



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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](#)

박사학위논문

화학적 요법을 이용한 넙치의 성 성숙
억제 기술 개발에 관한 연구

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

金基赫

2021年08月

화학적 요법을 이용한 납치의 성 성숙 억제 기술 개발에 관한 연구

지도교수 여인규

김기혁

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2021 년 08 월

김기혁의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 이영돈 印

위 원 이경준 印

위 원 정준범 印

위 원 허문수 印

위 원 여인규 印

제주대학교 대학원

2021 년 08 월

Development of sexual maturation inhibition technique
by using chemical method in olive flounder
(*Paralichthys olivaceus*)

Ki-Hyuk Kim

(Supervised by professor In-kyu Yeo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Doctor of Fisheries Science

2021. 08.

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, In-Kyu Yeo, Prof. of Marine Life Sciences

Department of Marine Life Sciences
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

LIST OF FIGURES	v
LIST OF TABLES	xi
ABSTRACT	xiii
제 1장. 종합 서론	1
제 2 장. 미성숙 암컷 넙치를 이용한 시상하부, 뇌하수체 및 간장 배양 세포에서 Dopamine, Anastrozole, Exemestane 및 Tamoxifen에 의한 성 성숙 관련 호르몬 물질의 억제	6
1. 서론	7
2. 재료 및 방법	9
2.1. 세포배양	9
2.2. 시료로부터의 RNA 추출 및 cDNA 합성	11
2.3. Quantitative qPCR 분석	12
2.4. 통계학적 분석	15
3. 결과	16
3.1. 시상하부, 뇌하수체 및 간장 배양세포 현미경 관찰	16
3.2. 시상하부 및 뇌하수체 세포에 Dopamine 투여 후 GnRH, Gth 및 ER mRNA level 변화	18

3.3. 간장 세포에 Aromatase inhibitors 투여 후 ER 및 VTG mRNA level 변화	23
3.3.1. Anastrozole에 의한 변화	23
3.3.2. Exemestane에 의한 변화	26
3.3.3. Tamoxifen에 의한 변화	29
4. 고찰	32
제 3 장. 미성숙 암컷 넙치를 이용한 Dopamine에 의한 성 성숙 억제	36
1. 서론	37
2. 재료 및 방법	39
2.1. 실험동물 및 Dopamine 처리	39
2.2. Dopamine 처리 후 샘플	40
2.3. 시상하부 및 뇌하수체에서의 Total RNA 추출 및 cDNA 합성	41
2.4. Quantitative PCR 분석	42
2.5. 생식소 중량 지수 관찰	42
2.6. 생식소 조직 관찰	43
2.7. 통계학적 분석	43
3. 결과	44
3.1. Dopamine 주사 후 시상하부 및 뇌하수체 GnRH, Gth 및 ER mRNA level 변화	44

3.2. Dopamine 주사 후 생식소 중량 지수(GSI) 변화 및 조직학적 변화 관찰	49
4. 고찰	52
제 4 장. 미성숙 암컷 넙치를 이용한 Aromatase inhibitors(AIs)에 의한 성 성숙	
억제	54
1. 서론	55
2. 재료 및 방법	57
2.1. 실험동물 및 Aromatase inhibitors 처리	57
2.2. Aromatase inhibitors 처리 후 샘플	58
2.3. 간 및 생식소에서의 Total RNA 추출 및 cDNA 합성	59
2.4. Quantitative PCR 분석	60
2.5. 생식소 중량 지수 관찰	60
2.6. 생식소 조직 관찰	61
2.7. 통계학적 분석	61
3. 결과	62
3.1. Anastrozole 주사 후 ER 및 VTG mRNA level 변화	62
3.2. Anastrozole 주사 후 생식소 중량 지수(GSI) 변화 및 조직학적 변화 관찰	64
3.3. Exemestane 주사 후 ER 및 VTG mRNA level 변화	70
3.4. Exemestane 주사 후 생식소 중량 지수(GSI) 변화 및 조직학적 변화 관찰	72

4. 고찰	78
제 5 장. 미성숙 암컷 넙치를 이용한 Tamoxifen에 의한 성 성숙 억제	81
1. 서론	82
2. 재료 및 방법	84
2.1. 실험동물 및 Tamoxifen 처리	84
2.2. Tamoxifen 처리 후 샘플	85
2.3. 생식소 중량 지수 관찰	85
2.4. 간 및 생식소에서의 Total RNA 추출 및 cDNA 합성	86
2.5. Quantitative PCR 분석	87
2.6. 생식소 조직 관찰	88
2.7. 통계학적 분석	88
3. 결과	89
3.1. Tamoxifen 주사 후 ER 및 VTG mRNA level 변화	89
3.2. Tamoxifen 주사 후 생식소 중량 지수(GSI) 변화 및 조직학적 변화 관찰	91
4. 고찰	96
종합 고찰	99
참고 문헌	105
감사의 글	117

LIST OF FIGURES

Figure 1. Photographs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) hypothalamus, pituitary and liver cell culture microscopic observation. (A) The hypothalamus cell of olive flounder was cultured (B) The pituitary cell of olive flounder was cultured (C) The liver cell of olive flounder was cultured.

Figure 2. Expression of GnRH mRNA level in the hypothalamus cell of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Dopamine (Da) of 2×10^{-7} M each, Dopamine (Da) of 2×10^{-7} M, Dopamine (Da) of 2×10^{-8} M and Dopamine (Da) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 3. Expression of Gth mRNA level in the pituitary cell of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Dopamine (Da) of 2×10^{-7} M each, Dopamine (Da) of 2×10^{-7} M, Dopamine (Da) of 2×10^{-8} M and Dopamine (Da) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 4. Expression of ER mRNA level in the hypothalamus cell of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Dopamine (Da) of 2×10^{-7} M each, Dopamine (Da) of 2×10^{-7} M, Dopamine (Da) of 2×10^{-8} M and Dopamine (Da) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 5. Expression of ER mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Anastrozole (Ana) of 2×10^{-7} M each, Anastrozole (Ana) of 2×10^{-7} M, Anastrozole (Ana) of 2×10^{-8} M and Anastrozole (Ana) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 6. Expression of VTG mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Anastrozole (Ana) of 2×10^{-7} M each, Anastrozole (Ana) of 2×10^{-7} M, Anastrozole (Ana) of 2×10^{-8} M and Anastrozole (Ana) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 7. Expression of ER mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Exemestane (Exe) of 2×10^{-7} M each, Exemestane (Exe) of 2×10^{-7} M, Exemestane (Exe) of 2×10^{-8} M and Exemestane (Exe) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 8. Expression of VTG mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Exemestane (Exe) of 2×10^{-7} M each, Exemestane (Exe) of 2×10^{-7} M, Exemestane (Exe) of 2×10^{-8} M and Exemestane (Exe) of $2 \times$

10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 9. Expression of VTG mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Tamoxifen (Tam) of 2×10^{-7} M each, Tamoxifen (Tam) of 2×10^{-7} M, Tamoxifen (Tam) of 2×10^{-8} M and Tamoxifen (Tam) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 10. Expression of ER mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Tamoxifen (Tam) of 2×10^{-7} M each, Tamoxifen (Tam) of 2×10^{-7} M, Tamoxifen (Tam) of 2×10^{-8} M and Tamoxifen (Tam) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 11. Expression of GnRH mRNA in the hypothalamus of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Dopamine (Da) add to Estrogen (E2) and Dopamine (Da) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 12. Expression of Gth mRNA in the hypothalamus of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2),

Dopamine (Da) add to Estrogen (E2) and Dopamine (Da) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 13. Expression of ER mRNA in the hypothalamus of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Dopamine (Da) add to Estrogen (E2) and Dopamine (Da) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 14. Effect of Estrogen (E2) and Dopamine (Da) treatment on Gonadosomatic index in female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Figure 15. Histological observations of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary treated E2 (Estrogen) and Da (Dopamine). Op : Ooplasm, No : Nucleolus, N : Nucleus, Yv : Yolk vesicle, Zr :Zona radiata.

Figure 16. Expression of ER mRNA in the gonad of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Anastrozole (Ana) add to Estrogen (E2) and Anastrozole (Ana) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 17. Expression of ER mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Anastrozole (Ana) add to Estrogen (E2) and Anastrozole (Ana) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 18. Expression of VTG mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys*

olivaceus) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Anastrozole (Ana) add to Estrogen (E2) and Anastrozole (Ana) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 19. Effect of Estrogen (E2) and Anastrozole (Ana) treatment on Gonadosomatic index in female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Figure 20. Histological observations of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary treated Anastrozole (Ana). Op : Ooplasm, No : Nucleolus, N : Nucleus, Yv : Yolk vesicle, Zr : Zona radiata, SC : Spermatocyte, SG : Spermatogonia

Figure 21. Expression of ER mRNA in the gonad of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Exemestane (Exe) add to Estrogen (E2) and Exemestane (Exe) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 22. Expression of ER mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Exemestane (Exe) add to Estrogen (E2) and Exemestane (Exe) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 23. Expression of VTG mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Exemestane (Exe) add to Estrogen (E2) and Exemestane (Exe) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 24. Effect of Estrogen (E2) and Exemestane (Exe) treatment on Gonadosomatic index in female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Figure 25. Histological observations of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary treated Exemestane (Exe). Op : Ooplasm, No : Nucleolus, N : Nucleus, Yv : Yolk vesicle, Zr :Zona radiata, SC : Spermatocyte, SG : Spermatogonia

Figure 26. Expression of ER mRNA in the gonad of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Tamoxifen (Tam) add to Estrogen (E2) and Tamoxifen (Tam) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 27. Expression of ER mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Tamoxifen (Tam) add to Estrogen (E2) and Tamoxifen (Tam) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 28. Expression of VTG mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Tamoxifen (Tam) add to Estrogen (E2) and Tamoxifen (Tam) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

Figure 29. Effect of Estrogen (E2) and Tamoxifen (Tam) treatment on Gonadosomatic index in female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Figure 30. Histological observations of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary treated Tamoxifen (Tam). Op : Ooplasm, No : Nucleolus, N : Nucleus, Yv : Yolk vesicle, Zr :Zona radiata

Figure 31. Sex hormone blocking mechanisms in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) for used Estrogen, Dopamine, Anastrozole, Exemestane and Tamoxifen. Plus (+) means increase in mRNA levels. Minus (-) means decrease in mRNA levels.

LIST OF TABLES

Table 1. Oligonucleotide primers used for Quantitative PCR (qPCR) in cell and tissue of hypothalamus, pituitary

Table 2. Oligonucleotide primers used for Quantitative PCR (qPCR) in hepatocyte and liver

ABSTRACT

Sex determination in some reptiles, amphibians, and fishes is known to be influenced greatly by environmental factors. Successful reproduction of 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 activity of the Estrogen (E2) is regulated through the Estrogen receptor (ER), which is divided into two subtypes, alpha and beta. In fish, the ER has been reported to be expressed in the brain, gonads, and liver. Vitellogenin (VTG) is a sex-specific protein that appears in the blood of mature females of oviparous vertebrates. The E2 secreted from eggs binds to the ER in hepatocytes to synthesize VTG proteins. It is known that VTG receptors are produced in eggs, and that ligands are produced in the liver. It is known that if a large amount of aromatase is secreted, the sex is changed to female, and if a small amount is secreted by an exogenous treatments of Fadrozole, it is changed to male.

Dopamine (Da) is a neurotransmitter that plays an important role in reproductive function, and plays a decisive role in inducing the breeding cycle in seasonal breeding animals, especially by regulating changes in gonadotropin. The sex hormones in fish include Gonadotropin releasing hormone (GnRH), Gonadotropic hormone (Gth), E2, etc.

Aromatase inhibitor (AI) blocks P450arom activity to inhibit aromatase enzyme activity and inactivates E2 production from androgen. In humans, ovarian aromatase in premenopausal women is responsible for a significant amount of circulating E2 and is extremely sensitive to changes in luteinizing hormone (LH) ; AI is also used to treat cancer in women. Drugs that function as AIs include Anastrozole (Ana), Exemestane (Exe), Fadrozole, Letrozole and Vorozole, all of which inhibit the production of E2 from androgen

by inhibiting aromatase activity. Researchers have investigated AI in various gonochoristic fish species and sex changing protogynous species, including fish, to induce female virilization.

Tamoxifen (Tam), an anti-estrogen (AE), is a selective estrogen receptor modulator that competes with the estradiol binding to the ER and is used to treat sex hormone-dependent breast cancer. Tam can be controlled by numerous variables, including growth factors. The ER/Tam complex, bound to the ER, brings in another protein known as a co-repressor, and this complex then binds to DNA and regulates gene expression. Researchers have also found that Tam acts as an agonist of E2 in some tissues, but as an antagonist in others. Tam has been studied in several fish, including Japanese medaka, tilapia, and zebrafish, with studies primarily on female virilization.

The main objective of modern aquaculture is to intentionally produce seedlings to preserve species, and create advanced fish species. Therefore, the research has focused on artificially inducing sexual maturation and ovulation. Studies have typically been conducted on methods such as; changing the concentrations of sex steroid hormones in rock fish (*Sebastes inermis*) by controlling the water temperature and photoperiod, the effects of water temperature and photoperiod on the development of Korean bullhead (*Tachysurus fulvidraco*) gonads, and inducing early sexual maturation in scallops by stimulating the water temperature. However, female fish generally exhibit problems with reduced immunity and slowed growth due to stress caused by the physiological changes required to produce eggs at the beginning of sexual maturation. Though studies have been reported on the induction and control of sexual maturity, no definite effects have been verified. Furthermore, though many experiments have been performed to determine the expression level of hormones by simply administering chemical factors into the fish body, no studies have reported sex control applicable to aquaculture farms.

The goal of this study was to secure and test technology for controlling (inhibiting) sexual maturation hormones such as maturation hormones through hormone regulation. To achieve this, first, we measured what is the difference Da, AI (Ana and Exe) and AE (Tam) affects inside a olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), at several concentrations (*in vitro*). Second, we intraperitoneally injected Da, AI and AE into the bodies of female olive flounder (*in vivo*). This study confirmed the GnRH, Gth, VTG and ER mRNA expression in the hypothalamus, pituitary, liver and gonad due to the Da, AE and AI, as well as gonad weight index and histological changes.

Furthermore, it is necessary to compare these results and examine signaling pathways through chemical and genetic comparative analyses of the effects of Da, AI and AE treatment. This could be used as basic data for investigating the hormone secretion rate when injecting chemical substances into the body, and in terms of direct application to aquaculture farms, it is expected to be highly utilized in the industry.

제 1장

종합 서론

종합 서론

어류를 포함한 척추동물의 성 성숙은 내분비 시스템에 의해 조절되며, 시상하부(Hypothalamus), 뇌하수체(Pituitary), 갑상선(Thyroid gland), 췌장섬(Pancreatic islet) 및 크로마핀 조직(Chromaffin tissue) 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(Jonsson and Hansson, 1984; Muir and Richard, 1999; Tovo-Neto et al., 2018). 성 호르몬의 일반적인 경로를 살펴보면, 시상하부 뇌하수체 생식선 축(Hypothalamus-Pituitary-Gonadal axis, HPG)을 따라 차례로 생식선 자극호르몬 방출호르몬인 Gonadotropin-releasing hormone(GnRH)를 분비하고 이는 뇌하수체 전엽(Anterior pituitary)에 위치한 GnRH 수용체를 활성화시키고, 두 종류의 다른 Gonadotropin(Gth)인 Follicle Stimulating Hormone(FSH)와 Luteinizing Hormone(LH)의 분비를 각각 조절함으로써 생식소 발달 및 성숙에 관여하게 되며, FSH에 의해 분비된 Estrogen(E2)에 의해 간세포에서 Vitellogenin(VTG)가 분비되어 여포세포로 이동 후 난의 성장 및 성숙을 유도하게 된다(Bhattacharya, 1992; Mateos et al., 2002; Park et al., 2016). E2의 자극에 의해 간에서 합성되는 VTG는 지질, 당 및 인을 포함하는 암컷 혈중 고분자 단백질로 VTG는 혈류를 통해 성숙중인 난모세포에 흡수되어 난황을 형성하며, 수정 후 배발달의 영양물질로서 중요한 역할을 한다(Sadasivam and Ding, 2003).

암컷의 성 성숙에 있어 중요한 인자로 알려진 E2는 뇌, 간 및 생식소에 작용하는 것으로 알려져 있으며, 주로 난소에서 합성되지만, 부신 및 지방 조직에서도 합성되며, 혈류를 타고 세포 안으로 침투 후 Estrogen receptor(ER)과 결합 후 활성화를 나타내게 된다(Fuentes and Silveyra, 2019). ER은 유전자 프로모터 영역에서 E2 반응 요소를 통해 ER mRNA의 전사를 증가시켜 발현되며, ER은 세포 표면에 있는 수용체와는 달리 세포 내부에 위치하며 ER alpha와 beta 두 개의 subunit으로 구성되어 존재하며 이는 각각

번식과 신경에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kitano et al., 2007).

한편, 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라의 대표적 양식어종이면서 가장 경쟁력이 있는 주요 어종이라고 할 수 있으며, 해수 어류 양식 생산량에서 가장 큰 비중을 차지하는 어류로 매년 꾸준히 증가를 하고 있으며, 제주도를 기준으로 여전히 그 생산량이 증가되는 추세이다. 이러한 넙치의 암컷은 수컷에 비해 성장이 빠르기 때문에 일반적인 양식현장에서는 암컷의 비율이 수컷에 비하여 높게 유지하여 사육하고 있다. 그러나 암컷 넙치는 산란 전 스트레스로 면역력의 저하와 성장이 둔화되며 양식장의 환경으로 인한 세균, 바이러스 및 기생충 감염에 노출이 높아져 이는 산란 후 폐사의 위험률이 높아지기 때문에 경제적 손실이 유발될 수 있는 것으로 보고되고 있다(Park et al., 2016). 따라서, 성 성숙 억제는 넙치의 지속적인 성장이 가능하고 성 성숙 단계에서 난황으로 이동하는 에너지가 성장 에너지로 갈 수 있으며, 면역기능의 능력을 높여 줄 수 있을 것으로 기대되고 있다. 이에 다양한 어종에서의 성 성숙 제어 및 산란 유도에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Jang et al., 1998; Kim et al., 2006; Hwang et al., 2010). 또한, 성 성숙제어 연구의 일환으로 암컷 어류의 성전환에 대한 연구도 다수 진행되고 있으며, 이러한 어류 생식 기관의 성전환은 자치어기의 성 전환 분화 과정에서 성 스테로이드 처리에 의해 유도할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Yoon et al., 1998). 이러한 인위적인 성 전환은 Medaka(*Oryzias latipes*)에서 처음으로 보고되어졌다(Yamamoto, 1954). 암컷에서 수컷으로의 성 전환은 E2 수치의 감소와 androgen 수치의 증가에 의해 유도되는 것으로 보고되고 있다(Whitehead, Bromage and Breton, 1983; Norberg et al., 1989; Bhandari et al., 2003).

우리나라를 포함하여 전 세계적으로 양식을 주 목적으로 다양한 종 보존 및 고급 어종 생산을 계획적으로 종묘 생산하기 위하여 인위적인 성 성숙 제어로 수은, 광주기 조

절 및 호르몬 투여를 통한 성 성숙 제어 및 산란을 유도하는 연구가 진행되어 왔다. 또한, 큰가리비(*Patinopten yessoensis*) 성패는 수온조절로써 성 성숙을 유도하여 산란을 유도 시켰으며(Kim et al., 2014), 유럽 농어(*Dicentrarchus labrax*)를 서로 다른 온도 15 °C, 18 °C 및 21 °C로 사육 후, 성장 및 성 성숙에 대한 성의 변화에 관하여 보고되고 있다(Navarro et al., 2009). 수온 및 광주기 조절에 따른 성 성숙의 방법으로 환경조절을 통한 참조기(*Larimichthys polyactis*) 수정란 생산 기술 확립을 위해 암컷 및 수컷 참조기의 수온(17 °C, 21 °C 및 25 °C)과 광주기(장일 및 단일주기)에 따른 정소 발달 및 혈중 성호르몬의 변화를 조사하였다(Kim et al., 2021). 이처럼 수온 및 광주기에 따른 성 성숙 제어 연구가 활발히 진행되고 있다. 우리나라에도 최근에는 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)의 인위적인 성 성숙 및 산란 유도를 위해 역시 수온 및 광주기 조절로 생식소 발달을 조직학적으로 조사하였다(Kim et al., 2000). 호르몬 투여에 따른 성 성숙의 방법으로는 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*)를 이용하여 Gth, human chorionic gonadotropin(HCG), luteinizing hormone releasing hormone analogue(LHRHa)등의 복강주사로 성숙 및 배란을 유도하여 수정란을 생산하는 연구가 보고되고 있다(Tamaru et al., 1996; Hassin et al., 1997; Marino et al., 2003). 또한, 최근에는 생명공학 기술의 발달로 어류 뇌하수체 기원 Gth 유전자의 cloning(Choi et al., 2005) 및 이들 유전자를 효모세포(Kamei et al., 2003)와 같은 bioreactor를 이용하여 유전자 재조합 단백질 생산 기술이 확립되어 유전적인 접근성을 활용하여 성 성숙에 관련한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 하지만, 수온 및 광주기 연구는 인위적인 요소들 및 외부적인 요인들로 인하여 실험 조건이 바뀔 수 있는 문제점들이 있다. 따라서, 이런 문제점들을 보완하기 위하여 성 성숙 억제 및 산란을 유도할 수 있는 화학 물질을 주사하여 인위적 및 외부적인 요인들의 위험을 차단하여 성 성숙 억제 및 산란에 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

따라서, 본 연구는 우리나라의 주요 양식대상 어류인 암컷 넙치를 이용하여 성 성숙 전 성 호르몬 관련 억제물질로 알려져 있는 Dopamine(Da), Aromatase inhibitor(AI)의 두 종류 Anastrozole(Ana) 및 Exemestane(Exe) 그리고 Anti-estrogen(AE)인 Tamoxifen(Tam) 4가지 화학물질을 이용하여 시상하부, 뇌하수체 및 간 세포를 배양한 후 각각의 화학물질을 농도별로 배지에 첨가하여 성 성숙 관련 호르몬 및 이와 관련된 물질의 관여하는 mRNA 변화를 분석하기 위하여 *in vitro* 실험을 수행하였다. 또한, *in vivo* 실험으로 4가지 화학적 물질을 넙치에 복강주사 후 시상하부, 뇌하수체 및 생식소로 이동하는 성 성숙 관련 호르몬 mRNA 발현량 분석 및 생식소의 조직변화에 대해서도 조사하였다.

제 2 장

시상하부, 뇌하수체 및 간장 배양 세포에서 Dopamine, Anastrozole, Exemestane 및
Tamoxifen에 의한 성 성숙 관련 호르몬 물질의 억제

1. 서론

어류의 번식활동은 시상하부(Hypothalamus) 뇌하수체(Pituitary) 생식소(Gonad) 축(HPG axis)으로 이어지는 내분비기관이 주로 담당하고 있으며, 그 중에서 뇌의 시상하부에서 생성되는 생식선자극호르몬 방출호르몬(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 뇌하수체에서 합성되는 생식선자극호르몬(Gonadotropin, Gth) 및 생식선에서 분비되는 성호르몬은 생식선 발달에 매우 중요한 역할을 하고 있다(Yaron et al., 2003). 시상하부에서 분비된 GnRH는 뇌하수체 전엽에 위치한 GnRH receptor와 결합하여, 두 종류의 Gth인 여포세포 자극 호르몬(Follicle stimulating hormone, FSH)과 황체형성호르몬(Luteinizing hormone, LH)의 분비를 유도하여 생식소 발달 및 성 성숙에 관여한다(Karigo et al., 2014).

생체 내 호르몬의 영향에 대한 많은 연구는 세포 배양을 통한 *in vitro* 실험을 통하여 많은 연구가 진행되어져 왔다. 어류의 세포 배양은 조직에 따라 그 배양 방식이 다양하며 차이를 나타낸다. 어류 간세포 배양은 포유류의 간세포 배양 방법을 기준으로 실험하고 있으나, 어종에 따른 세포의 부착상태 등은 서로 다르며, 뱀장어에 있어서 간세포 배양은 배양 수일 후, 세포 배양 dish의 표면 전체에 단층으로 확산되어 성장하는 것으로 알려져 있다(Kwon and Mugiya, 2004). 최근, 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 간세포 배양에서 보다 높은 포도당 생산, 알부민 합성, Vitellogenin(VTG), cytochrome P450의 활성화 및 ATP-binding cassette(ABC) transporter 발현을 포함하여 다양한 기능을 나타낸다는 보고되고 있다(Lammel et al., 2019). 또한, 어류의 두신(Head kidney)은 전신 스트레스 반응 조직 및 림프구의 조직으로서 면역 반응에 중요 역할로 많은 세포배양에 이용되고 있다(Khansari et al., 2017). 무지개 송어를 이용하여 activin의 처리를 통한 뇌하수체 세포 배양에서 Gth I 및 II의 분비를 확인하였으며(Kim et al., 1999),

Sprague-dawley의 뇌와 뇌하수체를 분리하여 배지에 염화칼륨을 농도별로 처리하여 GnRH 및 Gth mRNA level을 측정하여 Tyrosine hydroxylase(TH) activity를 확인하였다 (Arbogast and Voogt, 1997).

뇌하수체는 내분비계의 중요한 구성 요소 중 하나로 시상하부와 함께 다른 내분비계의 기능에 큰 영향을 나타내며, 성장과 발달, 신진 대사, 생식 및 신경계 기능에 중요한 호르몬을 분비하는 기관으로 뇌하수체의 세포를 배양하여 다양한 연구가 진행되고 있다(Ooi and Escalona, 2004).

