



염분 변화에 따른 명태(*Gadus Chalcogrammus*)의 스트레스 반응; 혈액생리학적 변화 및 유전자 발현

전소희* · 최진** · 김기태** · 변순규*** · 임현정*** · 김이경**** · 손새봄†
국립수산과학원(*연구원 · **연구사 · ***연구관 · †연구사) · ****강릉원주대학교(교수)

Blood Physiological Changes and Gene Expression on Walleye Pollock *Gadus Chalcogrammus* Stress Response to Salinity Fluctuation

So-Hee JEON* · Jin CHOI** · Ki-Tae KIM** · Soon-Gyu BYUN*** · Hyun-Jeong LIM*** ·
Lee-Kyung KIM**** · Saebom SOHN†

National Institute of Fisheries Science (*researcher · **junior researcher · *** senior researcher ·
†junior researcher) · ****Gangneung-Wonju National University (professor)

Abstract

The study evaluated the change of stress indicators in plasma and mRNA expression levels of stress-related genes in head-kidney and liver of walleye pollock, *Gadus chalcogrammus* according to acute salinity fluctuation. Walleye pollocks were exposed for 24 hours in five groups, as salinity are 34, 30, 25, 20, and 15 psu. The levels of hematocrit (Ht), glutamic oxaloacetate transaminase (GOT), cortisol, glucose, and superoxide dismutase (SOD) in plasma were increased as the salinity of the breeding water decreased. Ht increased with $37.5 \pm 1\%$ at 20 psu. GOT with 41.0 ± 5.03 U/L, cortisol with 882.73 ± 32.73 ng/mL, and glucose with 67.67 ± 11.6 ng/dL increased a significant difference at 25 psu. The SOD activity levels in plasma were highest at 15 psu with 3.51 ± 0.13 U/mL. Plasma hemoglobin (Hb) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) did not show a statistically significant difference according to salinity, but showed a tendency to increase as the salinity decreased. Total protein (TP) levels in plasma were the highest with 5.9 ± 0.61 g/dL at 25 psu. The relative mRNA expression of stress-related genes was investigated in the head-kidney and liver of walleye pollocks, and the mRNA expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and heat shock protein 70 (HSP70) increased, as the salinity decreased from 25 psu, whereas glucocorticoid receptor (GR) mRNA expression decreased as the salinity decreased. These results suggest that walleye pollocks become stressed-condition to salinity below 25 psu, but homeostasis can be maintained up to 15 psu in short-term.

Key words : Blood physiology, *Gadus chalcogrammus*, Salinity, Stress, Stress-related gene, Walleye pollock

I. 서론

대구과 어류에 속하는 명태(*Gadus chalcogrammus*)

는 우리나라 동해와 일본 북부의 아시아 지역에
서부터 오호츠크해, 베링해 및 미국 북부 등 북
태평양 지역에 널리 분포하고 있다(Hiatt et al.,

† Corresponding author : 051-400-5665, mcspring@korea.kr

※ 이 논문은 2022년도 국립수산과학원 수산과학연구사업 동해 특산품종 양식기술개발(R2022003)의 지원으로 수행된 연구입니다..

2010). FAO에 따르면, 국내 명태의 어획량은 1980년대 연간 7만톤에서 1990년대 6천톤으로 꾸준히 감소하였고, 2000년 이후로는 통계적으로 어획량 기록이 어려울 정도로 급감하였다(FAO, 2021). 국내에서 명태의 급감에 대한 원인으로는 기후변화로 인한 수온 상승과 남획이 주요 원인으로 여겨지고 있으며(Lee and Kim, 2010), 명태의 자원회복을 위해 국내 연구기관에서는 2016년 전주기적 명태 양식에 성공하였다.

염분, 수온, 용존 산소 및 사육 밀도 등의 수질 환경은 어류 양식에 있어서 중요한 요인이다(Alderdice and Forrester, 1971; Shi et al., 2011). 이전 연구들에 의하면 명태의 서식 수온은 10°C 이하의 저수온으로, 특히 명태 치어의 적수온은 2에서 7°C 사이로 알려져 있다(Bakkala, 1993; Nakatani and Maeda, 1984). 따라서 명태 양식에 있어서 수온 유지는 많은 비용 발생이 따른다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 여름철 해수 수온이 높은 시기에 상대적으로 수온이 낮은 지하 해수를 공급해 주는 것이 경제적으로 효율적일 수 있다(Lee, 2015). 그러나 지하 해수는 일반 해수에 비해 염분이 낮고 강우량에 따라 염분 변화가 크기 때문에(Lim et al., 2012) 양식 대상 종의 적정 사육염분 농도에 대한 연구가 필요하다. 해산어에 있어서 사육수의 염분 변화는 어체 내 스트레스 요인으로 작용될 수 있다(Bervoets et al., 1996). 급격한 염분 변화는 삼투압 스트레스로 작용하게 되고 단백질의 구조 변형, DNA 손상 및 지질 과산화 등으로 인하여 세포의 산화적 스트레스를 유발하게 된다(Evans and Kültz, 2020). 세포 내에서 산화적 스트레스는 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)를 발생시키며, 이를 제거하기 위해 항산화효소를 활성화시켜 활성산소를 제거함으로써 세포의 항상성을 유지한다(Martnez- Álvarez et al., 2005). 활성화 된 항산화효소는 산화적 스트레스에 대한 바이오마커로 이용이 되며 (Bansal and Kaushal, 2014), Superoxide dismutase (SOD)는 활성산소에 대항하여 처음 생성되는 항산화효소

이다(Nakano et al., 2014).

