

무지개송어의 간세포 초대배양에 의한 Vitellogenin 합성 유도

여 인 규

부경대학교 양식학과

Vitellogenin Induction by Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes in Primary Culture

In-Kyu Yeo

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Vitellogenin (VTG) induction in response estradiol-17 β (E₂) were electrophoretically examined in primary hepatocyte cultures in rainbow trout. The hepatocytes were maintained as monolayers on positively charged dishes for up to 7 days. The viability of hepatocytes on Day 7 in cultures decreased about 20.7% and 23.6% with and without E₂, respectively. The amount of DNA per dish also decreased to 13.7% and 14.0% with and without E₂, respectively. There were no differences in viability and DNA content between the control and E₂-treated cultures. Moreover, the rate of VTG to total protein concentrations reached the maximum level at the addition of 10⁻⁶ M E₂ to the incubation medium. However, the higher concentration of 10⁻⁵ M E₂ rather depressed the level.

Key words : Vitellogenin induction, Estradiol-17 β , DNA content, Viability, Hepatocyte culture, Rainbow trout

서 론

어류를 포함한 난생동물에 있어서의 알은 난황 전구체인 Vitellogenin (VTG)의 축적에 의해 성장하며, VTG는 에스트로겐에 의해 간에서 합성되는 것으로 알려져 있다 (Ng and Ider, 1983; Wallace, 1985). 에스트로겐에 의한 VTG 합성의 실험은 경골어류를 포함한 난생동물에 있어서 행하여져 왔다 (Hara and Hirai, 1978; Sundararaj and Nath, 1981; Van Bohemen et al., 1982). 그러나, 이러한 연구는 *in vivo*의 실험으로 혈액내의 VTG 합성 정도를 분석한 것에 불과하여 난황형성기의 기작을 밝혀 내기에는 부적합한 부분이 많다. 이에 비해 간세포 배양에 의한 *in vitro*의 실험은 그것을 판별하기에

아주 적합한 방법이라 할 수 있다.

간장의 조직 및 분리된 간세포에 의한 VTG 합성 유도는 조류 (Boehm et al., 1988) 및 양서류 (Stanchfield and Yager, 1978)에 있어서 성공된 사례는 많으나, 간세포의 초대배양에 의한 *in vitro*의 실험은 거의 보고되어 있지 않다.

어류에 있어서의 간세포 배양은 포유류의 간세포 배양 방법을 기준으로 행하여지고 있으나, 어종에 따른 세포의 부착상태 등은 서로 달라, 아직 확립되어진 상태까지는 이르지 못한 상태이다. 배양기에 있어서의 간세포 배양은 배양 수일 후, 배양접시의 표면 전체에 단층으로 확산되어 성장하는 것으로 알려져 있다 (Peyon et al., 1993; Kwon and Mugiya, 1994). 그리고, Kocal et al. (1988)은 소 혈청 첨가 배양액과 배양접시의

collagen 표면 코팅으로 무지개송어의 간세포 배양을 성공시켰다. 그러나, 혈청 속에는 다양한 물질들이 포함되어 있으므로, 특정호르몬 등의 단일 효과를 조사할 때에는 배양액내에 혈청을 첨가할 수가 없다. Kwon et al. (1993)은 혈청을 첨가하지 않은 조건에서의 무지개송어 배양 간세포는 단층확산이 어렵다고 보고하고 있다.

본 연구에서는, 무지개송어의 간세포 배양에 따른 간세포의 형태변화와 생존율을 조사함과 동시에, 에스트라디올-17 β 의 농도에 따른 VTG 합성을 조사하여, 난황형성기 기작 조사의 적합성을 조사하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)는 북해도 대학 수산학부내 옥외 사육수조에서 사육한 체중 100~150 g인 것을 사용하였다. 무지개송어는 실험 3일전에 먹이 급여를 중지한 후, 0.01% 2-phenoxyethanol로 마취시켜 사용하였다.

