

급격한 염분변화에 따른 담수어 3종의 프로락틴 및 성장호르몬 유전자 발현변화

박우동 · 이철호¹ · 김대중² · 손영창*

강릉대학교 해양생명공학부, ¹국립수산과학원 영동내수면연구소

²국립수산과학원 양식연구본부 양식관리팀

Changes in Prolactin and Growth Hormone Gene Expression in Three Freshwater Teleosts with Rapid Changes in Salinity

Woo Dong PARK, Cheul Ho LEE¹, Dae-Jung KIM² and Young Chang SOHN*

Division of Marine Molecular Biotechnology, Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea

¹Yeongdong Inland Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Yang-yang, Gangwon 215-821, Korea

²Aquaculture Research Team, Headquarters for Aquaculture, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

The changes in osmolality and the gene expression profiles of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) with rapid changes in salinity were compared in the eel (*Anguilla japonica*), crucian carp (*Carassius carassius*), and masu salmon (*Oncorhynchus masou*). Fish stocked in freshwater (FW) were abruptly transferred to experimental tanks containing FW, 50% seawater (50% SW), or 100% SW (SW). Blood samples and pituitary glands were collected 2 and 24 hrs after the exposure. No mortality was observed in SW eel (n=6), whereas all of the crucian carp (n=6) and two masu salmon (n=6) exposed to SW died after 1 and 24 hrs, respectively. The PRL mRNA levels of the eel and masu salmon decreased in 50% SW and SW compared to those of the fish kept in FW after 24 hrs, whereas the PRL levels of crucian carp were higher in 50% SW than in FW. Unlike the PRL mRNA levels, the GH mRNA levels of the eel did not differ significantly among three different salinities, while the GH mRNA levels of crucian carp and masu salmon increased significantly in 50% SW and SW after 24 hrs. The serum osmolalities increased marginally in the eel and masu salmon in 50% SW at 24 hrs (19% and 9%, respectively), whereas those of crucian carp increased abruptly in 50% SW (50% increase). These results suggest that the synthesis of PRL and GH is important in relation to the osmoregulatory system with environmental changes in salinity.

Key words: Eel, Masu salmon, Crucian carp, Prolactin, Growth hormone, Osmolality

서 론

급격한 염분변화에 따른 어류의 삼투압 조절은 이온과 수분 평형에 영향을 주어 어류의 생리조건을 악화시키거나 폐사를 유발하고 장기적으로 성장지연을 초래하는 것으로 알려져 있다 (Tsuzuki et al., 2001; Partridge and Jenkins, 2002). 경골어류는 환경수의 염분변화에 적응하기 위하여 항상성 (homeostasis) 유지 측면에서 삼투압 조절 (osmoregulation) 기구를 가지고 있으며 (Morgan and Iwama, 1991; Jarvis and Ballantyne, 2003), 주로 아가미, 소화관 및 신장에 존재한다고 알려져 있다 (Maina, 1990).

어류의 삼투압 조절에 관여하는 대표적인 호르몬은 뇌하수체에서 분비되는 성장호르몬 (growth hormone, GH)과 프로락틴 (prolactin, PRL)이다. 두 호르몬은 공통의 선조 유전자로부터 분화되었지만 (Kawauchi and Sower, 2006), 기능적인 측면에서는 독자적인 진화의 과정을 거쳐 왔다고 추정된다. 즉

경골어류의 PRL은 담수적응에, GH는 해수적응에 관여한다고 알려져 있다 (Madsen and Bem, 1992; Manzon, 2002). 틸라피아 (*Oreochromis mossambicus*)는 광염성 경골어류로 해수에서 저염분의 환경수로 옮겨졌을 경우 뇌하수체에서 분비되는 PRL은 크게 증가되었지만, GH는 담수에서 해수로 옮겨졌을 경우 일시적으로 증가되었다 (Seale et al., 2002; Yada et al., 1994). 또한 뇌하수체 세포의 in vitro 실험에서도 GH 분비는 배지의 삼투압이 높을 때 증가되었다 (Helms et al., 1991).