이와 같이 생체 내의 호르몬 변화에 관한 연구는 시상하부, 뇌하수체 및 간장세포의 초대배양을 통하여 *in vitro* 실험이 이루어졌으며, 본 연구에서도 미성숙 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 이용하여 *in vitro*에서 시상하부, 뇌하수체 및 간 세포를 배양하여 각 조직에 성 성숙 호르몬 차단물질로 알려진 Dopamine(Da), steroid 및 non-steroid Aromatase inhibitor(AI)의 Anastrozole(Ana), Exemestane(Exe) 그리고 항에스트로겐의 기능을 가진 Tamoxifen(Tam) 4가지 화학물질을 농도별로 배양액에 섞은 후 호르몬 관련 유전자인 GnRH, Gth, ER 및 VTG mRNA level의 변화를 조사하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포배양

시상하부 및 뇌하수체 세포 배양은 평균 중량 400 ± 12 g의 미성숙 암컷 넙치 6 마리를 2 phenoxyethanol(Sigma, USA) 50 ppm으로 마취 후 시상하부, 뇌하수체 조직을 분리하였다. 분리된 시상하부 및 뇌하수체 조직은 50 ml corning tube에 옮겨 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)로 3회 세척 후 1 mg/ml trypsin에서 25 °C에서 10분간 반응 후, 1 mg/ml trypsin inhibitor로 trypsin의 분해능을 억제시켰다. 억제시킨 조직에 25 mg/ml DNase I 을 첨가 후 1 mM EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)가 첨가된 HBSS로 세척 후, nylon mesh로 세포를 분리하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리 후 3 ml의 RPMI 1640(Sigma, USA) 배지를 첨가하여 현탁시켰다. 현탁시킨 세포들은 trypan-blue exclusion method로 cell test를 거쳐 농도를 3×10^4 개의 농도로 맞춰 RPMI 1640 배지에 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin 및 10 % FBS(Fetal Bovine Serum, Sigma, USA)를 첨가 후 petri dish에 넣어 25 °C에서 3일간 free culture 하였다. 3일간 free culture 후 대조구, E2(Abcam, USA) 2×10^{-7} M, E2와 Da를 각각 2×10^{-7} M 첨가한 혼합구, Da 단독 2×10^{-7} M, 2×10^{-8} M 및 2×10^{-9} M 첨가실험구의 총 6개의 실험구를 설정하였다. 대조구에는 RPMI 1640에 Da(Abcam, USA)을 녹인 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하였다. 세포는 6일간 매일 배양액을 갈아주었다.

간장세포 배양은 중량 380 ± 16 g의 미성숙 암컷 넙치를 2 phenoxyethanol(Sigma, USA) 50 ppm으로 마취 후 복부를 절개하여 간을 적출 후 lingel 용액으로 세척 후 Ca^{++} free 용액을 이용하여 간문맥을 통해 혈액 등 불순물을 제거하였다. 이후 collagenase(Sigma, USA)가 포함된 BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma, USA) 용액으로 간을 소화시킨 후 $Ca^{++}Mg^{++}$ free 용액으로 효소의 활성을 억제하여 간을 잘게 저미었다.

간장 세포(Hepatocyte) 분리는 50 ml의 Ca^{++} free 용액을 첨가 후 cell을 nylon mesh를 통과시켜 분리하여 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 모인 pellet의 세포는 3 ml의 RPMI 1640(Sigma, USA) 배지를 첨가하여 현탁시켰다. 현탁시킨 세포들은 trypan-blue exclusion method로 cell test를 거쳐 농도를 3×10^6 개의 농도로 맞춰 RPMI 1640 배지에 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin 및 10 % FBS(Fetal Bovine Serum, Sigma, USA)를 첨가 후 petri dish에 넣어 25 °C에서 3일간 free culture 하였다. 3일간 free culture 후 대조구, E2(Abcam, USA) 2×10^{-7} M, E2 및 Ana(Sigma, USA), Exe(Sigma, USA) 및 Tam(Sigma, USA)을 각각 2×10^{-7} M 첨가한 혼합구, Ana, Exe 및 Tam 단독 2×10^{-7} M, 2×10^{-8} M 및 2×10^{-9} M 총 6개의 실험구를 설정하였다. 대조구에는 RPMI 1640에 AI 및 Tam을 녹인 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하였다. 세포는 6일간 매일 배양액을 갈아주었다.

2.2. 시료로부터의 RNA 추출 및 cDNA 합성

시상하부, 뇌하수체 및 간장세포에서 total RNA 추출은 실험 시작 후 3일 째 및 6일 째 ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System kit(Promega, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하였다. Total RNA concentration은 Thermo Scientific uDrop Plate(Thermo Scientific, Germany)로 측정하였고, cDNA는 A260/280 ratio가 1.8 – 2.0이 되는 500 ng의 total RNA를 PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa, Japan)로 제조사의 프로토콜에 따라 합성하였으며, 합성된 cDNA는 Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용하였다.

2.3. Quantitative PCR 분석

시상하부 및 뇌하수체 세포의 Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용된 primer는 *in vitro*의 시상하부 및 뇌하수체 GnRH, Gth 및 ER mRNA level의 변화를 확인하기 위하여 GnRH, Gth 및 ER 각각의 forward 및 reverse primer를 National Center for Biotechnology Information(NCBI)를 사용하여 디자인하였으며, Table 1에 나타내었다. qPCR 분석은 TOPreal™ qPCR 2 × PreMIX (SYBR Green with low ROX) (Enzynomics, Daejeon, Korea)을 이용하여 Thermal Cycler DiceR® Real Time System Single(TaKaRa, Japan)로 분석하였다. PCR cycling은 initial denaturation 95 °C 10 min, denaturation 95 °C 10 sec, annealing 58 °C 30 sec 40 cycles, elongation 72 °C 20 sec, melting curve 1 min의 조건으로 수행하였다.

간장세포의 Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용된 primer는 *in vitro* 생식소 및 간에서의 ER 및 VTG mRNA level의 변화를 확인하기 위하여 ER 및 VTG 각각의 forward 및 reverse primer를 National Center for Biotechnology Information(NCBI)를 사용하여 디자인하였으며, Table 2에 나타내었다. qPCR 분석은 TOPreal™ qPCR 2 × PreMIX(SYBR Green with low ROX) (Enzynomics, Daejeon, Korea)을 이용하여 Thermal Cycler DiceR® Real Time System Single(TaKaRa, Japan)로 분석하였다. PCR cycling은 initial denaturation 95 °C 10 min, denaturation 95 °C 10 sec, annealing 58 °C 30 sec 40 cycles, elongation 72 °C 20 sec, melting curve 1 min의 조건으로 수행하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers used for Quantitative PCR (qPCR) *in vitro*, *in vivo* cell and tissue of hypothalamus, pituitary

Gene	Nucleotide sequence (5' → 3')
GnRH F	ATG TGC TGG TGG AAC CTG ACG C
GnRH R	TGG CTG CTG TGG TGA ATG TGG G
Gth F	AGC TTC GAC TGT CGT CCA AC
Gth R	CAG CAC CGA GTA CAT CTC CA
ER F	TGG CTG AGA TCT TCG ACA TGC
ER R	TGT CCT GAA CTG GCT GAA GA
Beta actin F	TGA ACC CTA AAG CCA ACA GGG AGA
Beta actin R	TGA TGC TGT TGT AGG TGG TCT CGT

Table 2. Oligonucleotide primers used for Quantitative PCR (qPCR) *in vitro*, *in vivo* gonad and liver

Gene	Nucleotide sequence (5' → 3')
VTG F	AGC TTC GAC TGT CGT CCA AC
VTG R	CAG CAC CGA GTA CAT CTC CA
ER F	TGG CTG AGA TCT TCG ACA TGC
ER R	TGT CCT GAA CTG GCT GAA GA
Beta actin F	TGA ACC CTA AAG CCA ACA GGG AGA
Beta actin R	TGA TGC TGT TGT AGG TGG TCT CGT

2.4. 통계학적 분석

본 실험의 데이터 결과는 IBM SPSS Statistics 21.0(SPSS Inc., USA)을 활용하여 one-way ANOVA-test로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 실시하여 측정하였으며, $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

3. 결과

3.1. 시상하부, 뇌하수체 및 간장 배양세포 현미경 관찰

미성숙 암컷 넙치의 시상하부, 뇌하수체 및 간장의 세포배양 과정 중 현미경을 사용하여 세포를 관찰하였다. 그 결과, 시상하부 및 간장 세포는 배양 시작할 때 보다 배양 24시간이 지난 후부터 plate에 점차적으로 부착하였으며, 세포는 배양 과정 중 응집하는 경향이 있는 것을 확인하였다(Fig. 1 A, C). 반면, 뇌하수체 세포는 배양 과정 중 24시간이 지나도 plate에 부착하지 못하였으나 30시간이 지난 후 점차 응집 및 세포 분열을 관찰할 수 있었다(Fig. 1 B). Free culture 3일째, 세포들의 응집 및 분열을 통하여 plate에 안정적으로 부착한 것을 현미경으로 검경 후, 다음 날부터 각 호르몬이 첨가된 배지를 plate에 투여하여 세포들을 자극하였으며, 이후의 세포의 형태 및 수량에는 free culture의 세포들과 큰 차이를 나타내지 않았다.

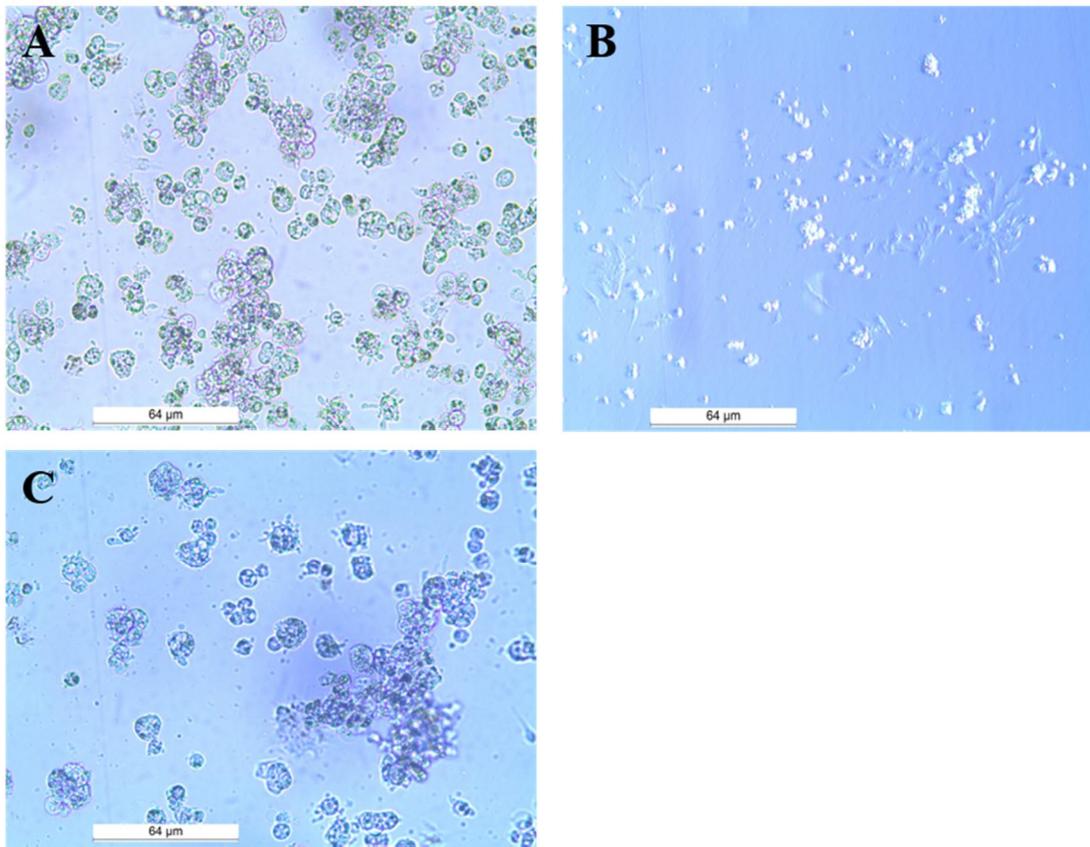


Figure 1. Photographs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) hypothalamus, pituitary and liver cell culture microscopic observation. (A) The hypothalamus cell of olive flounder was cultured. (B) The pituitary cell of olive flounder was cultured. (C) The liver cell of olive flounder was cultured.

3.2. 시상하부 및 뇌하수체 세포에 Dopamine 투여 후 GnRH, Gth 및 ER mRNA level 변화

배양 시상하부 세포에 Da 투여 후, GnRH mRNA level 변화량은 E2를 투여한 실험구에서 실험 3일 및 6일째 모두 대조구에 비해 GnRH mRNA level이 증가하였다. E2 및 Da 혼합 투여 실험구에서의 GnRH mRNA level은 실험 3일 째 1.209 ug/ml로 E2 투여 실험구 1.311 ug/ml 보다 증가하지 않았지만, 대조구 1.093 ug/ml 보다는 증가하였으며, 6일 째 E2 투여 실험구 1.537 ug/ml 보다 감소하였다. Da 단독 투여한 실험구에서의 GnRH mRNA는 2×10^{-8} M에서 가장 낮은 수치인 0.214 ug/ml를 나타냈지만, 2×10^{-8} M 보다 농도가 높은 2×10^{-7} M에서 GnRH mRNA는 높게 나타났으며, 2×10^{-9} M 농도에서의 GnRH mRNA level은 대조구와 비교하였을 때 유의성($P < 0.05$)은 없었지만, GnRH mRNA level에 영향을 나타내지는 못하였다(Fig. 2). 따라서, 시상하부 GnRH mRNA level은 Da의 영향으로 DMSO를 투여한 대조구와 비교하였을 때, 전체적인 감소를 나타내었다.

배양 뇌하수체 세포에 Da 투여 후, Gth mRNA level은 대조구와 비교하였을 때 증가하였으며, Da를 투여한 모든 실험구에서는 감소하였다. Da의 농도에 따른 Gth mRNA level의 변화에서 GnRH mRNA level과 유사하게 2×10^{-8} M 농도에서 가장 낮게 발현하였다(Fig. 3). 뇌하수체에서 Da의 영향은 시상하부의 GnRH mRNA level 보다 큰 변화는 나타내지 않았지만, Gth mRNA level이 DMSO를 투여한 대조구와 비교하였을 때, 전체적인 감소를 나타내어 뇌하수체에도 직접적인 영향을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

한편, Da 투여 후 시상하부에서의 ER mRNA level 변화량은 GnRH 및 Gth mRNA level과 유사하게 전반적인 감소를 나타내었다. E2를 투여하였을 때, 시상하부에서의 ER mRNA level은 1.591 ug/ml로 GnRH 및 Gth mRNA level 동일하게 증가하였으며, Da와

E2 혼합 및 Da 단독 투여 실험구에서는 3일째 1.138 ug/ml 및 6일째 0,824 ug/ml로 대조구 3일째 1.316 ug/ml 및 6일째 1.470 ug/ml과 비교하였을 때, 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 4). 이와 같이 시상하부에서 ER mRNA level은 GnRH 및 Gth mRNA level과는 다르게 2×10^{-8} M 농도가 아닌 고농도의 2×10^{-7} M 농도에서 0.460 ug/ml으로 가장 낮은 ER mRNA level을 나타내었다(Fig. 4). 따라서, 시상하부 ER mRNA level은 Da의 영향으로 DMSO를 투여한 대조구와 비교하였을 때, 감소를 나타내었다.

이와 같은 결과들로 Da는 시상하부 GnRH 및 ER mRNA level, 뇌하수체 Gth mRNA level의 감소를 유도할 수 있음을 확인하였다.

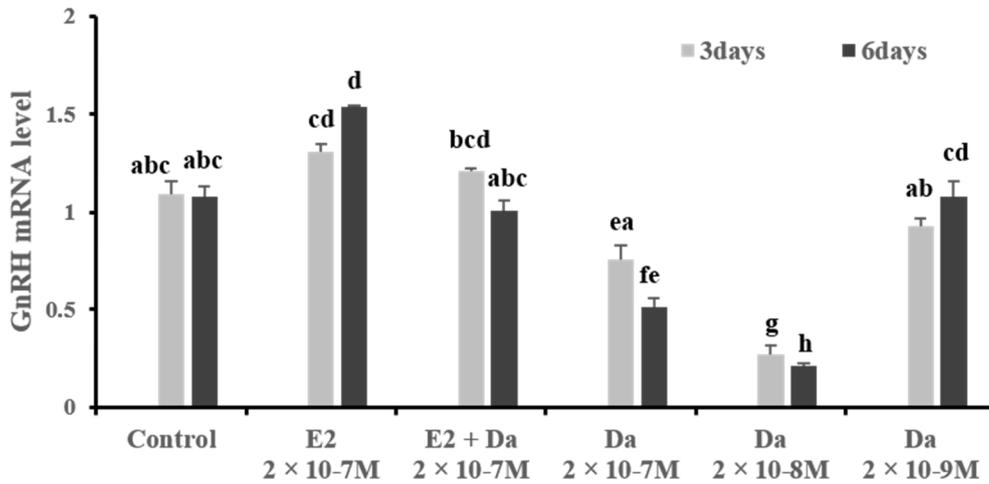


Figure 2. Expression of GnRH mRNA level in the hypothalamus cell of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Dopamine (Da) of 2×10^{-7} M each, Dopamine (Da) of 2×10^{-7} M, Dopamine (Da) of 2×10^{-8} M and Dopamine (Da) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

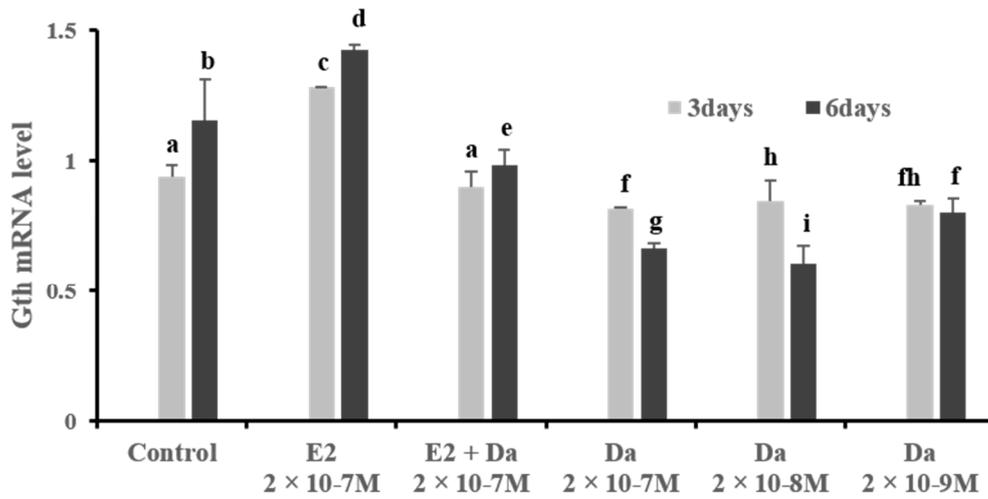


Figure 3. Expression of Gth mRNA level in the pituitary cell of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of $2 \times 10^{-7}M$, Estrogen (E2) + Dopamine (Da) of $2 \times 10^{-7}M$ each, Dopamine (Da) of $2 \times 10^{-7}M$, Dopamine (Da) of $2 \times 10^{-8}M$ and Dopamine (Da) of $2 \times 10^{-9}M$. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

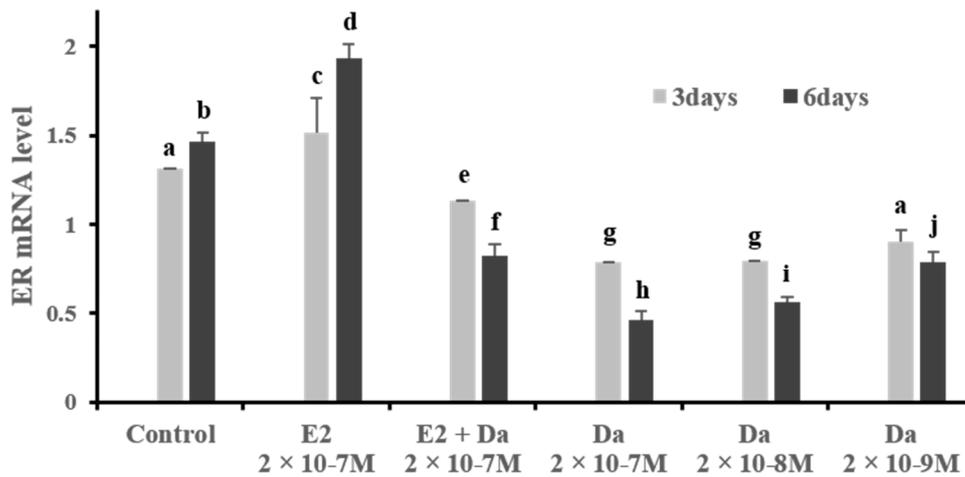


Figure 4. Expression of ER mRNA level in the hypothalamus cell of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of $2 \times 10^{-7}M$, Estrogen (E2) + Dopamine (Da) of $2 \times 10^{-7}M$ each, Dopamine (Da) of $2 \times 10^{-7}M$, Dopamine (Da) of $2 \times 10^{-8}M$ and Dopamine (Da) of $2 \times 10^{-9}M$. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

3.3. 간장 세포에 Aromatase inhibitors 투여 후 ER 및 VTG mRNA level의 변화

3.3.1. Anastrozole에 의한 변화

배양 간장 세포에 Ana의 E2 혼합 및 단독 투여 후, ER 및 VTG mRNA level은 대조구에 비해 전체적으로 감소하였다. E2를 투여한 실험구에서의 ER mRNA level은 3일 2.509 ug/ml 및 6일째 3.305 ug/ml로 유의적인 증가로 vitellogenesis의 형성을 확인하였으며, E2 및 Ana의 혼합 투여 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구와 비교하였을 때, 투여 후 3일째 유의적인 증가를 나타내었지만, 6일째 ER mRNA level은 대조구 1.643 ug/ml과 비교하였을 때, 1.589 ug/ml로 유사한 발현량을 나타내었다. Ana의 세 단계 농도별 투여 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구와 비교하였을 때, ER mRNA level이 유의적인 감소를 나타내었다. 세 단계의 농도별 처리 Ana의 단독 실험구에서의 ER mRNA level은 2×10^{-7} M에서 0.717 ug/ml 및 2×10^{-8} M에서 0.691 ug/ml로 낮았으며, 두 실험구 간의 유의차는 없었다(Fig. 5). Ana의 E2 혼합 및 단독 투여 실험구에서의 VTG mRNA level은 ER mRNA level과 유사한 변화량을 나타내었다. E2와 Ana의 혼합 투여 실험구에서의 VTG mRNA level은 1.272 ug/ml 및 1.009 ug/ml로 대조구 및 E2로 vitellogenesis로 형성시킨 실험구보다 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 시간이 지남에 따라 지속적인 감소를 나타내었다. 세 단계의 농도별 Ana의 투여 실험구에서 모두 시간이 지남에 따라 VTG mRNA level이 유의적인 감소를 나타내었으며, 2×10^{-7} M 농도에서 0.744 ug/ml로 가장 큰 감소를 나타내었다. E2 및 Ana 혼합 투여 실험구와 Ana 단독 투여 실험구의 2×10^{-9} M 농도의 VTG mRNA level은 각각 1.272 ug/ml과 1.241 ug/ml로 유사한 변화량을 나타내었다(Fig. 6). 따라서, 대조구 DMSO를 투여한 간장세포 대조구와 비교하였을 때, Ana의 투여는 ER 및 VTG mRNA level이 전체적으로 감소를 나타내어 간장세포에 직접적인 영향을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

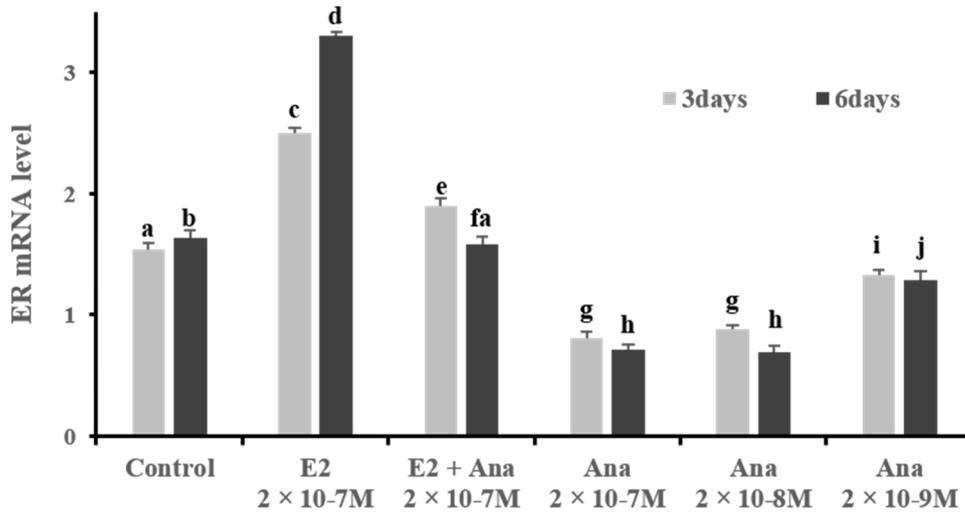


Figure 5. Expression of ER mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of 2×10^{-7} M, Estrogen (E2) + Anastrozole (Ana) of 2×10^{-7} M each, Anastrozole (Ana) of 2×10^{-7} M, Anastrozole (Ana) of 2×10^{-8} M and Anastrozole (Ana) of 2×10^{-9} M. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

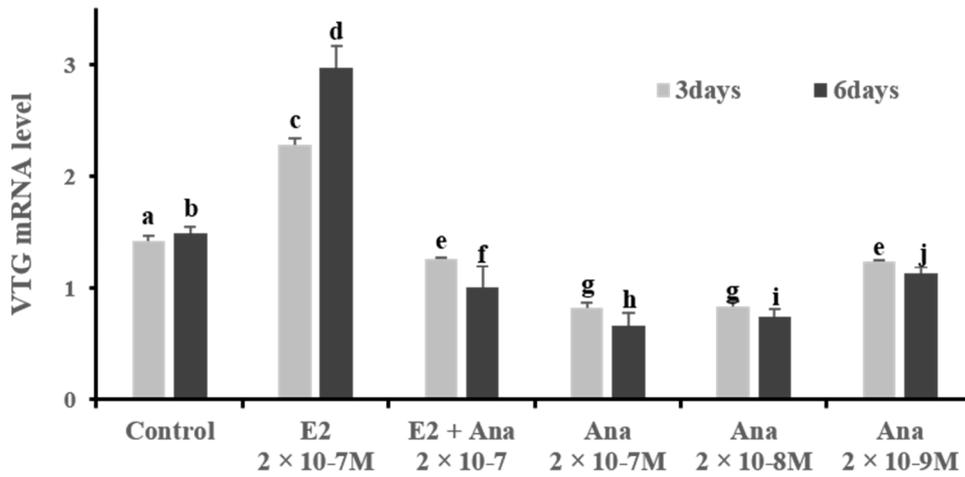


Figure 6. Expression of VTG mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of $2 \times 10^{-7} M$, Estrogen (E2) + Anastrozole (Ana) of $2 \times 10^{-7} M$ each, Anastrozole (Ana) of $2 \times 10^{-7} M$, Anastrozole (Ana) of $2 \times 10^{-8} M$ and Anastrozole (Ana) of $2 \times 10^{-9} M$. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

3.3.2. Exemestane에 의한 변화

배양 간장세포에 Exe의 E2 혼합 및 단독 투여 후, ER mRNA level은 대조구에 비해 전체적으로 감소하였다. E2를 투여한 실험구의 ER mRNA level 3일째 및 6일째 유의적인 증가로 vitellogenesis의 형성을 확인하였으며, E2 및 Exe의 혼합 투여 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구와 비교하였을 때, 모두 유의적인 감소를 나타내었다. E2와 Exe 혼합 투여 실험구에서의 ER mRNA level 변화량은 대조구인 DMSO를 투여한 실험구와 유의적인 감소를 나타냈을 뿐 아니라, 시간이 지남에 따라 1.011 ug/ml에서 0.916 ug/ml로 지속적으로 감소하였다. 세 단계의 농도별 Exe의 단독 실험 처리구인 2×10^{-7} M 농도에서 0.421 ug/ml로 가장 낮은 ER mRNA level을 확인하였으나, Exe의 투여 시간에 따라 3일째 ER mRNA level은 0.421 ug/ml에서 0.492 ug/ml로 6일째 유의성 있는 증가를 나타내었으며, 저농도인 2×10^{-7} M 실험구에 비해 높은 ER mRNA level을 나타내었다(Fig. 7).

