

Original article

분자지표 유전자 발현을 통한 *Chironomus riparius* 중금속 노출 스트레스 평가

김원석¹ · 박기연² · 곽인실^{1,2,*}

¹전남대학교 해양융합과학과, ²전남대학교 수산과학연구소

Stress Evaluation to Heavy Metal Exposure using Molecular Marker in *Chironomus riparius*. Won-Seok Kim¹ (0000-0003-3368-3891), Kiyun Park² (0000-0003-2965-6970) and Inh-Sil Kwak^{1,2,*} (0000-0002-1010-3965) (¹Department of Ocean Integrated Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; ²Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

Abstract Heavy metals are common pollutants in the freshwater environment and have toxicological effect in habitat organisms. The heavy metals highly accumulated in sediment and organism, and observed various physiological responses. In this study, we investigated the molecular response to heavy metal toxicity (Al, Aluminum; Cr, Chromium; Cu, copper; Mn, Manganese; Zn, Zinc) through expression of heat shock protein 40, 70, 90 (HSP40, 70, 90), cytochrome 450 (CYP450), Glutathione S-transferase (GST) and Serine-type endopeptidase (SP). HSPs showed up-regulation in Cu and Zn exposures. Furthermore, HSPs expression in treated groups tended to be higher than the control group. The tendency of CYP450 and GST mRNA expression was higher for Cr and Cu than for other exposure group. The expression of SP gene was low at Al exposure and other group were measured to be similar to control. These results suggest that heavy metal toxicity in freshwater ecosystem may affect physiological and molecular process. Also, the comprehensive gene expression in the aquatic midge *Chironomus riparius* give useful information to potential molecular biomarkers for assessing heavy metal toxicity.

Key words: heavy metals, *Chironomus riparius*, biomarker gene, ecotoxicology

서 론

현대 사회는 급속도로 진행되는 산업화로 인해 하천으로 유입되는 오염 물질의 양과 종류가 다양해지고 있으며, 유입되는 오염원 또한 복잡해지고 있다. 그중 중금속은 환경 내에서 가장 빈번하게 검출되는 오염물질로 자체적인 분해

및 희석이 어려우며, 퇴적물 내 높은 축적을 보인다(Garcia Sampaio *et al.*, 2008). 또한, 중금속은 서식 생물 체내 축적 정도가 높게 나타나 노출생물의 번식, 성장 및 면역 등에 영향을 주어 생태계 전반에 영향을 주는 유해물질로 많은 연구가 보고되었다(Rand *et al.*, 1995). 세포 성장에 필수적인 ribosomal protein 유전자를 통해 카드뮴(Cd), 구리(Cu)와 납(Pb)이 *Chironomus riparius*의 성장 단계별 미치는 영향에 대한 연구가 보고되었다(Park and Kwak, 2011). 또한, 최근에는 중금속 농도가 높은 지역에 서식하는 갈따구 종을 대상으로 종조성 변화와 함께 하순기질 기형과 성충 날개 구조

Manuscript received 14 May 2020, revised 9 June 2020, revision accepted 9 June 2020

* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148

E-mail: inkwak@hotmail.com, iskwak@chonnam.ac.kr

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

변형을 관찰하였다(Arimoro *et al.*, 2018; Arambourou *et al.*, 2019). 수서 곤충은 담수 생태계 내 중요한 요소로서 하천 내 고차 영양 단계에 위치하며 탄소 순환에 기여한다. 이와 같은 수서 곤충은 외부 유해 물질에 대해 분자 수준부터 개체 단위까지 영향을 받으며 알에서 유충, 번데기 그리고 성충 과정을 보내는 생활사는 환경 스트레스를 반영하는 지표로서 연구되고 있다(Anderson, 1980). *C. riparius*는 유충 시기에는 하천 저서에서 서식 후, 성충으로 변태 이후는 육상에서 서식하는 종으로 전반적인 수환경을 반영하는 지표생물로 이용되며 생태독성학 연구에 활발하게 이용된다(Martinez *et al.*, 2003; Park and Kwak, 2008). 또한, 염분, 온도 등의 이화학적 요인과 중금속, 내분비계교란물질 등의 화학물질에 대한 위해성 평가에도 적합한 생물로 제안되고 있다(Park and Kwak, 2014; Kim *et al.*, 2019).