극동산 뱀장어 (*Anguilla japonica*)는 회유성 어류로 다양한 서식환경과 염분농도에 적응할 수 있으며, 붕어 (*Carassius auratus*)는 환경 변화 (수질, 수온)에 대한 적응력이 좋으며 하천이나 호수 등의 다양한 담수에 서식한다. 산천어 (*Oncorhynchus masou*)는 연어과 어류이며 송어의 육봉형 (landlock type)으로 주로 강에서 서식한다. 어류의 삼투압 조절과 관련해서 많은 연구들이 보고되었으며 특히 연어과 어류 (Toftén et al., 2003), 송어 (*Mugil cephalus*) (Chang and Hur, 1999),

*Corresponding author: ycsohn@kangnung.ac.kr

감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) (Chang et al., 2002), 텔라피아 (Chang and Hur, 1999) 등에서 염분변화에 따른 생리적 변동이나 아가미 염류세포의 구조적 변화와 같은 연구가 이루어졌다. 그러나, 서로 다른 환경에서 서식하는 어류를 이용하여 삼투압 조절 기작에 관한 비교 연구는 거의 이루어지지 않았다. 본 연구의 목적은 뱀장어, 붕어 및 산천어가 급격한 염분변화에 적응하기 위하여 PRL과 GH의 mRNA가 어떻게 발현되는지 그리고 혈액 삼투압이 어떻게 변화되는지 비교 분석하는데 있다. 본 연구는 다양한 환경에서 서식하는 어류가 가진 염분변화에 따른 항상성 유지에 필요한 삼투압에 대한 기초적인 자료가 될 것으로 판단된다.

재료 및 방법

실험어와 실험조건

실험에 사용된 뱀장어 (39마리, 평균전장 49 ± 0.5 cm, 평균체중 179 ± 7.0 g), 붕어 (42마리, 평균전장 16.5 ± 0.2 cm, 평균체중 69 ± 3.6 g), 산천어 (42마리, 평균전장 23 ± 0.3 cm, 평균체중 163.7 ± 7.5 g)는 각각 덕진수산 (전라도, 광주), 중부내수면연구소 (경기도 가평), 영동내수면연구소 (강원도, 양양)에서 제공받았다. 본 실험은 영동내수면연구소에서 실시하였으며 실험전 1-2일 동안 실험어를 담수에서 안정화시킨 후에 실험에 사용하였다. 어류를 일시적으로 수용할 수 있는 사각형수조 ($140 \times 80 \times 60$ cm) 3개를 준비하고, 각 수조에 해수를 0 L, 335 L, 670 L 첨가하여 담수, 50% 해수 (16 psu), 100% 해수 (32 psu)로 3개의 염분구로 나누어 수온을 20°C 로 유지하였고 소형 폭기장치로 산소를 동일하게 공급하였다. 각각의 수조에 뱀장어, 붕어, 산천어를 각각 20마리씩 수용하였고 2시간, 24시간 후에 뇌하수체와 혈액을 채취하였다.

Sample의 채취 및 삼투압 측정

각각의 염분농도에서 2시간, 24시간 후 어류를 2-pheno-

xyethanol로 마취시켜 미부혈관에서 헤파린으로 처리 되지 않은 주사기 (needle 22 G)를 이용하여 혈액을 채취하고 뇌하수체 조직을 채취하였다. 뇌하수체는 액체질소에 급속 동결하였으며, -80°C 에서 조직별 total RNA를 추출하기 전까지 보관하였다 ($n=3-6$). 조직으로부터 total RNA는 RNA prep kit (Bioneer, Daejeon, Korea)로 추출한 후 (각 $0.5 \mu\text{g}$), M-MLV Reverse Transcriptase (Bioneer)를 사용하여 역전사반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다. 혈액은 24시간 동안 4°C 에 보관한 뒤 원심분리하여 혈청을 얻었고 혈청내 삼투압은 Vapor Pressure Osmometer (Vapro 5520, Wescor Co., Logan UT, USA)로 측정하였다.