배양 간장 세포에 Exe의 E2 혼합 및 단독 투여 후, VTG mRNA level은 대조구 및 E2를 이용하여 vitellogenesis로 형성 시킨 실험구와 비교하였을 때, 유의성 있는 감소를 나타내었다. Exe의 E2와 혼합 투여 실험구에서의 VTG mRNA level 변화량은 Ana와 유사한 변화량을 나타내었다. 농도별 Exe 단독 투여 실험구에서의 VTG mRNA level의 변화량은 2×10^{-7} M 및 2×10^{-8} M 농도에서 0.477 ug/ml 및 0.763 ug/ml로 가장 낮은 발현을 나타내었다. 2×10^{-9} M 농도에서 VTG mRNA level의 변화량은 대조구 1.565 ug/ml 및 1.624 ug/ml에 비해 1.401 ug/ml 및 1.383 ug/ml의 유의성 있는 감소를 나타내었지만, 시간이 지남에 따라 유의성 있는 변화량은 나타나지 않았다(Fig. 8). 따라서, DMSO를 투여한 간장세포 대조구와 비교하였을 때, Exe의 투여는 ER 및 VTG mRNA level이 전체적인 감소를 나타내어 간장세포에 직접적인 영향을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

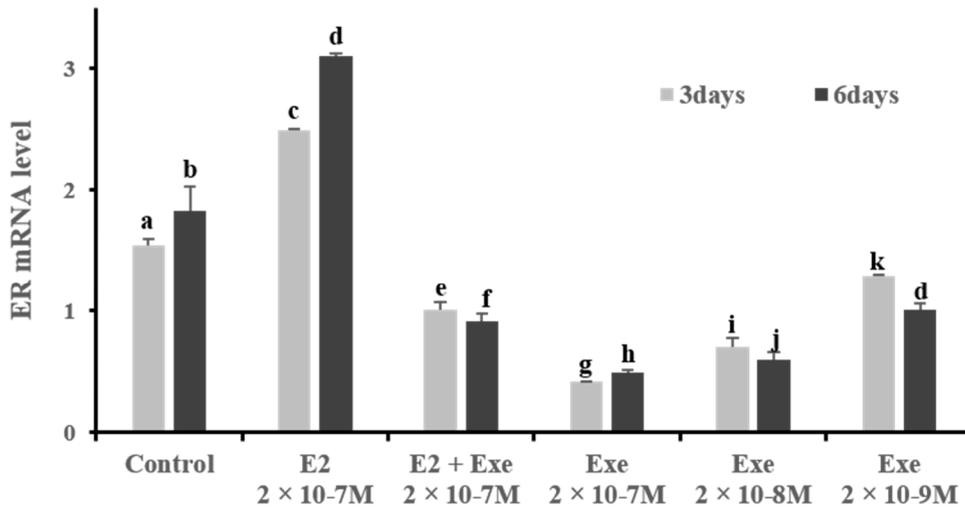


Figure 7. Expression of ER mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of $2 \times 10^{-7}M$, Estrogen (E2) + Exemestane (Exe) of $2 \times 10^{-7}M$ each, Exemestane (Exe) of $2 \times 10^{-7}M$, Exemestane (Exe) of $2 \times 10^{-8}M$ and Exemestane (Exe) of $2 \times 10^{-9}M$. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

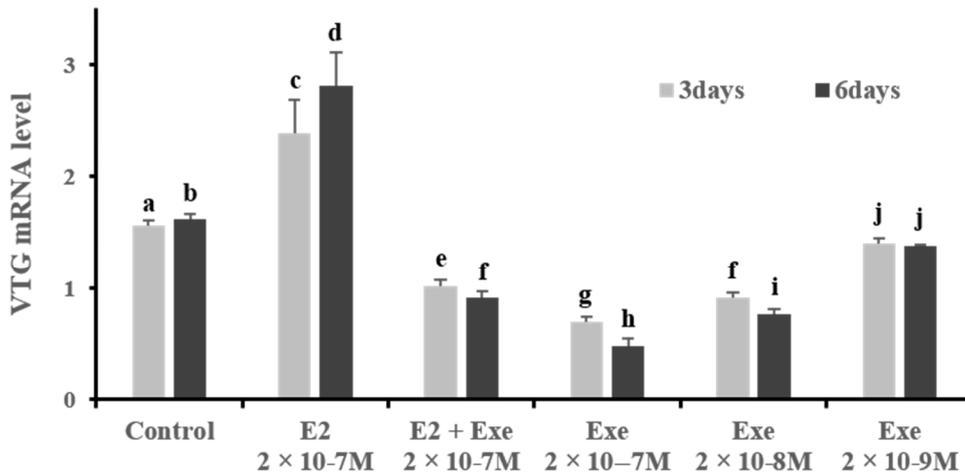


Figure 8. Expression of VTG mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of $2 \times 10^{-7}M$, Estrogen (E2) + Exemestane (Exe) of $2 \times 10^{-7}M$ each, Exemestane (Exe) of $2 \times 10^{-7}M$, Exemestane (Exe) of $2 \times 10^{-8}M$ and Exemestane (Exe) of $2 \times 10^{-9}M$. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

3.3.3. Tamoxifen에 의한 변화

배양 간장 세포에 항에스트로겐 기능을 가진 Tam 투여 후, VTG mRNA level의 변화량은 Tam과 E2 혼합 및 Tam 단독 투여 실험구 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다. E2를 투여한 실험구에서의 VTG mRNA level은 3일 2.080 ug/ml 및 6일째 2.623 ug/ml로 유의적인 증가로 vitellogenesis 형성을 확인하였으며, E2 및 Tam의 혼합 투여 실험구에서의 VTG mRNA level은 대조구 1.269 ug/ml 및 1.804 ug/ml와 비교하였을 때, 1.192 ug/ml 및 1.058 ug/ml의 유의적인 감소를 나타내었다. E2 및 Tam 혼합 투여 실험구에서의 VTG mRNA level 변화량은 유의적인 감소를 나타냈을 뿐 아니라, 시간이 지남에 따라 1.192 ug/ml에서 1.058 ug/ml로 지속적인 감소를 나타내었다. 세 단계의 농도별 Tam 단독 실험 처리구의 2×10^{-7} M 농도에서 0.671 ug/ml로 6일째 가장 낮은 VTG mRNA level을 확인하였으며, 저농도의 2×10^{-9} M의 투여 실험구에서 시간이 지남에 따라 0.945 ug/ml에서 1.106 ug/ml으로 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 9).

배양 간장 세포에 Tam을 투여 후, ER mRNA level의 변화량은 E2 및 Tam의 혼합 투여 및 Tam 단독 실험구에서의 대조구와 비교하였을 때, 유의적으로 감소하였으며, 시간이 지남에 따라 유의적인 감소를 나타내었다. 세 단계의 농도별 Tam을 배양 간장 세포에 투여 후, ER mRNA level은 모두 시간이 지남에 따라 유의적으로 감소하였으며, 2×10^{-7} M 농도에서 0.662 ug/ml로 가장 낮은 발현량을 나타내어 농도에 의존적인 감소를 나타내었다(Fig. 10). 따라서, 대조구 DMSO를 투여한 간장세포 대조구와 비교하였을 때, Tam의 투여는 ER 및 VTG mRNA level이 전체적인 감소를 나타내었으며, 저농도인 2×10^{-9} M 농도에서도 감소를 나타내 농도에 의존적임을 확인하였다.

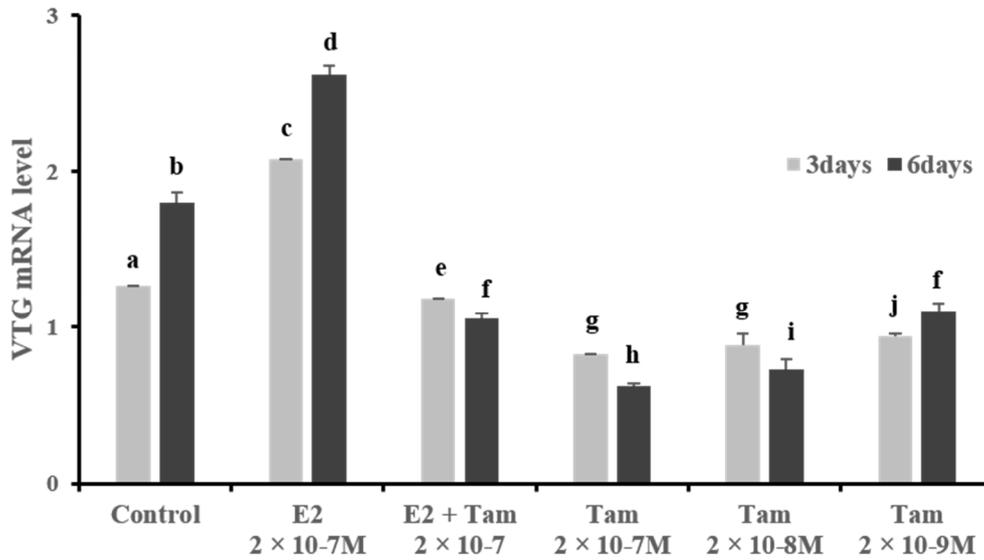


Figure 9. Expression of VTG mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of $2 \times 10^{-7}M$, Estrogen (E2) + Tamoxifen (Tam) of $2 \times 10^{-7}M$ each, Tamoxifen (Tam) of $2 \times 10^{-7}M$, Tamoxifen (Tam) of $2 \times 10^{-8}M$ and Tamoxifen (Tam) of $2 \times 10^{-9}M$. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

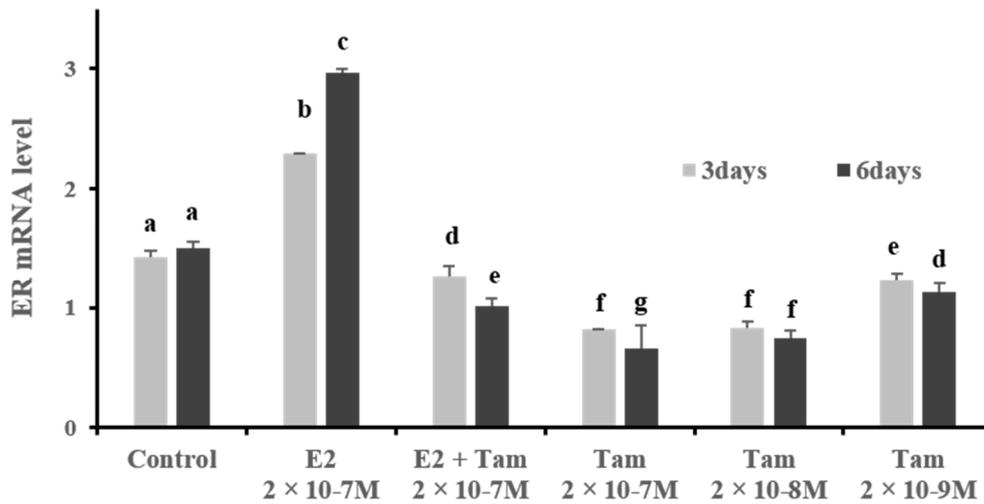


Figure 10. Expression of ER mRNA level in the hepatocyte of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were treated with DMSO (control), Estrogen (E2) of $2 \times 10^{-7}M$, Estrogen (E2) + Tamoxifen (Tam) of $2 \times 10^{-7}M$ each, Tamoxifen (Tam) of $2 \times 10^{-7}M$, Tamoxifen (Tam) of $2 \times 10^{-8}M$ and Tamoxifen (Tam) of $2 \times 10^{-9}M$. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

4. 고찰

이번 연구는 미성숙 암컷 넙치 시상하부, 뇌하수체 및 간 조직을 분리하여 각각의 세포를 배양 후, 미성숙 시기와 성숙시기를 구분하기 위하여 E2를 처리하였다.

GnRH에서 Gth로 분비를 억제시키는 화학물질인 Da를 처리하여 시상하부에서 생성되는 GnRH 및 ER mRNA level, 뇌하수체에서 분비되는 Gth mRNA level의 변화를 확인하였다. 또한, 생식소 및 간에서 작용하는 화학물질인 AI 두 종류 Ana, Exe 및 Tam을 배양 간장 세포에 처리하여 ER mRNA 및 VTG mRNA level의 변화량을 확인하였다. 그 결과, 각 화학물질들은 시상하부, 뇌하수체 및 간에서 발현되는 유전자의 변화량을 확인할 수 있었다. 중국 미꾸라지(*Paramisgurnus dabryanus*)에 Da를 근육 주사 후, 1시간 이내에 GnRH 및 Gth가 억제되었으며, Da를 Da 수용체의 길항제인 domperidone과 동시 근육 주사 후 역시 혈청의 Gth를 감소시켜 Da가 GnRH 자극 및 Gth 방출을 차단함으로써 Gth의 방출 억제 인자로 기능을 한다고 보고되었다(Lin et al., 1989). 이번 연구에서 미성숙 암컷 넙치 시상하부 및 뇌하수체 세포에 Da를 처리한 결과 3일 및 6일째 모두 GnRH, ER 및 Gth mRNA level은 전체적인 감소를 나타내었으며, 이러한 결과는 중국 미꾸라지의 연구결과와 유사하게 나타내었다. 따라서, Da는 단시간 내, 시상하부 및 뇌하수체에 직접적인 영향을 나타낼 수 있다는 것을 확인하였다.

E2는 다양한 신경 전달 물질 시스템에 있어 신호 전달을 변경하여 다양한 인지 과정에 영향을 미친다(Almey and Brake, 2015). E2는 Da 방출, 재흡수 및 Da 수용체 활성화에 영향을 미치는 기능적 활동에 급성 및 만성적 효과를 모두 가지며, 외인성으로 투여된 E2는 D2 수용체 결합에 큰 효과를 갖는다고 보고되었다(Becker and Rudick, 1999). 반면, E2의 또 다른 기능으로 Da 뉴런에 대하여 down-stream의 효과를 나타내며, 마우스의 뇌하수체 세포에 E2를 전 처리 하였을 때, adenylate cyclase 활성화로 인하여 D2

수용체 억제제가 감소되고 adenylate cyclase의 D1 수용체 활성화가 증가하며(Maus et al., 1989), E2에 의해 D2 수용체 신호 전달과 관련된 GTPase 활성화 단백질(GAP)인 G-protein Signaling 9-2(RGS 9-2)의 발현을 감소시키는 기능을 가진다고 보고되었다(Sliverman and Koenig, 2007). 이번 시상하부 및 뇌하수체 세포 배양 연구에서 E2 및 Da 혼합 실험구에서의 GnRH mRNA level은 감소하였지만, Da 단독 투여 실험구 보다 감소하지 않았다. Gth mRNA level 역시 E2 및 Da의 혼합 실험구에서 감소하였지만, Da 단독 투여 실험구 보다 감소하지 않았다. 또한, 시상하부 및 뇌하수체 세포에 E2 및 Da 혼합 투여 배지를 처리 후, 3일째 및 6일째 GnRH mRNA level은 시간이 지남에 따라 감소한 반면, Gth mRNA level은 증가를 나타내었다. 따라서, 이 결과는 E2가 시간이 지남에 따라 Da가 시상하부에서 E2의 plus적인 요인으로 작용하여 GnRH mRNA level을 감소시키는 기능을 나타낼 것으로 생각되었으며, 뇌하수체에서는 마우스의 선행 연구 결과에 따라 E2에 의해 D2 수용체 신호 전달에 RGS 9-2의 발현을 감소시켜 Gth mRNA level이 증가된 것으로 추정할 수 있었다. 이처럼, E2의 기능은 plus 및 minus 작용으로 Da의 기능을 조절 할 수 있음을 확인할 수 있었다.

Da를 3단계의 농도로 시상하부 및 뇌하수체 세포를 자극한 결과 $2 \times 10^{-8}M$ 농도에서 가장 낮은 GnRH mRNA level이 발현되었으며, 이것은 Da의 농도가 GnRH mRNA의 발현에 영향을 미치는 것으로 생각되었다. 하지만, 선행 연구에서 Da의 농도에 따른 연구 결과들은 아직 보고되지 않았다. 이번 세포배양 연구에서 Da의 농도 별 자극 결과를 바탕으로 선행 연구들의 시상하부 및 뇌하수체 세포의 GnRH neuron 및 Da 수송체의 변화를 살펴 구체적인 Da의 농도에 따른 기작에 관한 연구가 필요하다 생각된다. 이번 시상하부 및 뇌하수체 세포배양 연구에서 Da는 시상하부 세포의 GnRH mRNA 합성에 직접적으로 작용하여 Gth를 억제시키며, 뇌하수체 세포의 Gth mRNA 합성에도

작용하여 낚치의 성 성숙 억제가 가능한 것을 알 수 있었다.

AI는 생식소 여포세포에서 *aromatase*와 결합하여 *testosterone*에서 E2로 전환을 차단하는 화학물질로 알려져 있지만, ER의 활성을 억제시키는 기능 또한 가지고 있어 ER이 활성화 되는 부위 중 하나인 간세포에서 작용을 알아보았다. 그 결과, 생식소가 아닌 간에서 ER 및 VTG mRNA level이 감소를 나타내었으며, 이와 같은 결과들은 Ana 및 Exe 모두 여포세포에서 *aromatase*와 결합하는 AI 기능이 아닌 ER 및 VTG mRNA의 합성을 억제할 수 있는 또 다른 기능을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

항에스트로겐 기능을 가진 Tam은 많은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 ER 길항제로 알려져 있다(Custodio et al., 1994; Obata and Kubota, 2000). 더욱이 E2 이외의 steroid는 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 간장 세포 배양 연구에서 E2 투여 시, ER을 통해 VTG gene 발현을 증가시킬 수 있으며, 이러한 VTG gene의 증가는 Tam에 의해 완전히 억제될 수 있다고 보고되었다(Mori, Sumiya and Yokota, 2000). 이번 연구에서 VTG mRNA level은 E2 및 Tam의 혼합, Tam 단독 투여 실험구 모두 VTG mRNA 합성이 억제되었다. 이 결과 Tam은 ER과 결합으로 E2 작용을 억제하여 ER mRNA level이 감소됨을 알 수 있었다. 또한, E2 및 Tam 혼합 투여 실험구에서의 VTG 및 ER mRNA level은 감소를 나타냈다. 이러한 결과는 Tam은 ER과 결합 후, Tam/ER 결합체가 ER mRNA 발현도 억제시키는 작용으로 E2의 작용을 강하게 억제 시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

이번 *in vitro* 연구 결과 Da는 시상하부 및 뇌하수체에 직접적인 작용을 나타내 성 호르몬 관련 유전자 GnRH, Gth 및 ER mRNA level을 감소시켜 성 성숙 억제에 효능이 있을 것으로 생각된다. 또한, 여포세포에서 E2로의 전환을 차단하는 기능을 가진 AI는 간장 세포에 직접적으로 ER 및 VTG mRNA level을 감소시켜 생식소가 아닌 간에서도 작용할 수 있음을 알 수 있었으며, Tam 역시 기존의 항에스트로겐의 역할을 나타낼 뿐 아

니라 ER/Tam 복합체가 ER mRNA 자체를 억제하여 성 성숙 억제에 효능이 있을 것이라 판단하였다. 이러한 결과들을 바탕으로 *in vivo* 실험을 수행하였다.

제 3 장

미성숙 암컷 넙치를 이용한 Dopamine에 의한 성 성숙 억제

1. 서론

포유류와 어류의 성분화는 거의 비슷하지만, 포유류는 어미의 배속에서 성별이 구분되어 태어나며, 어류는 알에서 나온 뒤 환경적인 요인 즉, 수온, 광주기 및 유전적 조절과 같은 요인들로 인하여 성 분화가 나타나는 차이점을 나타낸다. 척추동물의 생식은 계층적으로 조직된 내분비 시스템에 의해 조절된다. 척추동물의 성공적인 생식은 brain-pituitary-gonad axis(BPG axis)에 따른 내분비기관이 담당하고 있으며, 뇌의 시상하부에서 생성되는 생식선자극호르몬 방출호르몬 인 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), 뇌하수체에서 합성되는 생식선자극호르몬 Gonadotropin(Gth) 및 생식선에서 분비되는 성호르몬에 의해 결정된다(Baum, 1979; Tobet and Fox, 1992). GnRH는 뇌하수체로부터 Gth의 분비를 자극하고 Gth는 난소로부터 성숙유도 스테로이드의 합성과 최종성숙 및 배란을 자극한다(Nagahama et al., 1985). 척추동물에서 GnRH는 뇌하수체 생식선으로부터 황체형성호르몬인 luteinizing hormone(LH)와 여포자극호르몬인 follicle stimulating hormone(FSH)의 합성 및 방출을 조절하며, 스테로이드 생성 및 gametogenesis를 조절한다(Sover et al., 2009). 하지만, 어류는 황체를 형성하지 않으므로 FSH 및 LH는 Gth1 및 Gth2로 표시한다.

Dopamine(Da)은 아드레날린 신경으로부터 신경 전달물질인 norepinephrine을 유리시키고 alpha, beta1 수용체 효능제로 사용되며, GnRH의 Gth 방출효과를 억제하여 그 이후의 과정, 즉 생식선의 발달과 성스테로이드의 분비를 억제하게 된다(Dufour et al., 2005). 또한 번식기능에 있어 중요한 역할을 하는 신경전달물질로, 특히 성선자극호르몬의 변화를 조절함으로써 계절번식 동물에서의 번식 주기를 유지하는데 결정적인 역할을 한다(Han et al., 2005). 또한 혈류를 따라 뇌하수체 전엽(Anterior pituitary)으로 이동되어 성선자극호르몬분비세포인 gonadotropes에 작용하여 Gth인 LH 및 FSH의 분비

를 촉진하고, 이들 Gth는 성선으로부터 Estrogen(E2), progesterone, testosterone 등과 같은 성호르몬 분비를 촉진하며, 이들 성호르몬은 시상하부에 존재하는 GnRH 신경세포의 활성을 조절한다. Da는 십각류, crayfish(*Cambaroides similis*) 및 담수 새우의 생식선 성숙 억제에 효과가 있다고 보고되었으며(Sarojini et al., 1995a; Tinikul et al., 2009a), Da의 길항제인 pimozone를 이용한 쏘가리(*Siniperca scherzeri*)의 배란을 유도하는 연구와 같은 성 성숙을 위한 연구는 이루어 졌지만(Zang et al., 1998), 성 성숙 억제를 위한 Da의 투여에 관한 연구는 아직 활성화되지 않았다.

이번 연구는 미성숙 암컷 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 성호르몬 억제물질로 알려진 Da를 체내 복강주사 하여 호르몬 조절로 인한 성 성숙 호르몬을 억제하는 기술을 확보하고자 실험하였다.

2. 재료 및 방법

2.2. 실험동물 및 Dopamine 처리

평균 350 ± 8 g의 미성숙 암컷 넙치를 제주 양식장에서 구매하여 연구실 수조에 광주기 light : dark = 12 : 12, 수온 18 ± 1 °C 로 3일간 순치 적응시켰다. 실험기간 동안 사료는 공급하지 않았다.

실험에 사용한 호르몬은 대조구로 사용한 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 용매제로 사용하였으며, vitellogenesis 단계를 유도하기 위해 E2 및 Da 2가지 화학물질을 사용하였다. 실험 1일차 순치 적응시킨 넙치 30마리를 2 phenoxyethanol으로 마취 후 E2 및 Da를 DMSO에 녹여 각 5개의 수조별로 대조구, vitellogenesis, vitellogenesis로 유도 후 Da 주사, E2 및 Da의 혼합 주사, Da 단독 실험구로 나눠 어체중 $5 \mu\text{g/g}$ 의 농도로 준비하여 복강주사 하였다.

2.3. Dopamine 처리 후 샘플

실험어에 복강주사 후 3일째 각각의 실험구에서 3마리 넙치를 전장 및 중량을 측정하여 해부 후 시상하부 및 뇌하수체를 적출하였으며, 생식소는 중량 측정 후 유전자 분석용과 조직학 분석용으로 보관하였다. Vitellogenesis 유도 후, Da의 작용을 알아보기 위하여 Da를 2차 주사하였으며, E2 및 Da 혼합 실험구, Da 단독 실험구 역시 Da를 2차 주사하였다. 실험 마지막 날인 6일째 모든 실험구에서의 실험어를 3일째와 같은 방법으로 해부 후 샘플을 보관하였다.

