

# *Strongylocentrotus nudus* 성계에서 빈산소에 의한 배 발생률 및 수정률에 관한 연구

이건섭<sup>1</sup>, 황진익<sup>1</sup>, 정영재<sup>2</sup>, 김동균<sup>3</sup>, 모상현<sup>4</sup>, 이택건<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국해양연구원

<sup>2</sup>신경대학교 생명공학과

<sup>3</sup>신라대학교 생물학과

<sup>4</sup>바이오에프디앤씨 항노화연구소

\*e-mail: tklee@kordi.re.kr

## Study of Fertilization and Developmental Rates by Hypoxia condition in *Strongylocentrotus nudus*

Gunsup Lee<sup>1</sup>, Jinik Hwang<sup>1</sup>, Youngjae Chung<sup>2</sup>, Donggiun Kim<sup>3</sup>, Sang Hyun  
Moh<sup>4</sup>, Taek-Kyun Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>South Sea Environment Research Department, Korea Ocean Research and  
Development Institute

<sup>2</sup>Department of Life Science and Biotechnology, Shin Gyeong University

<sup>3</sup>Department of Biological Science, Silla University

<sup>4</sup>Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd.

### 요 약

본 연구는 빈산소에 의한 동근 성계 (*Strongylocentrotus nudus*) 수정란의 수정률 및 발생률에 관한 연구이다. 대조군 (normoxia)과 실험군 (hypoxia) 으로 나누어 수정률과 발생률의 변화를 관찰 하였으며 또한 gonad 세포의 유전자 발현의 차이를 봄으로써 스트레스 관련 유전자와 항산화 관련 유전자의 변화를 확인 할 수 있었다. 결과적으로 수정률에서는 큰 차이를 확인 할 수 없었던데 반해 발생률에 있어서 빈산소의 경우 전혀 발생이 진행되지 않는 것을 확인 할 수 있었으며 또한 빈산소에 노출된 gonad 세포의 경우도 스트레스 또는 항산화 유전자가 많이 발현 되는 것을 관찰 할 수 있었다. 앞의 실험을 토대로 빈산소 환경에서 유전자 발현량의 차이를 더욱더 수행함으로써 빈산소 상태에 따른 죽음의 바다의 증가 얼마나 위험한 것인지 더욱더 관찰 할 수 있을 것이다.

### 1. 서론

Hypoxia (oxygen depletion)는 DO (dissolved oxygen) 수치가 2.8 mg O<sub>2</sub>/L이하로 줄어든 해양 환경에서의 현상을 말한다. 산소가 고갈돼 생물이 살아가기 힘든 환경인 hypoxia zone은 1960년대 이래로 지속적으로 증가하고 있으며 전체면적은 245,000 square kilometer에 이른다 (Diaz and Rosenberg 2008). Raquel Vaquer-sunyer과 Carlos M. Duarte는 2008년 논문에서 Hypoxia zone이 해마다 5.54% 이상 증가한다는 것을 보고하였으며 대부분의 hypoxia zone이 근해에서 이루어지고 해변 생태계를 심각하게 변화 시키고 있다고 보고하고 있다. 또한 이 논문에서는 어류, 극피동물, 갑각류, 연체동물,

자포동물 등에서 여러 실험 논문을 토대로 hypoxia 상태에서의 평균 50%가 죽는 lethal time으로 116시간이 소요 되는 것을 보고 하였으며 극심한 생태계 파괴의 주요 요인으로 생각된다 (Vaquer-Sunyer and Duarte 2008).

본 과제에서는 빈산소에 의한 발생학적인 단계에서의 배 발생률 및 gonad 세포에서의 HSP70의 유전자 와 glutathione reductase 발현양상을 확인함으로써 산소가 고갈된 빈산소 해역이 얼마나 많은 생태계를 위협하는지 확인해 보았다.

