

## 고주파 처리에 따른 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 생리적 스트레스의 생화학적 분석

김용균\* · 손예림 · 서삼열 · 박복리 · 박정아  
 안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

### Biochemical Analysis of Physiological Stress Induced by High Frequency Sound Treatment in the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*

Yonggyun Kim\*, Yerim Son, Samyeol Seo, Bokri Park and Junga Park

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

**ABSTRACT:** High frequency sounds disrupt physiological processes, such as feeding behavior, development and immune responses of *Spodoptera exigua*. We analyzed high frequency sounds with respect to biochemical changes in *S. exigua*. High frequency sound (5,000 Hz, 95 dB) suppressed protein synthesis and secretion of midgut epithelium. It also significantly inhibited a digestive enzyme activity of phospholipase A<sub>2</sub>. The gene expression of three different heat shock proteins and apolipoprotein III was altered, particularly in midgut tissue in response to high frequency sound treatments. High frequency sound treatments significantly increased sugar and lipid levels in hemolymph plasma. These results suggest that high frequency sounds are a physiological stress that induces biochemical changes in *S. exigua*.

**Key words:** Sound, Protein, Sugar, Lipid, Heat shock protein, *Spodoptera exigua*

**초록:** 고주파 처리는 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 생리변화를 유발시켜 섭식행동, 발육 및 면역반응의 변화를 초래한다. 본 연구는 이러한 고주파의 영향을 파밤나방의 생화학적 변화를 통해 분석했다. 고주파(5,000 Hz, 95 dB) 처리는 중장 상피세포의 단백질 합성과 분비를 억제시켰다. 또한 이 고주파 처리는 중장의 인지질분해(phospholipase A<sub>2</sub>) 소화효소의 활성을 현격하게 억제시켰다. 고주파 처리는 세 종류의 열충격단백질과 지질운송단백질(apolipoprotein III)의 유전자 발현을 변동시켰고 이러한 변화는 중장 조직에서 뚜렷했다. 혈림프 혈장에 존재하는 지질 및 유리당의 함량이 고주파 처리에 의해 현격하게 증가했다. 이러한 결과는 고주파 처리가 파밤나방의 체내 생화학적 변화를 유발시켜 생리적 교란을 유도하는 스트레스로 작용한다는 것을 제시하고 있다.

**검색어:** 음파, 유리당, 지질, 열충격단백질, 파밤나방

소리는 일부 곤충들이 사용하는 통신 수단이다. 곤충이 발산하는 소리는 크게 충돌음, 마찰음 그리고 진동음을 나눌 수 있다. 충돌음은 곤충의 몸 부위를 다른 부위에 부딪치면서 나오는 소리를 일컫는다. 예를 들어 여치류(*Meconema thalassinum*)가 풀잎 위에 앉아서 뒷다리로 잎 표면을 일정한 속도로 두드리면서 나오는 낮은 주파수의 음파가 주변의 같은 종에게 통신

신호로 이용되는 경우(Sismondo, 1980)로서 충돌음 통신으로 볼 수 있다. 반면에 몸의 상호 부위가 줄과 마찰편의 구조를 지닐 때 이 두 부위를 비비면서 발생하는 소리는 마찰음이 되며, 메뚜기와 귀뚜라미 등 많은 종류의 곤충이 이러한 소리로 교신하게 된다(Haskell, 1957; Stephen and Hartley, 1995). 진동음은 얇은 진동막을 활처럼 진동시키며 발생하는 소리로서 매미류에서 찾아 볼 수 있다(Young and Bennet-Clark, 1995). 반면에 소리를 감지하는 곤충의 청각은 소리의 물리적 신호를 전기적 신호로 전환하는 감각기와 이를 뇌로 이송하는 신경전달과

\*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received January 28 2012; Revised June 15 2012  
 Accepted July 3 2012

정 및 이에 상응한 행동 반응으로 이어지게 된다. 청각 수용은 고막, 기계감각털, 박각시류의 아랫입술수염 및 모기류의 존스 턴기관 등 곤충에 따라 다양하게 존재한다(McIver, 1985). 따라서 소리 발생과 청각이 짝을 이루면서 의사소통이 이뤄지며, 이때 소리를 이용한 통신은 종 특이적 주파수와 진동수를 갖게 된다(Jang, 2011).

스트레스 음파는 소리 수신자가 가청 범위에 속하나 참의사 소통이라기 보다는 오히려 정상적 생리 현상을 교란시킬 수 있는 소리로 정의될 수 있다. 스트레스 음파에 대한 연구는 척추동물 중심으로 연구되었다. 쥐의 경우 급성 스트레스 음파에 대해서 스트레스성 무통각증(antinociception)을 유발하는 반면, 장시간 스트레스 음파노출에 대해서는 반대로 만성통증(fibromyalgin) 또는 류마티스 관절염을 유발하여 스트레스 음파가 신경계와 면역계에 해로운 영향을 줄 수 있다고 밝혔다(Khasar et al., 2005).

스트레스 음파가 곤충 생리적 현상에 미치는 현상이 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 아메리카잎굴파리, 복숭아혹진딧물에서 분석되었다. 이들 곤충류는 모두 5,000 Hz의 주파수 소리에 생리적 반응이 교란되는 현상을 보였다. 파밤나방의 경우 유충의 섭식 활동이 둔화되고, 이에 따라 발육이 지연되며 면역 활동이 낮아지는 현상을 보였다(Park et al., 2011a). 이들 곤충류는 스트레스 음파에 노출될 경우 살충제에 대한 내성이 낮아져서 살충제의 방제 효과를 높여주는 응용적 효과도 보여 주었다.

이러한 기존 연구를 바탕으로 본 연구는 스트레스 음파가 보여주는 생리적 교란 현상이 체내 생화학적 변화에 기인되었을 것이라는 가설을 세우고 이를 증명하려 수행되었다. 스트레스 음파에 대해 먼저 섭식 행동에 저하를 주는 원인을 찾고자 소화관의 단백질 합성 및 분비 능력을 이차원 전기영동으로 분석했다. 또한 소화관에 존재하는 소화효소의 활성을 인지질분해효소를 대상으로 분석했다. 스트레스에 대해서 반응하는 단백질들을 대상으로 고주파 처리에 따른 이들 단백질 유전자의 발현을 분석했다. 끝으로 혈림프의 혈장에 존재하는 단백질, 탄수화물 및 지질의 함량을 분석하여 이들의 변화가 스트레스 음파와 관련이 있는지를 규명하였다. 본 연구 결과는 곤충이 고주파에 대해서 스트레스 반응을 보인다는 것을 생화학적으로 보여주었다.

