

급격한 수온 스트레스에 따른 시볼트전복, *Haliotis sieboldii* 치패의 생리적 변화

김태형, 김경주, 최미경¹, 여인규*

제주대학교 해양과학대학 해양과학부, ¹국립수산물과학원 패류육종연구센터

Physiological Changes of Juvenile Abalone, *Haliotis sieboldii* Exposed to Acute Water-temperature Stress

Tae-Hyung Kim, Kyung-Ju Kim, Mi-Kyung Choe¹ and In-Kyu Yeo*

Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

¹Shellfish Genetic & Breeding Research Center, Jeju 695-835, Korea

This study was conducted to investigate changes of hemolymph count, antioxidant enzyme activities (catalase: CAT and superoxide dismutase: SOD) and Heat Shock Protein 70 (HSP70) mRNA in hemolymph, hepatopancreas and gill of abalone (*Haliotis sieboldii*) exposed to various water temperatures. Abalones were exposed to 10, 15, 20, 25 or 30°C for 0, 6, 12, 24 or 48 hours. Survival rate of abalone was 100% at 10, 15, 20 and 25°C, but 0% at 30°C. Hemolymph counts increased at lower water temperatures (10 and 15°C) and decreased at 30°C. SOD activity decreased immediately after exposure to lower or higher water temperatures compared to the control (20°C) with an exception at 30°C where the activity increased. At lower temperatures, SOD activity rose high after 24 hours, but decreased again at 48 hours. At 25°C, it decreased compared to the control. CAT activity decreased immediately after exposure to 10 or 25°C compared to the control, and then was recovered to the initial level after increment. At 15°C, CAT activity was high after 6 hours, and then was recovered to the initial level after increment. At 30°C, the activity decreased throughout the experiment. The HSP70 mRNA expression in gill increased at lower temperatures compared to the control (20°C) and 25°C. In this study, rapid change of water temperature caused stress response in abalone which had been raised at 20°C. At molecular level, HSP70 was expressed rapidly, but antioxidant enzymes like SOD and CAT were expressed later than HSP70. At 15 and 25°C of water temperatures, the HSP70, SOD and CAT expression were stable with time. However, at 30°C, all abalone died possibly because they could not develop resistance to high temperature.

Keywords: Abalone, *Haliotis sieboldii*, HSP70, Superoxid dismutase (SOD), Catalase (CAT)

서론

최근 수산 산업은 수산 자원의 급격한 감소로 빠르게 양식 산업으로 전환되고 있으며, 이에 따라 많은 수산 생물 종들이 양식화 되고 있으며 그 중 대부분이 어류가 차지하고 있다. 어류를 제외하면 전복, 굴 등과 같은 패류 및 새우류와 같은 갑각류가 양식되고 있다. 그 중에서 육상 양식이 가능한 전복은 남해안 일대에서 많이 양식되고 있으며, 어류 양식과 비교할 때 충분한 경제적 가치와 경쟁력이 있는 품종중의 하나이다.

한편, 최근 양식 산업이 급속한 발달로 물리·화학적 스트레스에 의한 양식 생물의 질병이나 스트레스 등에 관한 많은 연

구가 이루어지고 있으며, 이러한 연구들은 양식 산업에 많은 도움을 주고 있다(Yang and Yeo, 2004). 하지만 이러한 연구 대부분이 어류에 국한되어 지고 있으며, 일부 전복 등과 같은 패류에 관한 연구가 이루어지고 있지만 어류 종들과 비교하면 미미한 실정이다. 하지만, 급격한 환경 변화 스트레스와 같은 스트레스적 상황이 유발되면 이동성이 빠른 어류들 보다 복족류인 전복과 같이 이동성이 매우 제한적인 패류에게 많은 영향을 미칠수 있을 것이라 여겨진다.

일반적으로 스트레스를 받게 되면 생체내에 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxy radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있다. 활성산소는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다(Ferraris et al., 2002). 이러한

*Corresponding author: ikyeo99@cheju.ac.kr

활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있고(Chance et al., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981), 이러한 항산화효소는 온도 변화에 의해 효소 활성이 증가 하는 것으로 보고되고 있다(Parihar et al., 1996; Parihar et al., 1997). 또한, 최근 환경변화로 인한 스트레스 반응은 세포레벨의 분자생물학적인 방법에 의해 연구되어 지고 있다(Snyder et al., 2001). 수온 변화와 같은 외부의 열 충격은 생체 내 중요한 방어 기작으로서 열충격단백질(Heat Shock Protein, HSP)을 생성시키게 되고, 생성된 HSP는 세포내에서 합성된 단백질의 정확한 3차 구조를 유지시켜 주는 것으로 알려져 있다(Welch, 1991; Young et al., 1993).