Cortisol과 glucose는 환경적 스트레스에 노출이 되었을 때, 증가하는 대표적인 생리학적 지표이다(Barton and Iwama, 1991; Pacheco and Santos, 2001). Cortisol은 대사와 삼투압을 조절하는 호르몬으로 전구체인 콜레스테롤로부터 합성이 되며, 스테로이드 합성의 기질로 사용이 되는 Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)이라는 단백질이 스테로이드 생성 세포의 미토콘드리아 막을 통해 콜레스테롤 수송에 관여하며 cortisol의 생성은 시작된다(Clark et al., 1994). 정상 상태에서 순환하는 cortisol 농도는 생물학적 기능을 유지하는데 필수적이지만 높은 cortisol 농도는 혈액 내 glucose 농도를 증가시킨다(Samaras et al., 2018). 또한 cortisol은 glucocorticoid receptor (GR)의 작용제로 작용하며, GR은 항상성을 유지하기 위해 chaperone, kinase, phosphatase 및 proteasome 등을 포함하는 수많은 세포질(cytoplasm) 단백질과 상호작용을 하는 유전자의 전사를 조절한다(Heitzer et al., 2007; Krug et al., 2014). Heat shock protein 70 (HSP70)은 대표적인 분자 chaperone으로, misfolding 된 단백질을 refolding 시켜 세포를 보호하는 역할을 한다. HSP70은 박테리아 감염에서부터 열충격, 중금속 노출 및 산화적 스트레스 등 다양한 환경 스트레스에 대항하여 세포를 보호하기 위해 광범위하게 발현된다(Podrabsky and Somero, 2004; Somero, 2010).

다른 스트레스 인자로, 간 기능장애 및 간 손상의 지표로 고려되는 glutamic oxaloacetate transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT)는 중요한 아미노기전이효소(Aminotransferases)이다(Wang et al., 2005; Ming et al., 2014). 체내 항상성 유지를 위한 에너지 생성과 관련된 total protein (TP)도 혈중 스트레스 지표로 고려되고 있다(Davis and Parker et al., 1990).

염분에 관한 명태의 연구로는 염분 노출 1일 후 명태 부화자어의 생존율은 34 psu에서 84.1%, 25 psu에서 74.7%, 20 psu에서 56.9%로 보고되었

다. 부화율 또한 염분 농도가 낮아짐에 따라 감소하였다(Choi et al., 2020). 그러나 염분 농도에 따른 명태의 생리적 반응이나 자치어를 제외한 성장 단계에 따른 염분의 영향 등에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구는 지하 해수 사용 시 낮아지는 사육수의 염분 변화에 의한 명태의 생리학적 변화를 이해하기 위해서 스트레스에 의해 유도되는 지표들을 평가하였으며, 명태 사육을 위한 적정 염분 조건을 규명하고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 실험어 및 사육수의 염분 조절

실험에 사용된 명태는 국립수산물과학원 동해수산연구소에서 사육하고 있는 2017년산 명태로, 실험어의 평균체중은 119.1 ± 8.51 g이고, 평균전장은 25.3 ± 5.23 cm이었다. 각 실험수조(1.2 m x 3.3 m x 0.7 m)에 20마리씩 실험어를 수용하여 유수식으로 사육하였으며, 수온은 $8.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하며, 2주간 순치하였다. 수온은 히트펌프(BLUE AIR-TEK, Korea)를 이용해 유지하였으며, 수온, 용존산소, 염분 및 pH는 YSI ProDSS (YSI Incorporated, USA)를 이용해 매일 측정하였다.

염분은 1일 간격으로 사육 수조에 담수를 첨가하여 조절하였으며, 수조의 환수량은 6 L/min으로 해수와 담수의 비율을 조절하여 34 psu에서 15 psu까지 매일 5 psu씩 점진적으로 낮춰주었다. 실험은 2반복으로 진행하였으며, 실험기간 동안 사료의 영향을 배제하기 위해 먹이는 공급하지 않았으며 24시간 동안 각 실험 염분에 노출 후 스트레스 관련 지표들을 분석하였다.

2. 혈액생리학적 분석

사육수의 염분 농도가 34, 30, 25, 20 및 15 psu로 조절된 각 실험수조에서, 염분 노출 24시간 후 무작위로 3마리의 명태를 선택하여 혈액을

채취하였다. 채혈 직전 실험어를 50 ppm의 tricaine methan sulphonate (MS-222, Sigma, USA)로 마취한 후 100 U/mL 농도의 헤파린이 처리된 주사기와 처리하지 않은 주사기를 사용하여 명태의 미부정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 그 후 헤파린 처리가 되지 않은 혈액은 즉시 hematocrit (Ht) 과 hemoglobin (Hb) 분석에 사용되었으며, 헤파린이 처리된 혈액은 25°C , 3,000 rpm에서 20 min 동안 원심분리 한 후 상층액인 혈장을 분리하였고 다음 분석 전까지 -80°C 에 보관하였다. Ht는 모세관을 원심분리(-4°C , 12,000 rpm, 10 min)하여 Ht-log chip (Micro-hematocrit reader, Hawksley Co, UK)을 이용하여 측정하였으며, Hb, GOT, GPT, glucose 및 TP는 자동생화학분석기(Fuji dry-chem 4000i, Fujifilm Co, JAPAN)를 이용하여 측정하였다. 또한 혈장 내 cortisol 농도 및 SOD 활성은 상업용 ELISA Kit (Cayman chemical, USA)를 사용하여 각각 제조사의 실험 절차에 따라 분석하였으며 흡광도는 450 nm에서 Multiskan Go (Thermo Scientific, USA) 장비를 이용하여 측정하였다.

