

뱀장어(*Anguilla japonica*) 뇌하수체 세포의 번식 관련 유전자 mRNA 발현에 미치는 Progesterone (P4), 17 β -estradiol (E2), Melatonin 및 Serotonin (5-HT)의 영향

윤정희¹ · 하지은¹ · 김동우¹ · 박보령¹ · 민정희¹ · 문성희² · 권준영^{1*}

¹선문대학교 수산생명의학과

²한국해양과학기술원 위해성분석연구센터

Effects of Progesterone (P4), 17 β -estradiol (E2), Melatonin and Serotonin (5-HT) on the mRNA Expression of Reproduction-related Genes in the Pituitary Cells of Eels (*Anguilla japonica*)

Jeong Hee Yoon¹, Ji Eun Ha¹, Dong Woo Kim¹, Bo Ryung Park¹, Jeong Hee Min¹,
Seong Hee Mun², Joon Yeong Kwon^{1*}

¹Sunmoon University, Department of Aquatic Life and Medical Science, Asan 31460, Korea

²Risk Assessment Research Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Geoje 53201, Korea

Corresponding Author

Joon Yeong Kwon

Sunmoon University, Department of
Aquatic Life and Medical Science,
Asan 31460, Korea

E-mail : jykwon@sunmoon.ac.kr

Received : May 19, 2023

Revised : May 27, 2023

Accepted : June 05, 2023

어류의 번식은 뇌에서 분비되는 다양한 신경호르몬과 뇌하수체에서 분비되는 생식소 자극 호르몬에 의해 조절된다. 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 번식도 이 호르몬들의 작용에 의해 조절되지만 성 성숙 시 신경호르몬이 뇌하수체 호르몬을 조절하는 방법은 완전히 밝혀지지 않았다. 이전 연구에 의하면 progesterone (P4), melatonin 및 serotonin (5-HT) 등과 같은 신경호르몬이 일부 어류의 번식 과정 조절에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 뱀장어의 뇌하수체를 초대 배양하였고, 안정화된 뇌하수체 세포에 P4, 17 β -estradiol (E2), melatonin 및 5-HT를 처리하였다. 이후 처리된 호르몬의 작용이 뇌하수체 세포에서 번식 관련 호르몬인 FSH β , LH β , GH 및 SL mRNA 발현에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 본 연구를 수행한 결과, P4는 뇌하수체 세포에서 FSH β 와 LH β 발현을 증가시켰고, melatonin은 FSH β 와 LH β 뿐만 아니라 GH와 SL의 발현을 증가시켰다. 하지만 5-HT는 이 유전자의 mRNA 발현에 유의한 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과는 P4 또는 melatonin이 뱀장어의 초기 성 성숙에 중요한 역할을 할 수 있음을 의미한다.

Fish reproduction is regulated by various neurohormones secreted from the brain and gonadotropic hormones secreted from the pituitary. Reproduction of eel (*Anguilla japonica*) is also regulated by these hormones. However, how the neurohormones regulate the secretion of pituitary hormones during sexual maturation is not completely understood. Previous studies have shown that neurohormones such as progesterone (P4), melatonin and serotonin (5-HT) are involved in the regulation of reproductive processes in some fish. In this study, the eel pituitary was primary cultured, and stabilized pituitary cells were treated with P4, 17 β -estradiol (E2), melatonin, or 5-HT. The effect of these treatments on the expression of FSH β , LH β , GH and SL mRNA was, then, investigated. P4 increased the expression of FSH β and LH β in pituitary cells, and melatonin increased the expression of GH and SL as well as FSH β and LH β . However, 5-HT did not significantly affect the expression of these mRNA. These results suggest that P4 and melatonin may play some important roles in the early sexual maturation of eels.

Keywords: Progesterone(프로게스테론), Melatonin(멜라토닌), Serotonin(세로토닌), Reproduction-related genes(번식 관련 유전자), *Anguilla japonica*(극동산 뱀장어)

서론

극동산 뱀장어(eel, *Anguilla japonica*)는 복잡한 생활사로 인해 실뱀장어를 잡아서 기르는 불안정한 양식으로 생산되고 있다. 완전양식의 중요성이 증가함에 따라 호르몬 처리(SPE, salmon pituitary extract)에 의한 뱀장어 성 성숙 유도 연구가 진행되어 수정란 생산, 자어 생산 및 실뱀장어로 변태 유도 등에 성공하였다(Tanaka et al., 2003; Kim et al., 2013). 하지만 이 방법으로 생산한 수정란들은 부화율이 낮고 배아 및 유생의 생존율이 낮아서 산업적인 규모의 종자 생산이라는 목표를 달성하지 못하였다(Ohkubo et al., 2008; Kagawa et al., 2001). 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해서는 뱀장어 성 성숙 과정에 대한 이해 증진을 통해 현재 사용되는 성숙 유도 기술을 개선해야 한다.

경골어류의 성 성숙은 시상하부-뇌하수체-생식소(hypothalamus-pituitary-gonad, HPG) 축을 중심으로 조절된다. 뇌에서 분비되는 다양한 신경호르몬은 뇌하수체에 작용하여 번식과 관련된 뇌하수체 호르몬들의 분비를 조절한다. 예를 들어 뇌의 시상하부에서 분비되는 GnRH (gonadotropin releasing hormone)는 뇌하수체에 작용하여 대표적인 생식소 자극 호르몬인 FSH (follicle-stimulating hormone) 및 LH (luteinizing hormone)의 분비를 자극하여 생식소 발달을 유도한다. 또한 GnRH는 뇌하수체에서 GH (growth hormone) 및 SL (somatolactin)의 분비를 자극하기도 하는데(Le Gac et al., 1993; Bhandari et al., 2003), GH는 IGF-1 (insulin-like growth factor I)의 생산을 유도하여 생식소 자극 호르몬의 분비를 자극하고(Huang et al., 1999; Hashizume et al., 2002), SL도 연어과 어류의 성숙시기에 뇌하수체에서 발현이 증가한다(Benedet et al., 2008). 뇌에서는 GnRH 뿐만 아니라 다양한 신경호르몬이 분비되는데 이 중 일부가 본 연구실에서 실시한 선행연구에서 뱀장어의 성 성숙과 관련이 있을 가능성이 있는 것으로 나타났다(Mun, 2022).

이 선행연구에서는 SPE 자극으로 성 성숙을 유도한 뱀장어 뇌하수체의 전사체를 분석하여 성숙 유도에 의해 상향 또는 하향 조절된 차별 발현 유전자(Differentially Expressed Genes, DEGs)를 조사하였다. 차별 발현 유전자 중 progesterone receptor type 1 (pgr1), growth regulating estrogen receptor binding 1 (greb1), solute carrier family 39 member 4 (slc39a4), tryptophan 5-hydroxylase 1 (T5H1), 1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase (CYP24A1), mitochondrial, alpha-2 adrenergic receptor-like (α 2A-AR)는 생식소 발달이 시작된 뱀장어에서 미성숙 뱀장어보다 30배 이상 상향 조절된 유전자였으며 이 6가지의 유전자 중 pgr1이 특히 높게 발현되었다. 이러한 결과는 SPE에 자극을 받은 뇌하수체가 progesterone (P4)에 반응할 가능성이 높다는 것을 의미한다.