전복은 복족강(Gastropoda), 원시복족목(Archaeogastropoda), 전복과(Haliotidae)에 속하며 전세계에 70여종이 분포하고 있다고 알려져 있으며(Lindberg, 1992), 이 중 어획 대상이 되는 대형종은 20여종으로 주로 온대 수역에서 많이 생산되고 있다. 우리나라 연안에 서식 분포하는 전복류로서는 제주도 북쪽인 남해안 이북에서 서식하는 한류계인 참전복(*Haliotis discus hannai*)과 수심 25 m 층의 2월 달 평균기온이 12°C가 되는 등온선을 경계로하여 남쪽인 제주도에 서식하는 난류계 대형종인 시볼트전복(*Haliotis sieboldii*), 까막전복(*Haliotis discus*), 말전복(*Haliotis gigantea*) 그리고 제주도에 서식하는 소형종인 오분자기(*Haliotis diversicolor aquatilis*) 등 5종이 알려져 있으며, 참전복 *Haliotis discus hannai*에서는 급격한 수온 스트레스에 대해 시간이 지날수록 모든 실험구에서 SOD가 증가하고, CAT인 경우 고수온 스트레스를 받은 실험구가 증가하는 경향을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Kim et al., 2005). 본 실험에서 사용한 시볼트전복 *Haliotis sieboldii*은 참전복에 비해 비교적 크기가 큰 난류성 대형종에 속하는 전복으로 한국의 남해안과 제주도 조간대의 수심 10 m 내외의 지역에 분포하는 것으로 알려져 있으며, 이에 비해 참전복은 한국의 전해안에 분포하며 비교적 낮은 수심인 4~5 m 정도에 서식하는 것으로 알려져 있다. 이러한 서식 환경의 차이는 생리적인 반응에 차이를 가져올 수 있으며 고부가가치의 양식 대상 중에 있어서 생리적 현상에 대한 연구는 사육환경에 있어 중요한 요인으로 작용할 것으로 여겨진다.

따라서, 본 연구는 고부가가치를 창출할 수 있는 시볼트전복을 이용하여 물리적 스트레스인 수온 스트레스에 대한 HSP70 mRNA의 발현과 항산화효소인 SOD 및 CAT 등을 측정하여 스트레스에 대한 생리학적 지표를 설정하고자 본 연구를 실시하였고, 본 연구진에서 이전에 연구되어진 참전복과 비교하여 전복류의 생리학적 반응을 알아보하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험전복

실험에 사용된 시볼트전복, *Haliotis sieboldii*는 제주수산연

구수 패류육종연구센터에서 분양받은 평균 각장 4.35±0.03 cm, 각폭 2.93±0.02 cm, 전중량 7.95±0.25 g인 개체를 사용하였다. 실험 전복은 미리 20°C에서 2주 동안 사육하며 순치시킨 후 순환 여과가 가능한 30 L 규모의 수조로 옮겨 10, 15, 20(대조구), 25 및 30°C의 수온 스트레스를 각각 주었으며, 이 때 염분농도는 30.0±0.5‰ 유지시켰고 PVC파이프(Ø 20 cm, L 20 cm)를 세로로 절단한 은신처(shelter)를 넣어서 공기를 공급하였다. 예비 사육기간에 먹이는 다시마를 충분히 공급하였으며, 실험구당 30마리의 전복을 실험에 사용하였고, 실험개시 후 각 수조에 넣어진 사육수의 수온이 목표치에 도달한 순간을 0 h로 정하여 0, 6, 12, 24 및 48 h째에 각각 5마리의 전복으로부터 혈구와 아가미 조직, 간부위의 조직 샘플을 채취하여 -70°C로 보관하며 분석에 이용하였다.

생존율 측정

실험개시 후, 0, 6, 12, 24 및 48 h째에 폐사한 개체를 각각 조사하였다. 폐사 개체의 계수는 은신처(shelter)와 수조 벽면에 부착능력이 없고, 유리병으로 발과 촉수를 자극하여도 반응이 없는 개체를 선택하여 조사하였다.

