulation in the brook trout (*Salvelinus*

fontinalis). Fish Physiol. Biochem., 3(4), 203-211.

Gray, M.A. and C.D. Metcalfe. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem., 16, 1082-1086.

Heemken, O.P., H. Reincke, B. Stachel and N. Theobald. 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. Chemosphere, 45, 245-259.

Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen and J.P. Sumpter. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environ. Toxicol. Chem., 15, 194-202.

Jonkers, N., R.W.P.M. Lanne and P. de Voogt. 2003. Fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in two Dutch estuaries: evidence of biodegradation in the field. Environmental Science & Technology., 37, 321-327.

Jung, J.H., J.K. Jeon and C.H. Han. 2005. Effects of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) on plasma sex steroids and vitellogenin in Rockfish (*Sebastes shelegeli*). Comp. Biochem. Physiol., C. 140, 295-299.

Kang, H.W., Chung E.Y. and Kim J.H. 2004. Sexual maturation and spawning characteristics in greenling, *Hexagrammos otakii* of the West Coast in Korea. J. Kor. Aqua. Soc., 17(1): 30-38.

- Kime, D.E. 1998. Endocrine disruption in fish. Kluwer Academic publisher. Boston, USA.
- Kinnberg, K., B. Korsgaard, P. Bjerregaard and A. Jespersen. 2000. Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish, *Xiphophorus maculatus*. J. Exp. Biol., 203, 171-181.
- Krishinan, A.V., P. Stathis, S.F. Permuth and L. Tokes. 1993. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinol., 132, 2279-2286.
- Lech, J.J., S.K. Lewis and F. Ren. 1996. *In vivo* estrogenic activity of nonylphenol in rainbowtrout. Funda., Appl. Toxicol., 30, 229-232.
- Lin, Y.W. and A.W. Schuetz. 1983. In vitro estrogen modulation of pituitary and progesterone-induced oocyte maturation in *Rana pipiens*. J. Exp. Zool., 226, 281-291.
- Mazzoldi, C. and M.B. Rasotto. 2001. Extended breeding season in the marbeled goby, *Pomatoschistus marmoratus* (Teleosti: Gobidae), in the Venetian Lagoon. Environ. Biol. Fish., 61, 175-183.
- Mochida, K., N. Ohkubo, T. Matsubara, K. Ito, A. Kakuno and K. Fujii. 2004. Effects of endocrine-disrupting chemicals on expression of ubiquitin C-terminal hydrolase mRNA in testis and brain of the Japanese common goby. Aqua. Toxicol., 70, 123-136.
- Monteiro, P.R.R., M.A. Reis-Henriques and J. Coimbra. 2000. Polycyclic

aromatic hydrocarbons inhibit *in vitro* ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.*, 48, 549-559.

Nagahama, Y. and S. Adachi. 1985. Identification of maturation inducing steroid in teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev. Biol.*, 109, 428-435.

Nagahama, Y., M. Yoshikuni, M. Yamashita and M. Tanaka. 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. In Sherwood, N.M. and C.L. Hew. (Eds.) *Fish physiology* V. 13. Molecular endocrinology of fish. Academic Press, London, pp. 393-439.

Nimrod, A.C. and W.H. Benson. 1998. Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. *Aquat. Toxicol.*, 44, 141-156.

Olea, N., R. Pulgar, P. Perez, F. Olea-Serrano, A. Rivas, A. Novillofertell, V. Pedraza, A.M. Soto and C. Sonnenschein. 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.*, 104, 298-305.

Park, M.H. 2004. *In vitro* effect of endocrine disrupting chemicals on oocytes maturation of yelloefin goby, *Acanthogobius flavimanus*. M.S. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.

Patiño, R. and Thomas, P. 1990a. Gonadotropin stimulates 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one production from endogenous substrates in Atlantic croaker ovarian follicles undergoing final maturation *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrin.*, 78, 474-478.