Real-Time Polymerase Chain Reaction

염분변화에 따른 GH와 PRL의 mRNA 발현 변화는 Real-Time PCR 방법으로 조사하였다. 사용된 oligo primers는 GenBank에 등록된 염기서열을 바탕으로 Primer Express v3.0 software (Applied Biosystems, Boston, MA, USA)를 이용하여 뱀장어, 붕어, 산천어에서 각각의 GH, PRL 및 β -actin 증폭용으로 제작하였다 (Table 1). 각 개체들의 뇌하수체로부터 합성한 cDNA ($0.5 \mu\text{g}$), 2 \times SYBR primix Ex-Taq (TaKaRa), 50 \times ROX Reference Dye II (TaKaRa), 표적유전자의 oligo primer (10 μM)와 함께 총량 20 μL 로 Real-Time PCR (Applied Biosystems 7500)을 수행하였다. PCR 프로토콜은 50°C 에서 2분, 95°C 에서 10분 반응 후, two-step PCR방법으로 95°C 에서 15초, 60°C 에서 1분으로 총 40 cycle을 수행하였다.

통계처리

각각의 실험결과로부터 얻어진 자료 값 사이의 유의성 검정은 SPSS 통계 패키지 (V.12)를 이용하여 분산분석 후, Duncan's multiple range test로 분석하였다 ($P < 0.05$). 단 붕어 (Crucian carp)에 있어서 GH와 PRL의 mRNA와 혈청내 삼투압 변화는 t -test로 분석하였다 ($P < 0.05$).

Table 1. Oligo primers used in the Real-Time PCR

Primers	Directions	Accession numbers	Sequences (5'-3')
Eel β -actin	Forward	AB074846	TCATGAAGTGCACGTCGA
Eel β -actin	Reverse	AB074846	ATCTCCTTCTGCATTCTGTCCG
Eel GH	Forward	M24066	AGCACAGCACCTGCACACA
Eel GH	Reverse	M24066	GGAGTAACAGCCGGCCAAT
Eel PRL	Forward	AY158009	GCTGTCCGACAAGCTTCACTC
Eel PRL	Reverse	AY158009	GGGCGTGGCATCAGGAT
Crucian carp β -actin	Forward	AB039726	TTGACTCAGGATGCGGAAACT
Crucian carp β -actin	Reverse	AB039726	GGTAGACGCTTCTGGAACGACT
Crucian carp GH	Forward	AF069398	CGCCCACTGGAAAAGATGA
Crucian carp GH	Reverse	AF069398	GGGTTCCCTACGATCAGACTGT
Crucian carp PRL	Forward	S82197	TGTCTCCATCAACGGTGTCCG
Crucian carp PRL	Reverse	S82197	GTGAGAGAGGTGCTGAGAGAGTG
Masu salmon β -actin	Forward	AB111056	GCGCGGCTACAGCTTCAC
Mmasu salmon β -actin	Reverse	AB111056	TCTCCTTGATGTCTCGTACGATTC
Masu salmon GH	Forward	X59762	CAGCCTAATGGTCCAGAAGCGC
Masu salmon GH	Reverse	X59762	CCTGGTTCCCGTGATGA
Masu salmon PRL	Forward	M24738	CAATGGCGACATCAGCAGTAAG
Masu salmon PRL	Reverse	M24738	TGTCCAGTCCATCTCCAGG