혈림프(Hemolymph) 수 측정

혈림프 수 측정은 실험개시 후, 0, 6, 12, 24 및 48 h째에 전복의 심장 옆 혈관으로부터 바늘 규격 26 GX 1/2 인 1 ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 0.9% 생리식염수로 10배 희석하여 혈구 계산판을 이용하여 살아있는 혈림프를 계수하였다(Fig. 1).

항산화효소 측정

항산화효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화하였다. 균질화된 시료는 원심분리(1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질

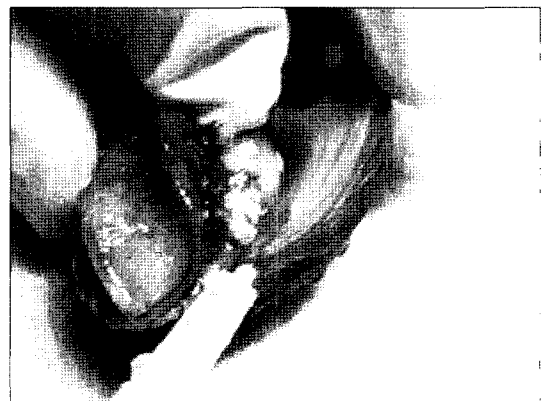


Fig. 1. Take a blood sample in abalone.

액은 다시 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다.

SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml에 간장 균질액 25 µl을 넣은 후 45 µl의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 325 nm의 파장에서 측정하였고, 효소활성의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. CAT활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다. 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer를 이용 540 nm에서 측정하였다.

RT-PCR 분석

동결된 아가미 조직에서 total RNA를 (주)Bioneer tissue RNA prep mate kit를 사용하여 추출하였다. 추출된 total RNA는 -70°C에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA사의 cDNA합성 kit인 ImProm-II™ reverse transcriptase kit A3800을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 PROMEGA사의 Taq DNA polymerase in storage buffer B kit을 사용하여 증폭하였다. cDNA를 증폭시키기 위하여 cDNA 2 µl, 10×PCR buffer 5 µl, MgCl₂ (25 mM) 3 µl, dNTP (10 mM) 1 µl, primer (sense) 1 µl (50 pmol), antisense 1 µl (50 pmol), Taq DNA polymerase 0.5 µl 및 Nuclease-Free water 36.5 µl를 혼합하여 94°C에서 5분간 pre-denaturation 시켜준 후 94°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. HSP70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer를 제작 합성하였고, 양성대조로 사용하기 위해 β-actin mRNA를 제작하였다(Table 1). PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100V로 전기영동하여 분리하였으며, 100bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA의 발현량을 정량하였다.

통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결 과

수온자극에 의한 생존율의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 생존율에서는 대조구(20°C)를 비롯한 다른 실험구(10, 15 및 25°C)에서는 실험종료시 까지 폐사된 개체가 발견되지 않아 100%의 생존율을 나타내었으나, 30°C 실험구에서만 12 h 이후 3마리가 폐사하여 90%의 생존율을 기록하였고, 24 h째에는 전량 폐사하여 0%의 생존율을 나타내었다(Fig. 2).

수온자극에 의한 혈림프 수의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 혈림프 수의 변화는 10°C 실험구에서는 대조구(20°C)와 비슷한 양상을 나타내었으며, 15°C 실험구의 경우 실험 0 h째에는 유의적으로 감소하는 경향을 나타내다가 6 h째에는 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었고 실험종료시 까지 이러한 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 25°C 실험구의 경우 6 h째에 유의적인 증가를 나타내었으나 이후 감소하는 경향을 나타내었으며 실험 종료시인 48 h째에는 급격히 증가하는 경향을 나타내었고, 30°C 실험구의 경우에는 0 h째에는 급격히 증가하였다가 6 h째부터 감소하는 경향을 나타내어 12 h 이후 전량 폐사하여 더 이상의 측정은 이루어지지 않았다(Table 2).

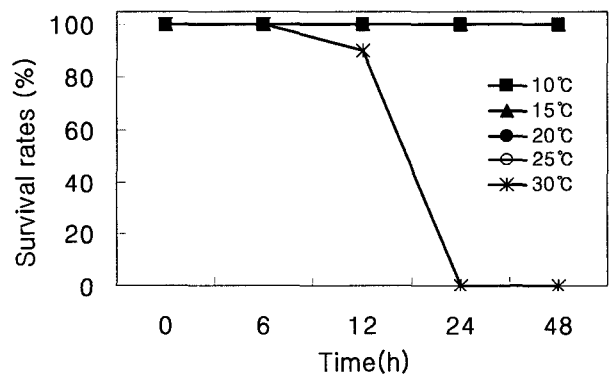


Fig. 2. Survival rates of the juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress.