1. 간세포의 분리 및 배양

간세포는 Kwon et al. (1993)의 방법에 의해 분리하였다. 먼저, 무지개송어는 0.01% 2-phenoxyethanol로 마취시켜, 담낭과 같이 간장을 분리하였다. 간문맥에 폴리에틸렌의 얇은 관(Hibiki, No.3)을 삽입하여, 수술용 실로 묶고, Ca²⁺이 포함되지 않은 관류용 buffer (120 mM NaCl, 1.22 mM MgSO₄·7H₂O, 4.7 mM KCl, 1.25 mM KH₂PO₄, 23 mM NaHCO₃, pH 7.4)를 약 10분간 관류하였다 (5~8 ml/min.). 그 후 collagenase(0.5 mg/ml; Wako Pure Chemicals) 및 소 혈청 알부민 (0.98 mg/ml; Sigma)을 포함한 관류용 buffer에 약 20분간 (5~8 ml/min.), 2 mM EDTA를 첨가하여 Ca²⁺ 및 Mg²⁺을 제거한 관류용 buffer에 약 10분간 각각 관류하였다. 관류 후 간장은 100 ml 비이커에 넣어 관류용 buffer로 3회 세척한 후, 50 ml의 관류용 buffer 내에서 해부가위로 잘게 분산시켰

다. 분산된 간세포는 pipet로 더욱 분리 여과시킨 후에 원심분리 (500 rpm, 2분)를 3회 반복하여 간실질세포 이외의 성분 (비실질세포, 파열 세포, 세포의 파편 및 적혈구 등)을 제거하였다.

간세포는 positive-charge (Falcon)를 행한 플라스틱 배양접시에 3×10⁵개를 넣어 배양하였다. 배양에는 0.2 μ M bovine insulin (Sigma), streptomycin (100 μ g/ml), penicillin (70 μ g/ml), 및 NaHCO₃ (23 mM)을 첨가한 William's medium (Ca 1.8 mM, Life Technol. Inc.)을 이용하였다. 간세포의 배양은 배양액 3 ml를 첨가하여 15°C, 5% CO₂ 조건하에서 행하였다. 사진 배양은 2일간 행하고, 배양액은 매일 교환하였다.

2. 세포의 형태관찰

간세포는 60 mm의 플라스틱 배양접시에 각각 다른 Ca²⁺ 농도 (0 mM과 1.8 mM)로 배양한 후, 광학현미경 (Nikon, Diaphoto)으로 관찰하였고, 또, estradiol-17 β (E₂, 10⁻⁶ M)의 첨가에 따른 변화를 scanning-전자현미경 (SEM, Hitachi S-2300)으로 관찰하였다. SEM 관찰을 위해 배양세포는 2.5% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde를 포함한 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2)로 고정한 후, 1% osmium tetroxide를 포함한 cacodylate buffer (0.05 M, pH 7.2)로 1시간 동안 고정하였다. 그 후, 농도별 에탄올로 탈수하고, 2-methyl-2propanol로 3회, 20분 씩 세척한 후, 진공펌프로 건조하였다. 최종적으로, 10 kV, 진공상태에서 gold-palladium 코팅을 하여 관찰하였다.

3. 배양세포의 생존율

배양세포는 2일간 배양을 한 후, E₂ 및 EGTA를 첨가하여 7일간 배양하여 0.03% EDTA를 포함한 인산 buffer (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.09 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄)를 첨가해 진동시켜 배양접시로부터 분리시켰다. 핵 염색은 0.05% crystal violet가 포함된 0.1 M

citric acid로 2시간 동안 행하였고, 핵 수는 Thomas 혈구계산관을 이용하여 측정하였다. 배양세포의 생존율은 E₂ 첨가 후 3, 5 및 7일에 각각 조사하여 E₂ 첨가 전의 생존 세포 수에 대한 퍼센트로 나타내었다.