P4는 경골어류에서 FSH와 LH 발현에 영향을 미쳐(Atteke et al., 2003; Wang et al., 2016) 암컷의 최종 성숙 및 배란을 자극하며 수컷에서는 정자의 성숙 및 운동성을 자극한다(Paulos et al., 2010).

합성 progesterone인 progestin 중 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP)는 대표적인 성숙 유도 스테로이드(MIS)로 알려져 있으며 극동산 뱀장어의 최종 성숙 및 배란을 유도하는데 사용된다(Ohta et al., 1996; Morini et al., 2017). 이 외에도 P4는 여러 생물의 번식 과정에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다(Miura et al., 2006; Murack et al., 2011; Fang et al., 2018). 포유류에서는 P4 작용의 상승효과와 관련하여 P4 처리 전 17 β -estradiol (E2) priming의 중요성에 대한 연구가 많이 진행되었다(Lagacé et al., 1980; Lesoon and Mahesh, 1992). 또한 P4가 melatonin에 의해 영향을 받아 조절될 것으로 제기되었으며(Abecia et al., 2002; Nakamura et al., 2003), P4가 5-HT에 의해서도 영향을 받는다(Bódis et al., 1992) 등 melatonin 및 5-HT가 P4와 상관관계가 있을 것으로 관찰되었다. 이와 같이 P4의 작용에 대한 연구가 많이 진행되었지만 뱀장어의 초기 성 성숙 및 번식에 관련하여 P4 처리에 대한 연구는 찾아보기 힘들다.

Melatonin은 주로 송과체에서 합성 및 분비되며, 계절 및 광주기 등의 영향을 받아 체내에서 다양한 기능을 한다. 그 중 제브라피쉬(*Danio rerio*), Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 등을 포함한 다양한 경골어류에서 melatonin의 처리가 생식소 자극 호르몬의 발현과 번식시스템에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Khan and Thomas, 1996; Díaz Rodríguez et al., 2001; Falcón et al., 2003; Carnevali et al., 2011). 유럽뱀장어 및 극동산 뱀장어에서는 성 성숙 과정에 melatonin이 부정적(Sébert et al., 2008) 또는 긍정적(Hyeon et al., 2021) 역할을 할 것으로 보고되었다. 하지만 아직까지는 melatonin이 뱀장어 성 성숙 및 번식에 어떤 역할을 하는지 불분명하다.

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT)은 신경전달물질 및 신경호르몬으로 작용하여 다양한 생리학적 기능을 수행한다(Seyedabadi et al., 2014). 그 중 금붕어(*Carassius auratus*), Atlantic croaker, Prussian carp (*Carassius gibelio Bloch*) 등 다양한 경골어류에서 GnRH 분비, 생식소 자극 호르몬 분비, 생식소 성숙 등과 같이 광범위한 번식 조절에 관여하는 것으로 나타났다(Khan and Thomas, 1992; Wong et al., 1998; Sokolowska-Mikolajczyk et al., 2015). 그러나 아직 뱀장어의 성숙에 미치는 5-HT의 영향에 대해서는 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 미성숙 뱀장어 뇌하수체 세포를 초대 배양하여 P4 처리에 의한 번식 관련 유전자의 mRNA 발현 변화와 P4 처리 전 E2 priming이 P4의 작용을 증가시키는지 조사하였고(Exp. 1), melatonin 및 5-HT의 처리가 미성숙 뱀장어 뇌하수체 세포에서 번식 관련 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다(Exp. 2). 이 후 번식 관련 유전자의 mRNA 발현을 유도한 P4 및 melatonin이 수용체 발현에도 영향을 미치는지 확인하였다. 따라서 본 연구의 목적은 호르몬 처리에 따른 미성숙 뱀장어 뇌하수체의 mRNA 변화를 확인함으로써 초기 뱀장어 성숙에 있어서 각 호르몬의 효과를 제안하는 데 있다.

재료 및 방법

1. 실험어

실험어는 양식산 뱀장어를 사용하였으며, 뇌하수체를 최적의 상태로 유지하기 위해 실험 1(Exp. 1), 실험 2(Exp. 2)로 나누어 실험을 진행하였다. Exp. 1에서는 gonadosomatic index (GSI) 0.23 ± 0.25 , hepatosomatic index (HSI) 1.6 ± 0.34 인 뱀장어 35마리(체장 63.1 ± 2.8 cm, 체고 4.5 ± 0.3 cm, 체중 516.5 ± 50.5 g)를 사용하였고, Exp. 2에서는 GSI 0.77 ± 0.52 , HSI 1.4 ± 0.26 인 뱀장어 43마리(체장 63.6 ± 4.2 cm, 체고 4.2 ± 0.3 cm, 체중 470.8 ± 56.7 g)를 사용하였다. 모든 실험어는 미성숙한 상태였기 때문에 암수 구분 없이 실험에 사용되었다.

2. 뇌하수체 세포 배양

적출한 뱀장어 뇌하수체는 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco)으로 개체 구분 없이 세척 후 칼로 자르고 trypsin-EDTA solution (Gibco)으로 세포를 분리한 후 27°C incubator (JEIO TECH)에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 fetal bovine serum (FBS, Gibco)을 처리하여 trypsin-EDTA 반응을 정지시켰고 원심분리 ($200 \times g$, 4°C , 10 min) 후 상층액을 제거하였다. 펠렛은 L-15 medium (Gibco) 89%, FBS 10%, Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin, Gibco) 1%가 포함된 배양액에 현탁하였다. 충분히 세포를 분리한 후 haemocytometer로 세포 수를 측정하고 trypan blue로 세포 생존율을 확인하였다. 각각 1.1×10^6 cell/ml (Exp. 1), 6.4×10^5 cell/ml (Exp. 2)의 세포를 poly-L-lysine solution (Sigma)으로 코팅된 24-well plate에 seeding하여 27°C incubator에서 4일간 세포를 안정화하였다. 안정화기간에는 48시간 간격으로 배양액을 교체했다.

3. 호르몬 준비 및 처리

각 호르몬의 처리 농도 및 시간은 Lagacé et al. (1980); Somoza and Peter (1991); Sébert et al. (2008) 등의 연구결과를 참고해서 결정하였고, melatonin 및 5-HT의 경우 이 연구에서 melatonin 및 5-HT 처리 후 뇌하수체에서 생식소 자극 호르몬의 발현에 유의한 차이가 나기 시작하는 농도를 저농도 처리구(L)의 농도로 정하였고, 이 농도의 100배에 해당하는 농도를 고농도 처리구(H)의 농도로 설정했다.