## 재료 및 방법

### 파밤나방 사육

유충을 1994년 안동시에 소재한 파(*Allium fistulosum* L.)

재배지에서 채집한 후 실내에서 인공사료(Goh et al., 1990)를 먹이로 파밤나방 유충을 누대 사육하였다. 사육 배양기의 조건은 온도 25±1℃, 광주기 16:8 h (L:D) 이었다. 성충의 먹이로 10%의 설탕물을 산란상자에 공급하였다.

### 음파처리

(주)그린테크로부터 제공받은 음파기기는 데시벨 측정기, 음파처리구(45×90 cm), 음파송출기로 구성되어 있다(Park et al., 2011a). 분석된 파밤나방은 모두 5령충이고 실내온도 25℃에서 주파수는 95 dB로 고정하고 5,000 Hz의 음파에서 24 시간을 노출시켜 생리변화를 관찰하였다.

### 이차원 전기영동 분석

스트레스 음파(5,000 Hz, 95 dB)로 파밤나방 5령 유충을 24 시간 처리한 후, 증장 내강과 상피세포에서 단백질 추출물을 얻었다. 증장 상피세포층은 인산완충용액(100 mM phosphate, 0.7% NaCl, pH 7.4)으로 세척한 후 동일한 완충 용액에서 조직을 분쇄하고 단백질을 추출하였다. 추출액은 12,500 x g의 원심분리로 상등액을 얻고, 이를 다시 인산완충용액으로 희석하여 효소활성 측정에 이용하였다. 증장 내강 물질은 12,500 x g의 원심분리로 상등액을 얻은 후 다시 인산완충용액으로 희석하여 단백질 분석에 이용하였다. 이 추출액을 10% trichloroacetic acid에서 단백질을 침강시켜, 침전 단백질을 시료완충용액(8 M urea, 4% CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, IPG buffer pH 3-10, 40 mM dithiothreitol (DTT))으로 용해시켰다. 이 수용성 단백질은 Bradford (1976) 분석법으로 단백질을 정량하였다. 이차원 전기영동은 isoelectric focusing (IEF)과 Ettan IPGphor II IEF System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용해 분석했으며, 단백질량은 300 µg, 분리는 총 18 시간 동안으로 100 V에서 1 시간 처리, 500 V에서 1 시간, 다시 1 kV에서 1 시간, 2 kV에서 2 시간 4 kV에서 2 시간, 6 kV에서 1 시간, 8 kV에서 8 시간으로 총 8단계로 구성되었다. IEF는 전용 막대젤(13 cm, pH gradient 3-10, Immobiline Drystrip, GE Healthcare)을 이용하였다. 변성 SDS-PAGE로 진행하기 전에 IEF 막대젤은 SDS 평형완충용액(6 M urea, 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, 10 mg/mL DTT)에 15 분간 침지하였다. 비변성 조건에 포화된 IEF 막대젤은 0.7% agarose 용액으로 12.5% SDS-PAGE 겔에 부착되었다. 이후 10 mA/gel로 1 시간 전기영동이 실시되고 이후 25 mA/gel로 5 시간 추가로 단백질 분리가 실시되었다. 전

기영동 후 젤은 silver 염색법(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 제조사의 사용 방법에 따라 분리 단백질을 검출하였다.

### 중장 인지질분해효소 활성 측정

중장 단백질의 추출은 이차원 전기영동 분석 시료의 방법과 동일하게 준비하였다. 내강 시료는 12,500 x g에서 5 분간 원심 분리한 후 상등액을 분리하여 인지질분해효소(phospholipase A<sub>2</sub>: PLA<sub>2</sub>) 활성 측정에 이용하였다. 측정 시료는 20  $\mu$ l의 10% bovine serum albumin, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)은 1,946  $\mu$ l, 1 M CaCl<sub>2</sub> 12  $\mu$ l, 중장시료를 20  $\mu$ l 섞은 후 마지막으로 2  $\mu$ l pyrene 표지된 기질(1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-sn-glycerol-3-phosphatidyl choline)을 넣은 후 10 분 동안 반응시켜 분광형광광도계(Aminco Bowman Series 2 Luminescence Spectrophotometer, FA257, Spectronic Instruments, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때 분광형광광도계는 345 nm의 입력광에 대해서 나타나는 형광을 398 nm에서 검출하였다. 이때 PLA<sub>2</sub> 효소활성은 Radvanyi *et al.* (1989)의 계산법으로 산출하였다.

### 스트레스 음파처리에 따른 파밤나방의 열충격단백질 (hsp70, 74, 83)과 ApoLpIII 유전자 변화 분석

파밤나방 5령 유충을 각 10 마리 씩 음파(0-5,000 Hz)에 24 시간동안 노출 시킨 후 각 조직별(혈구, 지방체, 소화관, 표피)로 Trizol 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 회사의 추천 방법으로 RNA를 추출하였고, 추출된 RNA는 정량 분석한 후 탈이온증류수를 이용하여 약 90 ng/ $\mu$ l로 희석하여 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하여 PCR에 이용하였다. 열충격단백질(hsp) 가운데 hsp70, hsp74, hsp83 유전자를 특정 프라이머(Xu *et al.*, 2011)를 이용하여 증폭하였다. 이때 프라이머 서열은 SexHsp70은 5'-CAT GAA TCC TCG CGC ACT GC-3', 5'-CCT TGT CGT TCT TGA TCA CG-3', SexHsp74는 5'-CCT ACC TGA ACA CCT CAG T-3', 5'-GGG ATC GTA GTA TTT CTG GTG-3', SeHsp83은 5'-GCT GAC ATT AGC ATG ATT GG-3', 5'-GGC AGG TCC TCA CTG TCT AC-3'이다. 또한 Apolipoprotein-III (ApoLpIII) 유전자의 특정 프라이머를 이용하였다. 이때 프라이머 서열은 5'-ATG GTC GCC AAG TTG TTC GTG-3', 5'-CTG CTT GTT GGC AGC CTC-3'이다. 각 PCR 시료의 구성은 다음과 같았다. cDNA 1  $\mu$ l, dNTP 2.5  $\mu$ l, 10x PCR 완충용액 2.5  $\mu$ l, 프라이머 각각 1  $\mu$ l (25 pmol/ $\mu$ l), Taq polymerase 0.5  $\mu$ l, 3차 증류수 16.5  $\mu$ l로 구성되었다. PCR 반응조건은 초기 94°C에서 2

분 동안 불활성단계를 거친 후, 35 반복으로 증폭 단계를 거쳤다. 증폭과정은 94°C에서 1 분 동안 변성단계와 프라이머 결합 반응은 hsp70, hsp74, hsp83, 및 ApoLpIII가 각각 47, 45, 48, 53°C에서 1 분, 72°C에서 1 분의 사슬연장 단계로 구성되었다. 이후 최종 사슬연장 단계가 추가로 72°C에서 10분 동안 이어졌다. PCR 생성물은 1x TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 1% 아가로즈젤로 확인하였다.