빈 산소에 의한 생물 반응 연구는 대부분 연구 대상 생물이 포유류에 한정되어 있다. 성계에 대한 빈 산소 상태에서의 연구는 거의 이루어져 있지 않으며 따라서 성계 배 발생에서부터 gonad 세포에 대

한 연구 더 나아가 빈 산소에 의한 유전자발현 차이에 대한 연구는 충분히 가치가 있을 것으로 판단된다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 성게배양

실험에 사용한 둥근성게 (*Strongylocentrotus nudus*) 성체는 산란기에 경남 거제 연안에서 직접 채집하여 한국해양연구원 남해연구소 양식동의 수조에서 다시마를 먹이로 하여 배양하였다.

### 2.2. 정자 및 알 추출 방법

산란기에 있는 성게 수컷에 1 N KCl 용액으로 자극을 주어 정자를 추출했다. 성게를 수조에서 꺼낸 후 입을 위로하고 입 주위의 막을 주사기로 찢어 KCl 용액을 주입하고 기다려 항문 주위 생식공에서 나오는 우유빛의 정자를 파스퇴르 피펫으로 조심스럽게 뽑아 사용했다. 정자의 추출과 마찬가지로 성게 암컷에 1 N KCl을 주입하고 해수가 담긴 비커에 거꾸로 올려놓고 생식공에서 방출하는 주황색 알을 모았다. 약 30분 동안 알을 모은 후 알 사이의 점액질 제거를 위해 알을 세척하여 사용하였다.

### 2.3. 수정률 실험

빈산소에 정자를 노출시킨 후 알을 주입하여 정자와 알이 만나 수정이 이루어지도록 20분정도 기다린 후 포르말린 용액을 주입하여 수정을 중단시킨 후 수정률을 측정했다. 수정률은 알의 바깥쪽에 수정막이 형성되어 있는지 여부를 관찰하여 수정란과 미수정란으로 구분하였다.

### 2.4. 초기 배 발생 실험

추출한 알에 정자 원액을 처리하여 체외 수정시킨 후 사용하였다. 약 10분 후 일부의 수정률을 측정하여 95% 이상의 알이 수정에 성공했을 때 빈 산소노출용 수정란으로 사용했으며 수정란은 200 cell/ml 정도의 적정밀도로 희석하였다. 수정이 시작되면 발생이 계속 진행되므로 빈 산소에 노출시켜 발생률을 측정했다. 발생률은 플루테우스 유생으로 발생이 진행된 정상유생과 비정상 유생으로 구분했으며 비정상 유생은 발생이 멈추거나 지연되어 포배기 혹은 낭배기까지 발생된

경우 등을 모두 포함하였다.

## 2.5 Western blot

산란기의 성게 성체를 빈 산소에 72시간 동안 노출시킨 후 성게 생식소 (gonad cell)를 채집 하였다. 성게의 생식소는 노출 후 성게 성체를 반으로 잘라 spatula를 사용해서 분리하였다. 분리 한 생식소는 protein extract solution (Intron)을 사용해서 단백질을 추출 하였다. 추출한 단백질은 nano drop를 사용해서 정량하였다. 추출한 단백질은 SDS-PAGE에 전기영동 한 후 stacking gel을 제거했다. 이후 3 M paper와 SDS-PAGE gel을 cassette에 조립한 후 transfer 한다. transfer가 끝나면 TBS로 3 M paper를 15분간 2회 세척한 후 5% skip milk에 30분 동안 담가둔다. 이후 TBS로 다시 2회간 세척하고 primary antibody (heat shock protein 70)와 secondary antibody (mouse-IgG)에 1시간 동안 담가둔다. 3 M paper의 단백질은 형광물질 ECL solution을 사용하여 flim으로 확인 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 빈 산소에 의한 성게에서의 수정률 비교

용존산소농도 2 ppm 이하의 해수에 20분 동안 노출된 정자를 이용하여 난자에 첨가한 후 수정률을 비교하였다. 빈 산소를 처리하지 않은 즉 일반 해수를 처리한 그룹을 대조군으로 하여 5번 반복 실험하였으며 빈산소를 처리한 실험군 또한 5번 반복 실험을 통하여 결과를 확인하였다 (표 1). 대조군의 경우 평균적으로 97.85%의 높은 수정률을 확인하였으며 실험군에서 또한 95.68%의 비교적 높은 수정률을 확인할 수 있었다. 따라서 빈 산소에 의해 수정률의 변화는 크게 확인 할 수 없었다.