P4 (Sigma) 및 E2 (Sigma)는 99.9% ethanol을 이용해 녹인 후 처리하려는 농도까지 단계 희석하여 최종 ethanol 함량 0.001% 이하, P4 50 nM, E2 20 nM이 함유되어 있는 배양액을 준비했다. Melatonin (Sigma) 및 5-HT (Sigma)는 99.9% ethanol을 이용해 녹인 후 처리하려는 농도까지 단계 희석하여 최종 ethanol 함량 0.01% 이하로, melatonin 0.2 μM , 20 μM , 5-HT 1 μM , 100 μM 이 함

Table 1. Hormones, concentrations and durations of each treatment in the experiments

	Experimental group	Hormones, concentrations and durations of each treatment
Experiment 1	Control	GnRH (500 nM, 2 h)
	P4	P4 (50 nM, 3 h), GnRH (500 nM, 2 h)
	E2	E2 (20 nM, 24 h), GnRH (500 nM, 2 h)
	E2+P4	E2 (20 nM, 24 h), P4 (50 nM, 3 h), GnRH (500 nM, 2 h)
Experiment 2	Control	GnRH (500 nM, 2 h)
	Melatonin L	Melatonin (0.2 μM , 1 h), GnRH (500 nM, 2 h)
	Melatonin H	Melatonin (20 μM , 1 h), GnRH (500 nM, 2 h)
	Control	GnRH (500 nM, 2 h)
	5-HT L	5-HT (1 μM , 1 h), GnRH (500 nM, 2 h)
	5-HT H	5-HT (100 μM , 1 h), GnRH (500 nM, 2 h)

P4: Progesterone, E2: 17β -estradiol, 5-HT: Serotonin, L: Low concentration, H: High concentration

유되어 있는 배양액을 준비했다. 또한 본 연구에서 유도하려는 호르몬인 FSH 및 LH는 기본적으로 GnRH의 자극에 의해 유도되기 때문에 GnRH (Sigma)를 동일한 방법으로 단계희석 후 모든 배지에 GnRH 500 nM이 함유된 배양액을 처리했다.

준비된 호르몬은 뇌하수체 세포 배양 후 4일 뒤 안정화 된 뇌하수체 세포에 처리해주었다. Exp. 1의 경우 E2 및 P4 처리 후 GnRH를 처리하였고 Exp. 2의 경우에는 melatonin 및 5-HT를 저농도, 고농도로 처리 후 GnRH를 처리했다(Table 1). 호르몬 처리 후에는 27°C incubator에 배양하여 호르몬에 대한 반응을 시켰으며 호르몬을 처리하지 않는 경우에는 배양액만 교체해주고 동일하게 27°C incubator에 배양했다.

4. RNA 추출 및 cDNA 합성

세포로부터 Trizol™ Reagent (Ambion)를 이용하여 제조사에서 제시되어있는 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. Trizol 처리 및 균질화 후 chloroform (Sigma)을 추가하여 RNA 분리 후 원심분

Table 2. Primer sequences for quantitative real-time PCR

Gene		Primer sequence	Product size
β-actin	F	GAGACCTTCAACACCCAG	95
	R	CCAGAGTCCATCACAATACCAG	
LHβ	F	GATCCCCATGTGACTTTCCC	72
	R	GCAGTCAGACGTGTCCATG	
FSHβ	F	CTCGCCAACATCTCCATCTC	99
	R	AGAATCCTGGGTGAAGCAC	
GH	F	TTACTCCGACTCCATCCCTAC	117
	R	GTCTTCAGAGGATACCCCATG	
SL	F	AAGCTGCTGGACCGAATCAT	110
	R	AGCTGGGCTCGTATCGAAGA	
pgr	F	GGGTAGTGACAGTGAGATTGG	116
	R	CAGCCAAGACAAATTTTCGG	
mtr	F	CGACAAGAACTCCCTGTGCTA	175
	R	CAGGATGAAGTGAAGAAGACC	

pgr: P4 receptor, mtr: melatonin receptor

리(4°C, 12,000 ×g, 20 min)하였다. Isopropanol (Sigma)로 RNA 침전 후 원심분리(4°C, 12,000 ×g, 10 min)하였고 75% ethanol을 사용하여 세척 후 다시 원심분리(4°C, 7,600 ×g, 5 min)하여 total RNA를 얻었다. Total RNA는 spectrophotometer (Nanodrop 2000, ThermoScientific)로 정량 후 TOPscrip™ RT DryMIX (Enzymatics)를 사용하여 cDNA를 합성하였고 남은 total RNA는 -80°C에 보관하였다.

5. qRT-PCR

qRT-PCR은 Topreal™ qPCR 2X PreMIX SYBR Green (Enzymatics), DEPC (Intron), cDNA를 혼합하였다. β-actin을 대조유전자로 상대적으로 정량하였고 본 실험에 사용된 각 유전자의 primer sequence는 Table 2와 같다. qRT-PCR 조건은 initial denaturation (95°C, 15 min), denaturation (95°C, 10 sec), annealing (60°C, 15 sec), elongation (72°C, 20 sec)으로 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)을 이용하여 진행하였다.

6. 통계 분석

실험결과는 평균값과 표준오차(SEM)로 나타냈으며 one-way

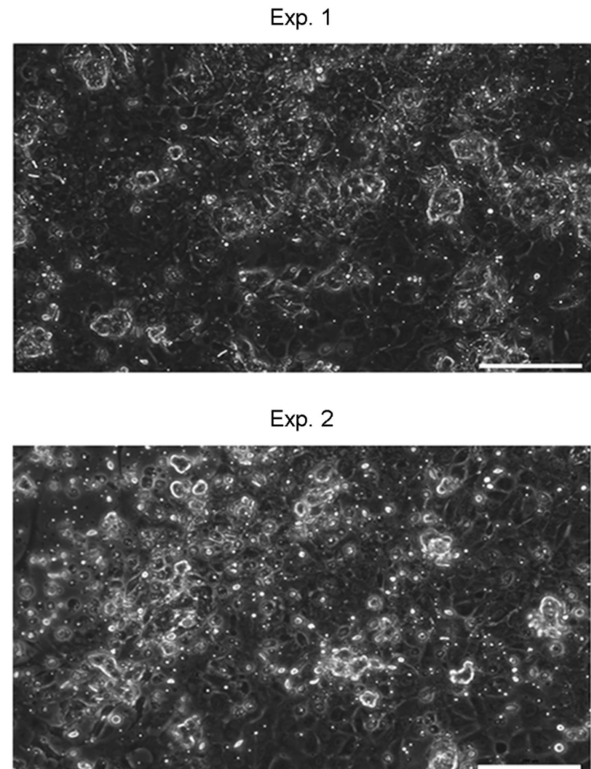


Fig. 1. Representative pituitary cells cultured for 4 days and observed under a phase contrast microscope (200×). From Exp. 1 and Exp. 2, the cells cultured did not show any marked differences in between experimental groups. Scaled bar = 100 μm.

ANOVA를 이용하여 호르몬 처리에 따라 번식 관련 호르몬의 유전자의 mRNA 발현이 달라지는지 조사하였고 Duncan test로 어떤 호르몬 처리구 사이에 유의한 차이가 있는지 분석하였다(SPSS Statistics 20, $p < 0.05$).

결 과

세포 배양 후 4일 동안 안정화된 뇌하수체 세포는 plate 바닥에 부착되어 시간이 지날수록 넓게 퍼졌고, 모든 실험구의 세포 배양 상태는 서로 차이가 없었다(Fig. 1). 이후 배양된 뇌하수체 세포에 각각 다른 호르몬(Exp. 1은 Control, P4, E2, E2+P4, Exp. 2는 Control, Melatonin L, Melatonin H, 5-HT L, 5-HT H)을 처리 후 GnRH로 FSHβ, LHβ, GH 및 SL의 유전자의 mRNA 발현을 유도하였다. Exp. 1을 수행한 결과, 뇌하수체 세포에서 FSHβ와 LHβ 발현이 P4 단독 처리구에서 유의하게 높았고($p < 0.05$), GH와 SL의 발현은 실험구 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다($p > 0.05$). 또한 pgr의 발현은 E2 처리구에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.05$), P4 처리에 의해 mtr의 발현은 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$) (Fig. 2).