최근 독성 물질에 대한 위해성을 실내만이 아닌 야외 수준에서 측정되는 농도를 직접적으로 반영하여 독성 실험을 진행하거나, 환경 중 서식하는 생물을 직접 mRNA 발현 및 형태적 변이를 통한 건강성 평가에 대한 시도가 진행되고 있다(Park *et al.*, 2018). 분자지표 유전자를 통한 독성학적 연구는 외부 스트레스로 인한 생물 영향을 체내 세포 수준에서 관찰할 수 있다. 또한, 연구대상의 조직과 유전자에 따라 항산화, 신진대사, 생식능력 등의 다양한 생리학적 반응을 확인함으로써 노출 물질이 생물에게 가져다 주는 영향성에 대해 판단할 수 있다. 기존 연구로는 중금속, 방향족 탄화수소로 오염된 지역과 건강한 지역에서 서식하는 *C. riparius*에서 분자적 수준에서 내분비계와 면역계 내 영향을 측정하고, 성충 날개의 형태적 변화를 관찰하여 환경오염 정도에 따른 서식 생물 반응에 대한 연구가 보고되었다(Arambourou *et al.*, 2019). 본 연구에서는 하천 내 측정된 중금속 농도를 *C. riparius*에 노출시켜 실제 야외에서 나타날 수 있는 영향에 대해 관찰하고 분석에 활용한 유전자들을 환경 위해성 진단을 위한 분자지표로서 현장 적용 가능성을 파악하고자 진행하였다. 본 연구를 위해 실내 사육 중인 *C. riparius*를 중금속(Al, Aluminum; Cr, Chromium; Cu, copper; Mn, Manganese; Zn, Zinc)에 노출 후 분자지표유전자(Heat shock protein 40, HSP40; Heat shock protein 70, HSP70; Heat shock protein 90, HSP90; Cytochrome 450, CYP450; Glutathione S-transferase, GST; Serine-type endopeptidase, SP) 발현을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물

연구 대상 종인 *C. riparius*는 OECD 표준 사육방법에 따

라 계대사육 중인 개체를 이용하였다. 사육 조건은 항온기 내부 온도 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 60%, 광도 500 lx, 광주기 16:8로 진행하였으며 사육수는 M4 배지를 이용하였다(Elendt, 1990). 저서에서 서식하는 환경조성을 위해 모래 ($< 63 \mu\text{m}$)를 투입하였다. 먹이로는 Tetramin (Tetra-Werke, Melle, Germany)을 갈아서 매일 0.5 mg day^{-1} 씩 공급하였다.

2. 노출 실험 및 조건

노출 물질로 이용된 Al, Cr, Cu, Mn, Zn은 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였으며, M4 배지를 통해 stock solution을 제조하여 노출을 진행하였다. 실제 환경 내 존재하는 농도를 기반으로 저농도, 중간농도, 고농도(Al: 7108, 12158, 22513 mg L^{-1} , Cr: 8.5, 13.8, 16.4 mg L^{-1} , Cu: 8.6, 14.9, 27.5 mg L^{-1} , Mn: 236.5, 391.3, 456 mg L^{-1} , Zn: 93, 114.1, 129.8 mg L^{-1})로 나누어 진행하였다(Fig. 1) (Kim *et al.*, 2015). 노출 실험을 위해 실내 사육 중인 *C. riparius* 4령기를 선별하여 진행하였으며, 300 mL 유리비커를 이용하여 진행하였다. 각 비커당 20개체씩 분배하고 3반복구로 노출실험을 진행하였으며 개체 간 공식을 방지하기 위해 소량의 tetramin을 공급하였다. 노출실험 조건은 사육환경과 동일하며, 개체치사는 스포이드를 이용한 물자극에 대한 반응으로 판단하였다. 중금속 노출 스트레스에 대한 분자지표 유전자 발현을 측정하기 위해 노출 96시간때 각 농도당 3마리씩 추출하여 유전자 발현 실험 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

3. 분자지표 측정을 위한 유전자 발현

유전자 발현 실험을 위해 RNA 추출은 Trizol (Invirogen,

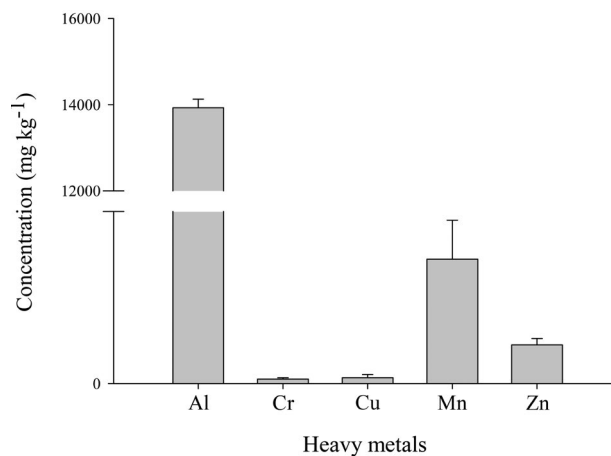


Fig. 1. Concentration of heavy metals in sediment.