Table 1. Oligonucleotide of primers for heat shock protein70 and β-actin

RNA species	Expected size	Primer sequence
β-actin mRNA	520bp	5'-GACHCAGATCATGTTYGARACC-3'
		5'-CCTTCTGCATRCGGTCAGC-3'
HSP70 mRNA	400bp	5'-CAGGACTTCTTCAACGGCAAG-3'
		5'-GTGCTCTTGCSACAGCTGA-3'

bp: base pairs.

Table 2. Variations of hemolymph factors of juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*) to exposure of acute water temperature

Time (h)	Experimental group				
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
0	1.79±0.60	1.52±0.20	2.25±0.80	2.68±1.45	3.20±1.05
6	1.55±0.55	3.07±0.95	1.80±0.80	2.74±0.75	1.78±1.10
12	1.95±1.35	2.43±1.85	1.75±0.85	1.90±1.20	1.70±1.05
24	1.98±0.90	2.92±0.90	2.20±0.85	1.71±0.35	
48	1.90±0.60	3.37±1.45	2.43±0.90	3.57±0.75	

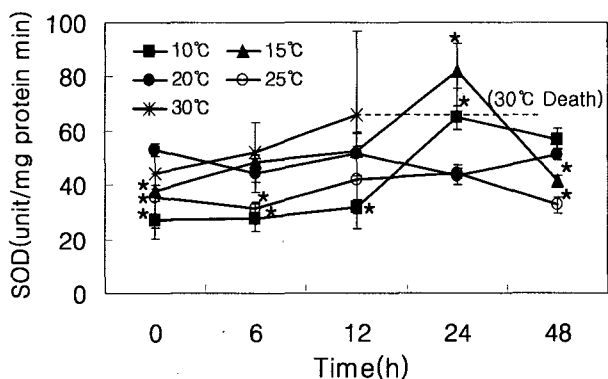


Fig. 3. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress. *P<0.05 as compared to control (20°C).

항산화 효소 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 SOD 활성은 실험 0 h째에는 30°C 실험구를 제외한 모든 실험구(10, 15 및 25°C)에서 대조구(20°C)보다 낮게 나타났으나, 10 및 15°C 실험구에서는 12 h 이후 24 h째에는 급격한 활성 증가를 보이다가 48 h째에 감소하였다. 또한, 25°C 실험구에서는 전 실험 기간동안 대조구(20°C)보다 낮은 활성을 나타내는 경향을 나타내었으며, 30°C 실험구의 경우에는 실험 개시 후부터 실험 개체가 전량 폐사한 12 h째까지 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3, P<0.05). CAT 효소 활성의 경우는 0 h째에서는 10 및 25°C 실험구에서 대조구보다 낮은 활성을 나타내었고, 시간이 경과함에 따라 10°C 실험구는 증가하는 경향을 나타내다가 24 h 이후에는 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 15°C 실험구에서는 6 h과 24 h째에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 25°C 실험구의 경우 실험 개시 시인 0 h과 6 h째에는 대조구(20°C)보다 낮은 활성을 나타내었으나, 점차 회복하는 경향을 나타내다가 48 h째에 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고, 30°C 실험구의 경우 6 h째부터 유의적으로 감소하는 경향을 나타내다가 12 h 이후 전량 폐사하였다(Fig. 4, P<0.05).

수온변화 시간에 따른 HSP70 mRNA의 양적 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 HSP70의 변화를 관찰하기 위하여 수온과 시간대 별로 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR를 통한 HSP70 mRNA의

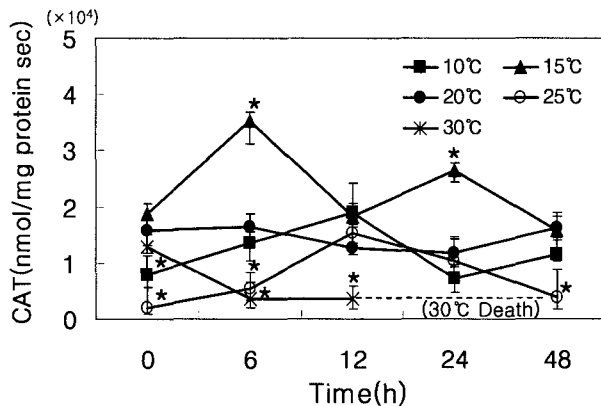


Fig. 4. Changes of catalase (CAT) activity in juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress. *P<0.05 as compared to control (20°C).