3. StAR, GR 및 HSP70 mRNA 발현 분석

Total RNA 추출을 위해 50 mg의 두신과 간 조직을 균질화하여 Trizol Reagent (Thermo, USA)를 이용하여 추출하였으며, total RNA 순도는 흡광도 206/280 비율이 1.8 이상이 되는 것을 사용하였다. 먼저, RT (Reverse transcriptase)-PCR은 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 각 유전자의 cDNA를 합성하였다. 이후 Primix PCR kit (Enzinomics, Korea)를 이용하여 PCR을 실시하였고 sequencing 통해 각 유전자의 단편을 확인하였다. PCR에 이용된 primer는 이미 알려진 명태의 HSP70 (GeneBank accession No. MF770310.1) 염기서열과 대서양 대구의 GR (GeneBank accession No. JF896315.1) 및 StAR (GeneBank accession No. XM00370229.1) 염기서열에 기초하여 “Primer3”

프로그램을 이용하여 제작하였다(<Table. 1>).

명태의 두신과 간 조직에서 StAR, GR 및 HSP70 mRNA의 발현을 상대정량하기 위해 Quantitative real time-PCR (qRT-PCR)을 실시하였으며, housekeeping gene은 명태에서 알려진 18s rRNA (GeneBank accession No. AB16661.1)를 이용하였다. TOPreal™ SYBR Green qPCR PreMIX Kit (Enzynomics, Korea)를 이용하여 0.25 μM의 SYBR Green을 포함한 각 20 μL 반응산물은 Applied Biosystems 7500 (Thermo, USA) 장비에서 95°C에서 10 min 반응 후 95°C 10 sec, 52°C 15 sec, 72°C에서 15 sec를 40회 반복하였다. 모든 샘플은 두 번 반복하였으며, 2-ΔCt 방법에 따라 데이터는 분석하였다.

<Table 1> List of primers used for mRNA expression analysis in walleye pollock

Primer name	Sequence (5' →3')	Remarks
HSP70 F	CAACGTGACAAGGTTTCCTC	RT-PCR
HSP70 R	TATCTTCACTAGTTGCTGGG	
GR F	CTCGTCATCAACGAAGAGAG	
GR R	TAGTTTACAGTCGAAGGCG	
StAR F	TAGATCTCAAGGCTGGATC	
StAR R	GCTAGAGCTGTTTGGTGCAA	
18s rRNA F	GTTCCCTTTGATCGCTCACCC	qRT-PCR
18s rRNA R	CGATCGGCCCAAGGTTATCT	
HSP70 F	ATCGTCACCAAGCTGTACCA	
HSP70 R	TATCTTCACTAGTTGCTGGG	
GR F	CTGCTGCAGATCTGCTTCTA	
GR R	TAGTTTACAGTCGAAGGCG	
StAR F	TAGATCTCAAGGCTGGATC	
StAR R	CTTGTAGTCATGCAGCCGTT	
18S rRNA F	GCTCACCCGCTACTTGGATA	
18S rRNA R	CGGCCCAAGGTTATCTAGAG	

4. 통계분석

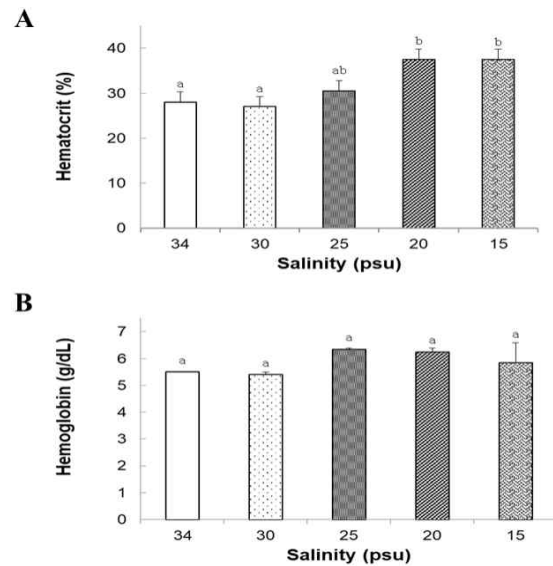
결과값은 평균과 표준편차(mean ± SD)로 나타내었으며, 실험구별 유의차는 SPSS프로그램(version

10.0; SPSS Inc., USA)에 의한 ANOVA test를 실시하여 Duncan's multiple range test로 평균 간의 유의성(P<0.05)을 검정하였고, qRT-PCR은 Kruskal-Wallis test를 실시하여 Duncan's multiple range test로 평균 간의 유의성(P<0.05)을 검정하였다.

III. 연구 결과

1. Hematocrit (Ht) 및 Hemoglobin (Hb)

사육수의 염분 변화에 따른 Ht와 Hb 변화를 [Fig. 1]에 나타내었다. 34 psu에서의 Ht 값은 28 ± 2%로 30 psu에서 27 ± 1%와 큰 차이를 보이지 않았으나, 20과 15 psu에서는 37.5 ± 2.5%로 사육수의 염분이 낮아질수록 Ht 값은 점차 증가하는 경향이 나타났다([Fig. 1A]).



[Fig. 1] Levels of A: Ht, and B: Hb in plasma of walleye pollocks exposed to different salinity. Values are presented as the mean ± standard deviation (n = 3). Each experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant differences (p < 0.05).