[표 1] 빈 산소에 의한 대조군과 실험군의 수정률 확인 비교

	대조군 1	대조군 2	대조군 3	대조군 4	대조군 5	TOTAL
수정	162/164	154/157	181/187	176/178	147/151	
미수정	2/164	3/157	6/187	2/178	4/151	
평균	98.78	97.45	96.79	98.88	97.35	97.85
	실험군 1	실험군 2	실험군 3	실험군 4	실험군 5	TOTAL
수정	164/168	157/164	154/163	136/144	149/155	
미수정	4/168	7/164	9/163	8/144	6/155	
평균	97.62	95.73	94.48	94.44	96.13	95.68

3.2 빈 산소에 의한 성계에서의 발생률의 비교

추출한 알에 성계 정자를 이용하여 체외 수정을 실시하였으며 일반 해수에서 처리한 대조군과 빈 산소를 처리한 실험군으로 나누어 실험을 수행하였다. 각 100개 이상의 난자를 이용하여 실험을 수행하였으며 3반복을 수행하였다. 수정 후 15 hr 경과 후 배발생 단계에서 blastula 단계에 도달한 그룹을 이용하여 각각의 발생량을 확인한 결과에서는 수정된 모든 개체에서 모두 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 수정 후 48 시간 경과 후 prism 단계에서의 배 발생률에서는 큰 차이를 확인할 수 있었다. 대조군 3반복 모두에서 수정이 된 수정란의 경우는 모두 배 발생이 완료된 것을 확인할 수 있었으며 상대적으로 빈 산소 처리 그룹에서는 모두 prism 상태로 발생이 되지 않는 것을 확인할 수 있었다 (표 2). 현미경을 통한 관찰에서도 위와 같은 사실을 확인할 수 있었다 (그림 1).

결론적으로 초기 배 발생 단계에서는 빈 산소에 의해 성계에서 거의 영향이 없는 것에 반해 후기 배 발생 단계에서는 극과 극의 영향력이 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[표 2] 빈 산소에 의한 대조군과 실험군의 발생률 비교

A. Blastula 단계에서의 발생률 비교 (수정 후 15 hr)			
	대조군 1	대조군 2	대조군 3
BLASTULA	100/100	161/161	167/167
BLASTULA ( X )	0	0	0
평균	100.00	100.00	100.00

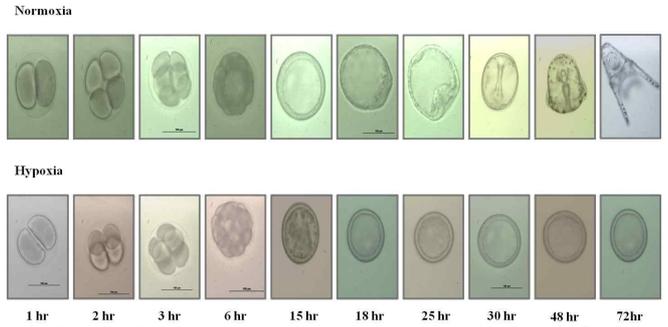
실험군			
	실험군 1	실험군 2	실험군 3
BLASTULA	124/124	196/196	147/147
BLASTULA ( X )	0	0	0
평균	100.00	100.00	100.00

B. Prism 단계에서의 발생률 비교 (수정 후 48 hr)			
	대조군 1	대조군 2	대조군 3
prism	108/108	121/121	136/136
prism ( X )	0/108	0/121	0/136
평균	100.00	100.00	100.00