발현은 20°C(대조구)와 25°C 48 h 시간제를 제외한 모든 실험구에서 HSP70 mRNA가 발현되는 것이 확인되었다. 특히, 30°C에서는 가장 뚜렷한 HSP70 mRNA의 발현이 나타났으며, 6 h째까지 발현이 높게 나타나다가 12 h째 발현이 감소하였고, 이후 모두 폐사하였다. 25°C 실험구의 경우 6 h째까지 일정한 HSP70 mRNA의 발현을 나타내었으나 12 h째에 감소하기 시작하여 24 h째에는 발현이 나타나지 않았다. 또한, 저수온 스트레스인 10과 15°C인 경우 10°C에서는 실험 개시부터 종료시인 24 h까지 HSP70 mRNA가 일정하게 계속 발현되었으며, 15°C 실험구의 경우 12 h째에 조금 감소하여 발현되는 경향을 나타내었다(Fig. 5). HSP70 mRNA의 발현정도를 β-actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과, 저수온 스트레스 실험구인 10과 15°C 실험구에서는 15°C 실험구보다 10°C 실험구에서 높은 발현을 나타내었으며 두 실험구 모두 실험개시부터 종료시 까지 일정한 발현을 나타내었고, 고수온 스트레스인 25와 30°C 실험구의 경우 30°C 실험구에서 0과 6 h째에 가장 높은 HSP70 mRNA 발현양을 나타내었으며, 25°C 실험구의 경우 12 h째 까지 일정한 발현을 나타내다가 24 h째부터 점차 감소하기 시작하여 48 h째에는 발현이 나타나지 않았다(Fig. 6).

고 찰

시볼트전복을 20°C에서 2주간 순치시킨 후, 순응수온별(10, 15, 20(대조구), 25 및 30°C)에서 적응기간별(0, 6, 12, 24 및 48 h)

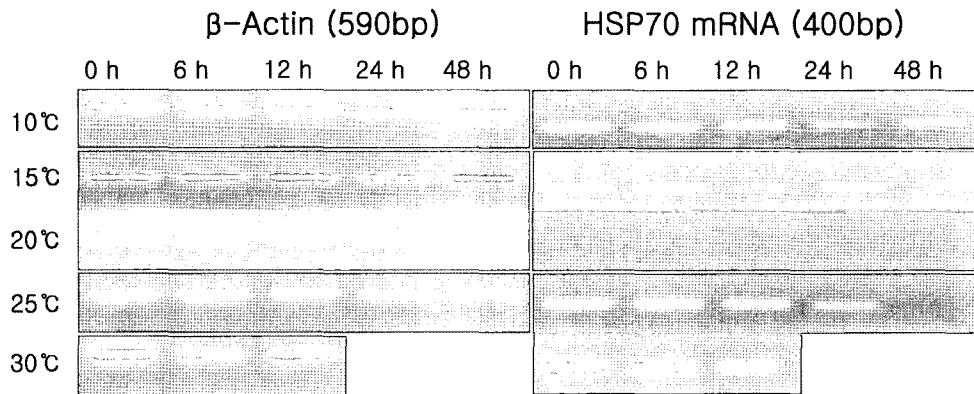


Fig. 5. Effect of acute Water-temperature stress on β -Actin mRNA and HSP70 mRNA of gill in juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*).

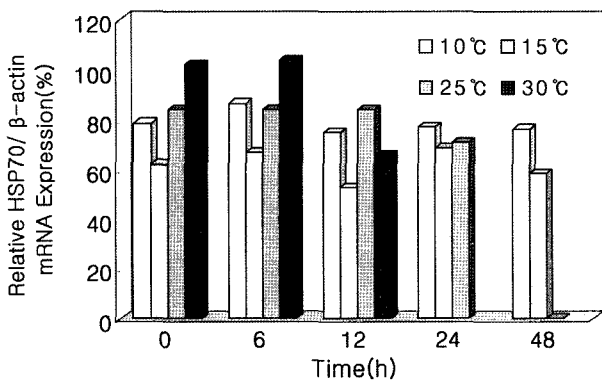


Fig. 6. Effect of acute Water-temperature stress on HSP70 mRNA of gill in juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*).