2.4. 시상하부 및 뇌하수체에서의 Total RNA 추출 및 cDNA 합성

시상하부 및 뇌하수체 조직 샘플에 RNAiso plus(TaKaRa, Japan)을 1ml 첨가 후 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 이후 chloroform(Sigma, USA)200 ul를 첨가한 뒤 충분히 inverting하여 실온에서 5 min 간 반응 후, 13,000 rpm에서 10 min 간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 분리하여 동량의 iso-propanol을 첨가하고 inverting 후 실온에서 5 min 반응 시킨 다음 13,000 rpm에서 10 min 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 제거하고 DEPC(Diethylpyrocarbonate) water로 제조된 75 % ethanol 1 ml을 첨가하고 13,000 rpm에서 10 min 원심분리 하였으며, 3회 반복하였다. 이후 상층액을 제거하고 pellet을 완전히 건조시킨 뒤 RNase free water에 녹여 시상하부 및 뇌하수체 조직으로부터 total RNA를 추출하였다. Total RNA concentration은 Thermo Scientific uDrop Plate(Thermo Scientific, Germany)로 측정하였고, cDNA는 A260/280 ratio가 1.8 – 2.0이 되는 500 ng의 total RNA를 PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa, Japan)로 제조사의 프로토콜에 따라 합성하였으며, 합성된 cDNA는 Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용하였다.

2.5. Quantitative PCR 분석

Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용된 primer는 *in vitro*에 사용한 primer를 동일하게 사용하였으며, Table 1에 나타내었다. qPCR 분석은 TOPreal™ qPCR 2 × PreMIX(SYBR Green with low ROX)(Enzynomics, Daejeon, Korea)을 이용하여 Thermal Cycler DiceR® Real Time System Single(TaKaRa, Japan)로 분석하였다. PCR cycling은 initial denaturation 95 °C 10 min, denaturation 95 °C 10 sec, annealing 58 °C 30 sec 40 cycles, elongation 72 °C 20 sec, melting curve 1 min의 조건으로 수행하였다.

2.6. 생식소 중량 지수 관찰

실험기간에 생식소 발달 상태를 조사하기 위해 해부 후 생식소 조직을 전자저울을 이용하여 0.01 g까지 습중량으로 측정하였다. 생식소중량지수(Gonadosomatic index, GSI)는 [생식소 중량 x 100 / 어체중]의 식에 의하여 계산하였다.

2.7. 생식소 조직 관찰

각 실험어의 생식소 조직은 Bouin's solution에 고정 후 ethanol에 단계별로 dehydrate 시켜 paraffin에 고정시켜 5 um의 두께로 section하였다. 조직학적 관찰을 위해, slide는 hematoxylin과 0.5 % eosin에 염색시켰다.

2.8. 통계학적 분석

본 실험의 데이터 결과는 IBM SPSS Statistics 21.0(SPSS Inc., USA)을 활용하여 two-way ANOVA-test로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 실시하여 측정하였으며, $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

3. 결과

3.1. Dopamine 복강주사 후 시상하부 및 뇌하수체 GnRH, Gth 및 ER mRNA level 변화

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Da를 복강주사 후, 시상하부에서의 GnRH mRNA level의 변화량은 E2를 주사하여 vitellogenesis를 형성시킨 실험구에서 주사 2일째 대조구와 비교하였을 때, 증가하지 않고 감소하였으나, 주사 5일째 대조구 보다 증가하여 vitellogenesis가 형성되었다. E2 주사 후 Da를 주사한 실험구에서의 GnRH mRNA level은 대조구와 비교하였을 때, 0.618 ug/ml에서 0.430 ug/ml으로 유의적인 감소를 나타내었으며, 5일째 GnRH mRNA level은 2일째 0.43 ug/ml 보다 0.482 ug/ml로 증가하였지만, 대조구 0.625 ug/ml와 비교하였을 때 낮게 발현하였다. E2 및 Da의 혼합 주사 실험구에서의 GnRH mRNA level 변화량은 2일 및 5일째 모두 각각 0.386 ug/ml 및 0.192 ug/ml로 대조구 보다 낮게 발현하였으며, 5일째 지속적인 감소 뿐 아니라 급격한 감소를 나타내었다. Da 단독 주사 실험구에서의 GnRH mRNA level 변화량은 E2 및 Da 혼합 주사 실험구와 유사하게 발현하였으나, 주사 5일째 0.405 ug/ml에서 0.331 ug/ml로 유의적인 감소를 나타내었으며, 혼합 주사 실험구에서의 5일째 GnRH mRNA level 보다 높은 발현량을 나타내었다(Fig. 11). 따라서, Da는 대조구 DMSO를 주사한 실험구와 비교하였을 때, 성 성숙 시기 및 미성숙 시기에 GnRH mRNA level 감소를 유도할 수 있음을 확인하였다.

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Da 복강주사 후 시상하부에서의 ER mRNA level 변화량은 E2를 주사하여 vitellogenesis를 형성시킨 실험구에서의 ER mRNA level과 비교하였을 때, 0.422 ug/ml로 대조구 0.649 ug/ml에 비해 증가하였다. E2 주사 후 Da를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 5일째 0.649 ug/ml에서 0.443 ug/ml으로 유의적인 감소를

나타내었으며, 대조구 0.422 ug/ml와 비교하였을 때, 증가를 나타내었다. E2 및 Da 혼합, Da 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구와 비교하였을 때 2일째 각각 0.343 ug/ml 및 0.348 ug/ml로 감소를 나타내었으나, 5일째 혼합주사 실험구에서는 0.343 ug/ml에서 0.330 ug/ml로 유의성이 없는 감소를 나타내었다. Da 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 수치의 변화는 크지 않았지만 0.348 ug/ml에서 0.333 ug/ml으로 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 12). 따라서, 시상하부에서 ER mRNA level은 성숙시기에 시간이 지남에 따라 감소를 나타내었으나, 대조구와 비교하였을 때, 감소하지 않았으며, 미성숙 시기에 감소를 나타내었으나 큰 차이를 나타내지 않았다.

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Da를 복강주사 후 뇌하수체 Gth mRNA level의 변화량은 E2 주사 후, vitellogenesis를 형성시킨 실험구에서의 Gth mRNA level은 대조구에 비해 0.341 ug/ml에서 0.743 ug/ml으로 급격히 증가하였으며, 주사 후 2일째 비하여 5일째 0.957 ug/ml로 지속적인 증가를 나타내었다. E2 주사 후, Da 주사한 실험구에서의 Gth mRNA level은 대조구에 비해 0.360 ug/ml에서 0.482 ug/ml로 증가하였으나, 주사 후 2일 0.743 ug/ml에서 5일째 0.482 ug/ml로 Da에 의해 감소하였다. 하지만, 대조구와 비교하였을 때, 여전히 증가를 나타내었다. E2 및 Da 혼합 주사 실험구에서의 Gth mRNA level은 대조구와 비교하였을 때, 주사 후 2일째 0.341 ug/ml에서 0.134 ug/ml 감소하였지만 5일째 0.192 ug/ml로 유의하게 증가하였다. Da 단독 주사 실험구에서의 Gth mRNA level은 대조구와 비교하였을 때, 주사 2일 후 0.341 ug/ml로 변화량은 없었으나 5일째 유의하게 0.130 ug/ml으로 감소하였다(Fig. 13). 따라서, Da는 성숙시기에 Gth mRNA level은 시간이 지남에 따라 감소하였으나, 대조구 DMSO를 주사한 실험구와 비교하였을 때, 증가를 나타내었다. 하지만, 미성숙 시기에서 Da는 뇌하수체의 Gth mRNA level 감소를 유도할 수 있음을 확인하였다.

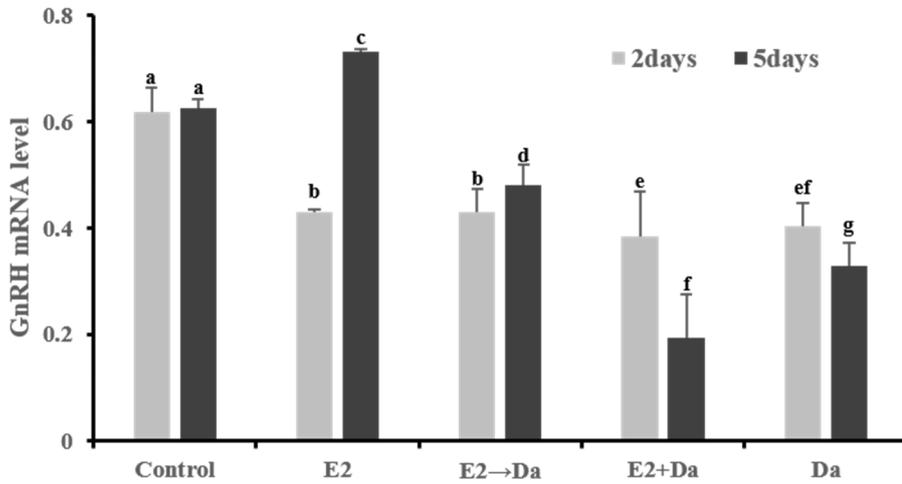


Figure 11. Expression of GnRH mRNA in the hypothalamus of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Dopamine (Da) add to Estrogen (E2) and Dopamine (Da) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

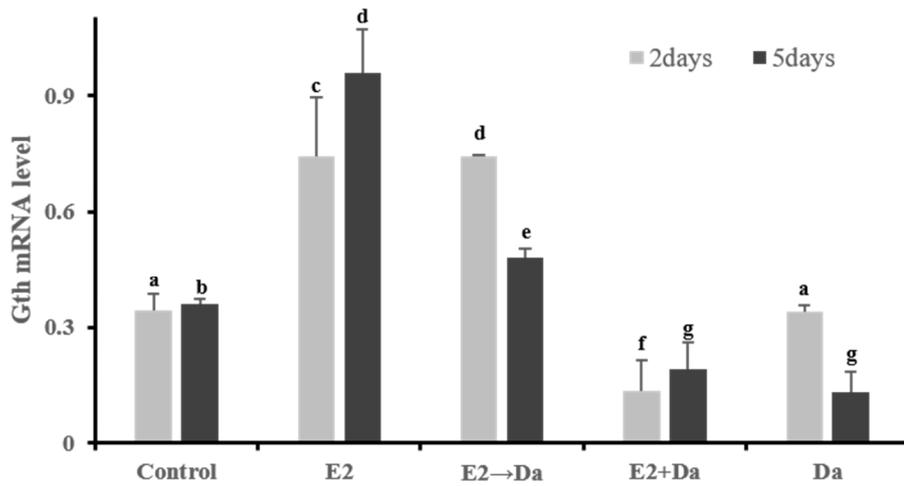


Figure 12. Expression of Gth mRNA in the hypothalamus of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Dopamine (Da) add to Estrogen (E2) and Dopamine (Da) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

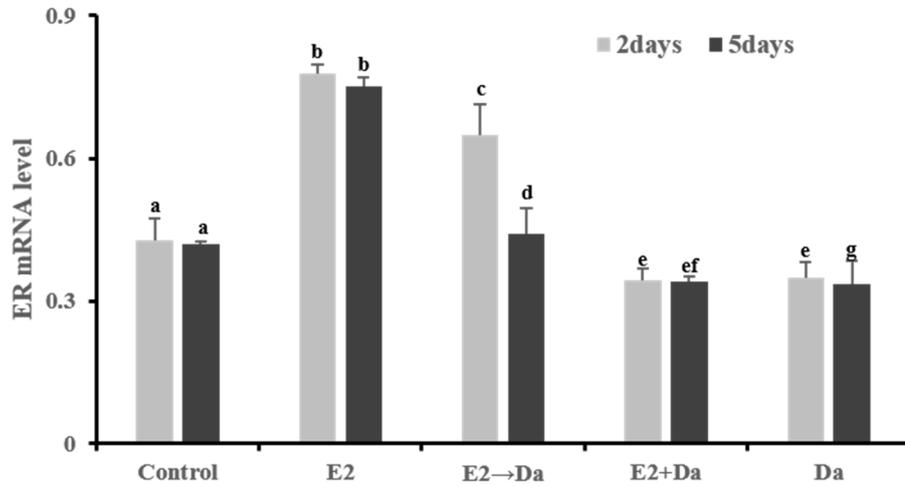


Figure 13. Expression of ER mRNA in the hypothalamus of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Dopamine (Da) add to Estrogen (E2) and Dopamine (Da) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

3.2. Da 복강주사 후 생식소 중량 지수(GSI) 변화 및 조직학적 변화 관찰

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Da 복강주사 후, 생식소 중량 지수인 Gonadosomatic index (GSI)는 E2를 주사한 실험구에서 증가하였으며, Da 단독 주사 실험구에서는 모두 감소하였다. 하지만, 대조구와 비교하였을 때, GSI는 증가하였다. 또한, 성숙 지수 기준인 1.2 보다 낮은 수치를 나타내었으며, 수치 변화에 따른 의미는 작용하지 않는다고 생각하였다(Fig. 14).

조직학적 변화 관찰 결과 대조구 DMSO를 복강주사한 넙치의 생식소에서 난세포질, 핵 및 인이 관찰되었다(Fig. 15. A). E2를 주사한 생식소는 난황포 및 여포세포층이 관찰되어 vitellogenesis의 전기 단계임을 나타내었다(Fig. 15. B). 그리고 E2 및 Da 혼합 주사 실험구에서의 2일째 조직학적 변화는 대조구와 비교하였을 때, 난세포 크기가 E2를 주사한 실험구와 비슷하였으나, 난황포 및 여포세포층은 관찰되지 않았다(Fig. 15. C). E2 및 Da 혼합 주사 실험구에서의 5일째 조직학적 변화는 3일째와 비교하였을 때, 난세포의 핵이 관찰되지 않았으며 더 이상의 성숙단계로 진행되지 않았다(Fig. 15. G). E2를 주사하여 vitellogenesis로 형성시킨 후, Da를 2차 주사한 실험구에서의 조직학적 변화는 5일째 E2를 주사한 실험구에서의 6일째와 비교하였을 때, 난황포 형성은 관찰되었으나 여포세포층은 관찰되지 않았다(Fig. 15. F). Da 단독 주사 실험구에서의 조직학적 변화는 2일째 대조구와 비교하였을 때, 난세포 크기가 비슷하였으나 핵 및 인의 관찰이 어려웠으며, 5일째 조직학적 변화에서 2일째와 비교하였을 때, 난세포 크기가 발달하였지만, E2 주사 실험구에 비해 난황포 및 여포세포층은 관찰되지 않았다(Fig. 15. D. E). 따라서, Da 주사 실험구에서 모두 vitellogenesis의 초기 단계에서 멈춰 성 성숙이 다소 지연됨을 확인하였다.

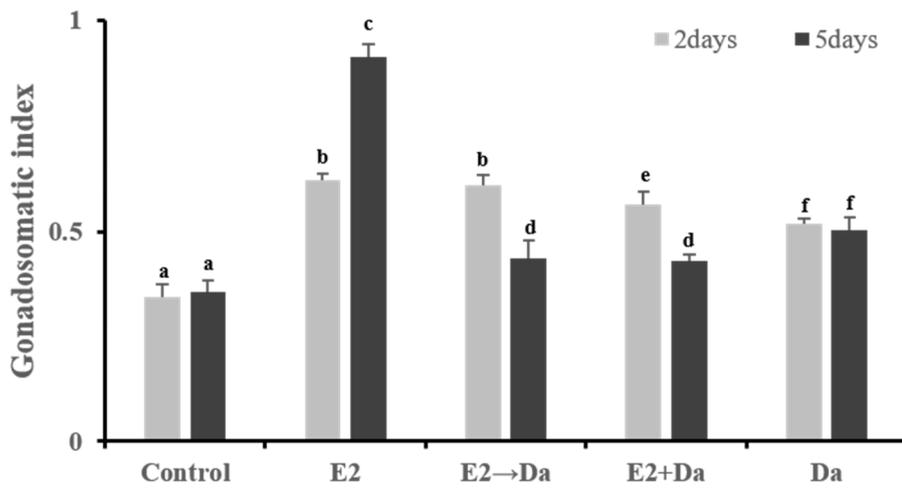


Figure 14. Effect of Estrogen (E2) and Dopamine (Da) treatment on Gonadosomatic index in female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

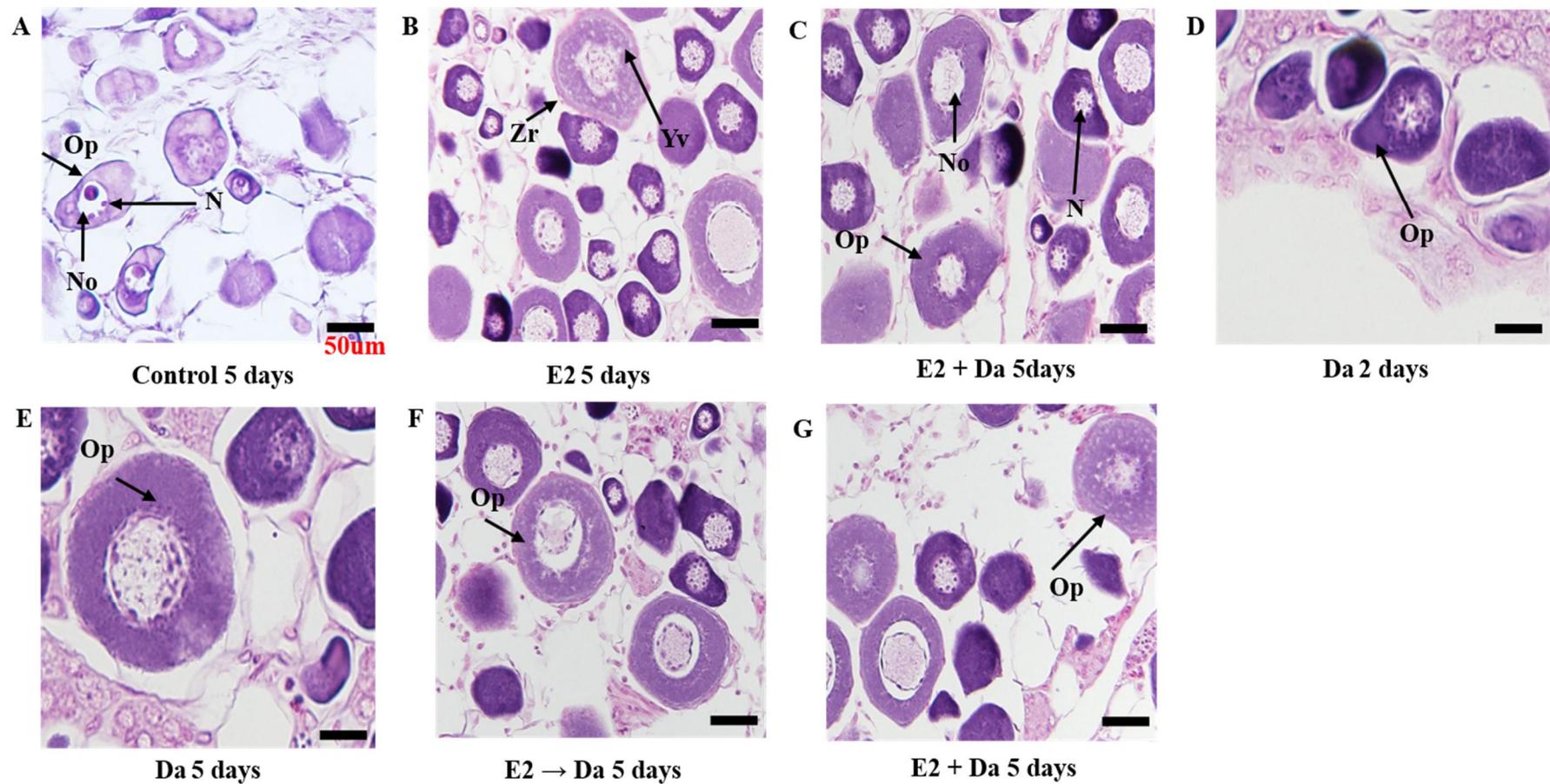


Figure 15. Histological observations of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary treated Estrogen (E2) and Dopamine (Da). Op : Ooplasm, No : Nucleolus, N : Nucleus, Yv : Yolk vesicle, Zr :Zona radiata.

4. 고찰

조류 및 포유류를 이용한 뇌하수체 이식 및 뇌 병변을 통한 초기 연구에서는 뇌하수체 호르몬 분비 조절을 통한 주요 생리 기능 조절에서 뇌 신경 내분비 인자의 핵심 역할을 한다고 밝혔다(Charlton, 2008). 경골어류에서 번식에 대한 Da의 신경 내분비 조절 기능은 1978년 금붕어(*Carrassius auratus*)를 이용한 억제 능력이 처음 알려졌다(Peter et al., 1978). 뱀장어(*Anguilla anguilla*)의 연구에서는 난소 발달에 있어 Gth의 방출을 유발하기 위해 pimozide를 이용하여 Da를 억제하였을 때, LH 합성 및 방출, VTG 및 난소의 vitellogenesis 자극에 있어 Gth를 증가시킨다고 보고되었다(Dufour et al., 2003). 또한, 금붕어(*Carassius auratus*)의 *in vitro* 연구에서 Da는 Gth II 방출을 억제 시키며, 이는 GnRH 감소로 인한 Gth II 방출이 억제된다고 보고하였다(Murthy et al., 1994). 이처럼 Da의 성 성숙 억제에 관한 연구들은 다양한 어종에 있어 연구가 진행 중이다.

어류의 Gth I 및 Gth II 분비는 여러 시상하부 작용제에 의해 자극되며, GnRH는 중심 자극제로 작용하며, Da는 중심 억제제로 작용한다(Yaron and Levavi-Sivan, 2006). 본 연구에서 미성숙 암컷 넙치에 Da 복강 주사 후, *in vivo*에서 시상하부 및 뇌하수체에서 발현되는 성 성숙 관련 호르몬 물질인 GnRH, Gth 및 ER mRNA level은 전체적인 감소를 나타내었다. 하지만, Da 단독 주사 실험구에서의 GnRH mRNA level은 감소하였지만, E2 및 Da 혼합 주사 실험구 보다 감소하는 경향을 나타내지 않았다. 뇌하수체 Gth mRNA level은 E2 및 Da 혼합 주사 실험구에서 역시 낮은 level이 관찰되었지만, vitellogenesis 유도 후, Da의 복강 주사에 의한 자극은 Gth mRNA level이 감소함에도 불구하고 미성숙 시기보다 높게 발현하였다. 이러한 결과는 미성숙 단계에서 넙치에 Da를 단독으로 투여하여도 이미 분비되어 있는 E2로 인하여 GnRH mRNA level은 감소하였지만, *in vitro*의 결과와는 다르게 급격한 감소를 나타내지 않는 것으로 생각되었다.

연어과(Salmonids) 어류의 연구에서 Da는 vitellogenesis 단계에서 E2가 Da의 억제 기능에 대한 도움을 준다고 보고하였다(Linard et al., 1995). 하지만, E2가 Da의 억제 기능에 어떠한 기능으로 작용하는지에 관한 뚜렷한 연구 결과는 아직까지 보고 되지 않았다. 또한, 마우스(Sprague-Dawley rat)에서 E2는 Da의 수용체 발현에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다(Lammers et al., 1999). 인간에서는 E2가 Da 의존성 질환에 관여한다는 연구 결과 및 다양한 생물 종들에 있어 의존적 인지 과정에 영향을 미친다는 연구 결과들이 늘어나고 있다(Almey, TA and Brake, 2015). 이와 같이 E2는 생식소 뿐 아니라 뇌 및 간에서도 작용하는 호르몬으로 그 기능의 다양성을 알 수 있다. 최근, 연구에서 E2는 뇌의 신경세포에서도 생성된다는 연구 결과가 있어(Lu et al., 2019), 생식소에서 생성되는 E2와 시상하부에서 생성되는 E2의 기능이 다를 것이라 생각된다. 이전 미성숙 암컷 넙치의 시상하부 및 뇌하수체 세포 배양 연구인 *in vitro* 연구 결과에서 E2 및 Da 혼합 투여 실험구에서의 GnRH 및 Gth mRNA level은 E2에 의해 감소 및 증가를 나타내었다. 하지만, *in vivo* 연구 결과에서 시상하부 Gth mRNA level의 변화량은 *in vitro*와는 다른 감소를 나타냈으며, 유의성은 나타내지 않았다.

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 관여하여 합성을 억제 시킬 것으로 생각되었는데, 이번 연구에서 Da가 시상하부에 직접적인 영향을 나타내 GnRH mRNA 합성을 억제하여 Gth의 분비를 억제할 뿐 아니라, 시상하부 내 ER mRNA 합성도 억제하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들로 Da는 넙치의 성 성숙 억제에 제한적으로 작용하지만, 시기에 따라 성 성숙 억제가 가능하다고 판단되며, 미성숙 시기에 Da 처리가 유효할 것으로 생각되었다.

제 4 장

미성숙 암컷 녀치를 이용한 Aromatase inhibitors(AIs)에 의한

성 성숙 억제

1. 서론

Aromatase는 CYP19A1(cytochrome P450 superfamily)의 member로 Estrogen(E2) 합성을 하는 enzyme이다. 일반적으로 aromatase는 난소의 분화 과정에 작용하며, 온도에 의존적으로 성 결정을 나타내는데, aromatase가 많이 분비되면 암컷으로 변화하고 반대로 적은 양이 분비되면 수컷으로 변화 된다고 알려져 있다(Babjak et al., 2012). 그리고 뇌, 간 및 생식소 조직과 같은 여러 조직에 널리 분포되어 있다.

Aromatase inhibitor(AI)는 P450arom activity를 차단하여 androgen으로부터 E2의 생성을 억제하여 E2 수치를 낮추고 Estrogen receptor(ER) 자극을 감소시키는 역할을 한다(Kitano et al., 2000). 이러한 AI는 nonsteroidal inhibitor와 steroidal inhibitor로 분류된다. 지용성인 steroidal inhibitor Exemestane(Exe)은 세포막을 통과하여 수용체와 결합 후 활성화하여 세포 내에서 target에 대한 효소를 생성하고 항 에스트로겐의 역할을 하며 aromatase 활성 부위에 비가역적으로 결합하여 불활성화를 일으켜 androgen이 E2로 전환하는 것을 차단한다(Brueggemeier, 2002).