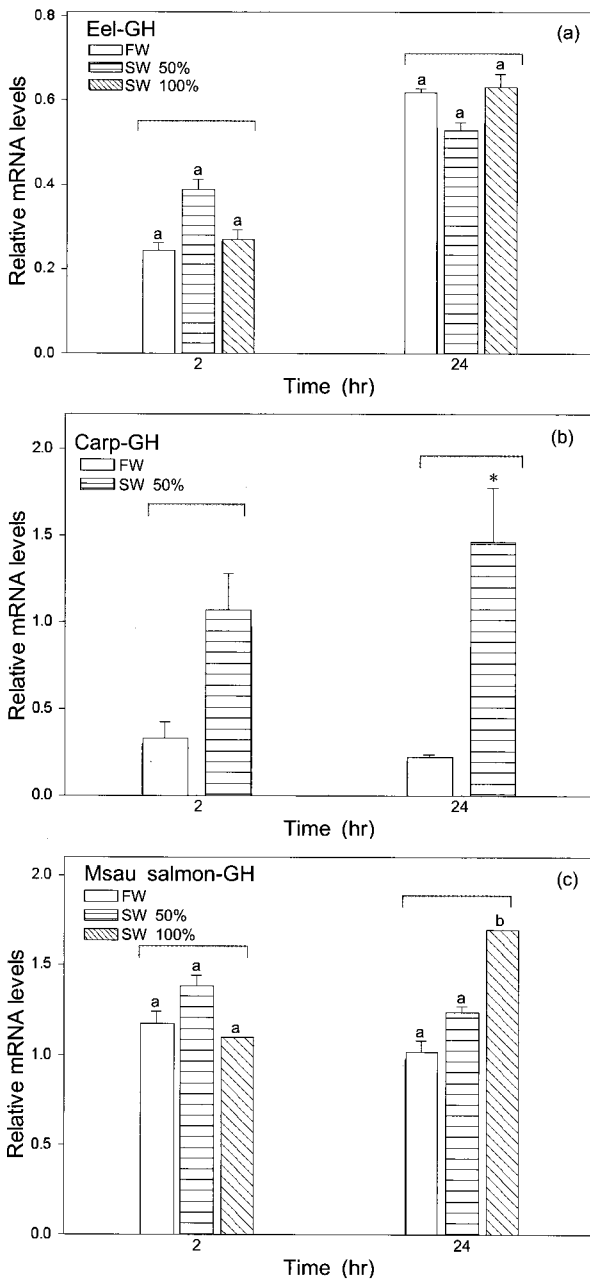


Fig. 2. Expression levels of growth hormone (GH) mRNA in the pituitary of eel (a), crucian carp (b) and masu salmon (c) that were exposed to different salinities. Values sharing the same letter do not significantly differ ($p < 0.05$). Asterisk represents significant differences ($p < 0.05$).

보였으며, 담수 대조군과 비교했을 때 50% 해수 그룹에서 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$) (Fig. 3b). 50%와 100% 해수에서 산천어의 삼투압 변화는 Init. Con. 그룹보다 2시간 후에 각각 5% (317 ± 2 mmol/kg)와 7% (336 ± 3 mmol/kg)의 증가를 보였으며, 24시간 후에는 9% (343 ± 5 mmol/kg)와 50% (465 ± 8 mmol/kg)의 증가를 보였다. 담수 대조군에 비해 실험 그룹에서 모두 유의적인 증가가 관찰되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 3c).