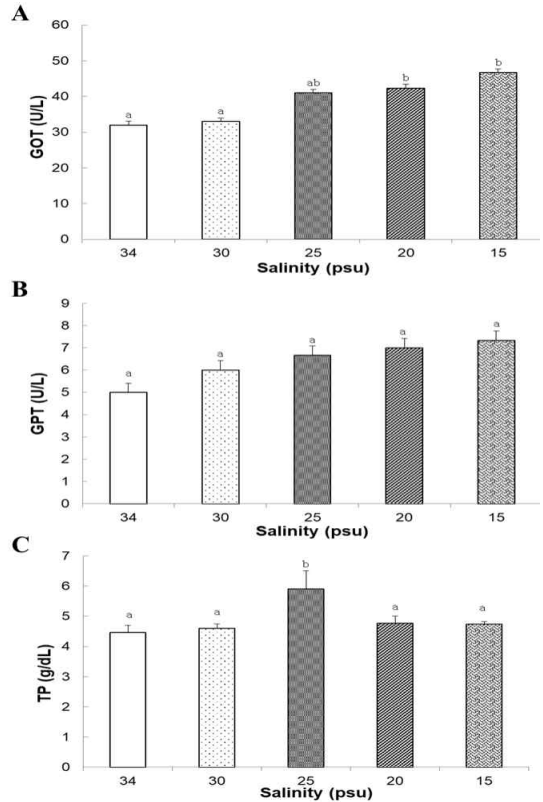
Hb은 34 psu에서 5.5 ± 0.0 g/dL, 25 psu에서 6.35 ± 0.05 g/dL로 증가하는 경향을 보였고, 15 psu에서는 5.85 ± 0.75 g/dL로 낮아지는 수치를 보였으나 통계적으로 유의차는 나타나지 않았다 ([Fig. 1B]).

2. GOT, GPT 및 TP

GOT 농도는 34 psu에서 32.0 ± 0.58 U/L로 가장 낮았고, 20 psu와 15 psu에서는 각각 42.3 ± 2.60 U/L와 46.7 ± 2.19 U/L로 나타났으며, 염분이 낮아지면 혈액 내 GOT 농도는 증가하는 경향을 보였다([Fig. 2A]). GPT 농도는 34 psu에서 5.0 ± 0.00 U/L였고, 15 psu에서는 7.3 ± 1.20 U/L로 나타나 사육수의 염분이 낮아질수록 점차 증가하는 경향을 보였지만 염분 농도에 따른 유의차는 나타나지 않았다([Fig. 2B]). TP는 25 psu에서 5.9 ± 0.61 g/dL로 가장 높은 농도가 나타났고, 34 psu는 4.46 ± 0.23 g/dL이고 15 psu에서 4.73 ± 0.09 g/dL로 나타났다([Fig. 2C]).

3. Cortisol, Glucose 및 SOD 활성

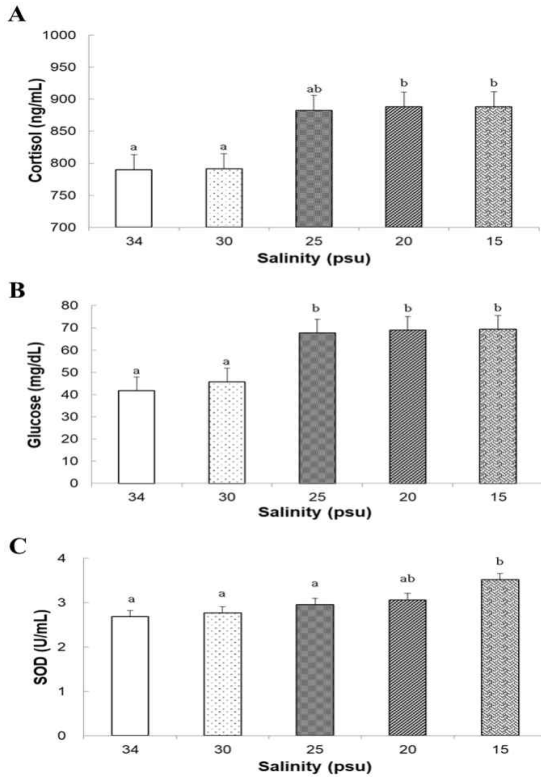
혈장 cortisol, glucose 농도 및 SOD 활성은 [Fig. 3]에 나타내었다. Cortisol 농도는 34 psu에서 790.00 ± 38.39 ng/mL로 가장 낮았으며, 25 psu에서 882.73 ± 32.73 ng/mL로 급격히 증가하며 15 psu에서 888.08 ± 22.84 ng/mL로 가장 높은 농도를 보였다([Fig. 3A]). Glucose 농도는 34 psu에서 41.67 ± 1.2 ng/dL로 가장 낮았으며, 25 psu에서 67.67 ± 11.6 ng/dL로 증가하였고, 15 psu에서 69.34 ± 4.98 ng/dL로 가장 높은 농도가 나타났다 ([Fig. 3B]). 염분 변화에 따른 명태의 SOD 활성은 34 psu에서 2.68 ± 0.14 U/mL로 가장 낮았으며, 염분이 낮아질수록 증가하는 경향을 보여 15 psu에서 3.51 ± 0.13 U/mL로 가장 높게 나타났다 ([Fig. 3C]).



[Fig. 2] Levels of A: GOT, B: GPT, and C: TP in plasma of walleye pollocks exposed to different salinity. Values are presented as the mean \pm standard deviation (n = 3). Each experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant differences (p < 0.05).