### 혈장 단백질 함량 분석

파밤나방 5령 유충 10 마리를 음파(0-5,000 Hz)에 24 시간 동안 노출시킨 후 혈립프를 추출하였다. 측정 시료는 1 ml의 1x Bradford 용액과 20  $\mu$ l의 혈장을 넣은 후 5 분 동안 상온에서 반응시켜 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 정량분석의 표준용액은 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea)을 이용하여 단백질 함량 표준 방정식을 얻었다.

### 혈장 지질 함량 분석

파밤나방 5령 유충 10 마리를 음파(0-5,000 Hz)에 24 시간 동안 노출 시킨 후 혈립프를 추출하였다. 측정 시료는 100  $\mu$ l의 혈장과 100  $\mu$ l의 지질추출용액(chloroform : methanol (1:1), v/v)을 5 분 동안 반응시킨 후 12,500 x g에서 5 분 동안 원심분리를 하였다. 원심분리된 상등액을 95°C의 항온수조에서 20 분 동안 반응시킨 후 200  $\mu$ l의 황산을 넣고 95°C의 항온수조에서 10 분 동안 다시 반응시켰다. 상온으로 옮긴 후 5 ml의 vanillin 용액(600 mg vanillin, 400 ml phosphoric acid)을 첨가 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 linseed oil (0 - 500  $\mu$ g)을 사용하여 지질 함량 표준 방정식을 얻었다.

### 혈장 유리당(free sugars) 함량 분석

파밤나방 5령 유충을 각 10 마리 씩 음파(0-5,000 Hz)에 24 시간동안 노출 시킨 후 혈립프를 추출하였다. 측정 시료는 100  $\mu$ l의 혈장에 300  $\mu$ l의 2% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 600  $\mu$ l의 methanol을 첨가한 후 5 분 동안 반응시켰다. 이후 12,500 x g에서 5 분 동안 원심분리를 하였다. 상등액을 유리당 분석에 이용하였다. 상등액이 200-300  $\mu$ l가 되도록 95°C의 항온수조에서 50 분 동안 증발시켰다. 이후 상온으로 옮긴 후 5 ml의 anthrone 용액(750 mg anthrone, 380 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 ml 증류수)을 첨가한 후 625 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 포도당(0 - 500  $\mu$ g)을 이용하였다.

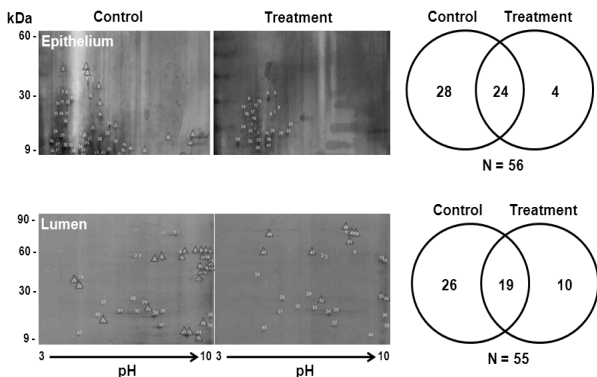
## 자료분석

처리에 따른 평균간 비교는 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 평균 간 비교는 Duncan의 다중 검정을 이용하였습니다. 자료의 도형화는 Sigma Plot 8.0 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA)을 이용하여 도식화하였다.

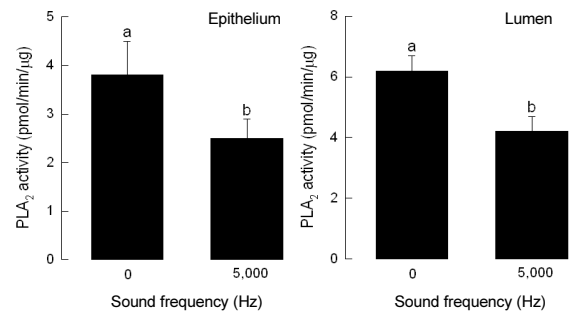
## 결과

### 고주파 처리에 따른 중장 단백질 변화

고주파 음파(5,000 Hz, 95 dB) 처리가 파밤나방의 중장 단백질 합성과 분비에 미치는 영향을 이차원 전기영동을 이용하여 분석하였다(Fig. 1). 이 스트레스 음파에 24 시간 노출 후 소화관을 적출하고 중장세포와 중장내강을 각각 분리하여 이차원 전기영동으로 분리하였다. 중장세포의 경우 비교적 작은 단백질(60 kDa 이하)의 단백질들이 분리되어 검출되었다. 전체적으로 세포내에는 56 개의 단백질이 검출되었다. 이 가운데 52 개는 대조구에서 발견되었고, 동일한 분석 조건에서 음파 처리구에서는 불과 28 개의 단백질만 검출되었다. 즉, 28 개의 단백질 처리구에서 검출되지 않은 반면, 4 개의 단백질은 음파 처리구에서 특이적으로 검출되었다. 내강에 존재하는 단백질을 분석한 결과 중장세포보다 큰 단백질들이 일부 나타났으며, 총 55 개의 단백질 검출되었다. 여기에도 마찬가지로 대조구(45 개)에서 처리구(29 개) 보다 많은 단백질이 검출되었다. 처리구는



**Fig. 1.** Influence of sound treatment (95 dB, 5,000 Hz, 24 h) on proteins in the midgut epithelium and luminal digestive juice of fifth instar *Spodoptera exigua* larvae. Proteins were separated by isoelectric focusing (IEF) and 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Triangles indicate specific proteins detected in each of the control and sound treatment larvae, respectively. Each treatment used 200  $\mu$ g proteins extracted from 50 larval tissues.