수용성인 nonsteroidal inhibitor Anastrozole(Ana)은 세포막을 통과하지 못하여 세포막의 수용체와 결합 후 활성화하여 세포 내에서 target에 대한 효소를 생성한다(Miller et al., 2008). 이는 aromatase의 활성을 제거하는 역할을 하며, aromatase 활성 부위에 가역적으로 결합하여 경쟁적 억제를 통해 androgen이 E2로 전환하는 것을 차단하는 기능과 ER의 비율을 감소시키는 기능으로 작용한다(Simpson, 2003). 이와 같이 AI는 anti-estrogen의 기능 및 aromatase의 활성을 제거하여 성 성숙 억제에 큰 영향을 미친다.

이번 연구에서는 androgen에서 E2로 전환 시 작용하는 aromatase와 결합하여 E2로의 전환을 억제시키는 물질로 알려진 Ana와 Exe를 미성숙 넙치를 대상으로 복강주사 및

E2를 이용하여 인위적으로 vitellogenesis 단계를 유도 후, 성숙 시기 및 미성숙 시기의 생식소 ER mRNA, 간에서 ER mRNA 및 VTG(Vitellogenin) mRNA level의 변화량 및 조직학적 변화를 비교 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험동물 및 Aromatase inhibitors 처리

평균 330 ± 17 g의 미성숙 넙치를 제주 양식장에서 구매하여 연구실 수조에 광주기 light : dark = 12 : 12, 수온 18 ± 1 °C 로 3일간 순치 적응시켰다. 실험기간 동안 사료는 공급하지 않았다.

실험에 사용한 Ana 호르몬은 대조구로 사용한 Dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma)를 용매제로 사용하였으며, Exe 호르몬은 ethanol을 용매제로 사용하였다. Vitellogenesis 단계를 유도하기 위해 E2를 사용하였다. 실험 1일차 순치 적응시킨 넙치 30마리를 2 phenoxyethanol(SIGMA, USA)으로 마취 후 E2 및 AI를 각각의 용매제에 녹여 각 5개의 수조별로 대조구, vitellogenesis, vitellogenesis로 유도 후 AI를 주사, E2 및 AI의 혼합 주사 및 AI 단독 주사 실험구로 나뉘어 $5 \mu\text{g/g}$ 의 농도로 준비하여 복강주사 하였다.

2.2. Aromatase inhibitors 처리 후 샘플

실험어에 복강 주사 후 3일 째 각각의 실험구에서 3마리의 넙치를 전장 중량을 측정하여 해부 후 생식소 및 간을 적출하였으며, 생식소는 중량 측정 후 유전자 분석용과 조직학 분석용으로 보관하였다. Vitellogenesis를 유도 후, AI의 작용을 알아보기 위하여 3번 수조의 실험어에 각각의 AI를 2차 주사하였으며, E2 및 AI 혼합 실험구, AI 단독 실험구에도 AI를 2차 주사하였다. 실험 마지막 날인 6일 째 모든 실험구의 실험어를 3일 째와 같은 방법으로 해부 후 샘플을 보관하였다.

2.3. 간 및 생식소에서의 Total RNA 추출 및 cDNA 합성

간 및 생식소 조직 샘플에 RNAiso plus(TaKaRa, Japan)을 1 ml 첨가 후 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 이후 chloroform(Sigma, USA) 200 μ l를 첨가한 뒤 충분히 inverting하여 실온에서 5 min간 반응 후, 13,000 rpm에서 10 min 간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 분리하여 동량의 iso-propanol을 첨가하고 inverting 후 실온에서 5 min 반응 시킨 다음 13,000 rpm에서 10 min 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 제거하고 DEPC water로 제조된 75 % ethanol 1 ml을 첨가하고 13,000 rpm에서 10 min 원심분리 하였으며, 3회 반복하였다. 이후 상층액을 제거하고 pellet을 완전히 건조 시킨 뒤 RNase free water에 녹여 간 및 생식소에서의 total RNA를 추출하였다. Total RNA concentration은 Thermo Scientific uDrop Plate(Thermo Scientific, Germany)로 측정하였고, cDNA는 A260/280 ratio가 1.8 – 2.0이 되는 500 ng의 total RNA를 PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa, Japan)로 제조사의 프로토콜에 따라 합성하였으며, 합성된 cDNA는 Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용하였다.

2.4. Quantitative PCR 분석

Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용된 primer는 *in vitro*에 사용한 primer와 동일하게 사용하였으며, Table 2에 나타내었다. qPCR 분석은 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX(SYBR Green with low ROX)(Enzynomics, Daejeon, Korea)을 이용하여 Thermal Cycler DiceR® Real Time System Single(TaKaRa, Japan)로 분석하였다. PCR cycling은 initial denaturation 95 °C 10 min, denaturation 95 °C 10 sec, annealing 58 °C 30 sec 40 cycles, elongation 72 °C 20 sec, melting curve 1 min의 조건으로 수행하였다.

2.5. 생식소 중량 지수 관찰

실험기간에 생식소 발달 상태를 조사하기 위해 해부 후 생식소 조직을 전자저울을 이용하여 0.01 g까지 습중량으로 측정하였다. 생식소중량지수(Gonadosomatic index, GSI)는 [생식소 중량 x 100 / 어체중]의 식에 의하여 계산하였다.

2.6. 생식소 조직 관찰

각 실험어의 생식소 조직은 Bouin's solution에 고정 후 ethanol에 단계별로 dehydrate 시켜 paraffin에 고정시켜 5 um의 두께로 section하였다. 조직학적 관찰을 위해, slide는 hematoxylin과 0.5 % eosin에 염색시켰다.

2.7. 통계분석

모든 측정값은 평균±표준오차로 나타냈으며, 유의차는 IBM SPSS Statistics Subscription을 이용하여 ANOVA를 이용한 다중 검정으로 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다($P < 0.05$).

3. 결과

3.1. Anastrozole 복강 주사 후 ER 및 VTG mRNA level 변화

미성숙 암컷 넙치에 Ana를 복강 주사 후, 생식소에서의 ER mRNA level은 전체적인 감소를 나타냈다. Vitellogenesis를 유도하기 위하여 E2를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 증가하였다. Vitellogenesis를 형성 후 Ana를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 주사 후 2일째 vitellogenesis가 형성되어 증가 후, Ana의 2차 주사 후 실험 5일째 0.738 ug/ml에서 0.577 ug/ml로 감소를 나타내었다. 하지만, 대조구와 비교하였을 때, 대조구 0.422 ug/ml 보다 0.557 ug/ml로 높게 발현하였다. E2 및 Ana의 혼합 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 2일째 0.427 ug/ml에서 5일째 0.300 ug/ml로 감소하였지만, 주사 2일째 감소 후 5일째 유의적으로 증가하였다. Ana의 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 0.261 ug/ml에서 0.250 ug/ml로 감소를 나타냈지만 2일째와 5일째 유의성은 없었다(Fig. 16).

E2 및 Ana를 복강 주사 후, 간에서 ER mRNA level의 변화는 vitellogenesis를 유도하기 위하여 E2를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 2일째 0.627 ug/ml에서 0.978 ug/ml, 5일째 0.672 ug/ml에서 1.090 ug/ml로 증가하였다. Vitellogenesis를 형성 후, Ana를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 주사 후 2일째 vitellogenesis가 형성되어 0.918 ug/ml로 증가 후 Ana의 2차 주사 후 실험 5일째 0.776 ug/ml로 감소를 나타내었다. E2 및 Ana의 혼합 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 0.501 ug/ml로 감소하였으며, 시간이 지남에 따라 0.39 ug/ml로 지속적인 감소를 나타내었다. Ana 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 2일째 및 5일째 각각 0.388 ug/ml 및 0.320 ug/ml로 낮게 발현하였으며, E2와 혼합 주사 실험구 0.390 ug/ml 보다도 낮게 발현하였으나, 2일 및 5일째 유의성은 없었다(Fig. 17).

E2 및 Ana를 복강 주사 후, 간에서 VTG mRNA level의 변화에서 vitellogenesis를 유도하기 위하여 E2를 주사한 실험구에서의 VTG mRNA level은 대조구에 비해 0.868 ug/ml에서 1.391 ug/ml로 증가하였다. Vitellogenesis를 형성 후 Ana를 주사한 실험구에서의 VTG mRNA level은 대조구에 비해 주사 후 2일째 vitellogenesis가 형성되어 1.378 ug/ml로 증가 후 Exe의 2차 주사 후 실험 5일째 0.802 ug/ml로 감소를 나타내었다. E2 및 Exe의 혼합 주사 실험구의 ER mRNA level은 대조구에 비해 0.453 ug/ml으로 감소하였으며, 시간이 지남에 따라 0.401 ug/ml로 지속적인 감소를 나타내었다. Exe 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 2일째 및 5일째 각각 0.388 ug/ml 및 0.220 ug/ml로 낮게 발현하였으며, E2와 혼합 주사 실험구 보다는 낮게 발현하였으며, 시간이 지남에 따라 지속적인 감소를 나타내었다(Fig. 18).

Ana의 복강 주사 후, 생식소 ER 및 VTG mRNA level 및 간 VTG mRNA level은 복강 주사 실험구와 비교하였을 때, 미성숙 시기에 E2 및 Ana 혼합, 단독 주사 실험구에서 모두 감소를 나타내었다. 하지만, E2를 복강 주사하여 vitellogenesis를 형성 후, Ana의 2차 주사 실험구에서 ER 및 VTG mRNA는 2일째 및 5일째 비교에서 시간이 지남에 따라 감소하였으나, 대조구와 비교하였을 때, 증가를 나타내었다. 따라서, Ana는 미성숙 시기에서 ER 및 VTG mRNA level의 감소를 유도할 수 있음을 확인하였다.

3.2. Anastrozole 주사 후 생식소 중량 지수(GSI) 변화 및 조직학적 변화 관찰

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Ana를 주사 후 생식소 중량 지수인 GSI는 E2 단독 주사 실험구에서 증가하였으며, Ana 단독 주사 실험구에서는 모두 감소하였다. 하지만, 대조구와 비교하였을 때, GSI는 증가하였다. 또한, 성숙 지수 기준인 1.2 보다 낮은 수치를 나타냈으며, 수치 변화에 따른 의미는 작용하지 않는다고 생각하였다(Fig. 19).

조직학적 변화 관찰 결과 대조구 DMSO를 주사 후 미성숙 암컷 넙치의 생식소에서 난세포 질, 핵 및 인이 관찰되었으며(Fig 20. A), E2 주사 후 생식소에서는 다량의 난황포 및 여포세포층이 관찰되어 vitellogenesis의 전기 단계임을 알 수 있었다(Fig 20. B). E2 및 Ana 혼합 주사 실험구에서의 2일째 조직학적 변화에서 난세포 크기는 대조구의 난세포와 비슷하였으며, 간성화 초기 단계에서 관찰할 수 있는 정모세포가 관찰되었다(Fig. 20. C). 또한, 5일째 난세포에서 정모세포 및 정원세포가 관찰되어 융성화가 진행됨을 관찰하였다(Fig. 20. G). E2 주사 후, vitellogenesis로 형성시킨 후 Ana를 2차 주사한 실험구에서의 조직학적 변화는 2일째 대조구의 난세포와 비교하였을 때, 크기는 비슷하였으며, 핵 안의 인이 다수 관찰되었으나 5일째 난세포에서는 크기가 감소하며 더 이상의 성숙단계로 진행되지 않았다(Fig. 20. F). Ana 단독 주사 실험구에서의 조직학적 변화는 2일째 난세포의 크기는 증가하였으나 E2 단독 주사 실험구에서의 난황포 및 여포세포층은 관찰되지 않았으며, 5일째 난세포 크기는 대조구보다 작아지며 정원세포가 관찰되어 융성화가 진행됨을 관찰하였다(Fig. 20. D. E).

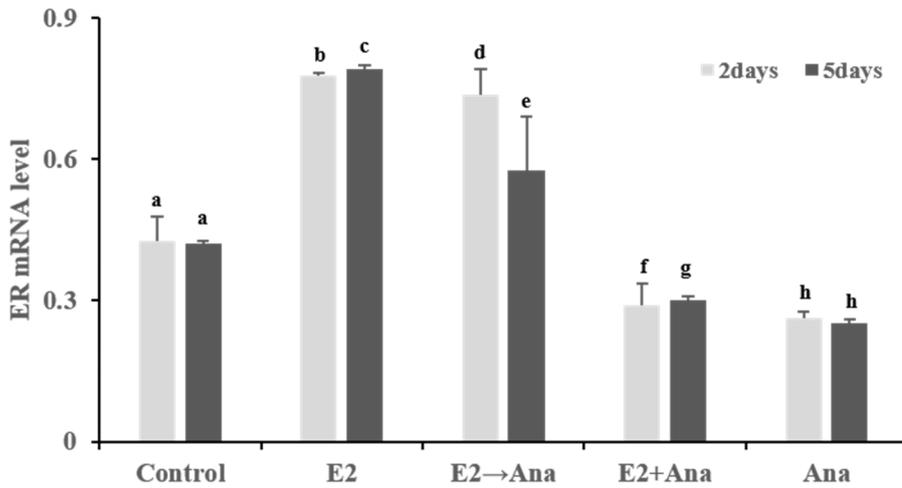


Figure 16. Expression of ER mRNA in the gonad of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Anastrozole (Ana) add to Estrogen (E2) and Anastrozole (Ana) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

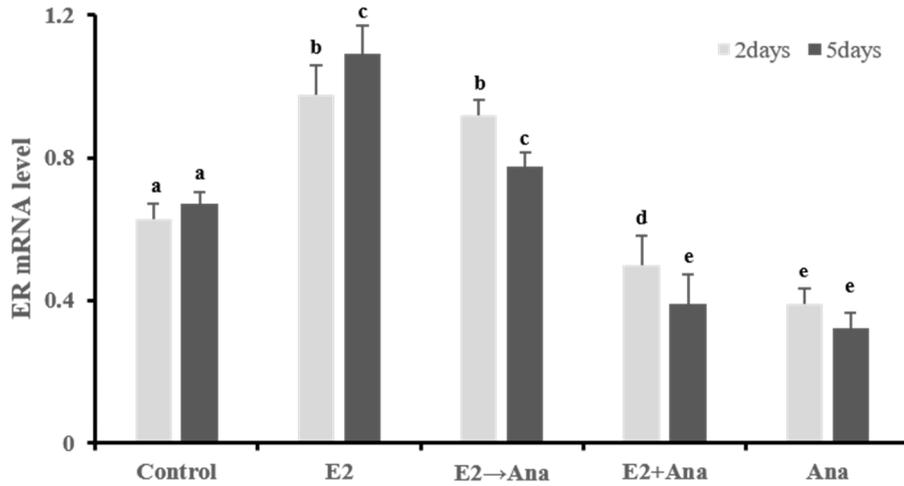


Figure 17. Expression of ER mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Anastrozole (Ana) add to Estrogen (E2) and Anastrozole (Ana) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

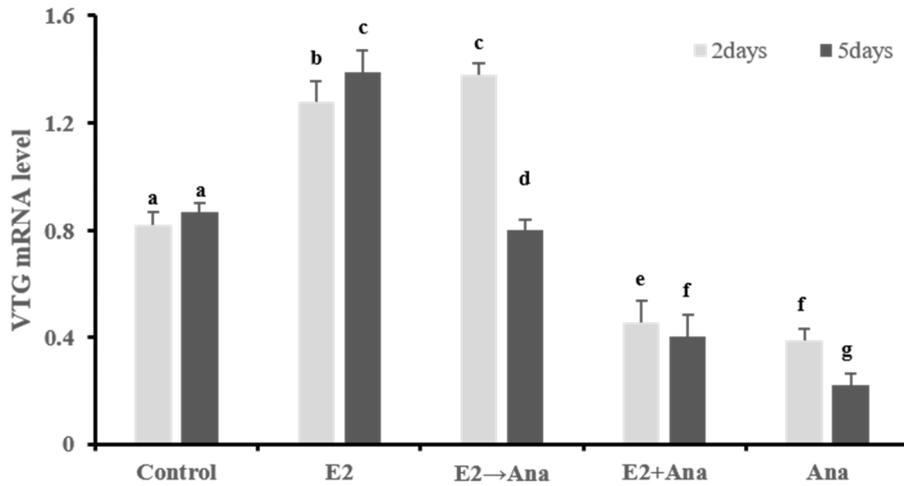


Figure 18. Expression of VTG mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Anastrozole (Ana) add to Estrogen (E2) and Anastrozole (Ana) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

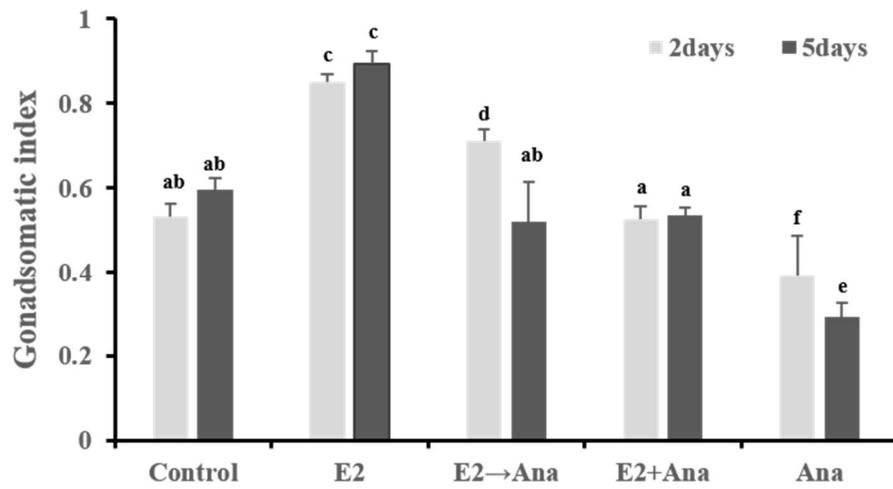


Figure 19. Effect of E2 (Estrogen) and Anastrozole (Ana) treatment on Gonadosomatic index in female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

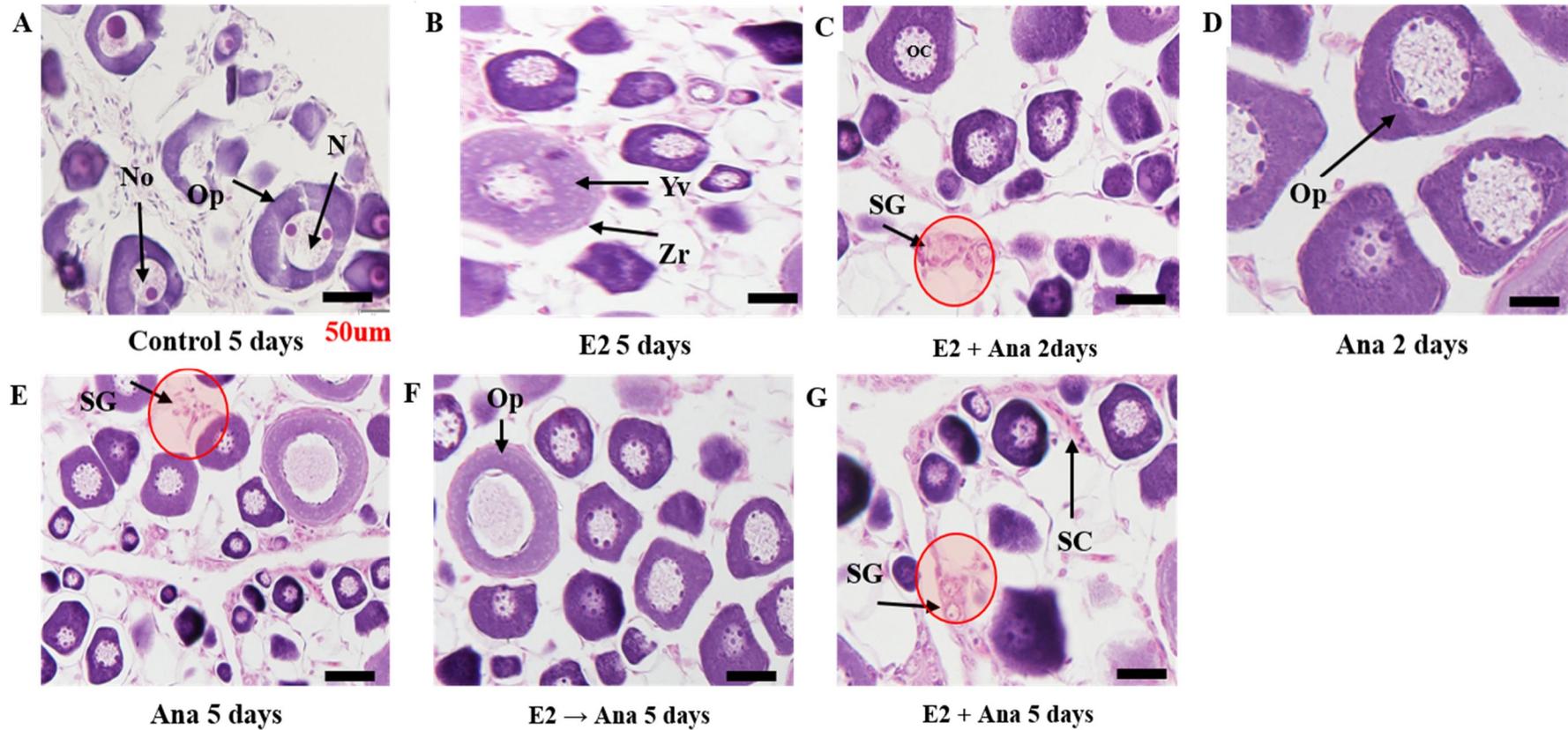


Figure 20. Histological observations of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary treated Anastrozole (Ana). Op : Ooplasm, No : Nucleolus, N : Nucleus, Yv : Yolk vesicle, Zr :Zona radiata, SC : Spermatocyte, SG : Spermatogonia

3.3. Exemestane 복강 주사 후 ER 및 VTG mRNA level 변화

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Exe를 복강 주사 후, 생식소에서의 ER mRNA level 변화에서 vitellogenesis를 유도하기 위하여 E2를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 증가하였다. Vitellogenesis를 형성 후 Exe를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 주사 후 2일째 vitellogenesis가 형성되어 증가 후, Exe의 2차 주사 후 0.791 ug/ml에서 5일째 0.316 ug/ml로 감소를 나타내었으며, 대조구와 비교하였을 때 역시 0.442 ug/ml에서 0.316 ug/ml로 유의적인 감소를 나타내었다. E2 및 Exe의 혼합 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 0.422 ug/ml에서 0.305 ug/ml로 감소하였으며, 2일째 0.310 ug/ml에서 5일째 0.305 ug/ml로 역시 감소하였고 유의성은 나타나지 않았다. Exe 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 유의적으로 2일째 0.427 ug/ml에서 0.227 ug/ml로 감소를 나타내었으며, 5일째 0.148 ug/ml로 지속적인 감소를 나타내었다(Fig. 21).

E2 및 Exe를 복강 주사 후, ER mRNA level 변화에서 vitellogenesis 유도를 위하여 E2를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 증가하였다. Vitellogenesis를 형성 후 Exe를 주사한 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 주사 후 2일째 vitellogenesis가 형성되어 증가 후, Exe 2차 주사 후 1.071 ug/ml에서 실험 5일째 0.516 ug/ml로 감소를 나타내었으며, 대조구와 비교하였을 때, 역시 0.552 ug/ml에서 0.516 ug/ml로 유의적인 감소를 나타내었다. E2 및 Exe의 혼합 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 0.552 ug/ml에서 0.353 ug/ml로 감소를 나타내었고, 2일째 0.360 ug/ml에서 5일째 0.353 ug/ml로 감소하였으나, 유의성은 나타나지 않았다. Exe 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 유의적인 2일 0.527 ug/ml에서 0.297 ug/ml로 감소를 나타내었으며, 5일 0.178 ug/ml로 지속적인 감소를 나타내었다(Fig. 22).

E2 및 Exe를 복강 주사 후, 간에서 VTG mRNA level의 변화에서 vitellogenesis를 유도하기 위하여 E2를 주사한 실험구에서의 VTG mRNA level은 대조구 0.602 ug/ml에 비해 0.291 ug/ml로 증가하였다. Vitellogenesis를 형성 후 Exe를 주사한 실험구에서의 VTG mRNA level은 대조구에 0.602 ug/ml 비해 주사 후, 2일째 1.081 ug/ml로 vitellogenesis가 형성되어 증가하였으며, Exe의 2차 주사 후, 실험 5일째 0.616 ug/ml로 감소를 나타내었다. 하지만, 대조구 0.602 ug/ml과 비교하였을 때, 유의성은 없었다. E2 및 Exe의 혼합 실험구에서의 VTG mRNA level은 대조구와 비교하였을 때, 2일째 0.542 ug/ml에서 0.626 ug/ml로 증가하였으며, 5일째 0.602 ug/ml에서 0.553 ug/ml로 유의적인 감소를 나타내었다. Exe 단독 주사 실험구에서의 VTG mRNA level은 대조구, E2 및 Exe 혼합 주사구와 비교하였을 때, 0.373 ug/ml에서 0.184 ug/ml로 유의적인 감소 및 지속적인 감소를 나타내었다(Fig. 23).

Exe의 복강 주사 후, 생식소 ER 및 VTG mRNA level 및 간 VTG mRNA level은 대조구 DMSO를 복강 주사 실험구와 비교하였을 때, 미성숙 시기에 E2 및 Exe 단독 주사 실험구에서 모두 감소를 나타내었다. 하지만, Ana와는 다르게 E2를 복강 주사하여 vitellogenesis를 형성 후, Exe의 2차 주사 실험구에서 ER 및 VTG mRNA는 2일째 및 5일째 비교에서 시간이 지남에 따라 감소하였을 뿐 아니라, 대조구와 비교하였을 때, 역시 감소를 나타내었다. 따라서, Exe는 미성숙 및 성숙 시기에 생식소 및 간에서의 ER 및 VTG mRNA level의 감소를 유도할 수 있음을 확인하였다.

3.4. Exemestane 주사 후 생식소 중량 지수 (GSI) 변화 및 조직학적 변화 관찰

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Exe를 주사 후, 생식소 중량 지수인 GSI는 E2 주사 실험구에서 증가하였으며, Exe 단독 주사 실험구에서는 모두 감소하였다. 하지만, 대조구와 비교하였을 때, GSI는 증가하였다. 또한, 성숙 지수 기준인 1.2 보다 낮은 수치를 나타냈으며, 수치 변화에 따른 의미는 작용하지 않는다고 생각하였다(Fig. 24).