4. StAR, GR 및 HSP70 mRNA 발현

염분 변화에 따른 StAR, GR 및 HSP70 mRNA의 상대적 발현은 [Fig. 4]에 나타냈다. 명태의 두신과 간에서 StAR mRNA 발현은 사육수의 염분이 낮아질수록 증가하였다([Fig. 4A와 B]). 두신의 StAR mRNA 발현은 15 psu에서 4.08 ± 0.11 로 가장 높게 나타났으며, 간에서는 20 psu에서 0.12 ± 0.11 로 가장 높게 나타났다. 명태의 두신과 간에서 GR mRNA 발현은 염분이 낮아질수록 감소하는 경향을 보였다([Fig. 4C와 D]) 두신에서의 GR



[Fig. 3] Levels of A: Cortisol, B: Glucose, and C: SOD in plasma of walleye pollocks exposed to different salinity. Values are presented as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Each experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

mRNA 발현은 34 psu에서 0.4 ± 0.00 로 가장 높았으며, 15 psu에서 0.21 ± 0.01 로 가장 낮았다. 간에서 GR mRNA 발현 또한 34 psu에서 0.42 ± 0.01 로 가장 높았으며 15 psu에서 0.22 ± 0.00 로 가장 낮은 발현을 나타냈다. 명태의 두신과 간에서 HSP70 mRNA의 발현 변화는 염분이 낮아질수록 증가하였다([Fig. 4E와 F]). 두신과 간은 34 psu에서 각각 56.77 ± 1.29 와 34.89 ± 1.33 으로 가장 낮은 발현을 보였으며, 15 psu에서 두신은 126.96 ± 4.63 이고, 간은 76.21 ± 2.65 으로 가장 높은 mRNA 발현을 나타냈다.

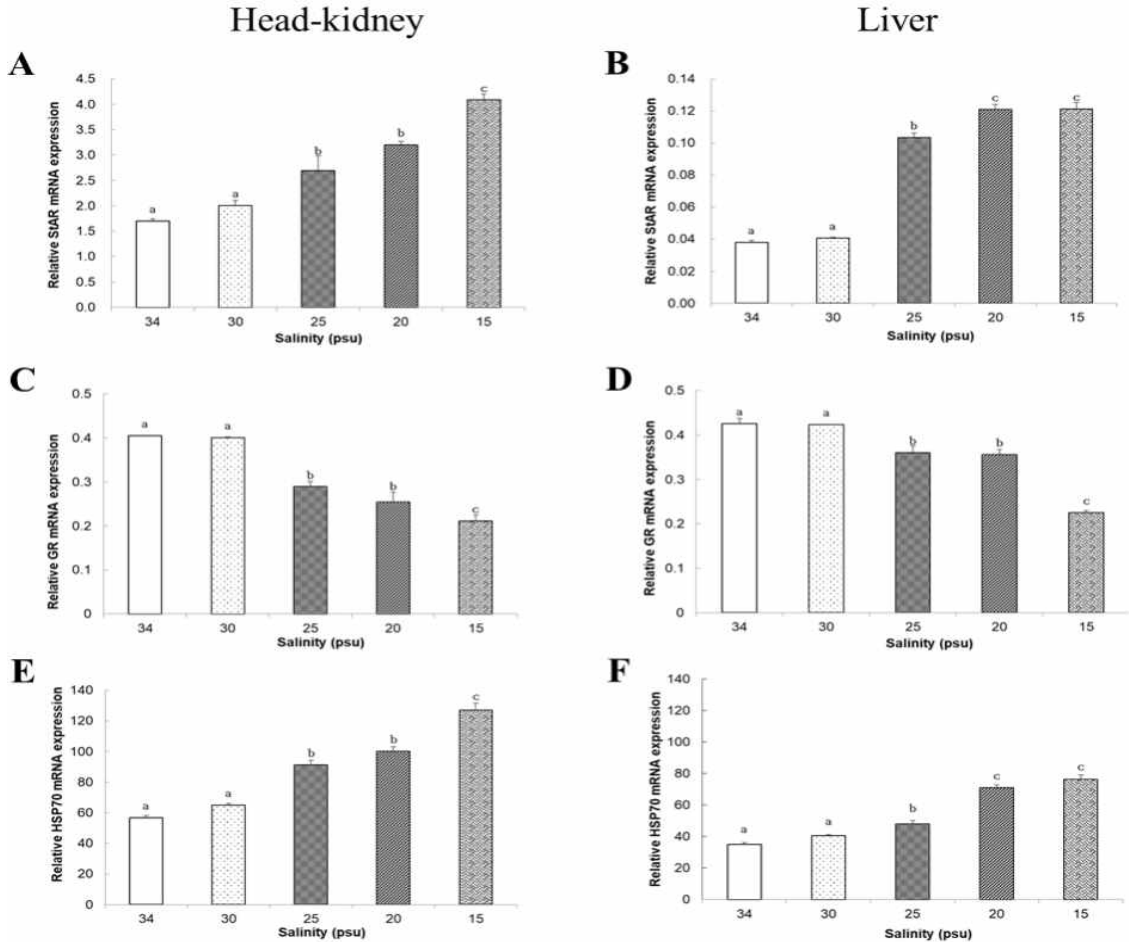
IV. 고찰

본 연구는 염분 스트레스에 따른 명태의 생리적 변화를 이해하기 위해서 혈액 내의 스트레스 지표들과 관련 유전자들의 mRNA 발현 수준을 조사하였다.

일반적으로 Ht와 Hb는 생체 내 산소 운반능력을 나타내는 생리학적 반응을 나타내는 지표로 알려져 있으며, 이전 연구들은 염분, 수온, 수질 오염 등 다양한 스트레스 환경에서 혈액 내 Ht와 Hb의 변화를 보고하였다(Houston, 1997; Hosseini et al., 2011; Park and Min, 2018). 본 연구에서 Ht 값은 20 psu에서 유의하게 증가하였는데, 혈액에서 적혈구의 비율을 나타내는 Ht 값의 증가는 혈액 내 혈당 증가를 의미한다. 따라서 명태는 20 psu 이하의 염분에 노출이 되면 혈당이 증가하고 혈액 내 적혈구 비율이 증가하는 것으로 보인다. Hb의 농도는 염분이 낮아지면 증가하는 경향이 보였으나, 단기간의 염분 스트레스에 노출 시 급격한 변화는 없었다.