4. DNA량의 측정

DNA는 E₂ 첨가 0일 및 7일의 배양세포로부터 Munro and Fleck (1966)에 의해 수정된 Schmidt-Thannhauser의 방법에 의해 추출하였다. DNA는 0.3 N NaOH 를 75분간 처리한 후, 2 N perchloric acid로 37°C에서 60분간 처리하여 추출하였다. DNA량은 Wilder and Stanley (1983)의 방법에 따라 분광광도계로 측정하여 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{DNA (mg/l)} = 0.0227 A_{260} - 0.0018 A_{232}$$

A₂₆₀과 A₂₃₂는 각각 파장 260 nm와 232 nm에서의 흡광도를 나타낸다.

5. E₂농도에 따른 VTG 합성의 경시적 변화

E₂는 95% 에탄올로 용해한 후, 2일간의 사전 배양 후에 10⁻⁸ M~10⁻⁵ M의 농도를 첨가하여 실험을 행하였다. 배양액은 E₂ 첨가 0, 3, 5 및 7일째 회수하여 원심분리 (3000 rpm, 20 min.)를 행하였다. 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE 로 분리하여, coomassie brilliant blue R-250 로 30분간 염색하였다. VTG의 판별은 Kwon et al. (1993)에 의해 분리된 무지개송어 VTG (분자량 175kDa)의 결과를 따라 행하였다.

VTG의 밴드 (175kDa)는 Bio Image (Millipore)를 이용하여 총 단백질에 대한 VTG의 integrated optical density (IOD)치를 퍼센트로 나타내었다. 이러한 퍼센트의 표현은 배양세포의 수 및 전기영동시의 각 lane의 단백질 양에서 생길 수 있는 오차를 제거하기 위해 사용하였다. 그리고, 이때의 VTG 농도와 IOD 치는 높은 상관관계를 나타내었다 (r=0.99, Fig. 1).

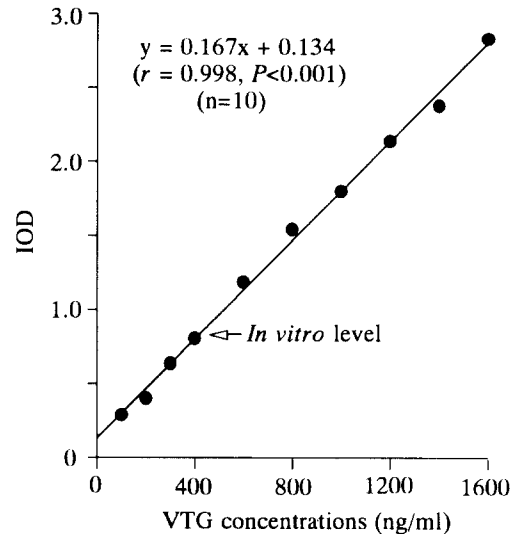


Fig. 1. Relationship between the amount of VTG and IOD after SDS-PAGE (Coomassie brilliant blue R-250).

6. 통계분석

실험 결과는 One-way ANOVA-test를 실시하여 Fisher's PLSD-test를 행하였다. 통계적 유의성은 P<0.05로 판단하였다. 그리고 퍼센트 결과는 arcsine의 수치로 전환 후 통계 분석을 하였다.

결 과

1. 세포의 형태관찰

무지개송어의 간세포는 collagenase에 의해 한 마리 당 3×10⁸의 간세포가 분리되었다. 그때의 생존율은 trypan blue 염색에 의해 90% 이상인 것으로 나타났다. 간세포는 2일간의 배양으로 6에서 8개의 세포가 작은 군을 형성하였다. 배양이 진행됨에 따라 점점 큰 군을 형성하여, 7일 후에는 배양접시 전반에 넓게 퍼져 단층을 형성하였다 (Fig. 2).

그러나, 배양액에 EGTA를 첨가하여 Ca²⁺를 제거한 결과, 간세포는 2일간의 배양으로 형성된 작은 군이 더 이상 커지지 않았고, 세포의 부착력도 약해졌다 (Fig. 2).