Table 1. Primers used to amplify specific genes.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Accession number
GAPDH	F: GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG R: TAATCCTTGGATTGCATGTA CTCTTG	EU999991
HSP40	F: CGATTTCGATCTATATGTGTCAT R: GCCTTCCAGCCCCGGCTTCAC	EU490320
HSP70	F: CATGTGAACGAGCCAAGAGA R: TCGAGTTGATCCACCAACAA	HM769899
HSP90	F: TTCGGTGTGGGTTTCTACTC R: CTCCACCAGTAGCTCGATCGGGT	EU490319
CYP450	F: GACATTGATGAGAATGATGTTGGTG R: TAAAGTGGAACTGGTGGGTACAT	FJ541450
GST	F: CATAAAAGCCCGTGCCTTAG R: GTGTGGCTTGAAAGTGCTGA	EZ966126
SP	F: GGATCTGCTGCTCATTGCACA R: CAGCTGAACCTGGATGTGAGG	EU783960

Scotland, UK)을 이용하였으며, genomic DNA 제거를 위해 DNase I(Takara, Japan) 처리를 진행하였다. 이후, 추출한 total RNA 정량을 위해 1.2% agarose gel 전기영동장치와 Gene-Quant 1300 (GE Healthcare, UK)을 이용하여 수행하였다. cDNA 합성은 4 µg total RNA와 random hexamer 프라이머를 이용하여 SuperScript[®] III RT kit (Invitrogen, Scotland, UK)로 합성하였다. 유전자 발현을 위한 내부적 대조군(Internal control)은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 이용하였다. 유전자 발현량 측정은 AB7300 Real Time PCR system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)과 SYBR green mixture (Takara, Japan)를 통해 94°C에서 20초, 55°C에서 40초 후 72°C에서 40초로 38회 실시하였다. 각 유전자 발현량은 AB7300 System SDS software을 이용하여 분석하였다.

4. 통계적 자료 분석

분자지표 유전자 발현량은 standard curve를 기준으로 GAPDH의 발현량을 internal control로 표준화하였다. 노출 대상과 대조군 간 유의성을 확인하기 위해 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Tukey's multiple range test로 분석하였다 ($p < 0.05$). 또한, 유전자 발현 간 연관성과 상관성 파악을 위해 R (ver. 3.6.1) 프로그램을 이용하여 heatmap과 correlation analysis를 진행하였다.

결과 및 고찰

1. 중금속 노출에 따른 HSPs 유전자 발현

HSPs에 속하는 HSP40, HSP70, HSP90 유전자 발현 결과 전체적으로 Cu와 Zn이 다른 노출군에 비해 발현이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2). HSP40 유전자 발현에서 Al, Cr, Mn은 저농도와 고농도에서 중간농도에 비해 상대적으로 높은 유전자 발현을 보였으나 대조군과 비슷한 수준의 발현량이 관찰되었다. Cu와 Zn은 다른 물질에 비해 상대적으로 높은 HSP40 발현을 보였으며, 농도의존적인 경향을 나타냈다. HSP70은 Al과 Zn에서 농도의존적으로 발현량이 증가함이 관찰되었으며 Cu 고농도군에서 가장 높은 HSP70 발현량을 나타냈다. HSP90은 Al을 제외한 모든 중금속에 대해 저농도와 고농도가 중간농도에 비해 높은 발현을 보였으며 Cu가 전체적으로 높은 발현을 나타냈다. HSPs는 생물 체대 대사 작용과 세포 활동에 있어 중요한 역할을 하며, 외부적 스트레스에 대한 분자마커로서 많은 연구가 진행되고 있다(Ireland *et al.*, 2004). HSPs에는 분자량에 따라 HSP40, 70, 90, 100과 small HSPs 등으로 구분된다(Kregel, 2002). HSPs는 샤페론 접합(folding), 전좌(translocation) 등의 활동을 통해 중금속 스트레스로 발생하는 산화 스트레스로부터 단백질의 항상성을 유지하는 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다(Hall, 2002). 본 연구에서 HSPs 발현 결과는 다른 중금속 물질에 비해 Cu에서 높은 발현을 나타냈다. 기존 연구에 의하면 Cu에 노출된 송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 발생된 활성산소와 apoptosis로부터 간세포 보호를 위해 HSP70 발현이 증가함이 보고되었다(Feng *et al.*, 2003). 또한, 구충제로 이용되는 fenbendazole 노출에 대해 *C. riparius* 내 HSP40, 70, 90 발현이 농도 의존적으로 증가되었다(Park *et al.*, 2009). 최근 HSPs는 이러한 특징을 통해 분자마커로서 많은 연구가 보고되며, 야외 환경에서 나타나는 다양한 스트레스 원인에 대하여 서식생물을 대상으로 시도한 연구가 보고되고 있다(Arambourou *et al.*, 2019). 해양 양식장에서 사육하는 지중해담치(*Mytilus galloprovincialis*)와 굴(*Crassostrea gigas*)을 대상으로 성장 정도와 HSP70 유전자 발현을 통해 어장환경 평가가 보고되었다(Kim *et al.*, 2016). 또한, *C. riparius*를 대상으로 중금속 오염이 진행된 외부 현장수 노출에 따른 HSPs 유전자 발현의 증가가 관찰되었다(Kim *et al.*, 2015).