GOT와 GPT는 간 기능 및 간 손상의 지표로 고려되며 주로 척추동물의 간세포에 존재하고 어류에서는 간과 비장 세포에 많이 분포하고 있다(Kang et al., 2007). GOT와 GPT 같은 아미노기전이효소는 정상적인 상태에서는 세포 내에 존재하지만 스트레스 환경에 노출이 되면 세포 내의 효소를 방출하여 혈액 내 농도가 증가한다고 알려져 있다(Smith and Romas, 1980). 본 연구에서 GOT는 20 psu에서 유의적인 차이를 보이며 증가하였다. GPT 또한 염분이 낮아질수록 증가하는 경향을 보였으나 유의차는 나타나지 않았다. 이러한 결과는, 낮은 염분에 노출된 조피볼락(*Sebastes schlegli*)과 염분 농도에 따른 굴(*Crassostrea gigas*)에서 혈장 GOT의 농도 증가를 보고한 이전 연구들과 비슷한 결과를 나타내었다(Wickes and Morgan, 1976; Oh et al., 2014).

Byrne et al. (1989)의 보고에 의하면 경골어류



[Fig. 4] StAR, GR, and HSP70 mRNA expression levels in walleye pollock based on water salinity. A: StAR in head-kidney, B: StAR in liver, C: GR in head-kidney, D: GR in liver, E: HSP70 in head-kidney, and F: HSP70 in liver. For walleye pollocks exposed to different salinity, samples were collected from the head-kidney and liver tissues. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$). Data are presented as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Each experiment was performed in triplicate.

에서 TP는 간 손상의 지표로 알려져 있다. 본 연구에서 TP 농도는 25 psu에서 증가 후 다시 감소하였는데, 염분 스트레스에 의해 TP 농도는 증가하지만, 염분 농도가 더 낮아지면 간 기능의 저하로 에너지 생성이 감소하고 스트레스에 저항 능력이 감소하는 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서 명태는 25 psu 이하의 염분에서는 간 기능 장애를 나타낼 수 있는 가능성을 시사한다.

Cortisol과 glucose는 어류의 대표적인 스트레스 지표이다(Barton et al., 1986; Barton and Iwama, 1991). 본 연구에서 명태의 혈장 cortisol 농도는 염분이 낮아질수록 증가하는 경향을 보여주며, 25 psu에서부터 유의차가 나타났다. Glucose도 cortisol과 함께 증가하였는데 25 psu에서 15 psu까지 비슷한 수준을 유지한다. Choi et al. (2006)에 따르면 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*)을 10

psu의 저염분에 24시간 노출시켰을 때 glucose 농도가 유의적으로 증가했다는 연구 결과를 보고하였으며, 넙치(*Paralichthys olivaceus*)와 조피볼락(*S. schlegeli*) 등에서도 본 연구 결과와 비슷한 경향을 보여주었다(Chang et al., 2002; Min et al., 2014). 이러한 결과는, 명태가 염분 스트레스에 노출이 되면 혈액 내 catecholamine과 corticosteroid의 빠른 교환이 나타나 cortisol 농도를 증가시키며, 간에서 gluconeogenesis가 어려워지고 혈액 내 glucose 농도는 증가하는 것으로 보인다(Cowey and Walton, 1989).

본 연구에서 SOD 활성은 사육수의 염분이 낮아질수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 15 psu에서 가장 높은 활성이 나타났다. 염분 스트레스에 따라 생성되는 활성산소를 제거하기 위해 SOD 활성을 증가하여 항상성을 유지하는 것으로 보인다. 이전 연구에서 병어(*Pampus argenteus*)는 낮은 염분에서 노출 시간이 증가함에 따라 SOD 활성이 증가하였으며(Fei et al., 2011), 철갑상어(*Acipenser naccarii*)를 담수에 20일간 노출시켰을 때 SOD 활성이 증가했다는 연구가 보고되었다(Álvarez et al., 2002).

StAR 단백질은 스테로이드 생성 속도를 조절하므로, StAR 단백질의 발현량으로 인해 스테로이드 호르몬 합성이 영향을 받는다(Stocco, 2000). 본 연구에서 StAR mRNA 발현은 염분이 낮아질수록 증가하였으며, 25 psu에서부터 발현량이 급격히 증가했다. Juan et al. (2008)의 연구에 의하면, 귀족돔(*Gilthead seabream*)의 경우 만성 스트레스에서 StAR의 발현이 cortisol과 함께 증가함을 보고하였다. 반면에 본 연구에서 GR mRNA의 발현은 염분이 낮아질수록 감소하였으며 25 psu에서부터 유의차를 보였다. 이러한 결과는 cortisol을 처리한 무지개송어에서 cortisol이 증가함에 따라 GR mRNA의 발현이 감소한다고 (Mathilakath et al., 2003; Park et al., 2011) 보고한 이전 연구 결과와 유사한 경향을 나타낸다.

HSP70은 다양한 환경 스트레스에 노출이 되면

높은 발현을 나타내어 세포 방어, 형태 변형 및 분자 chperone으로 단백질의 refolding에 관여한다 (Basu et al., 2002). 본 연구에서 HSP70 mRNA 발현은 염분이 낮아질수록 증가하며, 15 psu에서 가장 높은 발현을 나타냈다. 염분 스트레스에 대한 HSP70의 연구들은, 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 참돔치(*Mytilus coruscus*) 및 오만둥이(*Styela plicate*)에서 염분 변화에 따라 HSP70 mRNA의 발현이 증가하였음을 나타냈으며, 다양한 수산생물에서 HSP70에 대한 연구들이 보고되어져 왔다 (Hosseini et al., 2011; Pineda et al., 2012; Kim and Kang, 2015).