- Patiño, R. and Thomas, P. 1990b. Induction of maturation of Atlantic croaker oocytes by 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one *in vitro*: consideration of some biological and experimental variables. J. Exp. Zool., 255, 97–109
- Pickford, D.M. and I.D. Morris. 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.
- Ren, L., S.K. Lewis and J.J. Lech. 1996. Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression. Chem-Biol Interat., 100, 67-76.
- Scott, A.P., E.L. Sheldrick and A.P.F., Flint. 1982. Measurement of 17 α ,20 β -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.
- Sekigawa, T., T. Takahashi, T. Takatsu and Y. Sakurai. 2003. Maturation of fat greenling, *Hexagrammos otakii* females in Kikonai bay, Hokkaido. Nippon Suisan Gakkaishi, 69(3), 380-386.
- Smeets, J.S., I. Holsteijin, J.P. Giesy, W. Seinen and M. Van Den Berg. 1999. Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. Toxicol. Sci., 50:206-213.
- Talmage, S.S. 1994. Environmental and Human safety of Major Surfactants:

Alcohol Ethoxylates and Alkylphenol Ethoxylates. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Tokumoto, T., M. Tokumoto, R. Horiguchi, K. Ishkawa and Y. Nagahama. 2004. Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 101(10), 3686-3690.

Van Den Belt, K., P.W. Wester, L.T.M. Van Der Ven, R. Verheyen and H. Witters. 2002. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. Environ. Toxicol. Chem., 21, 767-775.

Villeneuve, D.L., A.L. Blankenship and J.P. Giesy. 1998. Interactions between environmental xenobiotics and estrogen receptor-mediated responses. In: Denison, M.S., Helferich, W.G. (Eds.), Toxicant Receptor Interactions. Taylor & Francis, Philadelphia, PA, USA, pp. 69-99.

Weber, L.P., R.L. Hill and D.M. Janz. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Banjo rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. Aquat. Toxicol., 63, 431-446.

White, R., S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter and M.G. Parker. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology, 135, 175-182.

VI. 감사의 글

항상 걱정만 끼쳐 드리고 세상 물정 모르는 부족하고 못한 제자를 채찍질과 함께 학문으로 이끌어 주신 백혜자 선생님께 진심으로 감사의 말씀 드립니다. 바쁘신 와중에도 논문을 심사해 주신 유명숙 교수님과 김현우 교수님께 감사의 말씀 올립니다. 학부과정부터 때로는 자상하게 때로는 열정적으로 가르침을 주신 강용주 교수님, 홍성운 교수님, 남기완 교수님과 김수암 교수님께도 감사의 말씀 올립니다. 또한 멀리에서 항상 관심을 가져 주시고 후원해 주시는 김형배 선생님과 이영돈 선생님께 감사드립니다.

지금은 집안 식구보다 더 자주 보는, 못한 놈 만나서 고생 많은 발생생식내분비 연구실의 식구들인 김경선 박사님, 4년째 동고동락하는 이수정 님, 학과 사무실에서 열심히 생활하시는 조도형 님, 그리고 김경주 님, 임도영 님, 주익정 님, 배선희님, 공미혜 님, 한영실 님에게도 감사의 말씀과 미안한 마음을 전합니다. 언제나 힘든 일을 도와주시고 신경 써 주시는 박경동 선배님과 박정호 선배님 그리고 이해원 선배님께 감사드립니다. 언제나 힘이 될 수 있는 자원생물학과 98학번 친구들에게도 고마운 마음을 전합니다.

언제나 반갑게 맞아 주시고, 기쁜 일과 슬픈 일을 항상 함께 하는 식구들인 송영보 박사님, 임봉수 박사님, 이치훈 선배님, 허상우 선배님, 허성표 님, 강형철 님, 이태진 님, 이희중 님께도 감사의 말씀 드립니다.

공부한다는 핑계로 집에 연락도 자주 드리지 않는 못된 아들을 노심초사 걱정하시는 어머니님, 아버지께 죄송한 마음과 함께 감사의 말씀 올립니다. 형님과 형수님 그리고 조카 종민이에게도 감사의 마음을 전하며, 지면을 통해 감사드린 모든 분들께 앞으로 더욱 정진하겠다는 말씀 올리면서 이 글을 마칩니다.