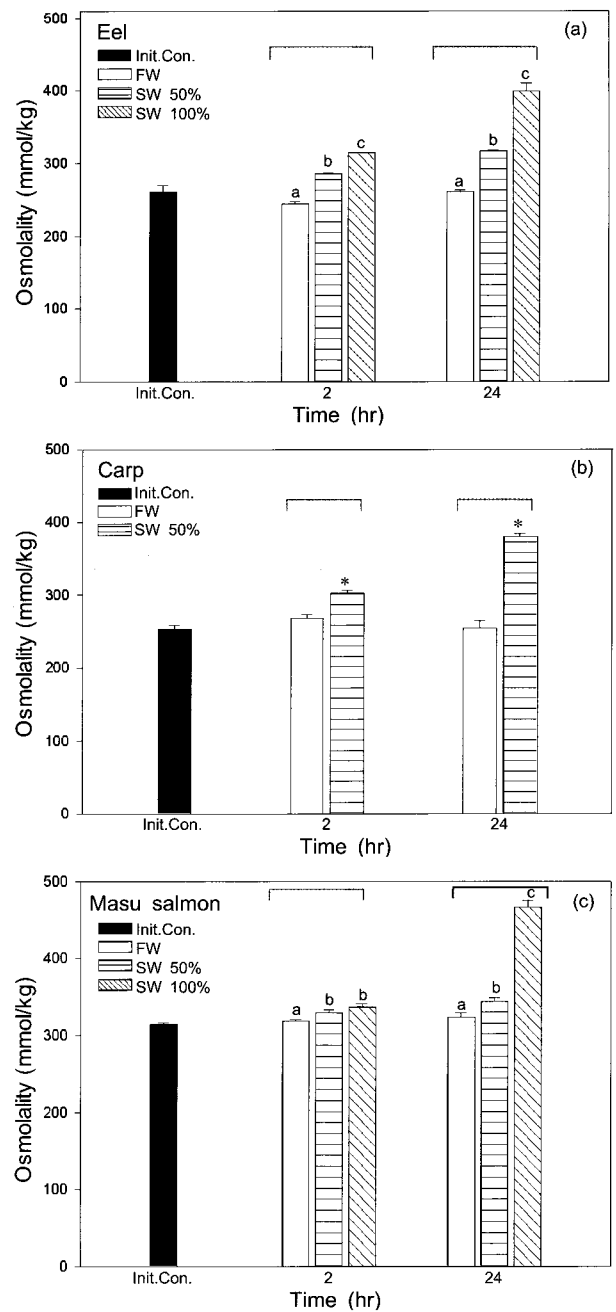


Fig. 3. Changes of serum osmolality in eel (a), crucian carp (b) and masu salmon (c) that were exposed to different salinities. Values sharing the same letter do not significantly differ ($p < 0.05$). Asterisk represents significant differences ($p < 0.05$).

고찰

경골어류의 염분 내성은 어종에 따라 다르다고 알려져 있다. 특히, 회유성 어류인 연어과 어류 또는 기수지역에 서식하는 망둥어와 송어과 어류 등은 해수와 담수에서 서식이 가능하지만, 담수에 서식하는 잉어과 어류는 해수에서 서식할 수 없다. 이것은 어종에 따라 다른 염분저항성을 갖기 때문이다

(Boeuf and Payan, 2001). 본 연구에서 실험기간 동안 뱀장어는 다양한 염분농도에서 100% 생존율을 보였고, 붕어의 경우 100% 해수에서 1시간 후에 모두 사망하였지만 50% 해수에서는 생존율이 100%였다. 산천어는 24시간 후 100% 해수에서 생존율이 66%였고, 50% 해수에서는 생존율이 100%였다. 따라서 붕어는 고염분에 대한 적응성이 강하지 않으며, 뱀장어와 산천어는 붕어 보다는 고염분에 대한 강한 적응성을 가지는 것으로 추정된다.

일반적으로 어류는 삼투압 조절 호르몬인 PRL과 GH가 삼투압조절기관에 작용해서 환경수의 염분변화에 적응하는 것으로 알려져 있다. 본 실험 결과에서 뱀장어, 붕어, 산천어의 PRL과 GH의 mRNA 발현이 어중에 따라 다른 경향을 보였지만 삼투조절 호르몬이 단기간에 분비되어 급격한 염분변화에 적응한 것으로 생각된다. 경골어류의 PRL은 뇌하수체로부터 생산·분비되며, 낮은 삼투압환경에 적응할 때 분비가 촉진된다(Hirano, 1986; Ayson et al., 1993; Auperin et al., 1994). 한편, 틸라피아 실험에서 담수에서 해수로 틸라피아를 순치시키면, 혈장내 GH농도는 증가하고, 해수에서 담수로 다시 옮겼을 경우 큰 변화는 나타나지 않았다(Seale et al., 2002). 본 연구에서도 PRL과 GH의 mRNA 발현은 담수에서 해수로 염분을 변화시켰을 때 서로 다른 결과를 나타내었으며, PRL mRNA 발현은 뱀장어의 경우 24시간 후 담수 대조군에서 유의적으로 높았지만 붕어와 산천어의 경우, 담수 대조군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나, 뱀장어의 경우 GH mRNA 발현 변화는 PRL mRNA 발현 결과와 달리 염분변화에 따른 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 즉, 붕어와 산천어는 담수 대조군과 비교하여 해수에 수용된 그룹에서 유의적으로 GH 발현량이 높았다. 본 연구에서는 어중에 따라 PRL과 GH의 mRNA 발현이 서로 다른 결과를 보였는데, 이는 광염성 해산어인 복어(*Takifugu rubripes*)와 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 실험결과와 잘 부합되는 결과이다. 즉, 복어는 100% 해수보다 25% 해수환경에서 PRL mRNA 발현이 증가되었고, 또한 25% 해수보다 100% 해수에서 GH mRNA 발현이 증가되었다(Lee et al., 2006). 넙치의 경우 PRL mRNA 발현이 저염분에서 유의하게 증가되었지만 고염분에서 GH mRNA 발현이 유의적인 차이를 보이지 않았다(Cho et al., 2006). 따라서 3종의 어류에서 급격하게 삼투압 환경이 변화되었을 때 PRL과 GH가 단기간에 분비되어 삼투압을 조절하지만, 어중에 따라서 PRL과 GH의 mRNA가 서로 다르게 발현되어 높은 삼투압 환경에 적응하는 것으로 생각된다.