생존율을 조사한 결과 30°C 실험구에서만 12 h 이후 3마리가 폐사하였고, 24 h째에 전량 폐사하였다. 이는 30°C 고수온에서는 20°C에서 순치된 개체라도 12 h째부터 생리적인 한계점에 도달하고 있음을 보여주는 것으로 판단되며, 참전복에 비해 급격한 고수온 스트레스에 대한 순응능력이 떨어진다고 판단된다.

또한 본 실험에서는 스트레스와 대사의 지표로 많이 사용되는 혈액 샘플(Cho et al., 2002; Vijayan and Moon, 1994)을 전복의 심장 옆 혈관에서 주사기를 이용하여 채취한 뒤, 혈림프(Hemolymph)를 계수하여 급격한 수온 스트레스에 따른 혈림프 수의 변화를 조사하였는데, 패류의 혈림프는 상처의 수복, 패각의 재생, 영양물질의 소화와 수송, 배설 및 생체방어에 관여한다고 알려져 있다. 그 결과 시볼트전복에서 급격한 수온 스트레스는 초기에 많은 스트레스 요인으로 작용하는 것으로 나타났으며, 저수온 스트레스인 경우 혈림프 생성을 저해하는 생리 활성이 나타나고, 고수온 스트레스일 경우 혈림프 생성을 많이 하는 생리 활성이 효과가 나타났다. 하지만, 고수온 스트레스의 경우 일정 시간이 지남에 따라 혈림프 생성이 억제 되어 대조구 실험구인 20°C 실험구의 수준으로 회복하는 경향을 나타내었으나, 25°C 실험구의 경우 24 h 이후에 혈림프 생성이 급격히 증가하는 것으로 나타났고, 저수온 스트레스인 15°C 실험

구의 경우 초기 저해되었던 혈림프 생성이 시간이 지남에 따라 증가되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 시볼트 전복이 초기 급격한 수온 스트레스에 대한 생리 반응이 시간의 지남에 따라 회복 반응으로 나타나는 것으로 보여지며, 30°C와 같은 고수온 스트레스를 단시간에 급격하게 받게 될 경우 생리적 방어 한계점에 도달해 유의적인 혈림프 수의 증감 없이 폐사되는 것으로 보여진다.

스트레스에 의해 발생하는 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 노출되었을 때 병적 상태에서는 이들이 과다하게 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다(Goldberg and Stern, 1977; Simon et al., 1981; Moody and Hassan, 1982). 이런 생체에서 발생하는 활성산소에 의한 단백질, 핵산 및 생체막 손상은 SOD 및 CAT 등 항산화효소에 의해 방어된다. 본 연구진에서 이전에 이루어진 참전복(*Haliotis discus hannai*)을 이용한 실험에서는 SOD의 경우 모든 실험구에서는 증가하는 경향을 나타내었으나, 고수온에서 12 h 이후 급격한 상승을 나타내었고, 저수온에서는 수온 스트레스 자극 직후에 증가한 후 감소하는 경향을 나타내었으며, CAT에 있어서는 고수온에 있어서 지속적인 상승을 나타내었다(Kim et al., 2005). 하지만, 본 실험에서 시볼트전복의 SOD의 양은 실험 개시후 0 h째에는 모든 실험구가 대조구(20°C)보다 감소하는 경향을 나타내었으며, 10 및 15°C 실험구의 경우 24 h째에 가장 높은 활성을 나타내었고, 25°C 실험구의 경우에는 대조구보다 낮은 활성을 나타내었다. CAT 활성 또한, 15°C 실험구를 제외한 전 실험구가 대조구 보다 낮은 활성을 나타내었고, 15°C 실험구 역시 24 h째 이후로는 회복되는 경향을 나타내었다. 이상의 결과를 보면 20°C에서 순치된 전복에서 항산화효소의 변화는 전복 종에 따라 다르게 나타나는 것으로 나타났으며, 시볼트전복의 경우 급격한 수온스트레스가 참전복에 비해 많은 스트레스 요인으로 작용한다고 여겨진다. 이러한 이유는 시볼트전복의 서식환경이 참전복에 비해 비교적 수심이 깊고, 수온의 변화가 적은 난류성 환경에서 서식하는데 기인하는 것으로 여겨진다. 또한, 생체나 방어 기작이 가지는 한계를 넘어선 수온 스트레스인 30°C에 노출

되었을 경우에는 SOD 활성은 증가하는 경향을 나타내며, CAT 활성은 감소하는 경향을 나타내었는데, 이러한 결과로 비추어 볼 때 30°C와 같은 한계 스트레스 상황에서는 SOD가 superoxide radical를 H₂O₂와 O₂로 전환시키기는 하지만 이 전환된 H₂O₂를 CAT가 O₂와 H₂O로 분해하는 능력이 떨어져 생체내 유해한 활성산소를 제거하지 못하고 있음을 보여주는 결과라 여겨진다.