**Fig. 2.** Influence of sound treatment (95 dB, 5,000 Hz, 24 h) on catalytic activity of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) in the midgut epithelium and lumen of fifth instar *Spodoptera exigua* larvae. "0" sound treatment indicates the untreated control. Each treatment consisted of five individual midguts and was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (Duncan's multiple range test).

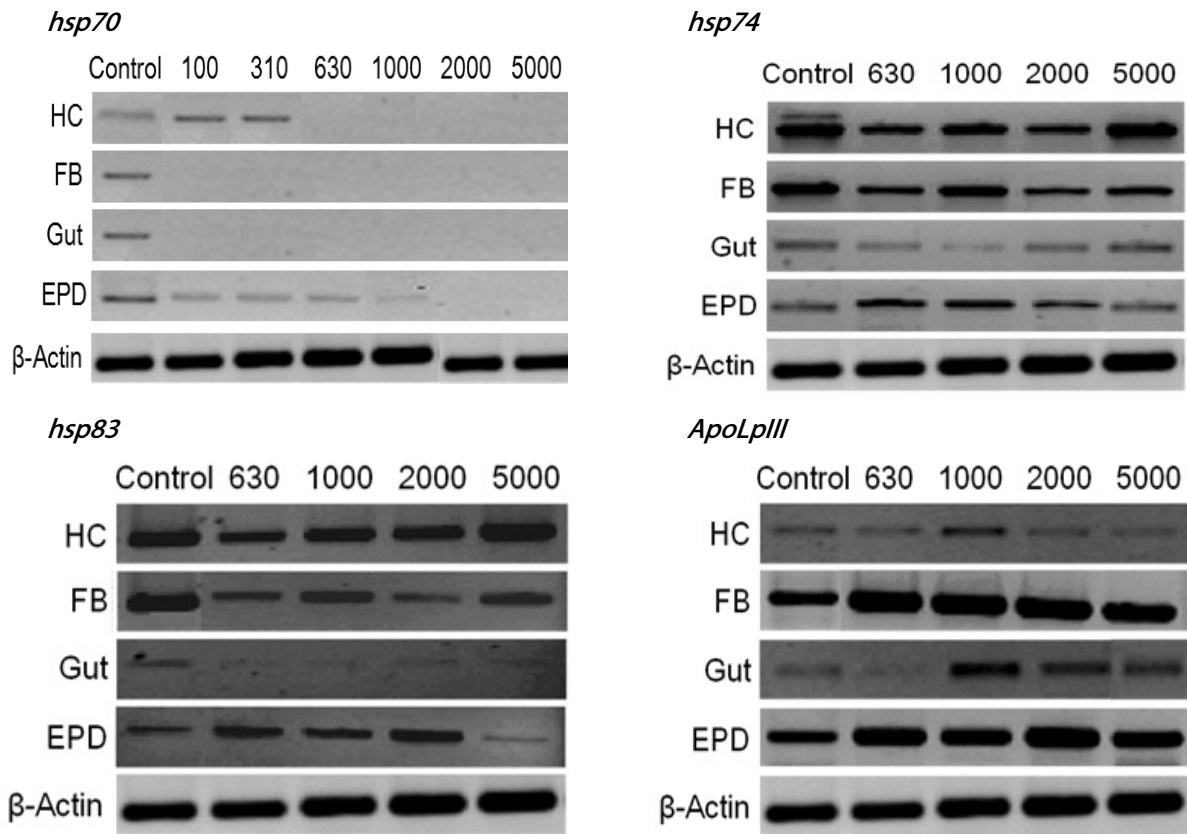
비록 26 개의 대조구 단백질을 보이지 않았으나 특이적으로 10 개의 단백질을 가졌다.

### 고주파 처리에 따른 중장의 인지질분해효소 활성 저하

고주파(5,000 Hz, 95 dB)를 24 시간 처리 후 중장 상피세포 및 중장 내강에 존재하는 PLA<sub>2</sub> 효소 활성변화를 분석하였다(Fig. 2). 파밤나방 중장 상피세포의 PLA<sub>2</sub> 효소 활성을 측정해 보면 대조구에서 약 3.8 pmol/min/ $\mu$ g의 PLA<sub>2</sub> 효소 활성을 보이는 반면, 처리구에서는 약 36%가 저하된 2.4 pmol/min/ $\mu$ g의 PLA<sub>2</sub> 효소 활성을 보였다(Fig. 2A). 중장 내강의 PLA<sub>2</sub> 효소 활성은 상피세포보다 높아 대조구의 경우 약 6.1 pmol/min/ $\mu$ g의 PLA<sub>2</sub> 효소 활성을 보이는 반면, 처리구에서는 다시 약 34%가 줄어든 4.0 pmol/min/ $\mu$ g의 PLA<sub>2</sub> 효소 활성을 보였다(Fig. 2B).

### 고주파 처리에 따른 파밤나방의 열충격단백질(hsp70, 74, 83)과 ApoLpIII 유전자 발현 변화

음파 처리에 따라 두 종류의 스트레스 관련 단백질의 유전자 발현 양상을 조사했다(Fig. 3). 조사된 4 종의 유전자들은 모두 음파 처리 없는 대조구에서 발현을 보였다. *hsp70*의 경우 음파 처리에 민감하게 발현량이 줄어들었다. 그러나 조직별로 감수성 정도가 달라 상이하여 혈구는 630 Hz 이상에서 발현량이 급격하게 줄어든 반면 표피세포는 모든 음파 처리에서 영향을 받았으나 특별히 1,000 Hz 이상에서는 거의 발현하지 않았다. 가장 민감한 조직은 지방체와 중장으로 모든 음파 처리구에서 발현을 보이지 않았다.



**Fig. 3.** Influence of sound treatment (95 dB) with different frequencies on expression of four different genes in different tissues of fifth instar *Spodoptera exigua* larvae. The expression of three heat shock proteins (hsps) and apolipoprotein III (ApoLpIII) was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The four different tissues were hemocyte (HC), fat body (FB), midgut (GUT) and epidermis (EPD).  $\beta$ -Actin expression was used to confirm cDNA integrity.