2. 중금속 노출에 따른 CYP450과 GST 유전자 발현

CYP450 유전자 발현 결과, Al과 Mn, Zn은 대조군 발현과 비슷한 수준을 보였다(Fig. 2). 전체 노출군 중 Cr과 Cu가

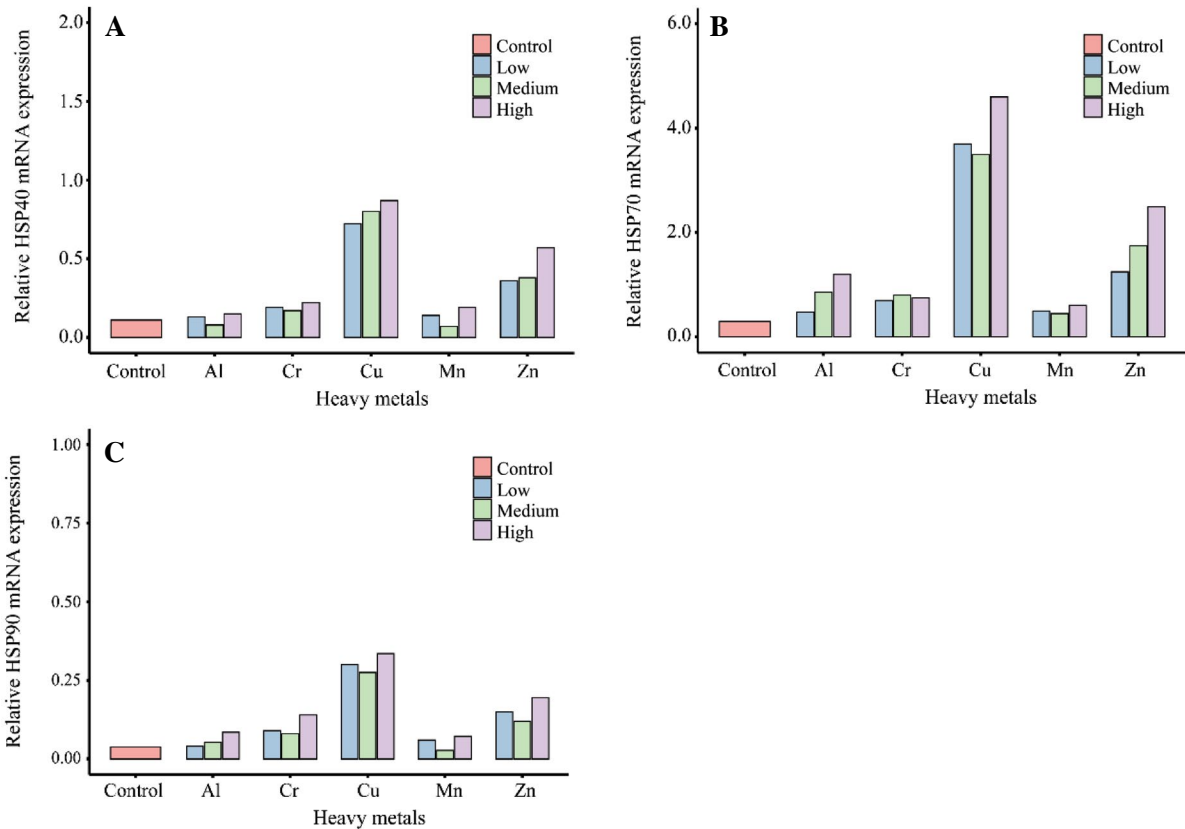


Fig. 2. mRNA expression of HSPs (A: HSP40, B: HSP70, C: HSP90) genes in *C. riparius* larvae exposed to heavy metals for 96 hours.

다른 노출군에 비해 상대적으로 높은 발현량을 보였으며, 저농도와 고농도에서 CYP450 발현이 높게 나타남을 관찰하였다. 또한, GST 유전자 발현은 Mn을 제외한 Al, Cr, Cu, Zn 노출군에서 대조군에 비해 높은 유전자 발현이 관찰되었다 (Fig. 3). 특히, Cr과 Cu에서는 고농도가 다른 농도군에 비해 상대적으로 높은 수준의 발현량이 관찰되었다. CYP450은 스테로이드 호르몬이나 중금속과 같은 외인성 물질 해독에 관여하는 요소로, 박테리아부터 포유류까지 모든 생물에서 존재하는 것으로 알려져 있다 (Kostaropoulos *et al.*, 2005). 곤충 내 CYP450은 호르몬이나 지방산, 스테로이드와 같은 내인성 합성 요소를 규제하며, 생물 내 성장, 발달 및 번식에 관여한다 (Scott, 1999; Feyereisen, 1999). 또한, CYP450은 다양한 효소 채널을 통해 생물 체내 산화-환원 시스템 매개체로서의 기능이 보고되었다 (Danielson, 2002). 이와 같은 CYP450 활성화에 대한 억제는 해독과 산화 시스템에 문제를 야기하게 되어 체내 활성산소 축적을 유도하게 된다 (Lin and Lu, 1998). GST는 외부 물질에 대한 해독에 가장 중요한 역할을 하는 효소로서 세포 내 운반과 호르몬 합성, 산화 스트레스로부터 방어기작 등을 수행하는 것으로 보고된다