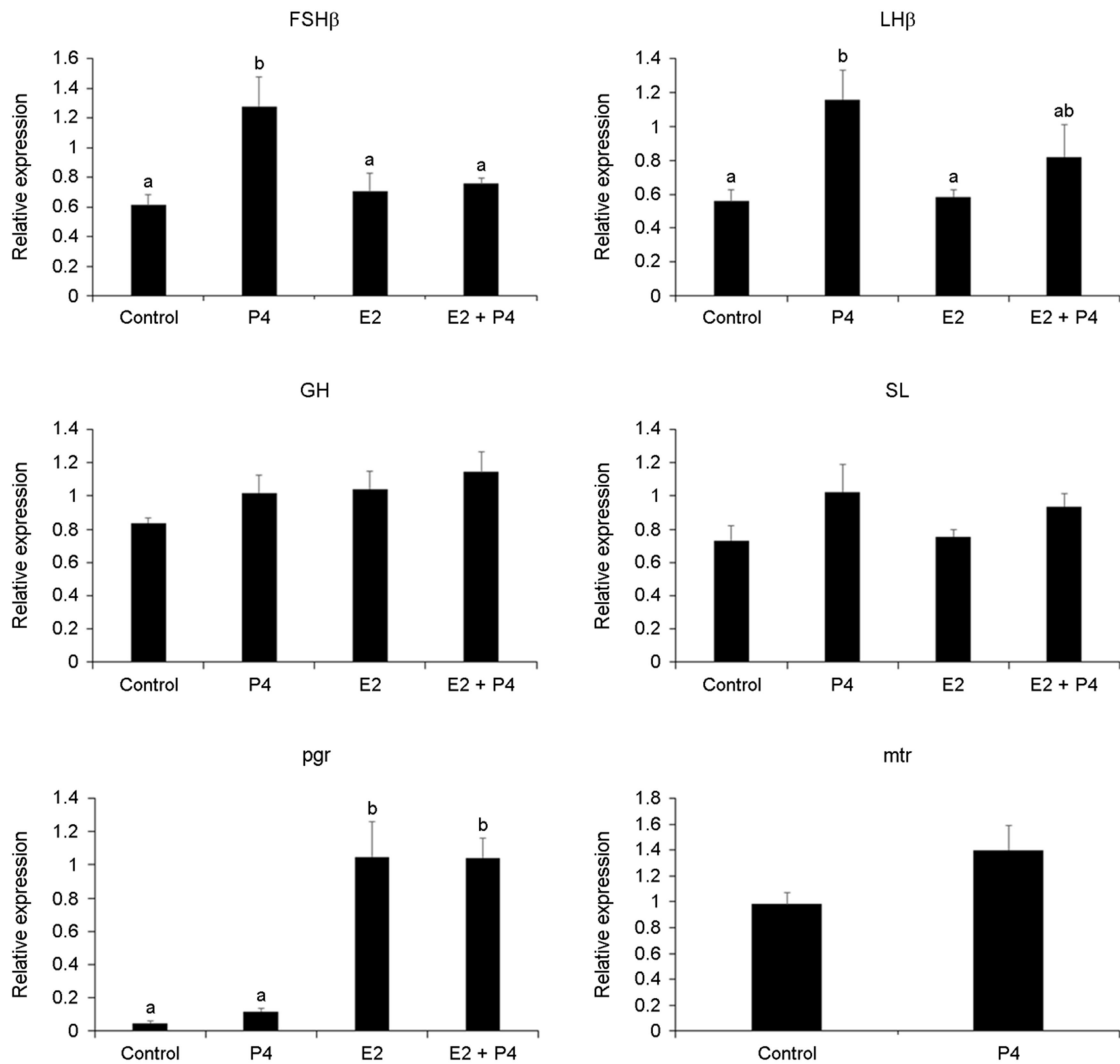


Fig. 2. Expressions of FSH β , LH β , GH, SL, pgr and mtr genes after treatments with GnRH only (Control), P4+GnRH (P4), E2+GnRH (E2) and E2+P4+GnRH (E2+P4), ($p < 0.05$).

Exp. 2를 수행한 결과, melatonin 처리구의 경우 뇌하수체 세포에서 FSH β 와 LH β 의 발현이 저농도 처리구에서 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), 함께 조사한 GH, SL의 발현도 저농도 처리구에서 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 또한 melatonin 처리에 의한 mtr과 pgr의 발현은 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$) (Fig. 3). 5-HT 처리구의 경우 뇌하수체 세포에서 대조구와 비교했을 때 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 하지만 처리구 사이에는 FSH β 와 LH β 의 발현이 저농도 처리구에서 가장 높았고, GH와 SL의 발현은 고농도 처리구에서 가장 높았다($p < 0.05$) (Fig. 4).

고찰

1. P4 및 E2 처리에 의한 번식 관련 유전자의 mRNA 발현 변화

P4는 경골어류의 번식 과정에서 암컷의 최종 성숙과 배란을 자극하거나 수컷에서 정자 성숙 및 운동성을 자극한다고 알려져 있다(Poulos et al., 2010). 일반적으로 뱀장어 성숙 시 FSH β 는 성숙 초기에 발현되고 LH β 는 성숙 후기에 발현된다(Saito et al., 2003; Jeng et al., 2007). 본 연구에서는 P4가 미성숙 뱀장어의 뇌하수체에서 성숙 초기에 발현되는 FSH β 뿐만 아니라 LH β 의 발현을 증가시켰다. 이와 동일하게 zebrafish의 배양된 뇌하수체에 progesterin