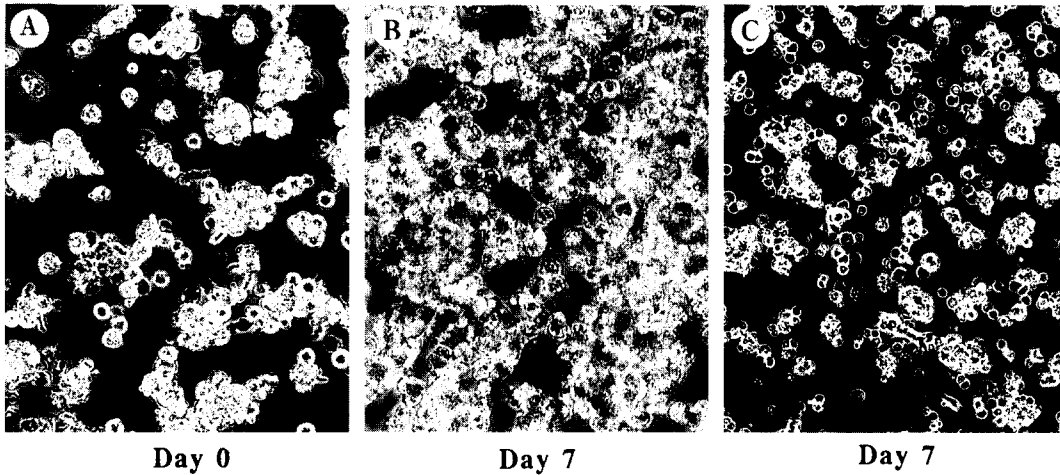


Fig. 2. Phase contrast micrographs of hepatocytes cultured in Ca-containing (A and B) or Ca-free (C) medium for 7 days. ($\times 150$).

SEM에 의한 외부형태의 변화는 E_2 첨가의 유무에 관계없이 차이를 나타내지 않아, E_2 를 첨가하지 않은 실험군의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 분리된 간세포의 표면은 스펀지와 유사하였으나, 3일간의 배양으로 많은 돌기가 형성되고, 세포의 크기도 커졌다. 7일째에는 돌기 및 세포의 크기가 더욱 커졌으나, 돌기의 수는 감소되었다.

2. 배양세포의 생존율 및 DNA의 양

Fig. 4는 E_2 및 EGTA 첨가에 따른 배양 7일 후의 간세포의 생존율을 나타낸 것이다. 대조군 (E_2 무첨가)의 생존율은 3, 5 및 7일에 각각 14.7%, 19.1% 및 23.6% 감소하였고, E_2 첨가군에서도 각각 15.4%, 18.8% 및 20.7% 배양 일수의 증가에 따라 감소하였다. 그리고, E_2 첨가의 유무

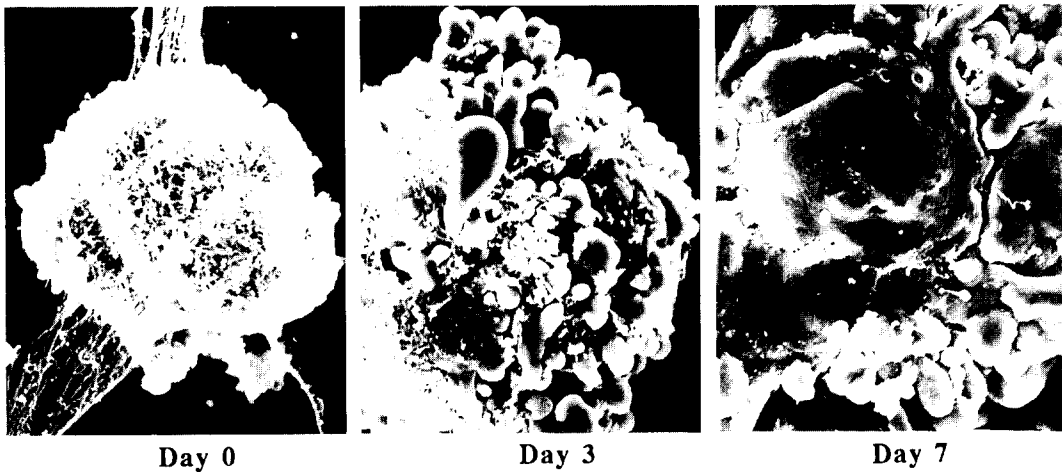


Fig. 3. Scannig electron micrographs showing the surface of cultured hepatocytes. ($\times 3000$).