조직학적 변화 관찰 결과 대조구 DMSO를 주사한 넙치의 생식소에서 난세포 질, 핵 및 인이 관찰되었다(Fig. 25. A). E2를 주사한 생식소에서는 난황포 및 여포세포층이 관찰되어 vitellogenesis의 전기 단계임을 알 수 있었다(Fig. 25. B). E2로 vitellogenesis를 형성 후 Exe의 2차 주사 실험구의 조직학적 변화 관찰에서 5일째 정모세포가 관찰되었으며(Fig. 25. F), E2 및 Exe의 혼합 주사 실험구에서의 조직학적 변화는 주사 2일째 정원세포가 관찰되어 응성화의 빠른 시작을 알 수 있었으며, 5일째에 정모세포가 커지며 뚜렷하게 관찰할 수 있었다(Fig. 25. C. G). Exe 단독 주사 실험구에서의 조직학적 변화 관찰은 2일째 정원세포 및 정모세포가 동시에 관찰되었으며, 5일째 정모세포가 뭉쳐져 간성화의 진행이 빠르게 진행되어 응성화가 진행되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 25.D. E).

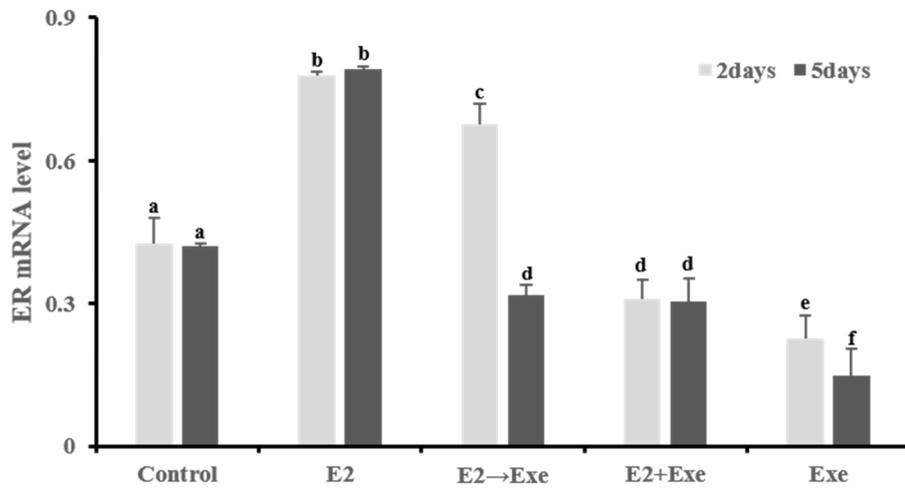


Figure 21. Expression of ER mRNA in the gonad of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Exemestane (Exe) add to Estrogen (E2) and Exemestane (Exe) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

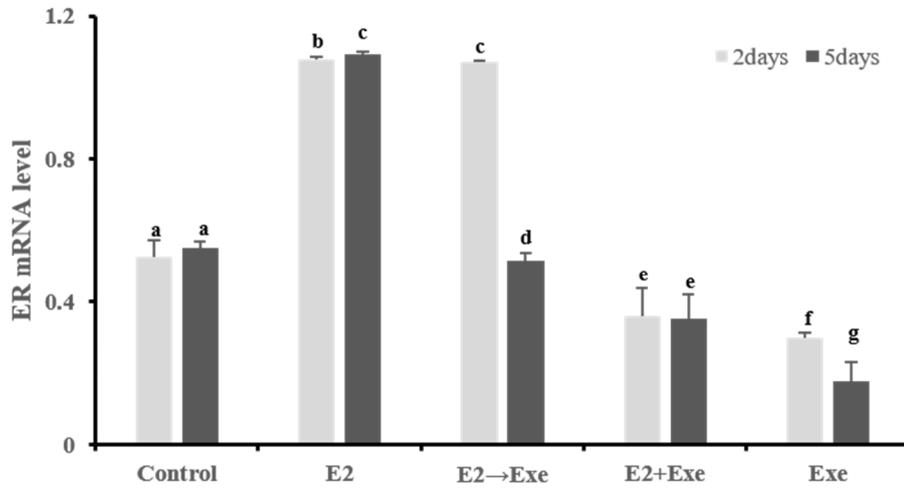


Figure 22. Expression of ER mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Exemestane (Exe) add to Estrogen (E2) and Exemestane (Exe) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

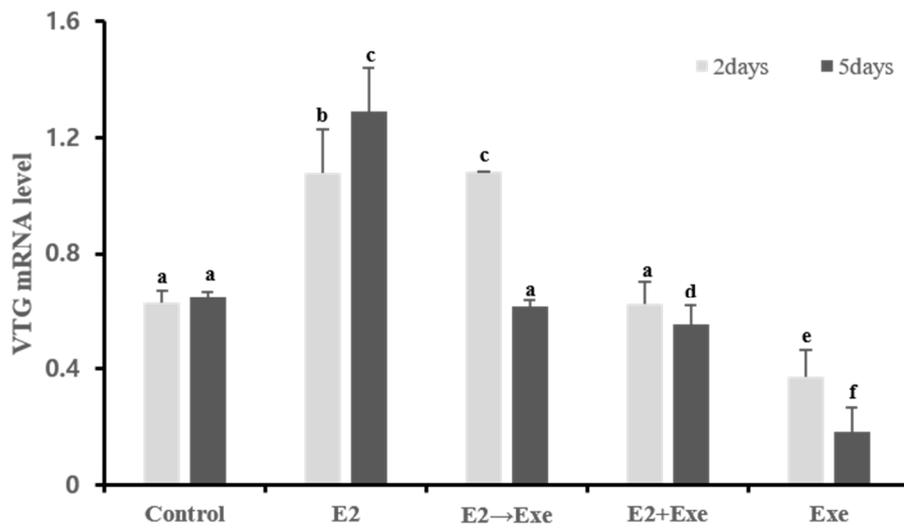


Figure 23. Expression of VTG mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Exemestane (Exe) add to Estrogen (E2) and Exemestane (Exe) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

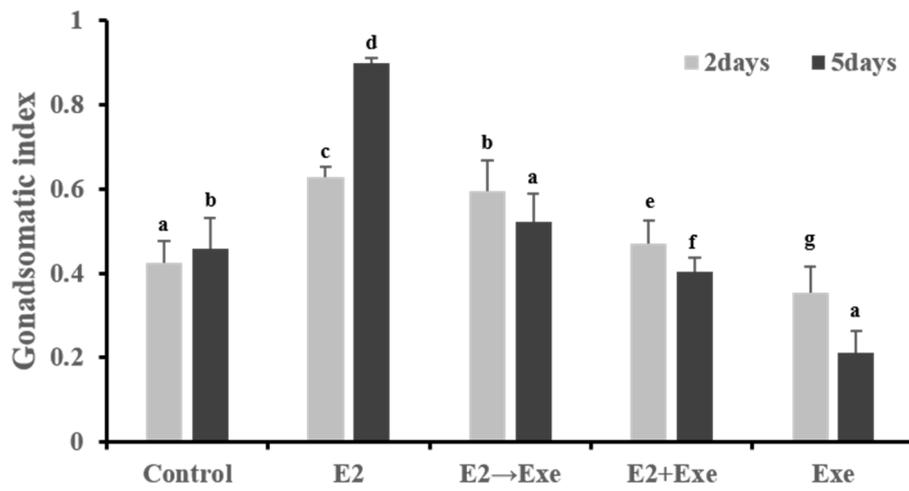


Figure 24. Effect of Estrogen (E2) and Exemestane (Exe) treatment on Gonadosomatic index in female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

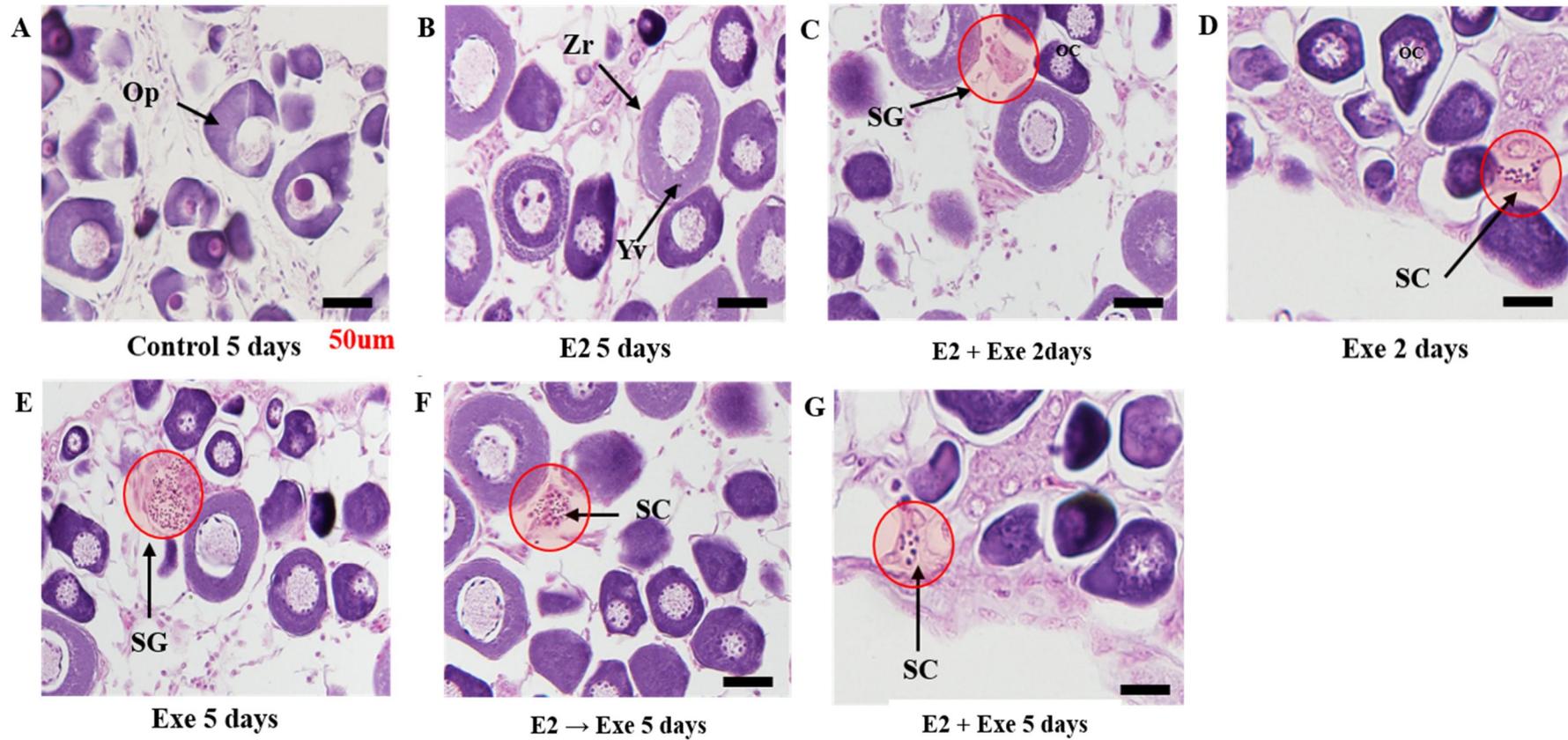


Figure 25. Histological observations of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary treated Exemestane (Exe). Op : Ooplasm, No : Nucleolus, N : Nucleus, Yv : Yolk vesicle, Zr :Zona radiata, SC : Spermatocyte, SG : Spermatogonia

4. 고찰

최근 어류의 성 전환에 있어 폐경기 여성의 유방암 치료에 있어 사용되는 3세대의 비가역적 AI를 사용하여 어류의 옹성화를 유도하는 시도가 이루어지고 있다(Gisler et al., 1998 ; Miller et al., 2008). 그중 Ana와 Exe는 다른 AI 보다 부작용이 적어 치료제로 많이 사용되고 있으며, 어류 및 다른 종들의 연구에도 많이 사용되어 왔다.

본 연구에서 미성숙 암컷 넙치에 Ana의 복강주사 후, 생식소 및 간에서의 ER 및 VTG mRNA level 변화량은 전체적으로 감소를 나타내었다. Ana를 사료에 첨가시켜 급이 시킨 잉어(*Cyprinus carpio*)에서 testosterone의 혈장 농도가 증가하였으며, 이는 testosterone이 E2로의 전환을 차단하였다고 보고되었다(Singh and Singh., 2013). 또한, fadrozole과 Ana는 지질, 콜레스테롤 및 트리글리세이드 농도의 감소를 나타낼 뿐 아니라, 옹성화를 위해 성 분화 되는 기간에 특이적인 지질 및 콜레스테롤의 생성을 억제시켰다고 보고되었다(Ranie and Maclatchy., 2017). 하지만, 본 연구에서 E2 주사 후 vitellogenesis를 형성시켜 Ana를 2차 주사하였을 때, ER 및 VTG mRNA level은 감소하였으나, 대조구와 비교하였을 때, 감소하지 않았다. 이러한 결과에서 Ana는 미성숙 시기에 생식소 여포세포에서 testosterone이 E2로의 전환에 작용하는 aromatase와 강하게 결합하였지만, 성숙 시기로 접어들수록 aromatase와의 결합력이 약할 수 있다 생각하였다. Ana는 인간의 폐경기 유방암 여성의 호르몬인 E2 및 LH의 혈청 수준을 감소시켰으며, testosterone의 혈청 수준이 크게 증가되었다고 보고되었다(Kyvernitakis et al., 2015). Ana 이외에도 non steroid 계열인 fadrozole은 다양한 어종에서 광범위하게 성 성숙 억제 작용이 있는 것으로 보고되고 있다(Hinfray et al., 2013). Fadrozole의 연구에서 coho salmon(*Oncorhynchus kisutch*)의 난모세포에서 E2를 감소시켰지만, testosterone의 분비에 대한 영향은 관찰되지 않았으며(Afonso et al., 1997), 대서양 넙치(*Hippoglossus*

hippoglossus) 생식소에서의 조직 관찰 변화 결과 간성화를 나타내는 정모 세포 및 정원 세포는 관찰되지 않았다(Babiak et al., 2012). 이번 Ana의 복강주사 실험에서 Ana는 기존의 연구 결과들과 유사한 결과를 나타내었으나, 미성숙 시기 및 성숙시기의 차이에 대하여 명확히 연구되지는 않았으며, 이번 연구 결과에서 미성숙 암컷 넙치를 vitellogenesis로 형성 후 생식소 및 간에서의 ER 및 VTG mRNA level이 감소하는 것으로 보아 성숙이 시작되는 단계에서 Ana의 효능은 약할 것이라 판단되었다.

미성숙 암컷 넙치에 Exe를 복강주사 후 생식소 및 간에서 ER 및 VTG mRNA level의 변화량에서 생식소 및 간의 ER 및 VTG mRNA level은 전체적으로 감소하였다. 또한, E2를 주사 후 vitellogenesis를 형성시켜 Exe를 2차 주사하였을 때, ER 및 VTG mRNA level이 감소하여 미성숙 시기가 아닌 성숙 시기에도 성 성숙의 억제를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다. Exe는 E2의 합성을 억제하여 투여 후 단시간 내에 혈중 E2의 농도를 낮추는 작용을 하며, AI로 steroid 계열의 hormone의 suicide inhibition이라 불리는 과정을 통하여 효소의 불활성화를 유도하는 aromatase의 기능을 억제하는 역할을 한다(Tiboni and Ponzano, 2016). ER은 cell membrane에도 존재하지만 주로 cell 내부에 위치하여 E2와 결합을 하며, Exe는 steroid AI로 cell 내에 위치한 ER과의 연관성을 알 수 있었다. 2010년 킬라피아에 Exe를 급이 시켰을 때 연구 결과에서 E2와의 비교에서 Exe가 생식선에서 testosterone이 E2로의 전환을 차단하여 미분화 된 생식선을 정소로 변형시켰다고 보고되었다(Ruksana et al., 2010). 또한, 2018년 black sea bass(*Centropristis striata*)를 Exe에 노출 후, 초기 sex change와 gonadal gene expression의 연구에서는 생식소의 female gonad development function을 가지는 *cyp19a1a* gene은 암컷에서 감소하였으나 대조구와 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, E2 response의 기능을 가지는 *esr2b* gene 그리고 egg envelope component의 function을 가지는 *zpc2* gene 역시 대조구

와 큰 차이는 나타내지 않았으나 감소하였다고 보고되었다(Breton et al., 2019). 본 연구에서 E2를 복강주사 후 AI를 주사하였을 때, ER mRNA level의 감소 현상이 AI 단독으로 주사하였을 때 보다 약간 높지만 상당히 급격하게 감소되는 것을 미루어 보았을 때, 간에서 직접적으로 ER을 억제하여 암컷의 성 성숙 억제를 유발시킬 수 있다는 것이라고 생각할 수 있었다. 또한, *in vitro* 연구 결과에서 Exe는 Ana와 유사하게 간 및 생식소에서 ER 및 VTG mRNA level의 발현 자체를 직접적으로 억제하는 영향을 나타내는 것을 확인하였으며, 이것은 AI의 기능이 아닌 또 다른 기능으로서 성 성숙 억제의 기능을 가진다고 판단하였다.

인간의 유방암 치료에 있어 Ana 및 Exe의 효능 비교 연구에서 비스테로이드의 경쟁적이고 가역적인 억제와는 대조적으로 비가역적인 Exe가 E2의 억제에 더 효능이 우수하다고 보고되었는데(Goss et al., 2013), 이번 연구 결과에서 역시 넙치의 생식소 및 간에서 ER 및 VTG mRNA level의 변화량과 생식소 조직학적 관찰에서 Exe가 Ana 보다 우수하다는 것을 알 수 있었다. 따라서, AI를 이용한 효과적인 성 성숙 제어 기술을 위해서는 다양한 AI 물질의 활용과 추가적인 실험이 요구되어야 할 것으로 판단된다.

제 5 장

미성숙 암컷 녀치를 이용한 Tamoxifen에 의한 성 성숙 억제

1. 서론

Tamoxifen(Tam)은 비스테로이드성 항에스트로겐으로 자궁, 유선, 난관 등의 E2 표적 기관에서는 E2와 경쟁적으로 결합하는 것으로 알려져 있으며, 일부 조직에서 E2 작용을 나타나게 하지만, 다른 조직에서는 E2 작용을 막는 역할을 하는 선택적 에스트로겐 수용체 작용제(Selective estrogen receptor modulator; SERM)로 작용한다(Dix and Jordan, 1980; Horwitz et al., 1981; Sutherland and San, 1979). SERM은 이론적으로 시상하부(Hypothalamus)와 뇌하수체(Pituitary)의 ER(Estrogen receptor)에 길항작용을 하여 negative feedback이 작용하지 못하게 하여 성 성숙을 억제 시키는 역할을 한다(Mikelman et al., 2017). 또한, 다양한 E2 조절 표적에 대한 대체 효과를 갖는 별도의 항에스트로겐의 능력을 말한다(Howell, Johnston and Howell, 2004). Tam은 인간에게 있어 성 호르몬 의존성 유방암의 치료제로 사용되며, ER에 결합한 ER/Tam 복합체는 co-repressors로 알려진 다른 단백질들을 불러들이며, 이 복합체는 DNA에 결합하여 유전자 발현을 조절하는 기능을 가진다(Shang et al., 2000).

어류에서 Tam은 Japanese medaka(*Oryzias latipes*), Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*) 및 zebra fish(*Danio rerio*) 등 몇몇의 어류에 연구되어 왔으며, 주로 암컷의 응성화에 대한 연구들이 주를 이뤘다(Chikae et al., 2004; Singh et al., 2012; Van der ven et al., 2007). Medaka의 연구에서 Tam은 E2, alpha-ethynylestradiol(EE2), flutamide 및 methyltestosterone(MT) 5가지 화학물질을 사료에 섞어 섭취 후, E2의 길항제 역할, androgen의 길항제 역할의 기능을 비교하여 vitellogenin(VTG) 합성에 미치는 영향을 관찰하였다(Chikae et al., 2004). Nile tilapia의 연구에서 Tam을 처리한 미성숙 tilapia의 성장이 대조구와 비교하였을 때, 월등히 빠른 성장을 나타낸다고 보고하였다(Singh et al., 2012). 이처럼 Tam은 ER의 길항제로 효과를 나타내며, 어류에 있어 estradiol이 존재

하는 곳에서 VTG 생성을 억제할 나타낸다고 보고되었으며(Leanos-Castaneda and Van Der Kraak, 2007), 성장의 부분에서도 차이를 나타내었다. 또한, 성장 부분에도 상당한 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

이번 연구는 항에스트로젠 및 SERM의 작용을 하는 Tam의 성 성숙 억제 효능을 확인하기 위해 미성숙 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 복강주사 후 간 및 생식소에서 유전적 요인인 ER mRNA level과 VTG mRNA level을 확인하였고 생식소 중량 지수(GSI) 및 조직학적 변화를 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험동물 및 Tamoxifen 처리

평균 350 ± 13 g의 미성숙 넙치를 제주 양식장에서 구매하여 연구실 수조에 광주기 light : dark = 12 : 12, 수온 18 ± 1 °C 로 3일간 순치 적응시켰다. 실험기간 동안 사료는 공급하지 않았다.

실험에 사용한 호르몬은 대조구로 사용한 Dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma)를 용매제로 사용하였으며, vitellogenesis 단계를 유도하기 위해 E2 및 Tam을 사용하였다. 실험 1일차 순치 적응시킨 넙치 30마리를 2 phenoxyethanol(SIGMA, USA)으로 마취 후 E2 및 Tam을 DMSO에 녹여 각 5개의 수조별로 대조구, vitellogenesis, vitellogenesis로 유도 후 Tam을 주사, E2 및 Tam의 혼합 주사 및 Tam 단독 실험구로 나눠 $5 \mu\text{g/g}$ 의 농도로 준비하여 복강주사 하였다.

2.2. Tamoxifen 처리 후 샘플

실험어에 주사 후 3일 째 각각의 실험구에서 3마리의 넙치를 전장 중량을 측정하여 해부 후 생식소 및 간을 적출하였으며, 생식소는 중량 측정 후 유전자 분석용과 조직학 분석용으로 보관하였다. Vitellogenesis를 유도 후 Tam의 작용을 알아보기 위하여 3번 수조의 실험어에 Tam을 2차 주사하였으며, 실험 마지막 날인 6일 째 모든 실험구의 실험어를 3일 째와 같은 방법으로 해부 후 샘플을 보관하였다.

2.3. 생식소 중량 지수 관찰

실험기간에 생식소 발달 상태를 조사하기 위해 해부 후 생식소 조직을 전자저울을 이용하여 0.01 g까지 습중량으로 측정하였다. 생식소중량지수(Gonadosomatic index, GSI)는 $[\text{생식소 중량} \times 100 / \text{어체중}]$ 의 식에 의하여 계산하였다.

2.4. 간 및 생식소에서의 Total RNA 추출 및 cDNA 합성

간 및 생식소 조직 샘플에 RNAiso plus(TaKaRa, Japan)을 1 ml 첨가 후 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 이후 chloroform(Sigma, USA) 200 μ l를 첨가한 뒤 충분히 inverting하여 실온에서 5 min 간 반응 후, 13,000 rpm에서 10 min 간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 분리하여 동량의 iso-propanol을 첨가하고 inverting 후 실온에서 5 min 반응 시킨 다음 13,000 rpm에서 10 min 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 제거하고 DEPC water로 제조된 75% ethanol 1ml을 첨가하고 13,000 rpm에서 10 min 원심분리 하였으며, 3회 반복하였다. 이후 상층액을 제거하고 pellet을 완전히 건조 시킨 뒤 RNase free water에 녹였다. Total RNA concentration은 Thermo Scientific uDrop Plate(Thermo Scientific, Germany)로 측정하였고, cDNA는 A260/280 ratio가 1.8 – 2.0이 되는 500 ng의 total RNA를 PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa, Japan)로 제조사의 프로토콜에 따라 합성하였으며, 합성된 cDNA는 Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용하였다.

2.5. Quantitative PCR 분석

Quantitative PCR(qPCR) 분석에 사용된 primer는 *in vitro*에 사용한 primer를 동일하게 사용하였으며, Table 2에 나타내었다. qPCR 분석은 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX(SYBR Green with low ROX)(Enzynomics, Daejeon, Korea)을 이용하여 Thermal Cycler DiceR® Real Time System Single(TaKaRa, Japan)로 분석하였다. PCR cycling은 initial denaturation 95 °C 10 min, denaturation 95 °C 10 sec, annealing 58 °C 30 sec 40 cycles, elongation 72 °C 20 sec, melting curve 1 min의 조건으로 수행하였다.

2.6. 생식소 조직 관찰

각 실험어의 생식소 조직은 Bouin's solution에 고정 후 ethanol에 단계별로 dehydrate 시켜 paraffin에 고정시켜 5 um의 두께로 section하였다. 조직학적 관찰을 위해, slide는 hematoxylin과 0.5 % eosin에 염색시켰다.

2.7. 통계학적 분석

본 실험의 데이터 결과는 IBM SPSS Statistics 21.0(SPSS Inc., USA)을 활용하여 two-way ANOVA-test로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 실시하여 측정하였으며, $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

3. 결과

3.1. Tamoxifen 복강 주사 후 ER 및 VTG mRNA level 변화

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Tam을 복강 주사 후, 생식소 및 간에서의 ER 및 VTG mRNA level 변화량은 E2를 주사하여 vitellogenesis를 형성시킨 실험구는 대조구에 비해 증가하였다. 생식소에서의 ER mRNA level은 E2로 vitellogenesis를 형성시킨 후 Tam을 2차 주사하여 5일째, 대조구인 0.422 ug/ml와 E2 주사 실험구의 0.791 ug/ml 보다도 낮은 0.343 ug/ml의 수치를 나타내었다. E2 및 Tam 혼합 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 대조구에 비해 낮게 발현하였으며, 시간이 지남에 따라 0.381 ug/ml에서 0.322 ug/ml로 유의적인 감소를 나타내었다. Tam 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 0.22 ug/ml로 가장 낮은 수치를 나타내었으나, 2일째 및 5일째 유의성은 없었다(Fig. 26). 따라서, 생식소에서 ER mRNA level은 미성숙 및 성숙 시기 모두 감소를 나타내었으며, 대조구와 비교하였을 때, E2 및 Tam 단독 주사 실험구 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다.