결론적으로 염분 변화에 따른 스트레스 지표들을 종합해 보면 명태는 30 psu까지 염분에서는 생리적으로 안정한 상태로 보이며, 25 psu 이하의 염분에서 Ht, cortisol, glucose, SOD 및 GOT의 변화가 나타났고, StAR, GR 및 HSP70 mRNA의 발현에서도 유의적인 차이가 나타남에 따라 일정 수준 이하의 염분은 명태에게 스트레스 요인으로 작용하는 것으로 보인다. 그러나 본 실험에서는 염분 스트레스에 따른 폐사는 발생하지 않았으며 각 염분 농도에서 24시간 노출 후의 생리적 반응에 대한 조사를 하였기 때문에 급성 염분 변화에 대해서 15 psu까지는 항상성을 유지하는 것으로 보인다. 장기간의 만성적 염분 스트레스 및 자치어 단계를 포함한 성장 단계에 따른 염분 스트레스에 대한 생리적 반응에 대한 연구는 아직까지 이루어지지 않았으며 향후 안정적인 명태 사육을 위해서는 염분 농도에 따른 더 세분화 된 연구가 필요할 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구 결과는 염분의 영향에 따른 명태의 생리적 반응 및 분자생물학적으로 염분 스트레스를 이해하는데 기초 자료로 활용될 것이라 기대한다.

References

Alderdice DF and Forrester CR(1971). Effects of Salinity, Temperature, and Dissolved Oxygen on

- Early Development of the Pacific Cod (*Gadus macrocephalus*). J Fish Res Board Can 28, 883~902.
<https://doi.org/10.1139/f71-130>
- Álvarez RMM, Hidalgo MC, Domezain A, Morales AE, Gallego MG and Sanz A(2002). Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. Journal of Experimental Biology 205(23), 3699~3706.
<https://doi.org/10.1242/jeb.205.23.3699>
- Bakkala RG(1993). Structure and Historical Changes in the Ground Fish Complex of the Eastern Bering Sea; NOAA Technical Report NMFS: Miami, FL, USA; U.S. Department of Commerce: Washington, DC, USA.
- Bansal M, Kaushal N(2014). Oxidative Stress Mechanisms and Their Modulation, 1st ed.; Springer: New Delhi, India, 1~166.
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-2032-9>
- Barton BA, Schreck CB and Sigismundi LA(1986). Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile Chinook salmon. Transactions of the American Fisheries Society 115, 245~251.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1986\)115<245:MA DECP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1986)115<245:MA DECP>2.0.CO;2)
- Barton BA and Iwama GK(1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu Rev Fish Dis 1, 3~26.
[https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Basu A, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM and Iwama GK(2002) Heat shock protein genes and their functional significance in fish. Gene 295(2), 173~183.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00687-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00687-X)
- Bervoets L, Verheyen R and Blust R(1996). Uptake of zinc by the midge larvae *Chironomus riparius* at different salinities: Role of speciation acclimation, and calcium. Environ Toxicol Chem 15(8), 1423~1428.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620150823>
- Byrne P, Speare DJ and Ferguson HW(1989). Effects of cationic detergent on the gills and blood chemistry of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Diseases of Aquatic Organisms 6, 195~196.
- Chang YJ, Min BH, Chang and Hur JW(2002). Comparison of blood physiology in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) cultured in converted freshwater from seawater and seawater from freshwater. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 35(6), 595~600.
<https://doi.org/10.5657/kfas.2002.35.6.595>
- Choi J, Lee KI, Han GS, Byun SG, Lim HJ and Kim HS(2020). Influence of Salinity on Hatching Rate of Fertilization Eggs and Larval Survival of Walleye Pollock *Gadus chalcogrammus*. JFMSE, 32(3), 725~731.
<http://doi.org/10.13000/JFMSE.2020.6.32.3.725>
- Choi CY, Min BH, Kim NN, Cho SH and Chang YJ(2006). Expression of HSP90, HSP70 mRNA and change of plasma cortisol and glucose during water temperature rising in freshwater adapted black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 19(4), 315~322.
- Clark BJ, Wells J, King SR and Stocco DM(1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). Journal of Biological Chemistry 269(45), 28314~28322.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)46930-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)46930-X)
- Cowey CB and Walton M(1989). Intermediary metabolism. In Fish Nutrition; Halver, J.E., Ed.; Academic press: New York, NY, USA, pp. 259~329.
- Davis KB and Parker NC(1990). Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. Aquaculture 91(3-4), 349~358.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90199-W](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90199-W)
- Evans TG and Kültz(2020). The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations. J Exp Zool 333(6), 421~435.
<https://doi.org/10.1002/jez.2350>
- FAO(2021). Global Fishery and Aquaculture Production. Available online at:
<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>
- Fei Y, Shiming P, Peng S and Zhaohong S(2011). Effects of low salinity on antioxidant enzymes activities in kidney and muscle of juvenile silver pomfret *Pampus argenteus*. Acta Ecologica Sinica 31(1), 55~60.
<https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2010.11.009>