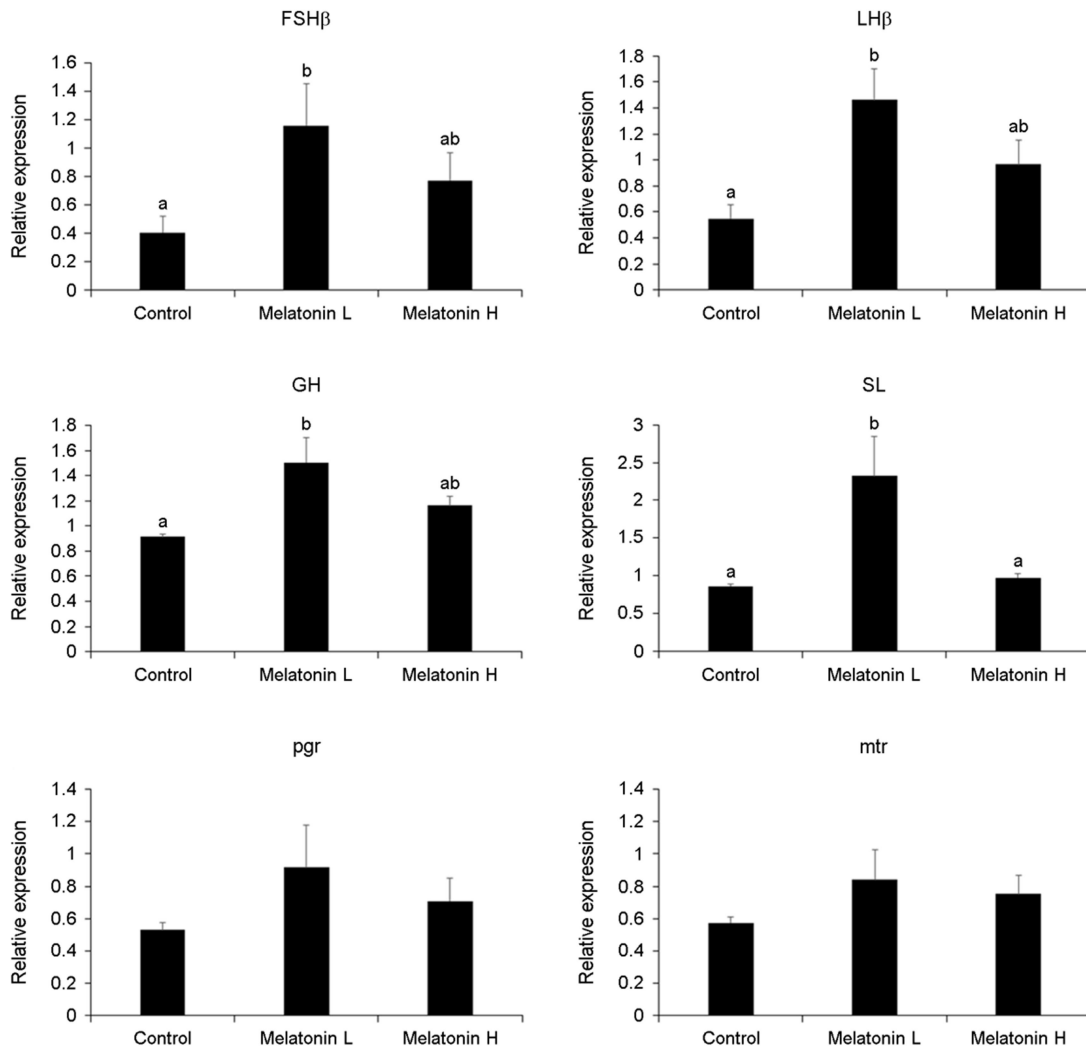


Fig. 3. Expressions of FSHβ, LHβ, GH, SL, pgr and mtr genes after treatments with GnRH only (Control), low concentration of melatonin (Melatonin L) and high concentration of melatonin (Melatonin H). Different alphabetical superscripts indicate significant difference between treatments, ($p < 0.05$).

을 처리한 연구에서도 FSHβ 및 LHβ의 발현이 유의하게 증가하였다(Wang et al., 2016). 또한 미성숙 무지개송어(*O. mykiss*)에서도 P4를 복강 주사 시 뇌하수체에서 LH 수준이 유의하게 증가하였고(Atteke et al., 2003), 어류에서 P4의 작용은 FSHβ 및 LHβ 유전자의 mRNA 발현을 증가시키는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 E2 처리 시 FSHβ 및 LHβ의 발현은 유의한 차이가 없었다. 이전 연구에서 뱀장어 뇌하수체 세포에 E2 처리 후 FSHβ의 발현이 증가하였다(Aroua et al., 2007). 금붕어 뇌하수체에서는 E2 처리 시 FSHβ 및 LHβ의 발현이 증가하였고, 그 효과는 생식소 발달 초기, 후기에 따라 차이를 보였다. 또한 E2의 처리 효과는 성숙 시기 및 E2 처리 농도에 영향을 받기 때문에(Huggard-Nelson et al., 2002) 본 연구에서 FSHβ 및 LHβ의 발현

이 차이가 나타나지 않았을 것이다.

GH의 경우 모든 처리구에서 유의한 차이가 없었다. 동일하게 유럽뱀장어(*Anguilla anguilla*)에서도 뇌하수체에 P4 처리 후 GH 방출에 유의미한 영향을 미치지 않았다(Rousseau et al., 2002). 암컷 잉어에서는 P4 및 E2의 처리가 농도에 따라 GH의 분비를 조절했다. 그러나 고농도에서는 오히려 GH의 분비를 유도하지 못했고 적정 농도의 처리가 GH의 분비를 자극한다고 보고했다(Degani et al., 1996). GH의 발현은 어종이나 P4 및 E2 처리 농도에 의해 차이가 나타나는 것으로 보이며, 이로 인해 미성숙 뱀장어의 뇌하수체 세포에서는 GH의 발현을 유도하지 못했을 것으로 생각된다.

SL의 경우에도 모든 처리구에서 유의한 차이가 나타나지 않았

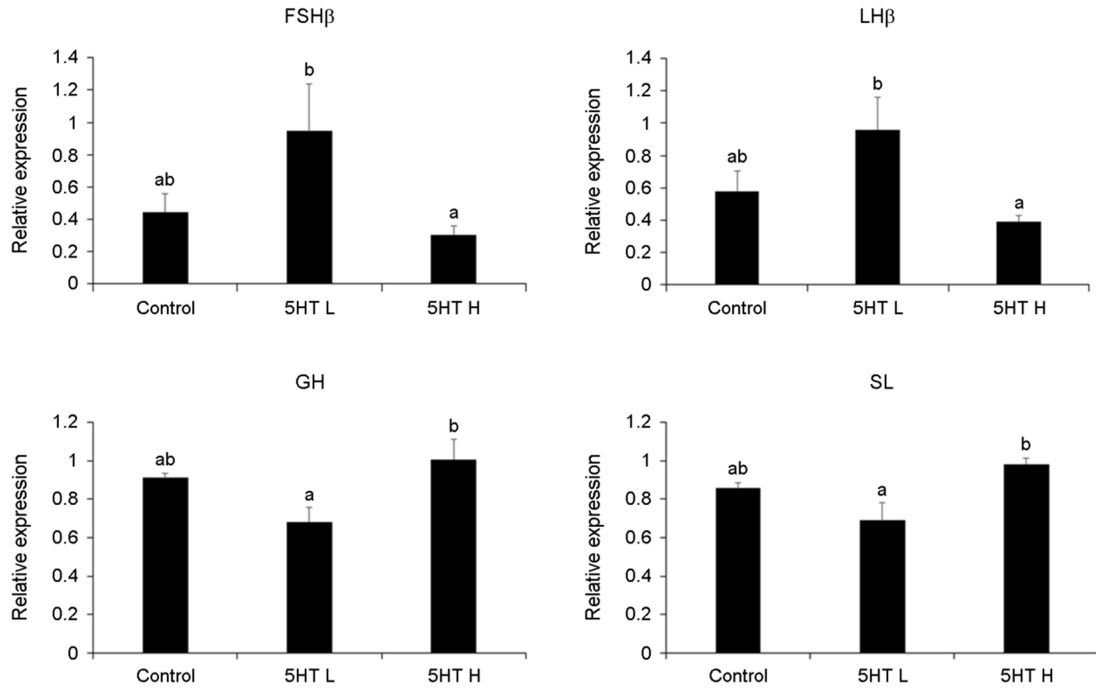


Fig. 4. Expressions of FSHβ, LHβ, GH, and SL genes after treatments with GnRH only (Control), low concentration of 5-HT (5-HT L) and high concentration of 5-HT (5-HT H). Different alphabetical superscripts indicate significant difference between treatments, ($p < 0.05$).