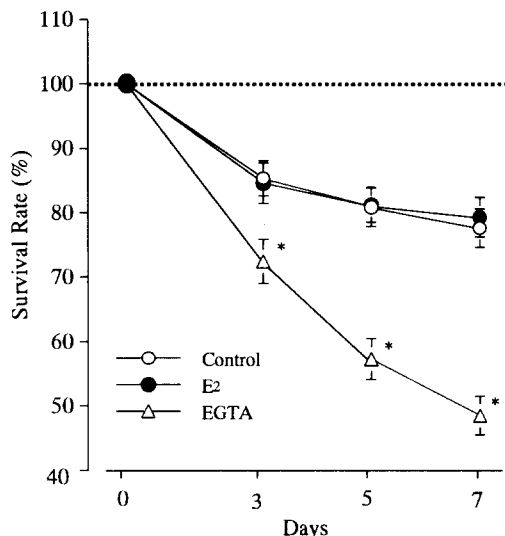


Fig. 4. Effects of E₂ (2×10⁻⁶M) and EGTA (1.8 mM) on the survival rate of hepatocytes for 7 days. Vertical bars represent the average (mean±SE) percentage of six experiments. *P<0.01 for E₂ alone.

에 따른 생존율의 차이는 나타나지 않았다. 그렇지만, EGTA의 첨가에 의한 배양액의 Ca²⁺ 제거로 생존율은 3 및 5일에 각각 28.6% 및 42.8%가 감소하였고, 배양 7일째에는 48.5%로 절반 이상의 배양세포가 사망하였다. 또한, 이때의 총 단백질 합성양도 배양액의 Ca²⁺ 제거에 따라, 약 32%가 감소하였다 (data not shown). 이러한 결과로 보아, 간세포 배양에는 배양액의 Ca²⁺이 중요한 역할을 가진다고 여겨진다.

배양의 경과에 따른 DNA량의 변화는 Fig. 5에 나타내었다. 2일간의 사전 배양 후의 DNA는 86.5 µg/dish로 나타났고, 7일간 배양을 계속함에 따라 약 14.0% 감소하였다. E₂를 첨가한 경우에도 약 13.7%로 감소하였으나, E₂를 첨가하지 않은 대조군의 그것과는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과로 보아, E₂ 첨가에 따른 배양 세포의 생존 상태의 변화는 거의 없는 것으로 판단된다.

3. E₂농도에 따른 VTG 합성의 경시적 변화

E₂ 10⁻⁸ M~10⁻⁵ M의 농도를 첨가하여 배양

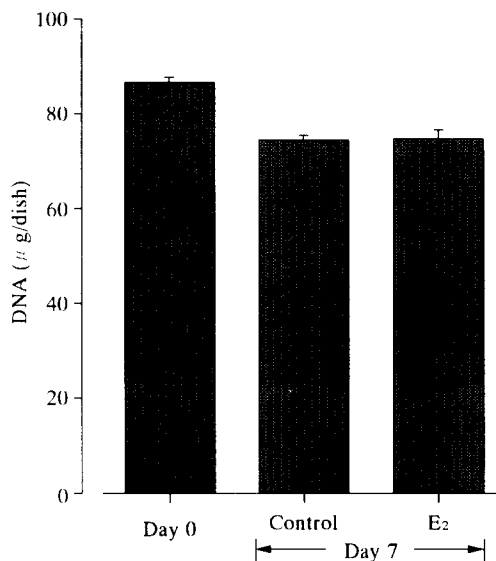


Fig. 5. Hepatocyte DNA content per dish on day 7 in culture with E₂ (2×10⁻⁶ M). Vertical bars represent the average (mean±SE) µg/dish of three experiments.