- Heitzer MD, Wolf IM, Sanchez ER, Witchel SF and DeFranco DB(2007). Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord* 8(4), 321~330.
<https://doi.org/10.1007/s11154-007-9059-8>
- Hiatt T, Dalton M, Felthoven R, Fissel B, Garber-Yonts B, Haynie A, Kasperski S, Lew D, Package C, Sepez J and Seung C(2010). Economic Status of the Ground Evaluation Report for the Groundfish Fisheries of the Gulf of Alaska and Bering Sea/Aleutian Islands Area, 254p.
- Hosseini P, Vahabzade H, Bourani MS and Kazemi R.(2011). The effects of salinity stress on hematocrit and hemoglobin in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Conference on Medical, Biological and Pharmaceutical Sciences (ICMBP'2011).
- Houston AH(1997). Review: Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? *Transactions of the American Fisheries Society* 126, 879-894.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1997\)126<0879RA TCHV>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1997)126<0879RA TCHV>2.3.CO;2)
- Juan C, Barbara C, Laura A, Josep V, Frederic WG, Simon M and Liuis T(2008). Stress-induced regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression in head kidney of Gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Endocrinology* 196(2), 313~322.
<https://doi.org/10.1677/JOE-07-0440>
- Kang DY, Kang HW, Kim GH, Jo KC and Kim HC(2007). Effect of cold shock on the physiological response of the cultured mullet, *Mugil haematocheilus* in winter. *Korean J Fish Soc* 40, 226~233.
<https://doi.org/10.5657/kfas.2007.40.4.226>
- Kim CW and Kang HS(2015). The expression of Hsp70 and GST genes in *Mytilus coruscus* exposed to water temperature and salinity. *Korean J Environ Biol* 33(4):450~458.
<https://doi.org/10.11626/KJEB.2015.33.4.450>
- Krug RG, Poshusta TL, Skuster KJ, Berg MR, Gardner SL and Clark K(2014). A transgenic zebrafish model for monitoring glucocorticoid receptor activity. *Genes Brain Behav* 13(5), 478~487.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12135>
- Lee Y, Kim D(2010). Measuring surface water temperature effects on the walleye Pollock fishery production using a Translog cost function approach. *Environ. Resour Econ Rev* 19(4), 897~916.
- Lim H, Kim Y, Son M, Kim K, Jeong M and Chang Y(2012). Quality characteristics of starry flounder *Platichthys stellatus* meat reared in different salinity. *J Fish Mar Sci Edu* 24(2), 324~332.
<http://dx.doi.org/10.13000/JFMSE.2012.24.2.324>
- Mathilakath MV, Stavroula R and Ramesh S(2003). Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 256~263.
[https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00092-3](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00092-3)
- Martínez-Álvarez RM, Morales AE and Sanz A(2005). Antioxidant defences in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fisher* 15(1-2), 75~88
<https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- Min BH, Park MS, Shin YK, Do YH and Myeong JI(2014). Physiological responses in Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*) exposed to ammonia. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 32(4), 344~352.
<https://doi.org/10.11626/KJEB.2014.32.4.344>
- Nakano T, Kameda M, Shoji Y, Hayashi S, Yamaguchi T and Sato M(2014). Effect of sever environmental thermal stress on redox state in salmon. *Redox Biol* 2, 772~776.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.007>
- Nakatani T and Maeda T(1984). Thermal effect on the development of walleye pollock eggs and their upward speed to the surface. *Bull Japan Soc Sci Fish* 50(6), 937~942.
<https://doi.org/10.2331/suisan.50.937>
- Oh SY, Kim CK, Jang YS, Choi HJ and Myoung JG(2014). Effect of salinity on survival, oxygen consumption and blood physiology of Korean rockfish *Sebastes schlegelii*. *Ocean and Polar Research* 36(2), 135~143.
<https://doi.org/10.4217/OPR.2014.36.2.135>
- Pacheco M and Santos MA(2001). Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla Anguilla L.* to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ Saf* 49, 64~75.

- <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2025>
 Park HJ and Min BH(2018). Stress Responses of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) to Salinity Changes. Korean Journal of Ichthyology 30(1), 1~8.
- Park YC, Kang YJ, Jeon HJ, Han KN, Baek JM, Lee WO, Kim JH(2011). Noise-induced Stress Response on Cortisol, Glucose, albumin and Glucocorticoid Receptor Expression in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Korean Journal of Environment and Ecology 25(6), 853~860.
- Pineda MC, Turon X and Legentil SL(2012). Stress levels over time in the introduced ascidian *Styela plicata*: the effects of temperature and salinity variations on Hsp70 gene expression. Cell Stress Chaperones 17, 435~444.
<https://doi.org/10.1007/s12192-012-0321-y>
- Podrabsky JE and Somero GN(2004). Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. J Exp Biol 207(13), 2237~2254.
<https://doi.org/10.1242/jeb.01016>
- Samaras A, Papandroulakis N, Lika K and Pavlidis M.(2018) Water temperature modifies the acute stress response of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (1758). J Therm Biol 78, 84~91.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.09.006>
- Shin MK, Park HR, Yeo WJ and Han KN(2018). Effects of Thermal Stress on the mRNA Expression of SOD, HSP90, and HSP70 in the Spotted Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*) Ocean Sci. J 53(1), 43~52.
<https://doi.org/10.1007/s12601-018-0001-7>
- Smith AC and Romos F(1980). Automated chemical analysis in fish health assessment. Journal of Fish Biology 17(4), 445~450.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02777.x>
- Somero GN(2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers.’ J Exp Biol 213(6), 912~920.
<https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Stocco DM(2000). The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. Journal of Endocrinology. 164(3), 247~253.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1640247>
- Wang YJ, Wu Z, Sheng XM and Tang HF(2005). Effect of beta-cypermethrin on GPT and GOT activities of crucian serum. Agr. Sci. Technol. 6, 20~23.
- Wickes MA and Morgan RP(1976). Effects of salinity on three enzymes involved in amino acid metabolism from the American oyster, *Crassostrea virginica*. Comparative Biochemistry and Physiology B 53(3), 339~343.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(76\)90338-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(76)90338-2)

-
- Received : 29 September, 2022
 - Revised : 17 November, 2022
 - Accepted : 24 November, 2022