다른 유전자들은 음파처리에도 발현을 보였으나, 유전자의 종류와 조직에 따라 차이를 보였다. 특별히 중장 조직의 경우 다른 조직에 비해 발현량의 변화를 뚜렷이 나타냈다. *hsp74*는 음파 처리에도 불구하고 모든 조직에서 대조구와 유사한 발현 양상을 보였다. *hsp83*의 경우 혈구와 지방체는 변화를 보이지 않았지만, 중장의 경우 모든 음파 처리구에서 발현량이 크게 줄었고, 표피세포의 경우는 5,000 Hz에서 발현량이 줄었다. *ApoLpIII*는 중장에서만 음파 처리에 따른 변화를 보였다. 이 유전자는 1,000 Hz 이상의 처리에서 발현량이 크게 증가했다.

### 고주파 처리에 따른 혈장에 존재하는 주 영양소 함량 변화

음파처리에 따른 *fms* 파밤나방 혈장에 존재하는 전체 단백질 함량 변화를 분석한 결과, 처리 주파수에 상관없이 일정하게 약 0.44%의 단백질 함량을 보였다. 혈장 내 지질은 대조구에서 약 0.3%를 보였으나, 5,000 Hz의 음파 처리구에서는 현격하게 증가하여 약 0.8% 이상으로 증가하였다. 혈장에 존재하는 유리당

의 경우 약 0.16%를 보였으나 음파 주파수의 증가에 따라 증가했고, 2,000 Hz 이상에서는 약 0.5%로 증가했다.

### 고찰

특정 주파수 음파의 곤충 생리에 미치는 연구가 파밤나방을 비롯하여 아메리카잎굴파리(*Liriomyza trifolii*) 및 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)에서 진행되었다(Seok *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011a,b). 분석된 이들 곤충에서 고주파(특히, 5,000 Hz)는 발육 생리, 섭식 행동 및 산란 생리과정에 저해를 주었다. 본 연구는 특별히 발육 생리 저해에 관심을 두고 스트레스 음파가 이러한 생리적 저해에 미치는 영향이 생체 생화학적 변화에서 나타나는 지 여부를 조사했다.

고주파는 중장세포의 단백질 합성과 분비에 영향을 주었다. 중장 단백질은 상피세포와 내강의 단백질로 분리하여 분석하였다. 기본적으로 중장세포에서 생합성된 단백질이 중장 내강으로 분비된다는 점에서 이들 단백질의 음파 처리에 따른 차이

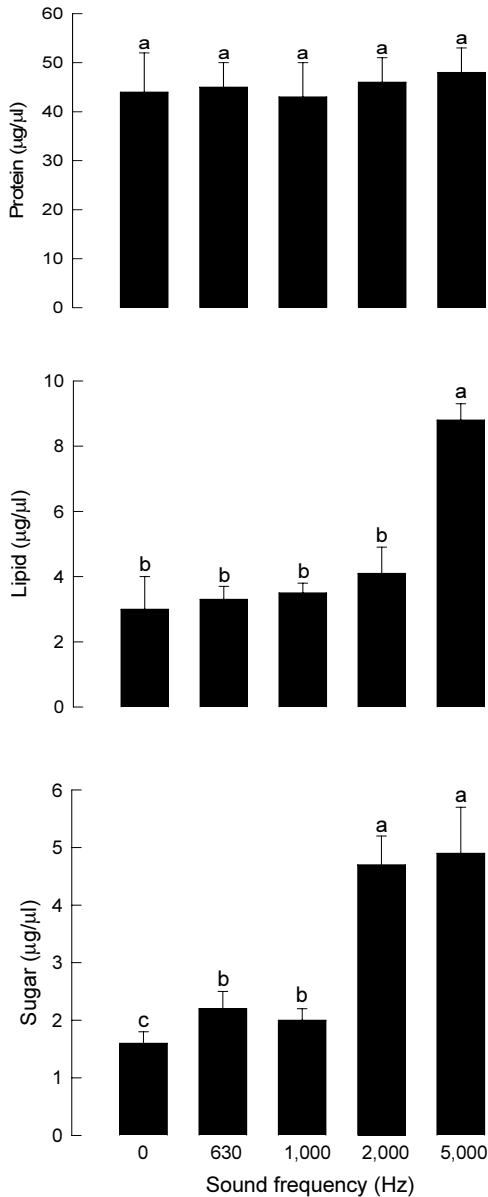
를 이차원 전기영동을 통해 분석하였다. 단백질의 전체 양상을 보면 중장세포와 내강에서 유사한 숫자의 단백질이 검출되었지만, 중장세포의 경우는 60 kDa 이하의 단백질이 검출되었고, 내강은 이 보다 범위가 넓은 90 kDa까지의 단백질도 검출되었다. 소화효소가 중장세포에서 분비될 것이고 이들 소화효소는 크게 단백질 분해효소, 탄수화물 분해효소 및 지질 분해효소를 갖게 된다. 단백질 분해효소는 다시 exopeptidase와 endopeptidase로 나누고, serine proteases, trypsin, chymotrypsin과 같은 endopeptidase가 음식물 속에 함유된 단백질을 작은 덩어리로 자르면, 이후 carboxypeptidase 또는 aminopeptidase와 같은 exopeptidase에 의해 최종 단백질 소화가 일어나게 된다(Tera, 1990). 이들의 분자 크기는 종마다 다양하지만, endopeptidase가 exopeptidase (> 100 kDa)에 비해 소형으로 20-35 kDa의 크기로 알려지고 있다(Applebaum, 1985). 탄수화물의 소화는 단백질 소화와 유사하게 amylase에 의해 이당류 또는 올리고당으로 소화되면, 다시  $\alpha$ -glucosidase에 의해 단당류로 소화된다. 곡물류를 섭식하는 바구미류(*Sitophilus oryzae*와 *S. granarius*)에서 amylase의 분자 크기는 약 56 kDa이었다(Baker and Woo, 2005). 지질의 분해는 중성지질의 경우는 일반 lipase, 그리고 인지질의 경우는 phospholipase (PL)에 의해 소화가 일어난다. 특별히 인지질 분해효소는 촉매하는 에스테르 결합 위치에 따라 PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLC 그리고 PLD 형으로 나뉘는 데, 본 연구에서 효소활성이 측정된 PLA<sub>2</sub>는 인지질 글리세롤 골격에서 두 번째에 위치한 에스테르 결합을 촉매하는 효소가 된다(Dennis, 1994). 박각시류(*Manduca sexta*)의 경우 일반 lipase는 75 kDa의 크기를 갖는다(Arrese *et al.*, 2001). 인지질분해 효소는 크기가 다양하나, PLA<sub>2</sub>의 경우는 분비성으로 소형(15-30 kDa)을 지니게 된다(Shrestha *et al.*, 2010). 본 연구에서 분석된 중장세포내 단백질은 대부분 60 kDa 이하인 반면 중장 내강에는 90 kDa 큰 분자가 있는 것은 중장세포에서 생성되는 여러 소형 소화효소에 먹이로부터 유래된 단백질이 내강에 존재하여 본 분석에 나타났을 것으로 사료된다. 이러한 조건에서 고주파의 음파 처리는 대조구에 비해서 중장의 두 영역에서 모두 적은 수로 나타나 중장세포에서의 단백질 합성을 억제하고, 합성된 단백질이 내강으로 분비되는 것을 억제하는 것으로 해석된다. 특별히 고주파 음파에 특이적으로 발현되는 단백질 중장세포와 내강에서 검출되었고 두 영역의 특이적 단백질들은 서로 상이했다. 이들 특이적 단백질들의 속성에 대한 연구는 각 단백질의 아미노산 서열을 분석한 후에 이해될 수 있을 것 같다. 결론적으로 고주파 음파는 중장의 일반적 단백질 합성조절을 교란하는 스트레스로 작용했다.