한편, 분자레벨에서의 스트레스 지표로 널리 사용되어 지고 있는 HSP70 mRNA의 발현은 대조구(20°C)와 25°C 실험구 48 h째를 제외한 모든 실험구에서 발현되었다. 특히 30°C 실험구에서는 0 h째와 6 h째에 강하게 발현하여 12 h째에 이르러서는 발현이 점차 약해지다가 전량 폐사하였으며, 25°C 실험구의 경우에는 24 h째까지 발현을 나타내다가 48 h째에 이르러서는 발현이 나타나지 않았다. 또한, 10 및 15°C 실험구의 경우에서도 모든 시간대에서 발현이 나타났는데, 이러한 결과는 저수온과 고수온 모두 시볼트전복에서는 많은 스트레스 요인으로 작용한다는 것을 보여주며, 설정 수온에 도달하는 0 h째 부터 HSP70 mRNA가 발현되어 실험 종료시인 48 h째까지도 발현이 계속 나타난 10 및 15°C와 같은 저수온에 대한 회복 반응은 다소 많은 시간이 필요할 수 있다는 것을 간접적으로 보여주는 결과라고 생각된다.

이상의 결과로, 20°C에서 순치된 시볼트전복은 참전복보다 급격한 수온 스트레스 반응에 민감하게 반응하는 것으로 보여지며(Kim et al., 2005), 저수온이나 고수온 스트레스 모두 생체의 활성을 저해하는 효과를 가져올 수 있을 것이라 여겨진다. 그러나 저수온 스트레스의 경우에는 고수온 스트레스가 미치는 생체 방어 기작에 대한 영향보다 적은 영향을 줄 것이라고 생각되며, 25°C 이상의 고수온 스트레스에 노출되었을 때 나타나는 생리학적 방어기작과 비교하여 보다 빠르게 작용하여 순응하는 것으로 생각되어진다. 또한, 25°C의 수온 스트레스의 경우에도 실험 종료시인 48 h째에 혈림프 수, SOD 및 CAT등이 급격히 변화하는 것으로 보아 25°C의 수온 스트레스 또한 장기간에 노출되었을 경우 심한 스트레스 요인으로 작용할 수 있을 것이라 여겨진다. 그러나 이러한 변화에 대한 종합적인 검토를 위해서는 좀 더 장기간에 걸친 연구와 각 장기간의 발현 양상에 대한 세부적인 연구가 추가되어야 할 것으로 판단되며, 더 많은 전복 종들을 대상으로 하여 실험을 진행함으로써 각 전복 종들간의 수온 스트레스에 대한 생리학적 차이점을 알아봐야 할 것이라 여겨진다.

요 약

본 연구는 시볼트전복, *Haliotis sieboldii* 치패를 이용하여 급격한 수온변화 스트레스에 따른 혈림프수의 변화와 간부위에서의 항산화효소 및 아가미 부위에서의 HSP70 mRNA의 변화를 조사하였다. 실험구는 10, 15, 20°C(대조구), 25°C 및 30°C로 설정하였으며, 측정 시간은 0, 6, 12, 24 및 48 h 후에 측정 하