어류는 환경수의 염분이 변하면 이를 극복하기 위하여 저삼투압조절(hypo-osmoregulation)이나 고삼투압조절(hyper-osmoregulation)을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험 결과에서 뱀장어, 붕어, 산천어는 급격한 염분변화에 적응할 때 다른 삼투조절 능력을 가지고 있는 것으로 판단된다. 3종 어류 모두 담수 대조군에 비해 환경수의 염분이 증가된 그룹에서 유의적으로 증가하였지만, 특히 주목할 부분은, 혈청 삼투압 농도의

증가율이 24시간후 50% 해수 그룹에서 큰 차이를 보였다. 즉, 뱀장어와 산천어의 증가율은 각각 19%와 9% 였지만 붕어는 50%의 증가율을 나타내었다. 이것은 어류에 따라 삼투조절 능력이 다르기 때문이며, 이러한 결과는 무지개송어(Madsen and Naamansen, 1989)와 송어(Lee et al., 1997)의 삼투압 조절 연구와 상응하는 결과이다.

경골어류의 삼투압 조절은 아가미, 소화관 및 신장 등과 같은 여러 기관에 의해 이루어지는데 Lee et al. (2006)의 실험 결과에서 복어를 저염분환경에 적응시켰을 때 삼투조절 호르몬과 삼투압의 변화뿐만 아니라 아가미 염류세포의 Na^+/K^+ -ATPase 활성이 저하되고, 세포의 개구부 크기는 작아지며, 그 수 또한 적어지면서 어체 내의 이온유출이 억제되는 메커니즘이 알려져 있다. 이처럼 삼투압 조절은 다양한 조직과 기관에서 통합적으로 이루어진다. 따라서, 다른 환경에 서식하는 어류의 염분환경 변화에 따른 어체의 삼투적응을 더욱 잘 이해하기 위해서는 삼투압 조절과 관련된 어체의 다른 기관이나 조직의 연구가 in vivo 뿐만 아니라 in vitro 실험에서도 종합적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 정리하면 뱀장어, 붕어, 산천어는 급격한 염분변화에 적응하기 위해서 삼투조절 호르몬인 PRL과 GH가 단기간에 합성되고, 체내 삼투압이 일시적으로 증가하였다. 그러나, PRL의 감소와 GH의 증가가 뱀장어와 붕어 보다 산천어에서 관련되어 있을 것으로 추정되며, 향후 더욱 세부적인 연구가 필요할 것이다.

사 사

실험장소와 실험어를 할애해주신 영동내수면연구소 관계자 분들께 심심한 사의를 표합니다. 저자 박우동은 교육인적자원부 2단계 BK21핵심사업의 수혜학생임을 밝히며 사의를 표합니다. 본 연구의 일부는 국립수산물품질관리원 내수성어류 양식 기술개발의 지원(RP-2008-AQ-001)에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Auperin, B., F. Rentier-Delrue, J.A. Martial and P. Prunet. 1994. Evidence that two tilapia (*Oreochromis niloticus*) prolactins have different osmoregulatory functions during adaptation to a hyperosmotic environment. *J. Mol. Endocrinol.*, 12, 13-24.
- Ayson, F.G., T. Kaneko, M. Tagawa, S. Hasegawa, E.G. Grau, R.S. Nishioka, S.K. David, H.A. Bern and T. Hirano. 1993. Effects of acclimation to hypertonic environment on plasma and pituitary levels of two prolactins and growth hormone in two species of tilapia, *Oreochromis mossambicus* and *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89, 138-148.
- Boeuf, G. and P. Payan. 2001. How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol. C*