(Enayati *et al.*, 2005). 수서 생물 세포 내 GST는 생물적 환경 정화 과정에 영향을 주며, 활성 산소로부터 세포를 보호한다 (Creaney *et al.*, 1995). CYP450과 GST는 환경 중에서 나타나는 다양한 물질에 대한 생물 체내 해독 기작에 관여하는 유전자로 많은 연구가 보고되고 있다. *C. riparius*에서 구충제로 이용되는 fenbendazole $1\sim 30\ \mu\text{g L}^{-1}$ 노출이 항산화 유전자들의 활성증가에 농도의존적으로 나타냈다 (Park *et al.*, 2009). 최근에는 나일틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)에 간과 비장에서 육가크로뮴 (Hexavalent chromium) 노출에 따라 GST와 CYP 활성이 증가하며 독성 영향으로 인해 조직 변화가 보고되었다 (Mohamed *et al.*, 2020). 본 연구 결과, 중금속 노출에 따라 CYP450과 GST 유전자의 발현증가가 확인되었으며 이는 중금속 독성으로 인해 발생한 *C. riparius* 체내 활성산소와 함께 항상성 유지를 위한 반응으로 보인다. 또한, 다른 중금속에 비해 Cr과 Cu에서 상대적으로 높은 발현이 측정된 것은 생물 체내에 다른 중금속 이온에 비해 단시간에 쉽게 흡수되어 나타난 경향으로 판단되며 추후 중금속 독성에 대한 장기 노출에 따른 발현 경향을 분석해야 할 것으로 사료된다.

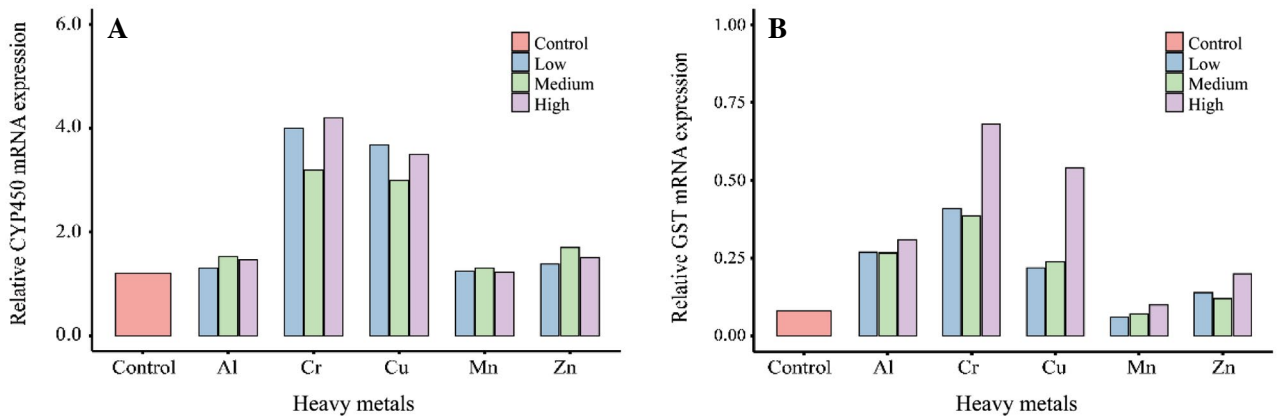


Fig. 3. mRNA expression of detoxification (A: CYP450, B: GST) genes in *C. riparius* larvae exposed to heavy metals for 96 hours.

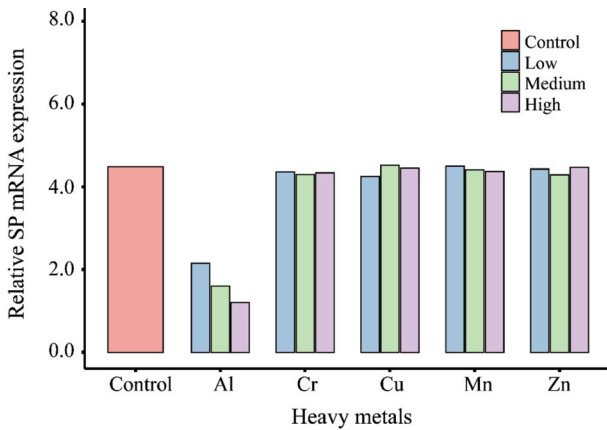


Fig. 4. mRNA expression of SP genes in *C. riparius* larvae exposed to heavy metals for 96 hours.