다. 이전 연구에서는 E2 처리에 의해 SL의 발현이 억제 또는 증가하였다(Astola et al., 2004; Onuma et al., 2005). E2는 SL 프로모터의 활성화에 관여하고 유전자 전사를 활성화시키는 POU 계열 전사 인자인 Pit-1을 자극하여 SL의 발현에 영향을 미친다(Onuma et al., 2005). 뱀장어에서는 후기 난황형성 단계로 갈수록 SL의 분비가 증가했다(Ozaki et al., 2007). 본 연구에서 P4 처리는 FSHβ 및 LHβ를 유도하였지만 GH 및 SL 발현에는 유의한 차이가 없었다. 이 같은 결과는 P4가 뱀장어에서 FSHβ 및 LHβ의 유전자의 mRNA 발현은 유도할 수 있지만 GH 및 SL의 mRNA 발현은 유도하지 않을 가능성이 있다. 하지만 P4 처리 후 SL의 발현 변화와 관련된 연구가 많이 진행되지 않았기 때문에 P4의 작용은 아직까지 불분명하다.

현재까지 P4 처리에 관하여 mtr의 발현에 어떤 영향을 미치는지에 대해 연구가 진행되지 않아 작용 메커니즘은 알 수 없다. 하지만 본 연구에서는 P4가 mtr의 발현을 유도하지 않았고, P4 처리에 의한 pgr의 발현도 유의한 차이가 없었다. Zebrafish에서도 P4 처리는 FSHβ의 발현을 증가시켰으나 pgr의 발현은 유의한 차이가 없었다(Liang et al., 2019). 또한 zebrafish의 배양된 뇌하수체에 progestin 처리한 연구에서는 FSHβ의 경우 progestin이 pgr에 의해 매개되어 FSHβ의 발현을 증가시킬 것이라고 주장하였다(Wang et al., 2016). 그렇지만 본 연구에서 P4의 처리가 FSHβ의 발현 증가는 유도하였지만 pgr의 발현에 유의한 증가를 유도하지는

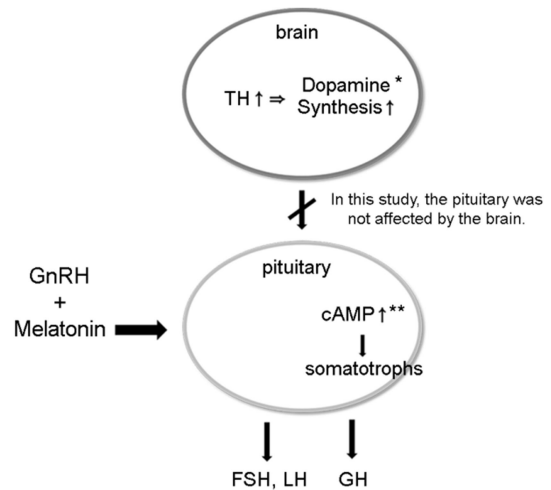


Fig. 5. Direct action of melatonin on the pituitary cells to induce gonadotropin production in the eels. This figure is shown by reference to the results of this study and those of Sébert et al. (2008)* and Falcón et al. (2003)**.

않았다. 이는 P4 처리에 의한 FSHβ 발현 유도 시 pgr은 제한요인으로 작용하지는 않는 것으로 보인다. LHβ의 경우에도 pgr과 무관하게 P4 처리에 의해 해당 유전자 발현이 증가되었다. 기존 연

구결과를 보면 LHβ의 경우 pgr 매개 없이도 progestin 처리에 의해 발현이 증가되었다(Wang et al., 2016). 따라서 P4 처리 후 FSHβ 및 LHβ 발현에 있어서 pgr이 크게 영향을 미치지 않을 가능성이 있다.

본 연구에서 E2의 처리는 pgr의 발현 증가를 유도하였고, P4의 효과를 상승시킬 것이라 기대하였으나 FSHβ 및 LHβ의 발현을 상승시키지 못했다. 포유동물(Lagacé et al., 1980; Lesoon and Mahesh, 1992), 미성숙 무지개송어의 연구에서도(Atteke et al., 2003) E2와 P4를 함께 처리 시 단독 처리구에 비해서 뇌하수체에서 FSHβ 및 LHβ 발현의 상승효과를 나타내지 않았다. E2의 처리는 pgr의 증가와 estrogen receptor (esr)의 감소로 인해 단기적으로는 FSHβ 및 LHβ의 발현 증가를 불러올 수 있지만, 이는 E2 처리 농도 및 시간의 적절성에 달려있다(Lesoon and Mahesh, 1992). 그러므로 E2는 pgr의 발현을 증가시키지만 이로 인해 P4의 작용을 극대화시키지는 않는다.

2. Melatonin 및 5-HT 처리에 의한 번식 관련 유전자의 mRNA 발현 변화

Melatonin 및 5-HT는 중추 및 말초신경에 작용하여 어류의 성숙 및 번식에 영향을 미친다(Prasad et al., 2015; Maitra and Hasan, 2016). 본 연구에서 뇌하수체 세포에 대한 melatonin의 처리는 저농도 처리구에서 FSHβ와 LHβ의 발현을 유의하게 증가시켰으나 고농도 처리구에서는 대조구와 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 melatonin이 뇌하수체 세포의 생식소 자극 호르몬 분비에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 다만 유효한 작용을 위해서는 너무 높은 농도는 적합하지 않을 것으로 판단된다. 선행연구에서는 melatonin에 의한 독성은 매우 낮았고, 어종마다 melatonin의 적정 농도가 다를 것으로 나타난 바 있다(Adriaens et al., 2006).

연어과 어류를 포함한 일부 어종에서 melatonin의 처리는 FSHβ 및 LHβ 발현에 영향을 미치지 않거나 감소를 유도하였다(Amano et al., 2004). 암컷 유럽뱀장어에서도 멜라토닌 implant를 장기간 복강에 삽입한 후 뇌하수체에서 FSHβ와 LHβ의 발현이 유의하게 감소하였다. 이 연구에서 장기간의 melatonin 처리가 뇌에서 도파민의 합성을 조절하는 tyrosine hydroxylase (TH)의 발현을 증가시켰고 TH에 의해 생성된 도파민이 생식소 자극 호르몬 발현을 억제하였다고 주장하였다(Sébert et al., 2008). 그러나 본 연구에서는 오히려 FSHβ와 LHβ의 발현을 증가시켰다. 본 연구는 *in vitro*로 진행되어 뇌에서 만들어진 도파민에 의한 억제 효과가 없는 환경이기 때문에 melatonin과 함께 처리한 GnRH에 의해 FSHβ와 LHβ 유전자 발현이 유도되었을 가능성이 있다(Fig. 5).

Melatonin 저농도 처리는 GH와 SL의 발현도 유의하게 증가시켰다. 암컷 무지개송어의 배양된 뇌하수체에 melatonin을 처리한 연구에서는 GH의 발현이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였고(Falcón et al., 2003), 대서양연어에서도 멜라토닌 implant를 장기간

이식 시 혈장 GH가 유의하게 증가하였다(Handeland et al., 2013). Falcón et al. (2003)은 melatonin에 영향을 받은 somatotrophs이 GH 분비를 조절하며, 야간에 cyclic AMP가 증가하였을 때 GH 분비를 자극한다고 주장하였다(Fig. 5). SL의 경우 melatonin 처리가 어떤 메커니즘으로 SL의 mRNA 발현을 조절하는지 현재는 알 수 없지만 뱀장어에서는 melatonin의 처리가 SL의 발현도 조절하는 것으로 관찰된다.