고주파의 중장에 대한 스트레스 작용은 PLA<sub>2</sub> 효소활성 분

석에서 뒷받침되고 있다. 소화작용에서 PLA<sub>2</sub>는 인지질을 분해하여 유리 지방산과 lysophospholipid로 분해한다. 지방산은 중장세포로 흡수되어 체내 중성지질 및 인지질의 합성으로 이어지게 된다. Lysophospholipid는 곤충에서 담즙의 작용을 하는 것으로 여겨진다(Stanley, 2006). 척추동물과 달리 담즙을 형성하지 않는 곤충은 비누화물질 구조를 지닌 이 물질이 지방을 유화하는 작용을 할 것으로 여겨져 먹이에 포함된 지방 소화에도 보조적 역할을 담당할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 고주파가 PLA<sub>2</sub> 활성을 낮추고 있다. 이는 인지질 분해를 억제함은 물론이고 전체 지질의 소화에도 억제효과를 줄 것으로 예상된다. 실제로 파밤나방의 경우, PLA<sub>2</sub> 억제 인자를 먹이에 주입할 경우 심각한 발육 지연 및 사망을 초래하였다(Kim and Kim, 2011). 고주파 음파가 PLA<sub>2</sub> 효소활성을 억제하는 것은 이 효소 분자에 직접 작용하여 촉매력을 억제하는 가능성과 중장세포에서 이 효소의 단백질 합성을 억제하는 것으로 나누어 볼 수 있다. 고주파가 분자에 직접 작용하는 지는 본 연구로서 판단할 수 없다. 그러나 후자의 단백질 합성 교란의 가능성은 있다. 즉, 앞의 이차원전기영동 분석 결과에 의하면 고주파가 중장세포의 단백질 합성 능력을 억제하는 것으로 내강으로 분비되는 PLA<sub>2</sub>의 총량이 낮아져 효소의 활성이 저하되는 것으로 판단된다.

고주파가 파밤나방에 생리적 스트레스로 작용하였는지를 파밤나방이 갖는 스트레스 관련 유전자들의 발현 분석으로 이뤄졌다. 열충격단백질(HSP)은 고온, 저온, 건조, 영양 결핍 등의 요인에 의해 발현되는 스트레스 관련 단백질이다(Feder and Hofmann, 1999). 이들의 본래 기능은 세포의 단백질 합성에 관여하여 단백질의 3차구조를 정상적으로 이루게 하는 chaperone 역할을 담당하게 된다(Hartl and Hayar-Hartl, 2002; Walter and Buchner, 2002). 이러한 열충격단백질은 일반적으로 4부류로 분류되어 분자량이 20-30 kDa되는 소형 HSP와 분자량이 60 kDa의 HSP60, 70 kDa의 HSP70 그리고 83 kDa의 HSP83을 포함하게 된다(Xu *et al.*, 2011). 본 연구에서는 파밤나방에서 밝혀진 3 가지 hsp 유전자들을 대상으로 음파 처리에 따른 발현을 분석하였다. hsp74 유전자를 제외하고 hsp70과 hsp83은 음파 처리에 따라 발현량이 억제되었다. 특별히 중장의 경우는 이러한 음파 처리에 민감하게 반응했다. 음파 처리에 따른 hsp 유전자들의 발현 억제는 파밤나방이 스트레스에 대해 대처하는 능력을 잃게 되는 생리적 악영향을 유발하게 된다. 고주파에 대한 중장의 민감도는 ApoLpIII 유전자 발현에서도 나타났다. ApoLpIII는 지질 운송단백질의 구성원으로 비교적 분자량이 큰 ApoLp I과 II로 구성된 곤충의 혈장 지질운송체인 고밀도 리포포린(high density lipophorin)에 지질이 결합하여 저밀도 리포포린으로 전환될 때 지질의 단백질 결합을 견고하게 하