3. 중금속 노출에 따른 SP 유전자 발현

단백질 분해 효소는 기생충의 소화 과정 내 주요 구성 요소로서 숙주 조직과의 상호작용을 위해 기능을 한다(Rhoads and Fetterer, 1997). SP는 곤충 내에 존재하는 단백질 분해 효소로 알려져 있으며(Terra *et al.*, 1996), 혈액응고, 면역 반응, 호르몬 활동과 성장 등 다양한 생리적 작용에도 관여하는 것으로 보고되고 있다(Barrett *et al.*, 2003). 본 연구 결과, SP 유전자 발현은 Al을 제외한 모든 노출군에서 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다. Al은 다른 노출군에 비해 상대적으로 낮은 발현량을 보였으며, 저농도에서 고농도로 감에 따라 발현량이 감소하는 경향이 관찰되었다(Fig. 4). 기존 연구에 의하면 SP 유전자는 본 연구에서 관찰한 HSPs, CYP450, GST 등과는 다르게 생물 내 일정 수준을 유지하고 있으며, 외부 자극에 대해 독성 영향을 받는 경우 감소하는 것으로 보고되고 있다(Park and Kwak, 2008). 또한, Al 독성은 *C. riparius*

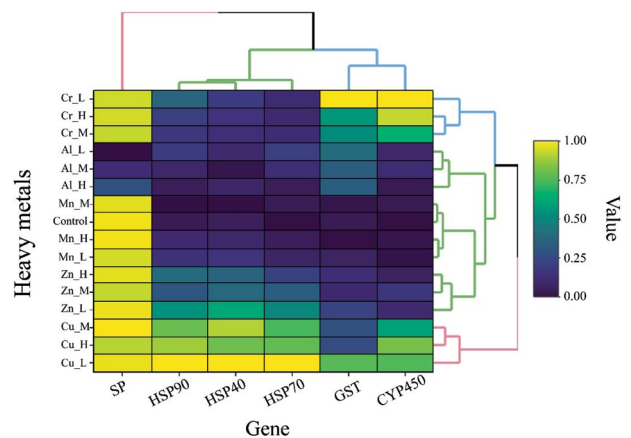


Fig. 5. Heatmap of relative mRNA expression level of HSP40, HSP70, HSP90, CYP450, GST and SP in *C. riparius* exposed to different concentration of heavy metals.

소화에 관여하는 침샘 유전자의 구조 및 기능적 손상을 주어 발현 감소에 대한 기존 연구와 비슷한 연구 결과가 보고되었다(Michailova *et al.*, 2003).

4. 히트맵(Heatmap)을 이용한 분자지표 유전자 발현

중금속 노출에 따른 분자지표 유전자 발현을 히트맵과 클러스터링으로 분석한 결과, 유전자 발현은 각각 SP와 HSPs 그리고 GST, CYP450으로 각각 3개의 그룹으로 분류되었다(Fig. 5). 또한 상관성 분석 결과, HSPs 그룹에 속하는 HSP40, 70, 90은 서로 높은 상관성을 보였다(Table 2). 또한, CYP450은 HSP70, 90과 유의한 수준의 상관성을 나타내었으며 GST와는 높은 유의 수준에서 양의 상관성을 관찰하였다. 히트맵에서 다른 그룹에 속하는 SP는 다른 유전자들과의 상관성 분석에서 유의성을 보이지 않았다. 노출 물

Table 2. The result of correlation analysis between specific genes.

	HSP40	HSP70	HSP90	CYP450	GST	SP
HSP40	1					
HSP70	0.91***	1				
HSP90	0.96***	0.92***	1			
CYP450	0.5	0.49*	0.56**	1		
GST	0.32	0.40	0.35	0.76***	1	
SP	0.41	0.12	0.33	0.28	-0.24	1

Significant differences are indicated with asterisk mark at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

질과 농도에 대한 히트맵 결과 Cr과 Cu는 각각 다른 그룹으로 분류되고, Al, Mn, Zn과 대조군은 같은 그룹으로 분류되어 3개의 그룹을 관찰하였다. 본 연구에서 관찰한 유전자 발현에 따른 히트맵과 상관성 분석 결과는 각기 다른 생리학적 기작을 지닌 유전자들에 대한 발현 경향성 파악에 용이하며 최근 다양한 연구에서 활용되고 있다. Park *et al.* (2016)은 방호도료의 주 성분으로 이용되는 Irgarol 노출에 대해 칠게 (*Macrophthalmus japonicus*) 아가미와 간체장 내 chitinase, ecdysone receptor 등의 유전자 발현을 히트맵으로 보고하였다. 연구 결과에서 관찰한 히트맵과 상관성 분석은 HSPs, SP, GST와 CYP450이 각각 면역, 해독, 소화 효소에 관여하는 특징이 반영된 결과로 판단된다.