간세포에 의한 VTG 합성의 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 합성 단백질은 배양액에 E₂를 첨가한 후 0, 3, 5 및 7일째의 배양액을 회수하여 분석하였다. 그 결과, 총 단백질에 대한 VTG의 비율은 E₂ 10⁻⁸ M에서는 3, 5 및 7일째에 각각 1.21, 2.84 및 3.74%이었고, 10⁻⁷ M에서는 2.01, 5.08 및 6.93%를, 10⁻⁶ M에서는 2.20, 7.45 및 9.34%를 각각 나타내었다. 그리고, 본 실험에서 사용한 가장 높은 농도인 10⁻⁵ M에서는 3, 5 및 7일째에 각각 1.98, 6.74 및 8.35%를 나타내어 10⁻⁶ M의 E₂ 첨가시 보다 VTG 합성률은 낮게 나타났다. 이러한 결과로 보아, 무지개송어의 간세포 배양에 있어서의 VTG 합성에는 E₂ 10⁻⁶ M 전후의 농도가 가장 알맞은 농도로 여겨진다.

고 찰

난황형성기의 다양한 기작을 조사하기 위해서는 간세포 배양이 유용하게 이용되어 지고 있다. 그러나, 어류에 있어서는 종에 따라 간세포의 배양

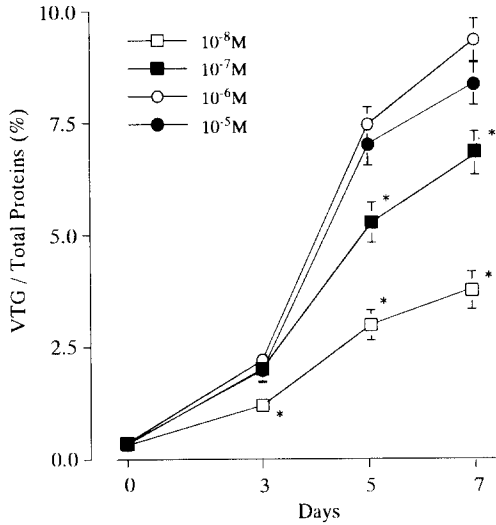


Fig. 6. Dose-effects of E₂ on VTG synthesis in primary cultures of hepatocytes. Hepatocytes were cultured in media containing the different concentrations (10⁻⁸~10⁻⁵M) of E₂ for 7 days. The activity of VTG synthesis was estimated for the relative optical density of VTG to total proteins after SDS-PAGE. Vertical bars represent the average (mean ±SE) percentage of four experiments. *P<0.01 for respective E₂ of 10⁻⁶M.

에 어려운 점이 많은 것이 사실이다. 특히, 무지개송어의 간세포는 배양 접시 등에 부착이 어려운 것으로 알려져 있다 (Kwon et al., 1993). 무지개송어의 간세포 배양이 어려운 이유로는 무지개송어의 서식 적정수온 (11~14°C)과, 세포분리에 이용된 collagenase의 효소 적정 온도 (37°C)의 차이를 들 수 있다. 또 하나의 이유로는 배양세포의 기질의 특이성을 들 수 있다. 어류의 간세포 배양의 개선책으로는 fibronectin (Silnutzer and Barnes, 1985), collagen (Macklis and Reutter, 1985) 및 vitronectin (Neumeier et al., 1985)이 이용되어져 왔다. 그러나, 어종에 따라 배양 상태가 다르게 나타나, 이러한 당단백질의 기질은 어종에 따른 선택성이 있는 것으로 여겨지고 있다. Kocal et al. (1988)은 무지개송