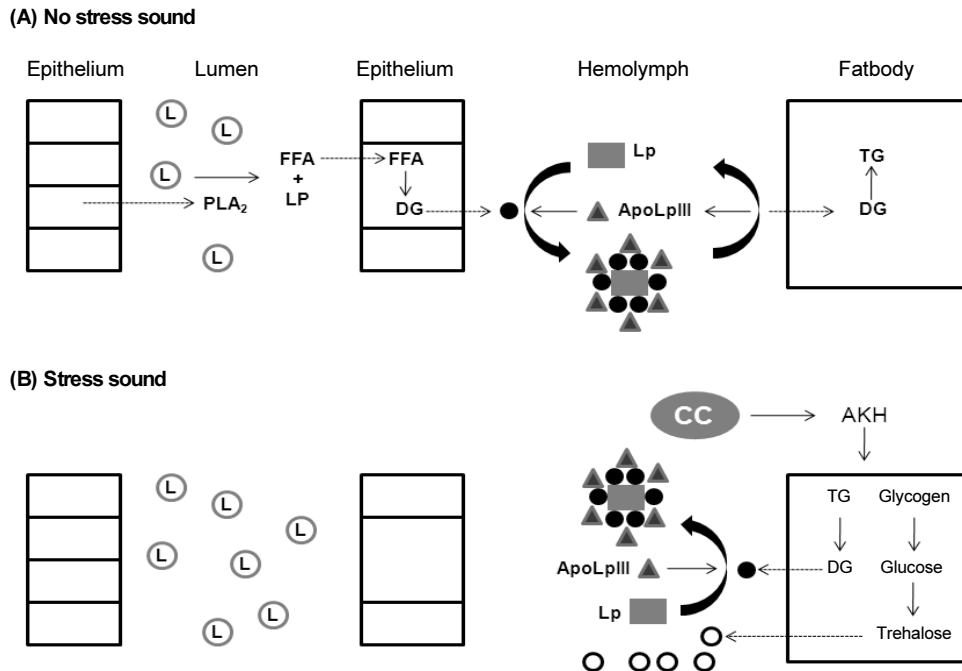
여주는 역할을 담당하게 된다(Weers and Ryan, 2006). 또한 ApoLpIII는 세균의 외막에 존재하는 지질다당체를 인식하는 면역물질로도 기능을 담당하고 있다(Halwani and Dunphy, 1999; Halwani *et al.*, 2000). 파밤나방에서 ApoLpIII의 발현을 RNA interference로 억제하여 주면 면역력이 크게 저하되고 발육이 억제되는 현상이 보고되었다(Son *et al.*, 2012). 고주파 음파는 이 단백질의 발현을 증가시켰다. 즉, 스트레스 환경 속에



**Fig. 4.** Influence of sound treatment (95 dB) with different frequencies on nutrient contents in hemolymph plasma of fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*. '0' sound treatment indicates non-treated control. Each treatment consisted of 10 individuals. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (Duncan's multiple range test).

이 물질이 면역 또는 지질 운송에 관여할 준비를 유도하는 것으로 해석된다. 실제로 혈림프의 지질 함량이 고주파 처리에 따라 증가했다. 즉, 이러한 지질 함량 증가는 곤충이 스트레스에 대처하려는 대사적 준비로 여겨지고, 이를 원활히 운반하려면 ApoLpIII의 양적 증가가 수반되어야 한다. 따라서 고주파 음파 처리에 대해서 ApoLpIII 유전자 발현량의 증가는 생리적 스트레스가 처리 파밤나방 내에서 일어나고 있다는 것으로 해석된다. ApoLpIII가 혈림프에 증가된 지질 운송에 참여하게 될수록 이들의 면역 작용에 기여도는 낮아져서 외래 병원체 침입에 대해서 대처 능력이 떨어지는 면역 결핍으로 이어질 수 있다(Adamo *et al.*, 2008). 이러한 현상은 이전 연구에서 보여준 스트레스 음파 처리에 따른 면역 저하 현상으로 설명되어 진다(Park *et al.*, 2011a).

음파 처리에 따라 혈림프에서 일어나는 생화학적 변화가 주요 영양물질을 대상으로 추적했다. 무처리구 파밤나방 유충 혈장에 존재하는 영양물질의 함량을 퍼센트 농도로 환산하여 보면 가장 많이 존재하는 것이 단백질이고 다음으로 지질 그리고 혈당으로 이어졌다. 혈장에 존재하는 단백질의 함량은 음파와 무관했다. 그러나 유리당과 지질은 음파 처리에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 혈장의 지질과 혈당 증가 현상은 음파 처리가 파밤나방에게 스트레스로 작용하는 데서 기인될 수 있다. 스트레스에 관련되어 곤충에서 분비되는 주요 호르몬은 기질동원호르몬(adipokinetic hormone: AKH)이다(Gäde *et al.*, 1997). 지질과 혈당을 높여주는 AKH는 체내 이화 작용을 높여주는 생리적 변화를 유발시켜 스트레스에 대처하게 한다(Velki *et al.*, 2011). 이러한 현상을 본 연구에서 분석한 스트레스 인자인 고주파 음파에 적용하여 생화학적 변화를 유도하는 가설을 세웠다(Fig. 5). 스트레스 음파가 없을 때에는 먹이에 존재하는 지질이 중장세포에서 분비되는 PLA<sub>2</sub>에 의해 분해되고, 이때 유리되는 lysophospholipid ('LP')는 다시 담즙으로 작용하여 다른 지질의 소화를 돕게 된다. 유리된 지방산은 중장세포로 흡수되어 중성지질의 일종인 diacylglycerol ('DG')로 전환되고 혈장으로 이동하게 된다. 혈장에 들어온 DG는 고밀도 리포단백에 결합하고 다시 ApoLpIII의 도움을 받아 저밀도 리포단백으로 전환되어 지방체로 이동한다. 지방체에서는 DG를 받아들이고, 전달 기능을 마친 리포단백은 다시 구성 요소로 분해된다. 지방체에서는 DG가 동화작용을 통해 중성지질인 triacylglyceride (TG)로 전환되어 저장된다. 반면에 파밤나방이 스트레스 음파에 노출되면 PLA<sub>2</sub>의 효소활성이 저하되고 이에 따라 중장의 지질 소화와 흡수가 억제된다. 그러나 고주파에 따른 스트레스로 내분비기관인 카디아체(corpora cardiaca: CC)에서는 AKH를 분비하고 이 호르몬의 작용 기관인 지방체로 하여금 이화작



**Fig. 5.** A working hypothesis of stress sound effect on biochemical changes in hemolymph plasma of fifth instar *Spodoptera exigua* larvae. (A) Without sound, diet lipid (L) in midgut lumen is digested by phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) into free fatty acids (FFA) and lysophospholipids (LP). FFA are then metabolized to diacylglyceride (DG), which is then released into the plasma. In the plasma, high density lipoprotein (Lp) is associated with DG and becomes low density Lp with the help of apolipoprotein III (ApoLpIII). Low density Lp delivers DG to the fat body, where it is changed to triacylglyceride (TG). (B) With the stress of sound, diet lipids are incompletely digested due to suppressed catalytic activity of PLA<sub>2</sub>. In response to the stressor, the corpora cardiaca (CC) releases adipokinetic hormone (AKH), which activates fat body catabolic pathways, in which TG and glycogen are broken down to DG and glucose. Glucose is then combined to form trehalose, which is released to plasma.