간에서의 ER mRNA level 변화량은 E2 복강 주사 후, vitellogenesis를 형성시킨 실험구는 대조구에 비해 2일째 및 5일째 모두 2배 이상 증가하였다. Vitellogenesis를 형성시킨 후, Tam을 2차 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 1.378 ug/ml에서 0.843 ug/ml으로 급격한 감소를 나타내었으며, E2 및 Tam의 혼합 주사 실험구에서는 2일째 대조구 0.727 ug/ml 보다 감소한 0.449 ug/ml의 발현량을 나타내었으나 2차 주사 이후 ER mRNA level은 2일째 발현량과 유의하지 않은 감소를 나타내었다. 하지만, 대조구 5일째 0.752 ug/ml과 비교하였을 때, 0.343 ug/ml의 유의적인 감소를 나타내었다. Tam 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 E2 및 Tam의 혼합 주사 실험구와 유사한 발현량을 나타내었으나, 5일째 0.419 ug/ml에서 0.420 ug/ml로 수치의 차이는 크지 않았지만

유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 27).

간에서의 VTG mRNA level 변화량은 생식소 ER mRNA level과 유사한 발현 패턴을 나타내었다. Tam 단독 주사 실험구에서의 ER mRNA level은 유의적인 증가를 나타낸 반면, VTG mRNA level은 2일 0.361 ug/ml에서 5일째 0.321 ug/ml로 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 28). 따라서, 간에서의 ER 및 VTG mRNA level은 대조구와 비교하였을 때, 미성숙 시기에서 감소를 나타내었으며, 성숙 시기에서 mRNA level은 2일째 및 5일째 시간이 지남에 따라 감소하였으나, 대조구와의 비교에서 증가를 나타내었다.

3.2. Tamoxifen 주사 후 생식소 중량 지수(GSI) 변화 및 조직학적 변화 관찰

미성숙 암컷 넙치에 E2 및 Tam을 복강 주사 후, 생식소 중량 지수인 GSI는 E2를 주사한 실험구에서 증가하였으며, Tam의 단독 주사 실험구에서 모두 감소하였다. 하지만, 대조구와 비교하였을 때, GSI는 증가하였다. 또한, 성숙 지수 기준인 1.2 보다 낮은 수치를 나타냈으며, 수치 변화에 따른 의미는 작용하지 않는다고 판단하였다(Fig. 29).

조직학적 변화 관찰 결과 대조구인 DMSO를 주사한 실험구에서의 생식소 난세포에서 핵 및 인의 관찰이 어려웠으며(Fig. 30. A), E2 주사 실험구에서의 생식소는 난황포 및 여포세포층이 뚜렷하게 관찰되어 vitellogenesis가 형성되었음을 알 수 있었다(Fig. 30. B). E2를 주사하여 vitellogenesis를 형성 후, Tam을 2차 주사한 실험구에서 생식소는 대조구와 비교하였을 때, 난황포가 부분적으로 관찰되었지만, 난세포 크기는 대조구보다 작았으며 E2 주사 실험구와 비교에서 역시 난세포가 줄어들었으며, 여포세포층은 관찰되지 않아 vitellogenesis 단계 중간에서 지연됨을 알 수 있었다(Fig. 30. F). E2 및 Tam 혼합 주사 실험구에서 2일째, 난세포 크기가 커졌으며 난황포 역시 관찰되었으나, E2 주사 후 Tam 주사 실험구와 동일하게 여포세포층은 관찰되지 않았다(Fig. 30. C). 또한, E2 및 Tam 혼합 주사 실험구 5일째 난세포 크기가 작아졌으며, 난황포는 관찰할 수 없어 성숙이 진행되지 않고 퇴행하는 것이 관찰되었다(Fig. 30. F). Tam 단독 주사 실험구에서의 생식소는 2일째 크기가 대조구와 비교하였을 때, 줄어들었으며(Fig. 30. D), 5일째 큰 변화는 나타나지 않아 성숙이 멈췄음을 알 수 있었다(Fig. 30. E).

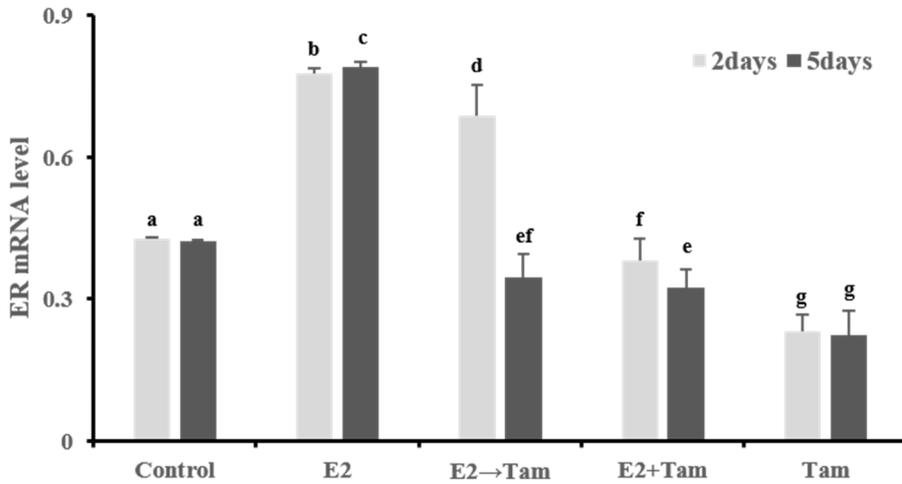


Figure 26. Expression of ER mRNA in the gonad of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Tamoxifen (Tam) add to Estrogen (E2) and Tamoxifen (Tam) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

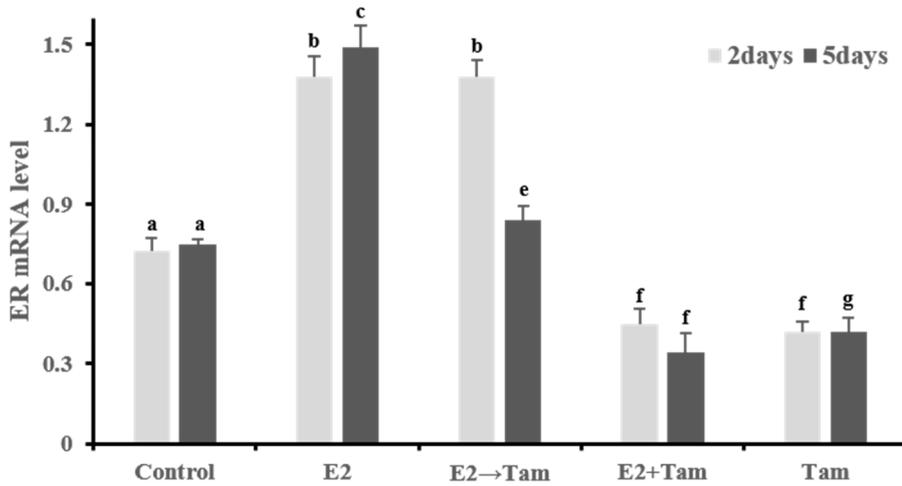


Figure 27. Expression of ER mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Tamoxifen (Tam) add to Estrogen (E2) and Tamoxifen (Tam) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

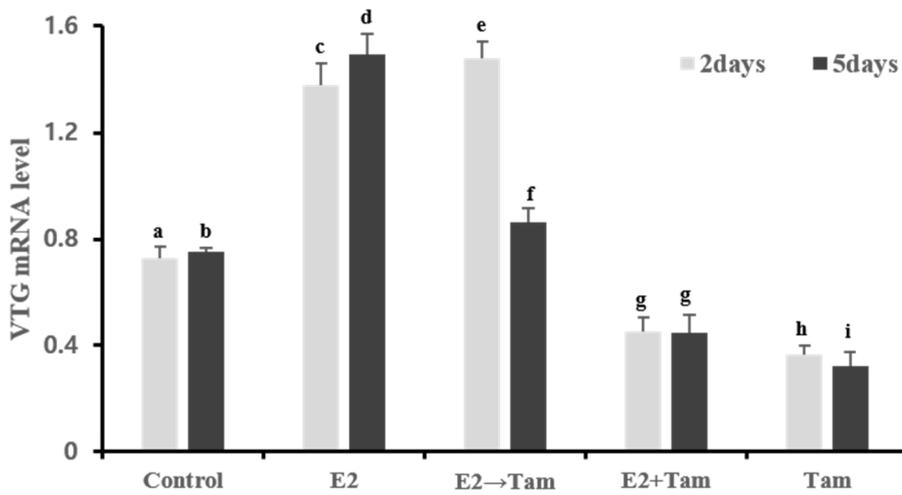


Figure 28. Expression of VTG mRNA in the liver of female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) that were injected with DMSO (control), Estrogen (E2), Tamoxifen (Tam) add to Estrogen (E2) and Tamoxifen (Tam) alone. Values are expressed as the mean SE. Different letters indicate a significant difference in mean values ($P < 0.05$ by two-way ANOVA following Duncan's multiple range test).

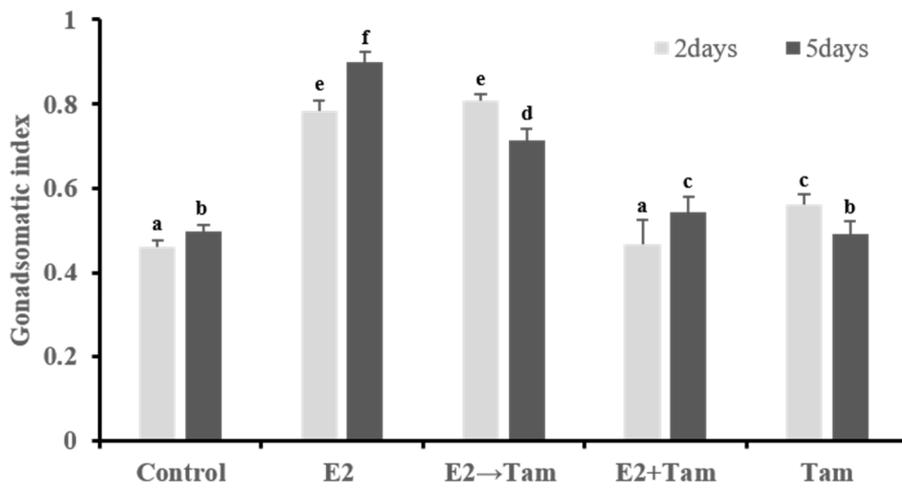


Figure 29. Effect of Estrogen (E2) and Tamoxifen (Tam) treatment on Gonadosomatic index in female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

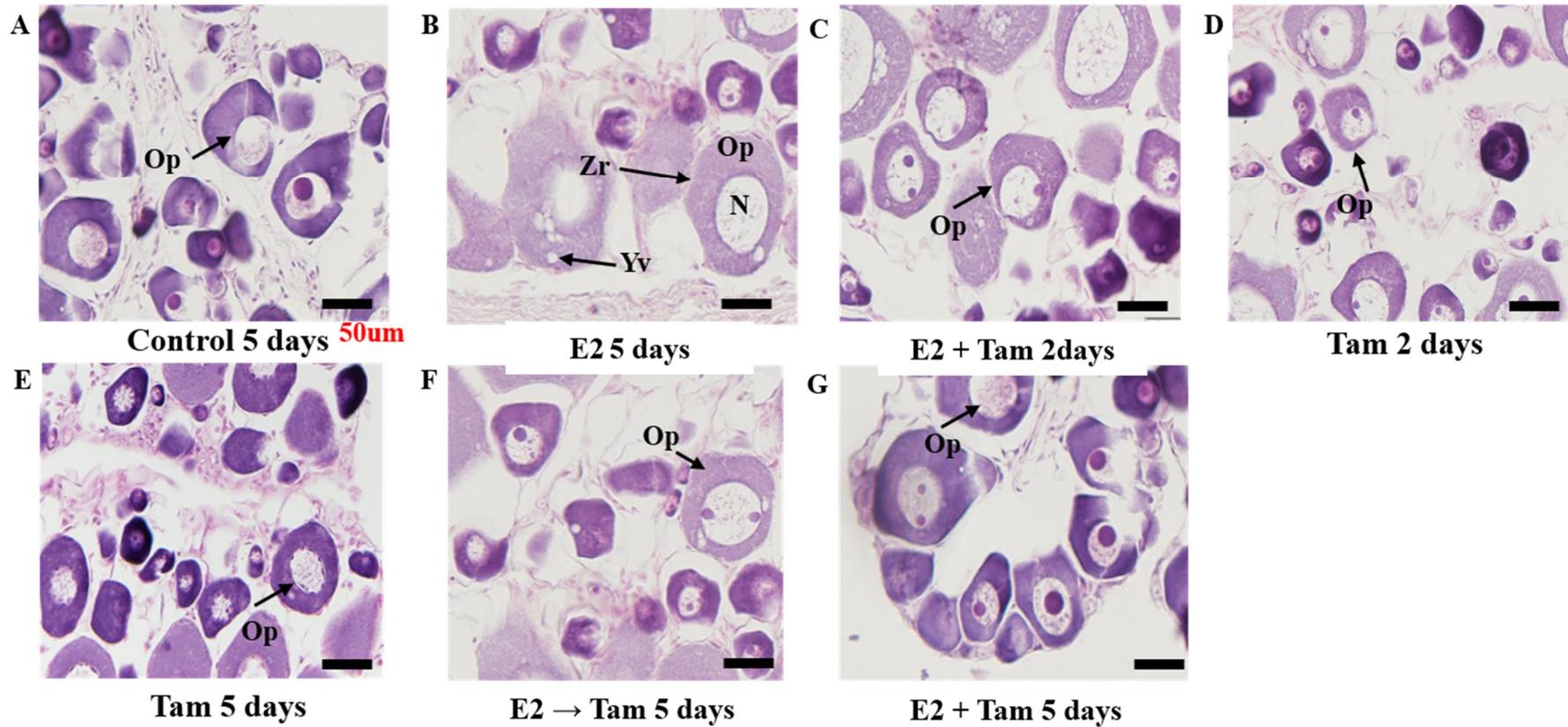


Figure 30. Histological observations of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary treated Tamoxifen (Tam). Op : Ooplasm, No : Nucleolus, N : Nucleus, Yv : Yolk vesicle, Zr :Zona radiata

4. 고찰

E2는 생리학에 있어 중심적인 역할을 하며, 세포에서의 역할은 세포 성장 조절에 관여하는 유전자의 전사를 활성화시키는 ER에 결합함으로써 그 역할이 시작된다(Dhingra and Kapil, 1999). 이러한 E2는 ER과의 결합으로 ER mRNA 전사를 활성화시켜 E2가 활성화된다. Tam은 비스테로이드 항에스트로겐으로 E2와 ER의 binding을 차단하는 물질로 E2의 기능을 차단하거나 ER과 결합하는 것으로 알려져 있다(Massarweh et al., 2008). 또한, 어류에 있어 Tam은 ER의 길항제로 효과를 나타내며, 어류에 있어 E2가 존재하는 곳에서 VTG 생성의 억제를 나타낸다고 보고되었다(Leanos-Castaneda and Van Der Kraak, 2007).

이번 연구는 미성숙 넙치에 Tam을 복강주사한 결과 예상된 바와 같이 Tam은 생식소에서의 ER mRNA level 감소로 인하여 간에서의 ER 및 VTG mRNA level이 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 생식소 내에서의 ER mRNA level 감소는 Tam이 초기 반응에 민감성을 나타내 E2 보다 강하게 ER과 결합하여 생식소 및 간에서의 ER mRNA level을 감소시킬 것이라 생각되었다. Tam/ER 복합체는 E2/ER 복합체와는 다른 ERE의 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 변화를 유발하여 E2와의 결합을 방해 및 ER의 감소를 유발시켜 성 성숙의 억제를 유도하는 것으로 판단되었다.

Chicken 연구에서 Tam 처리 후, 암컷 생식소의 퇴행을 나타냈으며, 외관상 testis의

형태를 나타냈으나, 조직학적 관찰에서 변화를 나타내지 않았다고 보고되었다(Koo et al., 1985). 미성숙 넙치에 Tam 단독 및 E2와 혼합 처리한 실험구에서도 유전학적인 mRNA의 변화는 관찰되었지만, 조직학적 관찰에서 변화를 나타내지 않았다. 경골어류에서는 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)와 틸라피아(*Oreochromis mossambicus*)에서 Tam의 효능에 대한 연구가 보고되었는데 생식소 성 분화에 있어 효능을 나타내지 않았다고 보고되었다(Guiguen et al., 1999). 또한, 2007년 넙치에 Tam을 처리하였을 때 ER alpha와 beta의 발현 결과에서는 anti-estrogenic 활성을 가진다고 확인하였다(Kitano et al., 2007). 이와 같이 Tam은 종에 따른 차이를 나타낼 뿐 아니라 성 성숙 전 및 성 성숙 후의 시간적 차이에 따라 ER 및 VTG receptor에 미치는 영향도 차이를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만, Tam은 앞서 언급한 바와 같이 ER과 결합을 할 수 있는 기능을 갖고 있으며, 이와 같은 결합으로 ER의 양을 감소시키는 반응을 나타낼 수 있다. 이번 결과가 Tam에 의한 E2 합성에 있어 시상하부-뇌하수체-생식소 축(BPG axis)에 걸친 negative feedback 작용에 대한 가능성이 예측되지만, 이러한 기작에 관하여는 아직 완전히 보고된 바 없어 Tam에 직접적인 관여가 있는지 검토가 필요하다.

종합 고찰

이번 연구는 시상하부에서 분비되는 GnRH 및 뇌하수체에서 분비되는 Gth를 제어할 수 있는 Dopamine(Da), 생식소의 여포세포에서 testosterone의 estrogen(E2)으로 전환을 시키는 효소인 aromatase와 결합하여 E2 생성을 억제시키는 Aromatase inhibitor(AI)의 두 종류인 Anastrozole(Ana) 및 Exemestane(Exe), 마지막으로 생식소에서 항에스트로겐의 기능을 하는 Tamoxifen(Tam) 총 4가지 화학물질을 이용하여 *in vitro* 연구로 시상하부, 뇌하수체 및 간 세포를 배양하여 배지에 각 화학물질을 혼합 투여하여 자극시켰으며, *in vitro* 결과를 바탕으로 성 성숙 관련 호르몬인 GnRH(Gonadotropin-releasing hormone), Gth(Gonadotropin), Estrogen receptor(ER) 및 Vitellogenin(VTG) mRNA level의 변화와 각 투여 물질에 따른 조직학적 변화를 관찰하기 위해 *in vivo* 실험으로 미성숙 암컷 넙치에 E2를 주사하여 vitellogenesis로 유도하여 미성숙 시기와 성숙 시기의 화학물질들의 차이를 확인하였다.

Da는 번식기능에 중요한 역할을 하는 신경전달물질로, 성선자극호르몬의 변화를 조절함으로써 계절번식 동물에서의 번식 주기를 유지하는데 결정적인 역할을 한다(Han et al., 2005). 이러한 Da는 주로 GnRH 분비를 억제함으로써 번식기능에 관여한다. GnRH 분비를 억제함에 있어 Da는 GnRH 신경세포 말단에 작용하여 시냅스전 억제에 의해 일어난다고 알려져 있는데 이는 Da 시스템이 GnRH 신경세포의 활성을 직접적으로 조절할 수 있다는 가능성을 시사하였으며(Leranth et al., 1984), 본 실험을 통해서 Da가 GnRH mRNA 및 Gth mRNA level의 감소를 나타냄으로 Da가 기능적으로 성 성숙의 억제를 가질 수 있다는 것을 확인하였다. Da를 이용한 *In vitro* 연구 결과 시상하부 및 뇌하수체 세포에서 농도에 따른 GnRH mRNA level의 차이를 나타냈으며, 농도에 따라 GnRH mRNA level에 영향을 나타낼 수 있는 것을 확인하였다. 또한, Da는 GnRH에서

Gth로의 경로에서 작용하여 Gth의 분비를 억제시킬 것으로 생각되었는데, 실험 결과 시상하부 및 뇌하수체 모두 작용한다는 것을 알 수 있었다. 본 *in vitro* 연구결과 E2 및 Da 혼합 투여 실험구에서의 GnRH mRNA level 및 ER mRNA level은 대조구에 비해 감소를 나타내었으며, *in vivo* 연구 결과 역시 시간이 지남에 따라 급격한 감소를 나타내었다. 또한, *in vivo* 결과에서 Da의 단독 주사 실험구보다 낮은 GnRH mRNA 및 ER mRNA level을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과들은 E2가 Da에 영향을 미치는 것으로 추측할 수 있었다. E2는 신경 전달 물질 시스템에 있어 신호 전달을 변경하여 다양한 인지 과정에 영향을 나타내며, Da의 방출 및 재흡수에 영향을 나타내는 기능적 활동에 관여를 나타낸다(Almey and Brake, 2015; Becker and Rudick, 1999). 또한, 인간에서 E2의 기능은 Da 의존성 질환에 관여한다는 연구 결과 및 다양한 생물들에 있어 영향을 미친다는 연구 결과들이 보고되고 있다(Almey and Brake, 2015). E2의 여러가지 기능 중 하나는 Da 뉴런에 대하여 down-stream의 효과를 나타낼 뿐 아니라, adenylate cyclase 활성을 통한 D2 수용체의 억제가 감소되며, adenylate cyclase의 D1 수용체 활성화를 증가시켜 D2 수용체의 신호 전달을 감소시키는 기능을 가진다고 보고되었다(Sliverman and Koenig, 2007). Da는 시상하부가 아닌 뇌하수체에도 직접적인 영향을 나타내어 Gth mRNA level의 감소를 나타내었으며, 이러한 감소에서 역시 E2는 Da에 영향을 나타내어 Gth mRNA level 변화를 유도하였으나, 시상하부에서의 GnRH mRNA level 감소가 아닌 Gth mRNA level의 증가를 나타내었다. 이러한 본 연구의 결과들 및 선행연구 결과들을 종합하였을 때, Da는 E2의 영향에 민감성을 나타내어 시상하부에서 E2가 plus적인 요인으로 작용하여 GnRH mRNA level을 감소시키는 반면, 뇌하수체에서 E2는 minus적인 요인으로 작용하여 Gth mRNA level을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 E2의 다양한 기능성에 관하여 시상하부 및 뇌하수체에서의 Da 수용체들에 관한 신호전달 연구가 필요하다고 판단된다. 또한, 성 성숙 시기를 따져 볼 때, 미성

숙 시기에 Da는 성 성숙 억제에 작용하지만, 성숙이 시작되는 vitellogenesis 단계에서는 큰 작용을 하지 않았다. *In vivo* 연구 결과 역시 GnRH, Gth 및 ER mRNA level의 감소에 영향을 나타내며, 조직학적 관찰 결과에서도 성 성숙의 지연을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과들로 Da는 성 성숙 억제에 효과적인 화학물질로 판단하였다.

Aromatase는 난소의 분화 과정에 작용하며, 그 분비되는 양에 따라 Aromatase가 다량 분비되면 암컷으로 변화하고 반대로 소량 분비되면 수컷으로 변화 된다고 알려져 있다(Babjak et al., 2012). Aromatase가 발현되는 대표적인 조직으로는 생식소가 있으며, 생식소 뿐 아니라 여러 조직에서 관찰되고 있는데, 고환, 태반 등과 같은 생식 기관 조직들과 뇌, 피부, 근육 및 간 등의 조직에서도 관찰된다고 보고되고 있다(Bulun et al., 1994; Shozu et al., 2002). 본 연구에서 사용한 Ana 및 Exe는 강력한 AI로 인간에 있어 유방암 환자에 E2의 생성을 막는 목적으로 사용되고 있다(Winer et al., 2005). Ana 및 Exe 이외에도 유방암 치료에 많이 사용되는 AI 중 fadrozole은 Ana와 같은 스테로이드성 AI로 다양한 어종에서 성 성숙 억제 작용이 있는 것으로 보고되고 있으며(Hinfray et al., 2013), coho salmon(*Oncorhynchus kisutch*)의 난모세포에서 E2를 감소시켰지만, testosterone의 분비에 대한 영향은 관찰되지 않았다고 보고하였다(Afonso et al., 1997). 본 연구에서는 이러한 AI 중 Ana 및 Exe를 이용하여 *in vitro* 연구에서 aromatase와 결합하여 E2의 생성을 억제하고 testosterone의 분비를 촉진하는 작용 및 ER의 불활성화시키는 작용이 아닌 간에서의 ER mRNA level 및 VTG mRNA level을 억제시키는 기능이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 간장세포 배양에 AI를 처리 후, 생식소가 아닌 aromatase 효소가 발현되는 여러 조직에서의 ER mRNA level 감소가 나타날 수 있음을 추측할 수 있었으며, 본 연구 결과에서 확인하였다. *In vivo* 연구 결과 Ana는 E2와 혼합 주사 실험구에서의 ER mRNA level이 감소하였는데 E2가 ER과 결합에도 불구하고

Ana의 기능 중 하나인 ER의 활성화를 억제시키는 작용 뿐 아니라 ER mRNA level도 억제시키는 기능을 가진다고 생각되었다. Exe는 Ana와는 다르게 E2를 이용하여 vitellogenesis로 유도 후, Exe의 2차 주사에서 생식소 및 간 모두 ER mRNA 및 VTG mRNA level이 감소하여 성숙이 유도 후에도 성 성숙 억제를 유도 시킬 수 있는 차이를 나타냈다. 이러한 Ana 및 Exe의 차이점은 명확히 밝혀지진 않았으나, 수용성인 Ana는 세포막을 쉽게 통과하지 못하여 세포막의 수용체와 결합 후 활성화하여 세포 내 target에 대한 효소를 생성하는 반면(Miller et al., 2008), 비스테로이드성 Exe는 세포막을 쉽게 통과하여 수용체와 결합 후 활성화하여 세포 내 target에 대한 효소를 생성하여 aromatase와 결합하여 testosterone이 E2로의 전환을 억제시키는(Brueggemeier., 2002) 차이로 ER 및 VTG mRNA level에 변화를 나타낸 것으로 추정할 수 있었다. 또한, 조직학적 변화 관찰 역시 성숙 시기 및 미성숙 시기에서 정원세포 및 정모세포의 관찰에 차이를 나타내었는데 이러한 결과 역시 스테로이드 및 비스테로이드의 차이로 나타낸 결과로 추정할 수 있었다. 따라서, 스테로이드 및 비스테로이드 AI의 차이를 세포 내부 및 외부에서의 signal에 대하여 명확하게 밝힐 필요가 있다.