P4 처리의 결과와 마찬가지로 melatonin 처리 후에도 mtr 및 pgr의 발현에는 유의한 변화가 없었다. 본 연구결과와 달리 포유류에서는 melatonin 주사 후 콜레스테롤이 P4로 합성되는데 중요한 효소인 P450scc를 감소시켜 황체에서 P4의 분비를 억제했다(Webley and Hearn, 1987). 이와 반대로 Fang et al. (2019)은 melatonin 처리가 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 활성화해 steroidogenic acute regulatory protein (StAR)을 상향 조절하고 StAR은 P4 합성에 필요한 콜레스테롤 운반하여 P4의 분비를 유도할 수 있다고 주장하였다. 또한 melatonin의 처리가 P4 합성에 아무런 영향을 미치지 않은 결과도 있다(Peltier et al., 1998). Melatonin 처리 후 수용체의 변화는 pgr의 경우 포유류 자궁에서 유의하게 증가하였다(Abd-Allah et al., 2003). 또 다른 연구에서는 melatonin 주사 후 P4의 증가를 유도하였지만 mtr와 pgr의 증가를 유도하지 않았고, melatonin과 에탄올의 동시 투여가 수용체의 증가를 유도하여 에탄올과 멜라토닌이 함께 작용할 것이라고 시사하였다(Chuffa et al., 2013). 이전 연구에 의하면 melatonin이 P4 합성에 미치는 영향은 실험 조건이나 생물에 따라서 다를 것으로 예상되며, melatonin 처리에 의한 P4와 pgr 및 mtr의 합성 및 증가는 동일하게 조절하지는 않을 것으로 생각된다.

5-HT의 경우 본 연구에서 조사한 모든 유전자의 mRNA 발현이 대조구와 5-HT를 처리구 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았고, FSHβ 및 LHβ와 GH 및 SL의 발현이 서로 반대로 발현되는 경향이 나타났다. 금붕어 뇌하수체 세포에 5-HT를 처리한 연구에서는 GTH 분비가 농도 의존적으로 증가하였고 GH의 분비는 농도 의존적으로 감소하였다(Somoza and Peter, 1991; Wong et al., 1998). 이 외에도 다양한 어류에서 5-HT의 처리는 GTH의 분비를 유의하게 증가시켰다(Khan and Thomas, 1992; Sokolowska-Mikolajczyk et al., 2015). Wong et al. (1998)은 5-HT가 gonadotrophs와 somatotrophs의 5-HT 수용체와 결합하며, 5-HT2 작용제인 α methyl 5-HT에 의해서 GTH 분비를 유도하고 GH 분비 억제할 것이라고 제시하였다. 또한 Sokolowska-Mikolajczyk et al. (2015)는 5-HT와 도파민과의 상호작용이 LH 분비를 유도할 것이라고 하였다. 이전 연구에 의하면 5-HT가 대부분의 어류에서 GTH의 분비를 유도하고 GH의 분비를 억제하는 것으로 보인다. 5-HT 처리에 의한 SL 발현 조절에 관하여 현재까지 밝혀진 바 없으며, 뱀장어에서는 5-HT의 처리가 번식 관련 유전자의 mRNA 발현에 영향을 미칠 가능성이 낮을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 미성숙한 뱀장어의 뇌하수체 세포에 다양한 호

르몬을 처리하였고, 이 중 P4 또는 melatonin의 처리가 번식 관련 유전자의 mRNA 발현에 영향을 미친다는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 세포 수준에서 생식소 자극 호르몬 유전자의 발현을 관찰하였고, 실제 뱀장어 체내에서의 작용은 본 연구결과와 다를 수도 있을 것이다. 그럼에도 불구하고 이 두 호르몬은 뱀장어의 번식에 관여할 가능성이 높아 보이며, 뱀장어 번식 유도 기술의 개선을 위한 추후 연구의 대상으로 주목해볼 필요가 있다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 과학기술분야기초연구사업(NRF-2020R1A2C1010475)의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

- Abd-Allah ARA, El-Sayed EM, Abdel-Wahab MH, Hamada FMA. 2003. Effect of melatonin on estrogen and progesterone receptors in relation to uterine contraction in rats. *Pharmacological Research* 47: 349-354.
- Abecia JA, Forcada F, Zúñiga O. 2002. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. *Veterinary Research Communications* 26: 151-158.
- Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R, Janssen K, Smits J. 2006. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology* 228: 333-343.
- Amano M, Iigo M, Ikuta K, Kitamura S, Okuzawa K, Yamada H, Yamamori K. 2004. Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. *Zoological Science* 21: 79-85.
- Aroua S, Weltzien F, Belle NL, Dufour S. 2007. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids. *General and Comparative Endocrinology* 153: 333-343.
- Astola A, Calduch-Giner JA, Ortiz M, Pérez-Sánchez J, Valdivia MM. 2004. Genomic structure and functional analysis of promoter region of somatolactin gene of sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Biotechnology* 6: 411-418.
- Atteke C, Vetillard A, Fostier A, Garnier D, Jego P, Bailhache T. 2003. Effects of progesterone and estradiol on the reproductive axis in immature diploid and triploid rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 134: 693-705.
- Bhandari RK, Taniyama S, Kitahashi T, Ando H, Yamauchi K, Zohar Y, Urano A. 2003. Seasonal changes of responses to gonadotropin-releasing hormone analog in expression of growth hormone/prolactin/somatolactin genes in the pituitary of masu salmon. *General and Comparative Endocrinology* 130: 55-63.
- Benedet S, Björnsson BT, Taranger GL, Andersson E. 2008. Cloning of somatolactin alpha, beta forms and the somatolactin receptor in Atlantic salmon: Seasonal expression profile in pituitary and ovary of maturing female broodstock. *Reproductive Biology and Endocrinology* 6: 1-17.
- Bódis J, Török A, Tinneberg H, Hanf V, Hamori M, Cledon P. 1992. Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells. *Fertility and Sterility* 57: 1008-1011.
- Carnevali O, Gioacchini G, Maradonna F, Olivotto I, Migliarini B. 2011. Melatonin induces follicle maturation in *Danio rerio*. *PLoS One* 6: e19978.
- Chuffa LGA, Seiva FRF, Fávoro WJ, Amorim JPA, Teixeira GR, Mendes LO, Fioruci-Fontanelli BA, Pinheiro PFF, Martinez M, Martinez FE. 2013. Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. *Reproductive Toxicology* 39: 40-49.
- Degani G, Boker R, Jackson K. 1996. Growth hormone, gonad development, and steroid levels in female carp. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology* 115: 133-140.
- Díaz Rodríguez E, Fernández Alvarez C, Castrillón PO, Esquifino Perras AI, Díaz López B. 2001. *In vitro* pituitary prolactin, growth hormone and follicle stimulating hormone secretion during sexual maturation of female rats primed with melatonin. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 61: 27-33.
- Falcón J, Besseau L, Fazzari D, Attia J, Gaildrat P, Beauchaud M, Boeuf G. 2003. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology* 144: 4648-4658.
- Fang L, Li Y, Wang S, Yu Y, Li Y, Guo Y, Yan Y, Sun Y. 2019. Melatonin induces progesterone production in human granulosa-lutein cells through up regulation of StAR expression. *Aging (Albany NY)* 11: 9013-9024.
- Fang X, Wu L, Yang L, Song L, Cai J, Luo F, Wei J, Zhou L, Wang D. 2018. Nuclear progesterone receptor (pgr) knockouts resulted in subfertility in male tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The Journal*