어의 간세포배양에 collagen을 이용하여 성공하였으나, 그들은 배양액 내에 소 혈청을 첨가하고 있어 배양 간세포에서 호르몬 작용 등의 단일 기작을 조사하기에는 부적합한 방법이라 할 수 있다. 이처럼 어류, 특히 무지개송어의 간세포 배양에는 아직 많은 문제점이 존재하고 있는 것이 사실이다. 본 실험에서 사용한 간세포는 실험 3일전에 먹이공급을 중단시켜 간에서의 담즙의 생산정도를 낮게 유지시킨 후 사용하였다. 3일간 먹이공급을 중단시킨 간세포의 사용으로, 초기 부착률이 약 30% 증가하는 결과를 나타내었다 (data not shown). 그리고, 본 실험에서는 positively charged dish를 이용하여 세포 성장인자인 0.2 μM의 insulin을 첨가시킨 배양액으로 배양함으로써 높은 생존율과 DNA 함유량의 유지가 가능하였다.

일반적으로, Ca²⁺은 세포내 정보 전달 물질로 알려져 있으며, 단백질의 합성 및 분비에 중요한 역할을 가진다 (Hawes et al., 1992; Detimary et al., 1994; Wong et al., 1994). 최근, VTG의 합성에 있어서도 세포의 Ca²⁺농도와 비례적인 성질을 가진다고 보고되어져 있다 (Yeo and Mugiya, 1997). 본 실험에서는, 배양액내의 Ca²⁺의 존재가 배양세포의 생존율을 크게 좌우하는 결과를 보였다. 이처럼, 간세포배양에 있어서의 Ca²⁺은 VTG 합성뿐만 아니라, 세포의 생존 및 세포간의 골격형성에도 중요한 역할을 가진다고 여겨진다.

VTG 합성은 조류 (Boehm et al., 1988) 및 양서류 (Stanchfield and Yager, 1978)에 있어서 성공된 사례가 보고되어져 있다. 어류에 있어서는, 뱀장어의 간세포 배양에 의한 VTG 합성은 E₂ 10⁻⁵ M에서 가장 높은 합성률을 가진다고 보고되어져 있다 (Peyon et al., 1993). 한편, Maitre et al. (1986)은 무지개송어의 간세포 배양에 있어서, 10⁻⁶ M의 E₂를 투여 후, 3일째에 최대의 합성치를 나타내었다. 이에 반해, Kwon et al. (1993)은 같은 종의 간세포배양에 있어서 10⁻⁶ M의 E₂를 투여 후, 5일째에 최대의 합성치를 나타낸다고 보고하고 있다. 본 연구에 있어서도,

10^{-6} M의 투여에서 최대의 합성치를 나타내었다. 그리고, 총 단백질에 대한 VTG의 비율로 표현한 결과, 배양 7일째까지 연속적으로 증가하는 경향을 보였다. 이러한 증가는 배양 11일째까지도 지속되었다. 이러한 결과로, 실험 조건에 따라 VTG 합성의 정도에는 차이가 발생하는 것을 알 수 있다. 이것은 배양기간의 경과에 따른 세포의 사망률의 증가가 그 원인으로 여겨진다. 그렇지만, 총 단백질에 대한 VTG의 비율로 나타내는 방법은 생존세포의 단백질 합성과 비교하여 VTG 합성을 상대적으로 판단함으로써, VTG 합성에 미치는 외부인자의 영향을 보다 정확히 판단할 수 있을 것이라고 여겨진다.