적 요

중금속은 다양한 경로를 통해 환경 중 배출되어 서식 생물에 노출되며 체내 다양한 생리학적 불균형을 유도한다. 본 연구에서는 수서생물지표종으로 이용되는 깔따구 (*Chironomus riparius*)를 이용하여 야외 중금속 (Al, Aluminum; Cr, Chromium; Cu, copper; Mn, Manganese; Zn, Zinc) 농도 노출에 따른 다양한 분자발현 반응과 상관성을 분석하였다. 생물 체내 분자 반응을 관찰하기 위해 heat shock protein 40, 70, 90 (HSP40, 70, 90), cytochrome 450 (CYP450), Glutathione S-transferase (GST) and Serine-type endopeptidase (SP)를 이용하였다. 그 결과, 스트레스 분자마커로 이용되는 HSPs 유전자들은 중금속 노출된 개체들에서 대조군보다 높은 경향을 보였으며 Cu 노출 시 가장 높은 발현을 나타냈다. 해독에 관여하는 CYP450과 GST 유전자 발현 결과, Cr과 Cu에서는 다른 노출군에 비해 높은 발현 경향을 나타냈다. SP 유전자 발현 결과 Al을 제외한 모든 노출군이 대조군과 유사한 발현 패턴을 보였다. 이와 같은 연구 결과는 실내에서 환경 중 존재하는 실제 농도를 반영한 독성실험을 통해 노출물질과 농도에 따라 특이적으로 발현하는 분자마커 패턴을 보고하였다. 또한, 수생태계로 유입되는 중금속이 하천에 서식하는 생물에 주는 유해 영향에 대한 정보와 분자 지표 유전자들의 현장 적용 가능성을 보여준다.

험을 통해 노출물질과 농도에 따라 특이적으로 발현하는 분자마커 패턴을 보고하였다. 또한, 수생태계로 유입되는 중금속이 하천에 서식하는 생물에 주는 유해 영향에 대한 정보와 분자 지표 유전자들의 현장 적용 가능성을 보여준다.

저자정보 김원석(전남대학교 대학원생), 박기연(전남대학교 연구교수), 곽인실(전남대학교 교수)

저자기여도 개념설정: 곽인실, 방법론: 곽인실, 박기연, 자료 분석: 김원석, 박기연, 자료제공: 박기연, 김원석, 자료관리: 곽인실, 박기연, 김원석, 원고 초안작성: 김원석, 원고 교정: 김원석, 박기연, 원고 편집 및 검토: 김원석, 박기연, 곽인실, 과제관리: 곽인실, 연구비 수주: 곽인실

이해관계 본 연구는 이해관계의 충돌 여지가 없습니다.

연구비 본 연구는 한국연구재단 중점연구사업 [NRF-2018-R1A6A1A-03024314]의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Anderson, R.L. 1980. Chironomidae toxicity tests biological background and procedures. In Aquatic invertebrate bioassays. ASTM International.
- Arambourou, H., R. Planelló, L. Llorente, I. Fuertes, C. Barata, N. Delorme, P. Noury, Ó. Herrero, A. Villeneuve and C. Bonnineau. 2019. *Chironomus riparius* exposure to field-collected contaminated sediments: from subcellular effect to whole-organism response. *Science of the Total Environment* **671**: 874-882.
- Arimoro, F.O., Y.I. Auta, O.N. Odume, U.N. Keke and A.Z. Mohammed. 2018. Mouthpart deformities in Chironomidae (Diptera) as bioindicators of heavy metals pollution in Shiroro Lake, Niger State, Nigeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **149**: 96-100.
- Barrett, A.J., N.D. Rawlings and J.F. Woessner. 2003. Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, New York.
- Creaney, J., G.L. Wijffels, J.L. Sexton, R.M. Sandeman, T.W. Spithill and J.C. Parsons. 1995. Fasciola hepatica: localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology* **81**: 106-116.
- Danielson, P.B. 2002. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism* **3**: 561-597.
- Eldent, B.P. 1990. Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in aphnia magna Straus. *Protoplasma* **154**: 25-33.
- Enayati, A.A., H. Ranson and J. Hemingway. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molec-*