였다. 그 결과 실험기간 중의 생존율은 30°C 실험구를 제외한 모든 실험구에서 100%의 생존율을 나타내었으며, 30°C 실험구에서는 12 h 이후 3마리가 폐사하여 90%의 생존율을 기록하였고, 24 h째에는 전량 폐사하여 0%의 생존율을 나타내었다. 혈림프 수의 변화는 15°C 및 25°C 실험구의 경우 증가하는 경향을 나타내었고, 30°C 실험구의 경우 감소하는 경향을 나타내었다. SOD의 경우 급격한 수온 스트레스 직후 모든 실험구에서 감소하는 경향을 나타내었으나, 30°C 실험구에서는 계속 증가하는 경향을 나타내었고, 12 h 이후에는 모든 개체가 폐사하여 더 이상의 관찰은 할 수 없었다. 또한 10 및 15°C 실험구의 경우 24 h째에 모두 최고의 활성 상태를 나타내었으나, 48 h째에는 감소하는 경향을 나타내었고 25°C 실험구의 경우 대조군과 비교하여 감소하는 경향을 나타내었다. CAT에서는 수온 스트레스 직후 10 및 25°C 실험구에서는 대조군과 비교하여 낮은 활성을 나타내었으며, 시간의 지남에 따라 회복하는 경향을 나타내었다. 또한, 15°C 실험구의 경우에는 6 h째에 가장 높은 CAT 활성을 나타내었으며, 이 후 차츰 회복하는 경향을 나타내었고, 30°C 실험구의 경우에는 시간의 지남에 따라 유의적으로 활성이 낮아지는 경향을 나타내었다. HSP70 mRNA의 발현은 대조군(20°C)과 비교하여 25°C 48 h째 실험구를 제외한 모든 실험구에서 유의적으로 높게 발현되었다. 이상의 결과로, 20°C에서 순치된 시볼트전복은 급격한 수온 스트레스에 대해 많은 스트레스 요인으로 작용하는 것으로 나타났으며, 수온 스트레스에 대한 생리학적 방어 기작이 분자 레벨인 HSP70 mRNA에서는 신속히 발현되어 스트레스에 대처하지만, SOD나 CAT와 같은 항산화 효소의 발현은 다소 늦게 작용하는 것으로 나타났다. 그러나, 시간의 지남에 따라 5°C 내외의 스트레스와 저수온 스트레스의 경우에는 비교적 안정화되는 것으로 보여지며, 10°C 이상의 고수온에 노출되었을 경우에는 생리학적 방어기작이 한계점에 이르러 더 이상 방어 기작이 작동하지 않아 폐사에 이르게 되는 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 2005년도 제주대학교 두뇌한국21 사업에 의하여 연구되었으며, 연구비를 지원하여 주신 데 대하여 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Chance, B., H. Sice and A. Boveris, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59, 527-605.
- Cheng W., I. S. Hsiao, C. H. Hsu and J. C. Chen, 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17, 235-243.

- Cho, K. S., E. Y. Min and J. C. Kang, 2002. Changes of haematological constituents in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to HCB and PCBs. *J. Kor. Fish. Soc.*, 35, 110–114.
- Ferraris, M., S. Radice, P. Catalani, M. Francolini, L. Marabini and E. Chiesara, 2002. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquatic Toxicology*, 59, 283–296.
- Goldberg, B. and A. Stern, 1977. The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophys.*, 178, 218–225.
- Kim, T. H., M. H. Yang, M. G. Choe, S. J. Han and I. K. Yeo, 2005. Physiological studies on acute water-temperature stress of abalone (*Haliotis discus hannai*). *Kor. J. of aquaculture*. Vol. 18, 7–12.
- Lindberg, L. J., 1992. Evolution, distribution and systematics of Haliotidae. (in) S. A. Shepherd and I. M. Thomad (ed.), *Abalone of world: Biology, Fisheries and Culture*, Blackwells, London, pp. 3–18.
- Lowry O. H., N. J. Rosenbrought., A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
- Marklund S. and G. Marklund, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, 469–474.
- Moody, C. S. and H. M. Hassan, 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 2855–2859.
- Nelson D. P. and L. A. Kiesow, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem.* 49, 474–478.
- Parihar, M. S., A. K. Dubey, T. Javeri and P. Prakash, 1996. Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *J. Therm. Biol.*, 21, 323–330.
- Parihar, M. S., T. Javeri, T. Hemnani, A. K. Dubey and P. Prakash, 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J. Therm. Biol.*, 22, 151–156.
- Simon, R. H., C. H. Scoggin and D. Patterson, 1981. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 256, 7181–7186.
- Snyder, M. J., E. Givertz and E. P. Mulder, 2001. Induction of marine mollusk stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41, 22–29.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon, 1994. The stress response and plasma disappearance of corticosterone and glucose in a marine teleost sea raven. *Can. J. Zool.*, 72, 379–386.
- Welch, W. J., 1991. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3, 1033–1038.
- Wendel, A. and S. Feuerstein, 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem Pharmacol.*, 30, 2513–2520.
- Yang, J.H. and I.K. Yeo, 2004. Physiological studies on acute water-temperature stress of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Kor. J. Ichthyol.*, 16, 19–26.
- Young, D., E. Roman., C. Moreno., R. O'Brien and W. Born, 1993. Molecular chaperones and the immune response. *Phyl. Trans. R. Soc. London*, 339B, 363–367.

원고접수 : 2005년 11월 5일

수정본 수리 : 2006년 5월 2일