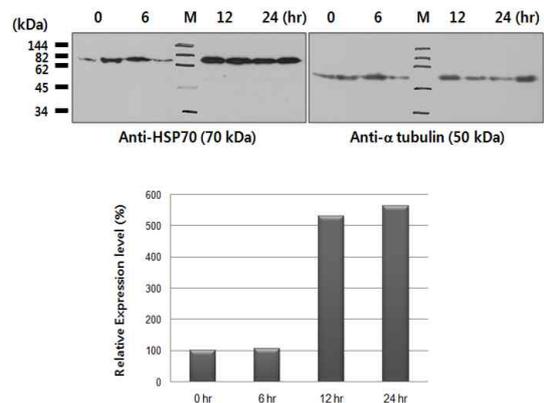
실험군			
	실험군 1	실험군 2	실험군 3
prism	0/162	0/178	0/121
prism ( X )	162/162	178/178	121/121
평균	0.00	0.00	0.00



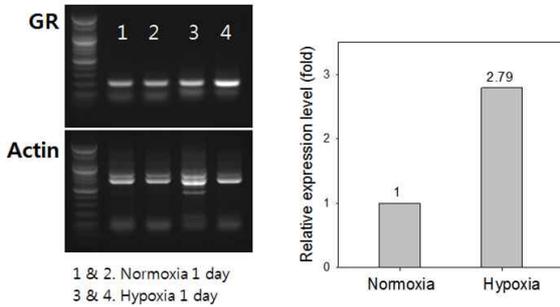
[그림 1] 빈산소 상태에서의 성계 배발생 단계의 확인

3.3 빈산소에 노출된 성계 gonad에서 HSP70 단백질 발현과 glutathione reductase 양의 변화 분석

빈 산소에 노출 될 경우 가장 빈번한 유전자의 발현량 차이를 보일 것으로 예상되어지는 HSP70 유전자와 항산화 효소인 glutathione reductase 발현 차이를 확인해 보았다. HSP70의 경우 빈산소를 처리하였을 때 0 시간과 비교하여 12시간째에 약 5.32배가 증가하는 현상을 확인 하였으며 24시간째에도 5.64배가 증가하는 현상을 western blot analysis와 상대적인 발현량 비교로 확인할 수 있었다. 일반적으로 HSP70의 경우 스트레스가 증가 할 시에 증가하는 단백질로 알려져 있으며 따라서 빈산소가 성계 수정란에 상당히 많은 스트레스를 주는 것으로 확인 하였다. 또한 항산화 효소 중의 하나인 glutathione reductase의 경우도 빈산소의 경우 RT-PCR의 결과에서 약 2.79배 증가하는 현상을 상대적인 발현으로 확인하였다.



[그림 2] Western 분석에 의한 HSP70 유전자의 발현량의 비교



[그림 3] PCR에 의한 Glutathione reductase 유전자의 발현량의 비교

#### 4. 결론

빈산소 환경에 의한 등근성계에서의 배 발생률의 변화를 확인한 결과 발생이 유도 되지 않은 것을 확인하였으며 또한 스트레스 관련 유전자 또는 항산화 관련 유전자의 증가를 통해 빈산소가 등근성계에 확실한 독성이 있음을 확인 할 수 있었다.

#### 5. 사사

본 연구는 국토해양부 과제 (PM56700(PJT200461))의 지원을 받아 이루어졌습니다.

#### 6. 참고문헌

[1] Diaz RJ, Rosenberg R (2008) Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321 (5891):926-929. doi:321/5891/926 [pii] 10.1126/science.1156401

[2] Li H, Zuo S, He Z, Yang Y, Pasha Z, Wang Y, Xu M (2010) Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299 (6):H1772-1781. doi:ajpheart.00557.2010 [pii] 10.1152/ajpheart.00557.2010

[3] Morales J, Mulner-Lorillon O, Cosson B, Morin E, Belle R, Bradham CA, Beane WS, Cormier P (2006) Translational control genes in the sea urchin genome. *Developmental biology* 300 (1):293-307

[4] Saito K, Kondo E, Matsushita M (2011) MicroRNA 130 family regulates the hypoxia

response signal through the P-body protein DDX6. *Nucleic acids research* 39 (14):6086-6099

[5] Siikavuopio SI, Dale T, Mortensen A, Foss A (2007) Effects of hypoxia on feed intake and gonad growth in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 266 (1-4):112-116

[6] Vaquer-Sunyer R, Duarte CM (2008) Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (40):15452