- ular Biology **14**: 3-8.
- Feyereosem, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology* **44**: 507-533.
- Garcia Sampaio, F., C. de Lima Bojink, E. Tie Oba, L. Romagueira Bichara dos Santos, A. Lúcia Kalinin and F. Tadeu Rantin. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **147**: 43-51.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11.
- Ireland, H.E., S.J. Harding, G.A. Bonwick, M. Jones, C.J. Smith, and J.H. Williams. 2004. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemma minor*. *Biomarkers* **9**: 139-155.
- Kim, W.S., C. Hong, K. Park and I.S. Kwak. 2019. Ecotoxicological response of Cd and Zn exposure to a field dominant species, *Chironomus plumosus*. *Korean Journal of Ecology and Environment* **52**: 266-273.
- Kim, W.S., K. Park, J.K. Kim and I.S. Kwak. 2016. Expression of the heat shock protein 70 gene and external developmental traits of two Bivalvia species, *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*, under aquaculture environments. *Korean Journal of Ecology and Environment* **49**: 22-30.
- Kim, W.S., R. Kim, K. Park, N. Chamilani and I.S. Kwak. 2015. The molecular biomarker genes expressions of rearing species *Chironomus riparius* and field species *Chironomus plumosus* exposure to heavy metals. *Korean Journal of Ecology and Environment* **48**: 86-94.
- Kostaropoulos, I., D. Kalmanti, B. Theodoropoulou and N.S. Loumbourdis. 2005. Effects of exposure to a mixture of cadmium and chromium on detoxification enzyme (GST, P450-MO) activities in the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology* **14**: 439-447.
- Kregel, K.C. 2002. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* **92**: 2177-2186.
- Lin, J.H. and A.Y. Lu. 1998. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* **35**: 361-390.
- Martín-Folgar, R. and J.L. Martínez-Guitarte. 2017. Cadmium alters the expression of small heat shock protein genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Chemosphere* **169**: 485-492.
- Martín-Folgar, R. and J.L. Martínez-Guitarte. 2019. Effects of single and mixture exposure of cadmium and copper in apoptosis and immune related genes at transcriptional level on the midge *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae). *Science of the Total Environment* **677**: 590-598.
- Martinez, E.A., B.C. Moore, J. Schaumlöffel and N. Dasgupta. 2003. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper-spiked sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**: 204-212.
- Michailova, P., J. Ilkova and K.N. White. 2003. Functional and structural rearrangements of salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) in response to freshly neutralized aluminium. *Environmental Pollution* **123**: 193-207.
- Mohamed, A.A.R., W. El-Houseiny, A.E. El-Murr, L.L. Ebrahim, A.I. Ahmed and Y.M.A. El-Hakim. 2020. Effect of hexavalent chromium exposure on the liver and kidney tissues related to the expression of CYP450 and GST genes of *Oreochromis niloticus* fish: Role of curcumin supplemented diet. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **188**: 109890.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2008. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di (2-ethylhexyl)phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* **74**: 89-95.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2011. Ribosomal protein S3 gene expression of *Chironomus riparius* under cadmium, copper and lead stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health Science* **3**: 347-355.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2014. The effect of temperature gradients on endocrine signaling and antioxidant gene expression during *Chironomus riparius* development. *Science of the Total Environment* **470**: 1003-1011.
- Park, K., H.W. Bang, J. Park and I.S. Kwak. 2009. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* **77**: 359-367.
- Park, K., N. Chamilani, W.S. Kim, T.S. Kwak and I.S. Kwak. 2016. Changes of exoskeleton surface roughness and expression of crucial participation genes for chitin formation and digestion in the mud crab (*Macrophthalmus japonicus*) following the antifouling biocide irgarol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **132**: 186-195.
- Park, K., T.S. Kwak, W.S. Kim and I.S. Kwak. 2018. Changes in exoskeleton surface roughness and expression of chitinase genes in mud crab *Macrophthalmus japonicus* following heavy metal differences of estuary. *Marine Pollution Bulletin* **138**: 11-18.
- Rand, G.M., P.G. Wells and L.S. McCarty. 1995. Introduction to aquatic toxicology. Fundamentals of aquatic toxicology effects, environmental fate, and risk assessment. Taylor and Francis Publishers, North Palm Beach, Florida, USA, 3-67.
- Rhoads, M.L. and R.H. Fetterer. 1997. Extracellular matrix: a tool for defining the extracorporeal function of parasite proteases. *Parasitology Today* **13**: 119-122.
- Scott, J.G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**: 757-777.
- Terra, W.R., C. Ferreira, B.P. Jordao and R.J. Dillon. 1996. Digestive enzymes. In: Biology of the Insect Midgut, Lehane, MJ and Billingsley, PF.

Appendix 1. List of gene expression studies in *Chironomus riparius*.

Organisms	Gene	Exposed material	Concentration	Response	Reference
<i>Chironomus riparius</i>	Ribosomal protein S3 (RpS3)	Cadmium, copper and lead	1~500 $\mu\text{g L}^{-1}$	Up-regulate with dose-dependent trend	Park and Kwak, 2011
	Small heat shock protein	Cadmium	0.1 and 1.0 mM	Up-regulate response compare to control group at 24 hour	Martín-Folgar and Martínez-Guitarate, 2017
	Immune related gene (Inhibitor of apoptosis protein 1 and Death regulator Nedd2-like caspase)	Cadmium and copper	0.1~10 μM	Up-regulate with dose-dependent manner	Martín-Folgar and Martínez-Guitarate, 2019
	Heat shock protein 40, 70 and 90	Fenbendazole	1~30 $\mu\text{g L}^{-1}$	Up-regulate with dose-dependent trend	Park <i>et al.</i> , 2009
	Serine-type endopeptidase	di-2-(ethylhexyl)-phthalate	1~30 $\mu\text{g L}^{-1}$	Up-regulate with dose-dependent trend	Park and Kwak, 2008