요 약

무지개송어의 초대배양 간세포에 있어서 Vitellogenin (VTG)의 합성 유도는 전기영동적 수법에 의해 행하였다. 간세포는 7일 동안 positively charged dish를 이용한 배양으로 단층 확산되었다. 배양 7일의 간세포 생존율은 E_2 의 유무에 따라 각각 20.7% 및 23.6%가 감소하였으며, DNA 함유량도 각각 13.7% 및 14.0%가 감소하였다. E_2 첨가군과 대조군간에는 생존율과 DNA 함유량에 있어서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그리고, 총 단백질에 대한 VTG의 비율은 E_2 10^{-6} M의 첨가시에 최대치를 나타내었다. 그러나, 고농도(10^{-5} M)에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Boehm, K. D., R. L. Hood, and J. Ilan, 1988. Induction of vitellogenin in primary monolayer cultures of cockerel hepatocytes. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A., 85 : 3450-3454.
- Detimary, P., P. Gilon, M. Nenquin, and J.-C. Henquin, 1994. Two sites of glucose control of insulin release with distinct dependence on the energy state in pancreatic B-cells. Biochem. J., 297 : 455-461.
- Hara, A. and H. Hirai, 1978. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 59B : 339-343.
- Hawes, B. E., S. B. Waters, J. A. Janovick, J. E. Bleasdale, and P. M. Conn, 1992. Gonadotropin-releasing hormone-stimulated intracellular Ca^{2+} fluctuations and luteinizing hormone release can be uncoupled from inositol phosphate production. Endocrinology, 130 : 3475-3483.
- Kocal, T., B. A. Quinn, I. R. Smith, H. W. Ferguson, and M. A. Hayes, 1988. Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In Vitro Cell. Dev. Biol., 24 : 304-308.
- Kwon, H. C., S. Hayashi, and Y. Mugiya, 1997. Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol., 104B : 381-396.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685.
- Macklis, J., R. L. Sidman, and D. H. Shine, 1985. Cross-linked collagen surface for cell culture that is stable, uniform, and optically superior to conventional surfaces. In Vitro Cell. Dev. Biol., 21 : 189-194.
- Maitre, J.-L., Y. Valotaire, and C. Guguen-Guillouzo, 1986. Estradiol-17 β stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. In Vitro Cell. Dev. Biol., 22 : 337-343.
- Munro, H. N. and A. Fleck, 1966. Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. Analyst, 91 : 78-88.
- Neumeier, R. and W. Reutter, 1985. Hepatocyte adhesion on plastic. Exp. Cell Res., 160 : 287-296.
- Ng, T. B. and D. R. Idler, 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In Fish Physiology (Edited by Hoar W. S., Randall D. J. and Donaldson E.M.) 9 : 374-404.

- Peyon, P., S. Baloche, and E. B. Gerard, 1993. Synthesis of vitellogenin by eel (*Anguilla anguilla* L.) hepatocytes in primary culture: Requirement of 17 β -estradiol priming. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 91 : 318–329.
- Silnutzer, J. E. and D. W. Barnes, 1985. Effects of fibronectin-related peptides on cell spreadin. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 21 : 73–78.
- Stanchfield, J. E. and J. D. Yager, 1978. An estrogen responsive primary amphibian liver cell culture system. *Exp. Cell Res.*, 116 : 239–252.
- Sundararaj, B. I. and P. Nath, 1981. Steroid-induced synthesis of vitellogenin in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 43 : 201–219.
- Van Bohemen, Ch. G., J. G. D. Lambert, H. J. Th. Goos, and P. G. W. J. Van Oordt, 1982. Estrogen and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 46 : 81–92.
- Wallace, R. A., 1985. Vitellogenin and oocyte-growth in nonmammalian vertebrates. In *Developmental Biology* (Editde by Browder L.) 1 : 127–177.
- Wilder, I. B. and J. G. Stanley, 1983. RNA-DNA ratio as an index to growth in salmonid fishes in the laboratory and in streams contaminated by carbaryl. *J. Fish Biol.*, 22 : 165–172.
- Wong, A. O. L., F. V. Goor, R. M. Jobin, C. M. Neumann, and J. P. Chang, 1994. Interactions of cyclic adenosine 3',5'-Monophosphate, protein kinase-C, and calcium in dopamine- and gonadotropin-releasing hormone-stimulated growth hormone release in the goldfish. *Endocrinology*, 135 : 1593–1604.
- Yeo, I.-K. and Y. Mugiya, 1997. Effects of extracellular calcium concentrations and calcium antagonists on vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 105 : 294–301.