- Toxicol. Pharmacol., 130, 411-423.
- Chang, Y.J., B.H. Min, H.J. Chang and J.W. Hur. 2002. Comparison of blood physiology in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) reared in converted freshwater from seawater and seawater from freshwater. J. Kor. Fish. Soc., 35, 595-600.
- Chang, Y.J. and J.W. Hur. 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearing water. J. Kor. Fish. Soc., 32, 310-316.
- Cho, Y.M., J. Shin and Y.C. Sohn, 2006. Gene expression levels of growth hormone, prolactin and their receptors of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by salinity changes. J. Kor. Fish. Soc., 39, 326-332.
- Helms, L.M., E.G. Grau and R.J. Borski. 1991. Effects of osmotic pressure and somatostatin on the cAMP messenger system of the osmosensitive prolactin cell of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Gen. Comp. Endocrinol., 83, 111-117.
- Hirano, T. 1986. The spectrum of prolactin action in teleosts. Prog. Clin. Biol. Res., 205, 53-74.
- Jarvis, P.L. and J.S. Ballantyne. 2003. Metabolic responses to salinity acclimation in juvenile shotnose sturgeon *Acipenser brevirostrum*. Aquaculture, 219, 891-909.
- Kawauchi, H. and S.A. Sower. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. Gen. Comp. Endocrinol., 148, 3-14.
- Lee, Y.C., Y.J. Chang and B.K. Lee. 1997. Osmoregulation capability of juvenile grey mullets (*Mugil cephalus*) with the different salinities. J. Kor. Fish. Soc., 30, 216-224.
- Lee, K.M., T. Kaneko and K. Aida. 2006. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*. Gen. Comp. Endocrinol., 146, 318-328.
- Madsen, S.S. and H.A. Bern. 1992. Antagonism of prolactin and growth hormone: impact on seawater adaptation in two salmonids, *Salmo trutta* and *Oncorhynchus*. Zool. Sci., 9, 775-784.
- Madsen, S.S. and E.T. Naamansen. 1989. Plasma ionic regulation and gill Na^+/k^+ -ATPase changes during rapid transfer to sea water of yearling rainbow trout, *Salmo gairdneri*: time course and seasonal variation. J. Fish Biol., 34, 829-840.
- Maina, J.N. 1990. A study of the morphology of the gills of an extreme alkalinity and hyperosmotic adapted teleost *Oreochromis alcalicus grahami* (Boulenger) with particular emphasis on the ultrastructure of the chloride cells and their modifications with water dilution. A SEM and TEM study. Anat. Embryol., 181, 83-98.
- Manzon, L.A. 2002. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. Gen. Comp. Endocrinol., 125, 291-310.
- Morgan, J.D. and G.K. Iwama. 1991. Effects of salinity on growth, metabolism, and ion regulation in juvenile rainbow trout and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fall chinook salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48, 2083-2094.
- Partridge, G.J. and G.I. Jenkins. 2002. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream (*Acanthopagrus butcheri*). Aquaculture, 210, 219-230.
- Seale, A.P., L.G. Riley, T.A. Leedom, S. Kajimura, R.M. Dores, T. Hirano and E.G. Grau. 2002. Effects of environmental osmolality on release of prolactin, growth hormone and ACTH from the tilapia pituitary. Gen. Comp. Endocrinol., 128, 91-101.
- Toften, H., A.M. Arne sen and M. Obling. 2003. Feed intake, growth and ionoregulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in relation to dietary addition of a feeding stimulant and time of seawater transfer. Aquaculture, 217, 647-662.
- Tsuzuki, M.Y., K. Ogawa, C.A. Strussmann, M. Maita and F. Takashima. 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adults in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Aquaculture, 200, 349-362.
- Yada, T., T. Hirano and E.G. Grau. 1994. Changes in plasma levels of the two prolactins and growth hormone during adaptation to different salinities in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Gen. Comp. Endocrinol., 93, 214-223.

2007년 12월 15일 접수
2008년 2월 13일 수리