용을 촉진시켜 저장된 TG나 글리코젠(glycogen)에서 DG와 포도당을 유리시키고, 포도당은 다시 곤충의 혈당인 trehalose로 전환되어 혈림프로 방출되게 된다. 이러한 결과로 스트레스 음파에 노출된 파밤나방은 혈장의 지질 함량과 유리당의 농도가 올라가는 스트레스 대처 상태로 전환되게 된다. 이러한 가설을 증명하기 위해서는 추후 스트레스 음파와 AKH의 혈장 농도 사이의 관계가 규명되어야 한다.

본 연구는 고주파의 음파가 파밤나방으로 하여금 생리적 스트레스 음파로 작용할 수 있다는 것을 체내 생화학적 변화로 나타낸다는 사실을 보여 주었다. 그러나 스트레스 음파를 감지하여 이러한 생화학적 변화를 유도하는 본체에 대해서는 추후 연구에서 이뤄져야 할 부분이다. 또한 스트레스 음파가 생체 분자에 직접 미치는 영향도 추후 연구에서 규명되어야 할 부분이다.

## 사사

본 연구는 2012년도 농촌진흥청 아젠다과제에서 지원한 연구과제로 수행되었다. 음파 처리 시설을 대여하여 준 (주)그린테코에 감사의 말씀을 드립니다.

## Literature Cited

- Adamo, S.A., J.L. Roberts, R.H. Easy and N.W. Ross. 2008. Competition between immune function and lipid transport for the protein apolipoprotein III leads to stress-induced immunosuppression in crickets. *J. Exp. Biol.* 211: 531-538.
- Applebaum, S.W. 1985. Biochemistry of digestion. pp. 279-311. *In* Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 4, eds. by G.A. Kerkut and L.I. Gilbert. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Arrese, E.L., L.E. Canavoso, Z.E. Jouni, J.E. Pennington, K. Tsuchida and M.A. Wells. 2001. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 7-17.
- Baker, J.E. and S.M. Woo. 2005. Purification, partial characterization, and postembryonic levels of amylases from *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2: 415-428.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 71: 248-254.
- Dennis, E.A. 1994. Diversity of group types, regulation and



- function of phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biochem.* 269: 13057-13060.
- Feder, M.E. and G.E. Hofmann. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243-282.
- Gäde, G., K.H. Hoffmann and J.H. Spring. 1997. Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future direction. *Physiol. Rev.* 77: 963-1032.
- Goh, H.G., S.G. Lee, B.P. Lee, G.M. Choi and J.H. Kim. 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 29: 180-183.
- Halwani, A.E. and G.B. Dunphy. 1999. Apolipoprotein-III in *Galleria mellonella* potentiates hemolymph lytic activity. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 563-570.
- Halwani, A.E., D.F. Niven and G.B. Dunphy. 2000. Apolipoprotein-III and the interactions of lipoteichoic acid with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 233-241.
- Hartl, F.U. and M. Hayar-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
- Haskell, P.T. 1957. Stridulation and associated behaviour in certain Orthoptera. I. Analysis of the stridulation of, and behaviour between males. *Anim. Behav.* 5: 139-148.
- Jang, Y. 2011. Insect communication: concepts, channels and contexts. *Kor. J. Appl. Entomol.* 50: 383-393.
- Khasar, S.G., P.G. Green and J.D. Leine. 2005. Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. *Pain* 116: 79-86.
- Kim, J. and Y. Kim. 2011. Three metabolites from an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibit larval development of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) by inhibiting a digestive enzyme, phospholipase A<sub>2</sub>. *Insect Sci.* 18: 282-288.
- McIver, S.B. 1985. Mechanoreception. pp. 71-132. *In Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 6, eds. by G.A. Kerkut and L.I. Gilbert. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Park, J., J. Seok, S.V. Prasad and Y. Kim. 2011a. Sound stress alters physiological processes in digestion and immunity and enhances insecticidal susceptibility of *Spodoptera exigua*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 50: 39-46.
- Park, J., S.V. Prasad and Y. Kim. 2011b. Effects of sound stress on physiological processes of the American leafminer, *Liriomyza trifolii*, and proteomic analysis. *Kor. J. Appl. Entomol.* 50: 131-139.
- Radvanyi, F., L. Jordan, F. Russo-Marie and C. Bon. 1989. A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A<sub>2</sub> using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Anal. Biochem.* 177: 103-109.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03, Ed. Cary, NC, USA.
- Seok, J., T. Kang and Y. Kim. 2010. Sound stress induces developmental alterations and enhances insecticide susceptibility in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Kor. J. Pestic. Sci.* 14: 415-420.
- Sismondo, E. 1980. Physical characteristics of the drumming of *Meconema thalassinum*. *J. Insect Physiol.* 26: 209-212.
- Shrestha, S., Y. Park, D. Stanley and Y. Kim. 2010. Genes encoding phospholipase A<sub>2</sub> mediate insect nodulation reactions to bacterial challenge. *J. Insect Physiol.* 56: 324-332.
- Son, Y., J. Hwang and Y. Kim. 2012. Functional study of the gene encoding apolipoprotein III in development and immune responses in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Asia Pac. Entomol.* 15: 106-112.
- Stanley, D.W. 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 25-44.
- Stephen, R.O. and J.C. Hartley. 1995. Sound production in crickets. *J. Exp. Biol.* 198: 2139-2152.
- Tera, W.R. 1990. Evolution of digestive systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 181-200.
- Velki, M., D. Kodrik, J. Vecera, B.K. Hackenberger and R. Socha. 2011. Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172: 77-84.
- Walter, S. and J. Buchner. 2002. Molecular chaperons-cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 1098-1113.
- Weers, P.M.M. and R.O. Ryan. 2006. Apolipoprotein III: role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 231-240.
- Xu, Q., Q. Zou, H. Zheng, F. Zhang, B. Tang and S. Wang. 2011. Three heat shock proteins from *Spodoptera exigua*: Gene cloning, characterization and comparative stress response during heat and cold shocks. *Comp. Biochem. Physiol. B* 159: 92-102.
- Young, D. and H.C. Bennet-Clark. 1995. The role of the tymbal in cicada sound production. *J. Exp. Biol.* 198: 1001-1019.