Tam은 clomifene과 같은 선택적 에스트로겐 수용체 조절제로 일부 조직에서는 E2의 작용을 나타내지만, 다른 조직에서는 E2의 작용을 하여 이론적으로는 시상하부의 ER에 길항작용을 하여 negative feedback이 작용하지 못하게 하여 성 성숙을 억제한다. Tam은 ER 발현 조직에서 ER에 경쟁적으로 결합하여 스테로이드 호르몬 신호 전달을 차단하며, 유방암 조직의 풍부한 ER과 결합하여 종양의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다(Tate et al., 1984). ER은 ligand인 E2와 결합하여 dimerization이 되고, 핵 내로 이동하여 Estrogen responsive element(ERE) promoter와 결합하여 특정 유전자들의 발현을 촉진시키는 일종의 전사인자로 작용된다(Liu, Nawaz and Zhang, 2004). Tam/ER 복합체

는 ERE의 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). 이러한 Tam/ER 복합체는 유전적 요인에 있어 형태 및 기능의 변화를 나타내어 E2와의 결합을 방해하여 E2/ER 복합체의 형성을 억제하여 E2의 활성을 차단시켜 선택적 에스트로겐 수용체 작용제(Selective estrogen receptor modulator, SERM)로 작용하여 이번 *in vitro* 및 *in vivo* 연구에서 성 성숙 억제에 효능이 있음을 알 수 있었다.

지금까지의 연구 결과들을 요약해 보면, 시상하부에서 생성되는 GnRH 및 ER mRNA level은 Da 단독, Da 및 E2 혼합 처리 실험의 *in vivo* 및 *in vitro* 연구 결과 모두 감소를 나타낸 반면, 뇌하수체에서 생성되는 Gth mRNA level은 Da 및 E2 혼합 처리 실험의 *in vivo* 및 *in vitro* 연구 결과 증가를 나타내었다. 간에서의 ER 및 VTG mRNA level은 AI인 Ana 및 EXE 그리고 Tam을 처리한 *in vivo* 및 *in vitro* 연구 결과 모두 감소를 나타내었다. 생식소에서의 ER mRNA level 역시 모두 감소를 나타내었으며, 조직학적 관찰 결과 Da 및 Tam을 주사한 넙치의 생식소의 변화는 성숙의 지연을 관찰한 반면, AIs를 주사한 넙치의 생식소의 변화에서 정모세포 및 정원세포가 관찰되어 성 전환 초기 단계를 관찰하였다(Fig. 31). 따라서, 이번 연구에 사용된 4가지 화학적 물질 모두 유전적 및 조직학적 관찰에서 성 성숙 억제 효능이 있음을 확인하였으며, 미성숙과 성숙 시기 및 억제 능력을 종합하였을 때, AI가 생식소에서 작용하는 기능이 아닌 간에서도 직접적인 작용을 나타내어 새로운 기능을 가질 수 있다는 것을 확인하였으며, 미성숙 및 성숙 시기 모두 억제가 가능함을 나타내어 4가지 화학물질 중 가장 효능이 있을 것이라 생각되었다. 하지만, 본 연구는 단시간 내의 유전적 및 조직학적 변화를 관찰하였으며, 지속적인 투여를 통하여 보다 구체적인 E2, ER, GnRH, Gth 및 각 화학물질들의 mechanism에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

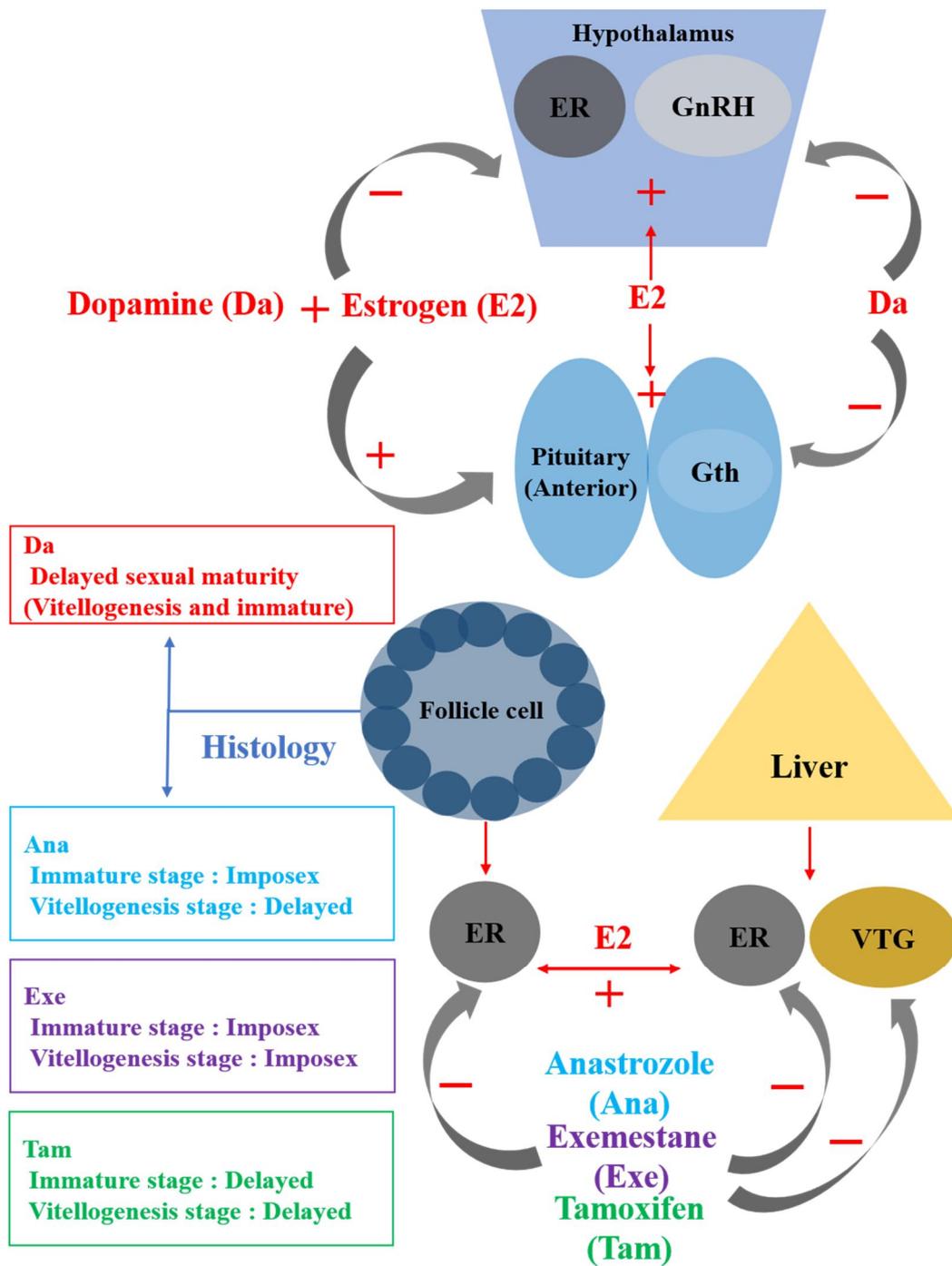


Figure 31. Sex hormone blocking mechanisms in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) for used Dopamine, Anastrozole, Exemestane and Tamoxifen. Plus (+) means increase in mRNA levels. Minus (-) means decrease in mRNA levels.

참고 문헌

- Afonso, L. O. B., Campbell, P. M., Iwama, G. K., Devlin, R. H., & Donaldson, E. M. 1997. The effect of the aromatase inhibitor fadrozole and two polynuclear aromatic hydrocarbons on sex steroid secretion by ovarian follicles of coho salmon. *General and comparative endocrinology*, 106(2), 169-174.
- Almey, A., Milner, T. A., & Brake, W. G. 2015. Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Hormones and behavior*, 74, 125-138.
- Arbogast, L. A., & Voogt, J. L. 1997. Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology*, 138(7), 3016-3023.
- Babiak, J., Babiak, I., van Nes, S., Harboe, T., Haugen, T., & Norberg, B. 2012. Induced sex reversal using an aromatase inhibitor, Fadrozole, in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 324, 276-280.
- Baum, M. J. 1979. Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 3(4), 265-284.
- Becker, J. B., & Rudick, C. N. 1999. Rapid effects of estrogen or progesterone on the amphetamine-induced increase in striatal dopamine are enhanced by estrogen priming: a microdialysis study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64(1), 53-57.
- Bhattacharya, S. (1992). Endocrine control of fish reproduction. *Current science*, 135-139.
- Bulun, S. E., Simpson, E. R., & Word, R. A. 1994. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78(3), 736-743.

- Breton, T. S., Kenter, L. W., Greenlaw, K., Montgomery, J., Goetz, G. W., Berlinsky, D. L., & Luckenbach, J. A. 2019. Initiation of sex change and gonadal gene expression in black sea bass (*Centropristis striata*) exposed to exemestane, an aromatase inhibitor. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 228, 51-61.
- Brueggemeier, R. W. 2002. Overview of the pharmacology of the aromatase inactivator exemestane. *Breast cancer research and treatment*, 74(2), 177-185.
- Chikae, M., Ikeda, R., Hasan, Q., Morita, Y., & Tamiya, E. 2004. Effects of tamoxifen, 17 α -ethynylestradiol, flutamide, and methyltestosterone on plasma vitellogenin levels of male and female Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 17(1), 29-33.
- Choi E, Ko H, Shin J, Kim MA, Sohn YC. 2005. Expression of gonadotropin genes in Manchurian trout *Brachymystax lenok* and production of recombinant gonadotropins. *Fisheries Sci* 71:1193-1200.
- Cosman, F., & Lindsay, R. 1999. Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum. *Endocrine Reviews*, 20(3), 418-434.
- Custódio, J. A., Dinis, T. C., Almeida, L. M., & Madeira, V. M. 1994. Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxy radical scavenging activity. *Biochemical pharmacology*, 47(11), 1989-1998.
- Dhingra, K. 1999. Antiestrogens—tamoxifen, SERMs and beyond. *Investigational new drugs*, 17(3), 285-311.
- Dix, C. J., & Jordan, V. C. 1980. Modulation of rat uterine steroid hormone receptors by estrogen and antiestrogen. *Endocrinology*, 107(6), 2011-2020.

- Fabian, C. J. 2007. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *International journal of clinical practice*, 61(12), 2051-2063.
- Geisler, J., King, N., Anker, G., Ornati, G., Di Salle, E., Lønning, P. E., & Dowsett, M. 1998. In vivo inhibition of aromatization by exemestane, a novel irreversible aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 4(9), 2089-2093.
- Goss, P. E., Ingle, J. N., Pritchard, K. I., Ellis, M. J., Sledge, G. W., Budd, G. T., ... & Shepherd, L. E. 2013. Exemestane versus anastrozole in postmenopausal women with early breast cancer: NCIC CTG MA. 27—a randomized controlled phase III trial. *Journal of clinical oncology*, 31(11), 1398.
- Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J., Iseki, K., McMeel, O. M., Martin, S. A. M., & Fostier, A. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 54(2), 154-162.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., & Chang, C. F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 352-366.
- Hassin, S. D. de Monbrison, Y. Hanin, A. Elizur, Y. Zohar and D. M. Popper, 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156, 305–316.
- Hinfray, N., Nobrega, R. H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Marechal, E., Chadili, E., ... & Brion, F. 2013. Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected

by oestradiol. *Journal of Endocrinology*, 216(3), 375-388.

HORWITZ, K. B., AIGINGER, P., KUTTENN, F., & McGUIRE, W. L. 1981. Nuclear estrogen receptor release from antiestrogen suppression: amplified induction of progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology*, 108(5), 1703-1709.

Howell, S. J., Johnston, S. R., & Howell, A. 2004. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 18(1), 47-66.

Hwang, E. K., Gong, Y. G., Ha, D. S., & Park, C. S. 2010. Inducing the regeneration and maturation of free-living gametophytes of *Ecklonia stolonifera* Okamura (Laminariales, Phaeophyta). *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(3), 231-238.

Jang et al., 1998. Induced Ovulation in the Mandarin Fish, *Siniperca scherzeri* by Sex-Maturation Hormones. *Korean Aquaculture*, 11(4), 513-519.

Jönsson, A. C., & Hansson, T. 1984. Influence of sex steroids on the catecholamine biosynthesis in chromaffin tissue from rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and comparative endocrinology*, 55(2), 200-207.

Kamei H, Ohira T, Yoshiura Y, Uchida N, Nagasawa H, Aida K. 2003. Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese eel *Anguilla japonica* using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. *Gen Comp Endocrinol* 134:244-254.

Karigo, T., Aikawa, M., Kondo, C., Abe, H., Kanda, S., & Oka, Y. 2014. Whole brain-pituitary in vitro preparation of the transgenic medaka (*Oryzias latipes*) as a tool for analyzing the differential regulatory mechanisms of LH and FSH release. *Endocrinology*, 155(2), 536-547.

- Khansari, A. R., Parra, D., Reyes-López, F. E., & Tort, L. 2017. Cytokine modulation by stress hormones and antagonist specific hormonal inhibition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) head kidney primary cell culture. *General and comparative endocrinology*, 250, 122-135.
- KIM, D. J., HAN, C. H., & AIDA, K. 1999. Effects of Activin on Testosterone-primed Immature Rainbow Trout Gonadotropin Release in vitro. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 32(2), 204-210.
- Kim, H. W., Kim, J. H., Park, J. W., Baek, H. J., & Kim, D. J. 2021. Effects of Photoperiod and Water Temperature on Male Sex Steroid Levels in Cultured Small Yellow Croaker (*Larimichthys polyactis*). *Journal of Life Science*, 31(3), 314-320.
- Kim, B. H., Min, K. S., Lee, S. J., Park, K. Y., An, C. M., & Min, B. H. 2006. Effect of temperature on induced sexual maturation of the ark shell, *Scapharca broughtonii* (Schrenck) broodstock. *The Korean Journal of Malacology*, 22(2), 175-182.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., & Abe, S. I. 2000. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 56(1), 1-5.
- Kitano, T., Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Koyanagi, T., & Abe, S. I. 2007. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular reproduction and development*, 74(9), 1171-1177.
- Koo, G. C., Allen, H. L., Long, R. A., Serio-Dunn, R., Goggin, B., & Weppelman, R. M. 1985. Effect of tamoxifen on H α Y antigen expression and gonadal development in

chicken embryos. *Differentiation*, 29(2), 140-144.

Kyvernitakis, I., Albert, U. S., Kalder, M., Winarno, A. S., Hars, O., & Hadji, P. 2015. Effect of anastrozole on hormone levels in postmenopausal women with early breast cancer. *Climacteric*, 18(1), 63-68.

Lammel, T., Tsoukatou, G., Jellinek, J., & Sturve, J. 2019. Development of three-dimensional (3D) spheroid cultures of the continuous rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Ecotoxicology and environmental safety*, 167, 250-258.

Lammers, C. H., D'Souza, U., Qin, Z. H., Lee, S. H., Yajima, S., & Mouradian, M. M. 1999. Regulation of striatal dopamine receptors by estrogen. *Synapse*, 34(3), 222-227.

Leaños-Castañeda, O., & 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. *Toxicology and applied pharmacology*, 224(2), 116-125.

Leranth, C., MacLusky, N. J., Shanabrough, M., & Naftolin, F. 1988. Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology*, 48(6), 591-602.

Li, A., Sadasivam, M., & Ding, J. L. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 2799-2806.

Lin, H. R., Peng, C., Van Der Kraak, G., & Peter, R. E. 1989. Dopamine inhibits gonadotropin secretion in the Chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*). *Fish physiology*

and biochemistry, 6(5), 285-288.

- Linard, B., Bennani, S., & Saligaut, C. 1995. Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology*, 99(2), 192-196.
- Liu, Z., Shi, H. Y., Nawaz, Z., & Zhang, M. (2004). Tamoxifen induces the expression of maspin through estrogen receptor- α . *Cancer letters*, 209(1), 55-65.
- Lu, Y., Sareddy, G. R., Wang, J., Wang, R., Li, Y., Dong, Y., ... & Brann, D. W. 2019. Neuron-derived estrogen regulates synaptic plasticity and memory. *Journal of Neuroscience*, 39(15), 2792-2809.
- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M. G. Finoia, Y. Zohar and C. C. Mylonas, 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH α implant, *Aquaculture*, 219, 841-858.
- Massarweh, S., Osborne, C. K., Creighton, C. J., Qin, L., Tsimelzon, A., Huang, S., ... & Schiff, R. 2008. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer research*, 68(3), 826-833.
- Mateos, J., Mananos, E., Carrillo, M., & Zanuy, S. 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1), 75-86.
- Maus, M., Bertrand, P., Drouva, S., Rasolonjanahary, R., Kordon, C., Glowinski, J., & Enjalbert, A. 1989. Differential modulation of D1 and D2 dopamine-sensitive adenylate

- cyclases by 17β -estradiol in cultured striatal neurons and anterior pituitary cells. *Journal of neurochemistry*, 52(2), 410-418.
- Miller, W. R., Bartlett, J., Brodie, A. M., Brueggemeier, R. W., Di Salle, E., Lønning, P. E., ... & Goss, P. E. 2008. Aromatase inhibitors: are there differences between steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors and do they matter?. *The oncologist*, 13(8), 829-837.
- Mori, T., Sumiya, S., & Yokota, H. 2000. Electrostatic interactions of androgens and progesterone derivatives with rainbow trout estrogen receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 75(2-3), 129-137.
- Muir, W. M., & Howard, R. D. 1999. Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: sexual selection and the Trojan gene hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13853-13856.
- Murthy, C. K., Zheng, W., Trudeau, V. L., Nahorniak, C. S., Rivier, J. E., & Peter, R. E. 1994. In vivo actions of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist on gonadotropin-II and growth hormone secretion in goldfish, *Carassius auratus*. *General and comparative endocrinology*, 96(3), 427-437.
- Navarro-Martín, L., Blázquez, M., Viñas, J., Joly, S., & Piferrer, F. 2009. Balancing the effects of rearing at low temperature during early development on sex ratios, growth and maturation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): limitations and opportunities for the production of highly female-biased stocks. *Aquaculture*, 296(3-4), 347-358.
- Norberg, B., Björnsson, B. T., Brown, C. L., Wichardt, U. P., Deftos, L. J., & Haux, C. 1989. Changes in plasma vitellogenin, sex steroids, calcitonin, and thyroid hormones related to sexual maturation in female brown trout (*Salmo trutta*). *General and Comparative Endocrinology*, 75(2), 316-326.

- Obata, T., & Kubota, S. 2000. Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum. *Neuroscience letters*, 296(1), 41-44.
- Ooi, G. T., Tawadros, N., & Escalona, R. M. 2004. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Molecular and cellular endocrinology*, 228(1-2), 1-21.
- Park, H. K., Jun, L. J., Kim, S. M., Park, M., Cho, M. Y., Hwang, S. D., ... & Jeong, J. B. 2016. Monitoring of VHS and RSIVD in cultured *Paralichthys olivaceus* of Jeju in 2015. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(2), 176-183.
- Peter, R. E., Crim, L. W., Goos, H. T., & Crim, J. W. 1978. Lesioning studies on the gravid female goldfish: neuroendocrine regulation of ovulation. *General and Comparative Endocrinology*, 35(4), 391-401.
- Ring, A., & Dowsett, M. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-related cancer*, 11(4), 643-658.
- Ruksana, S., Pandit, N. P., & Nakamura, M. 2010. Efficacy of exemestane, a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(1), 69-74.
- Sang-Gu LIM and Chang-Hee HAN. 2012. Effect of water temperatures and photoperiods on gonadal development in banded catfish *Pseudobagrus fulvidraco*. *Jour. Fish. Mar. Sci. Edu.*, 24(6), pp. 854~861.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., & Fingerman, M. 1995. In vivo effects of dopamine and dopaminergic antagonists on testicular maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *The Biological Bulletin*, 189(3), 340-346.
- Savouret, J. F., Bailly, A., Misrahi, M., Rauch, C., Redeuilh, G., Chauchereau, A., & Milgrom, E. 1991. Characterization of the hormone responsive element involved in the

- regulation of the progesterone receptor gene. *The EMBO Journal*, 10(7), 1875-1883.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A., & Brown, M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, 103(6), 843-852.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937.
- Shozu, M., Sumitani, H., Segawa, T., Yang, H. J., Murakami, K., Kasai, T., & Inoue, M. 2002. Overexpression of aromatase P450 in leiomyoma tissue is driven primarily through promoter I. 4 of the aromatase P450 gene (CYP19). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6), 2540-2548.
- Silverman, J. L., & Koenig, J. I. 2007. Evidence for the involvement of ER β and RGS9-2 in 17- β estradiol enhancement of amphetamine-induced place preference behavior. *Hormones and behavior*, 52(2), 146-155.
- Simpson, E. R. 2003. Sources of estrogen and their importance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 86(3-5), 225-230.
- Singh, A. K., & Singh, R. 2013. In vivo response of melatonin, gonadal activity and biochemical changes during CYP19 inhibited sex reversal in common carp *Cyprinus carpio* (L). *Animal reproduction science*, 136(4), 317-325.
- Sutherland, R. L., & San Foo, M. 1979. Differential binding of antiestrogens by rat uterine and chick oviduct cytosol. *Biochemical and biophysical research communications*, 91(1), 183-191.
- Tamaru, C. S., C. T. Carlstrom, Jr. W. J. Fitzgerald and H. Ako, 1996. Induced final maturation and spawning of the marbled grouper, *Epinephelus microdon* capture from

- spawning aggregations in the republic of Palau, Micronesia, *J. World Aqua. Soc.*, 27, 363–372.
- Tate, A. C., Greene, G. L., DeSombre, E. R., Jensen, E. V., & Jordan, V. C. 1984. Differences between estrogen-and antiestrogen-estrogen receptor complexes from human breast tumors identified with an antibody raised against the estrogen receptor. *Cancer research*, 44(3), 1012-1018.
- Tiboni, G. M., & Ponzano, A. 2016. Fetal safety profile of aromatase inhibitors: Animal data. *Reproductive Toxicology*, 66, 84-92.
- Tobet, S. A., & Fox, T. O. 1992. Sex differences in neuronal morphology influenced hormonally throughout life. In *Sexual differentiation* (pp. 41-83). Springer, Boston, MA.
- Tovo-Neto, A., da Silva Rodrigues, M., Habibi, H. R., & Nóbrega, R. H. 2018. Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. *General and comparative endocrinology*, 265, 230-236.
- Tsukamoto, K., Lee, T. W., & Fricke, H. 2003. Eel Biology (eds Aida, K., Tsukamoto, K. & Yamauchi, K.) 121–140.
- Yaron, Z., & Levavi-Sivan, B. 2006. *Physiology of Fishes*.
- Yoon Y. D. 1998. The effects of endocrine disrupters on reproduction and development of wild animals. *Dev. Reprod*, 2(2), 115-133.
- Young Dae KIM, Chu LEE, Byung Hwa MIN, MeeKyung KIM, Gi Seung KIM, Jae-suk CHOI, Won Gun AN and Myung-Mo NAM. 2014. Early sexual maturation through temperature stimulation and development of *Patinopecten yessoensis*. *Korean J. Malacol.* 30(4): 311-319.
- Young Jin CHANG, Han Kyu LIM and Joon Yeong KWON. 2001. Changes in plasma

steroid hormone level in rockfish (*Sebastes inermis*) by the controlled water temperature and photoperiod. *J. Korean Fish. Soc.* 34(1), 13-16.

Whitehead, C., Bromage, N. R., & Breton, B. 1983. Changes in serum levels of gonadotropin, oestradiol 17 β and vitellogenin during the first and subsequent reproductive cycles of female rainbow trout. *Aquaculture*, 34(3-4), 317-326.

Winer, E. P., Hudis, C., Burstein, H. J., Wolff, A. C., Pritchard, K. I., Ingle, J. N., ... & Somerfield, M. R. 2005. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *Journal of clinical oncology*, 23(3), 619-629.

감사의 글

대학이란 문턱에 접어든지 20년이 훌쩍 넘은 이 시점에 무엇보다 소중하고 뜻깊은 자리에 서게 되어 무척이나 감동스럽고, 학문의 가치와 저의 인생에서 중대하고도 많은 깨달음을 얻은 날들이었습니다.

감사의 말씀을 전하고 싶은 분들이 너무 많습니다. 먼저 이 논문이 나오기까지 부족한 저에게 시종일관 세심한 관심을 갖고 지도해 주시며, 믿고 인내해주신 **여인규** 지도교수님께 너무 감사드립니다. 그리고 학부와 석사시절의 지도교수님이신 경상대학교 **박찬일** 교수님께 감사드립니다. 또한, 논문 심사를 맡아 바쁘신 와중에도 정성으로 조언과 용기를 주신 **이영돈** 교수님, **이경준** 교수님, **허문수** 교수님, **정준범** 교수님께 깊은 감사드립니다.

본 논문을 위해 연구 기간 동안 정성껏 도와주며 주저하지 않았던 문혜나 박사님 그리고 박천만, 노윤희, 김수림에게 감사의 마음을 전하며, 실험실은 다르지만 재학 중 실험에 큰 도움을 주신 김병훈 박사님, 최송희, 신재형에게 감사의 마음을 전합니다. 또한, 저의 박사과정 연구에 도움을 주신 국립수산물과학원 제주수산연구소 미래양식센터 정민환 박사님께도 감사드립니다.

늘 부족하고 어리숙하기만 했던 저에게 이러한 시간과 기회를 만들어 주신 모든 분들께 죄송하고 감사합니다.

마지막으로 그 길고 긴 시간 저를 뒷바라지 하시며 노심초사 보살피 주신 아버지, 어머니 그리고 응원해준 동생에게 큰 감사의 마음을 전합니다. 이것이 끝이 아닌 새로운 시작이라는 말씀 새겨 듣고 새로운 시작에 대한 준비를 잘 하겠습니다. 다시 한 번 저의 곁에 있어준 모든 분들께 감사드립니다.