- of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 182: 62-71.
- Handeland SO, Imsland AK, Björnsson BT, Stefansson SO, Porter M. 2013. Physiology during smoltification in Atlantic salmon: Effect of melatonin implants. *Fish Physiology and Biochemistry* 39: 1079-1088.
- Hashizume T, Kumahara A, Fujino M, Okada K. 2002. Insulin-like growth factor I enhances gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from bovine anterior pituitary cells. *Animal Reproduction Science* 70: 13-21.
- Huang YS, Rousseau K, Le Belle N, Vidal B, Burzawa-Gérard E, Marchelidon J, Dufour S. 1999. Opposite effects of insulin-like growth factors (IGFs) on gonadotropin (GtH-II) and growth hormone (GH) production by primary culture of european eel (*Anguilla anguilla*) pituitary cells. *Aquaculture* 177: 73-83.
- Huggard-Nelson DL, Nathwani PS, Kermouni A, Habibi HR. 2002. Molecular characterization of LH- β and FSH- β subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 188: 171-193.
- Hyeon JY, Byun JH, Kim ES, Heo YS, Fukunaga K, Kim SK, Imamura S, Kim SJ, Takemura A, Hur SP. 2021. Testis development in the Japanese eel is affected by photic signals through melatonin secretion. *PeerJ* 9: e12289.
- Jeng SR, Yueh WS, Chen GR, Lee YH, Dufour S, Chang CF. 2007. Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *General and Comparative Endocrinology* 154: 161-173.
- Kagawa H, Ohta H, Tanaka H. 2001. Recent progress of research on larvae production of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture Science* 49: 127-132.
- Khan IA, Thomas P. 1992. Stimulatory effects of serotonin on maturational gonadotropin release in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*. *General and Comparative Endocrinology* 88: 388-396.
- Khan IA, Thomas P. 1996. Melatonin influences gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *General and Comparative Endocrinology* 104: 231-242.
- Kim DJ, Lee BI, Kim KK, Kim EO, Son MH, Seong KB. 2013. Effects of estradiol-17 β on the feminization of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Life Science* 23: 998-1003.
- Lagacé L, Massicotte J, Labrie F. 1980. Acute stimulatory effects of progesterone on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 106: 684-689.
- Le Gac F, Blaise O, Fostier A, Le Bail PY, Loir M, Mourot B, Weil C. 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: A review. *Fish Physiology and Biochemistry* 11: 219-232.
- Lesoon LA, Mahesh VB. 1992. Stimulatory and inhibitory effects of progesterone on FSH secretion by the anterior pituitary. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 42: 479-491.
- Liang YQ, Huang GY, Zhen Z, Tian F, Hou L, Lin Z, Ying GG. 2019. The effects of binary mixtures of estradiol and progesterone on transcriptional expression profiles of genes involved in hypothalamic-pituitary-gonadal axis and circadian rhythm signaling in embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 174: 540-548.
- Maitra SK, Hasan KN. 2016. The role of melatonin as a hormone and an antioxidant in the control of fish reproduction. *Frontiers in Endocrinology* 7: 38.
- Miura T, Higuchi M, Ozaki Y, Ohta T, Miura C. 2006. Progesterone is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 103: 7333-7338.
- Morini M, Peñaranda DS, Vilchez MC, Nourizadeh-Lillabadi R, Lafont A, Dufour S, Asturiano JF, Weltzien F, Pérez L. 2017. Nuclear and membrane progesterone receptors in the european eel: Characterization and expression *in vivo* through spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 207: 79-92.
- Mun SH. 2022. Transcriptomic changes in the reproduction control system of eel (*Anguilla japonica*) in response to induction of sexual maturation. Sunmoon university Ph.D.
- Murack PJ, Parrish J, Barry TP. 2011. Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* 104: 121-125.
- Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H. 2003. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertility and Sterility* 80: 1012-1016.
- Ohkubo N, Sawaguchi S, Nomura K, Tanaka H, Matsubara T. 2008. Utilization of free amino acids, yolk protein and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 282: 130-137.
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Hirose K. 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 139: 291-301.
- Onuma T, Ando H, Koide N, Okada H, Urano A. 2005. Effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding growth hormone/prolactin/somatolactin

- family hormones and a pituitary-specific transcription factor in masu salmon pituitary cells *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 143: 129-141.
- Ozaki Y, Ishida K, Saito K, Ura K, Adachi S, Yamauchi K. 2007. Immunohistochemical changes in production of pituitary hormones during artificial maturation of female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 73: 574-584.
- Paulos P, Runnalls TJ, Nallani G, La Point T, Scott AP, Sumpter JP, Huggett DB. 2010. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, norethindrone. *Aquatic Toxicology* 99: 256-262.
- Peltier MR, Robinson G, Sharp DC. 1998. Effects of melatonin implants in pony mares 1. acute effects. *Theriogenology* 49: 1113-1123.
- Prasad P, Ogawa S, Parhar IS. 2015. Role of serotonin in fish reproduction. *Frontiers in Neuroscience* 9: 195.
- Rousseau K, Le Belle N, Sbahi M, Marchelidon J, Schmitz M, Dufour S. 2002. Evidence for a negative feedback in the control of eel growth hormone by thyroid hormones. *Journal of Endocrinology* 175: 605-613.
- Saito K, Lokman PM, Young G, Yamauchi K. 2003. Follicle-stimulating hormone beta, luteinizing hormone beta and glycoprotein hormone alpha subunit mRNA levels in artificially maturing Japanese eel *Anguilla japonica* and naturally maturing new zealand longfinned eel *Anguilla dieffenbachii*. *Fisheries Science* 69: 146-153.
- Sébert ME, Legros C, Weltzien FA, Malpoux B, Chemineau P, Dufour S. 2008. Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. *Journal of Neuroendocrinology* 20: 917-929.
- Seyedabadi M, Fakhfour G, Ramezani V, Mehr SE, Rahimian R. 2014. The role of serotonin in memory: Interactions with neurotransmitters and downstream signaling. *Experimental Brain Research* 232: 723-738.
- Sokolowska-Mikolajczyk M, Gajdzinski D, Gosiewski G, Socha M. 2015. Serotonin, GnRH-A, and dopamine interaction in the control of *in vivo* luteinizing hormone release in Prussian carp (*Carassius gibelio Bloch*) at the time of gonad recrudescence. *Czech Journal of Animal Science* 60: 45-51.
- Somoza GM, Peter RE. 1991. Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from *in vitro* perfused goldfish pituitary fragments. *General and Comparative Endocrinology* 82: 103-110.
- Tanaka H, Kagawa H, Ohta H, Unuma T, Nomura K. 2003. The first production of glass eel in captivity: Fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 493-497.
- Wang C, Liu D, Chen W, Ge W, Hong W, Zhu Y, Chen SX. 2016. Progestin increases the expression of gonadotropins in pituitaries of male zebrafish. *Journal of Endocrinology* 230: 143-156.
- Webley GE, Hearn JP. 1987. Local production of progesterone by the corpus luteum of the marmoset monkey in response to perfusion with chorionic gonadotrophin and melatonin *in vivo*. *Journal of Endocrinology* 112: 449-457.
- Wong AOL, Murphy CK, Chang JP, Neumann CM, Lo A, Peter RE. 1998. Direct actions of serotonin on gonadotropin-II and growth hormone release from goldfish pituitary cells: Interactions with gonadotropin-releasing hormone and dopamine and further evaluation of serotonin receptor specificity. *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 23-34.