

염분농도에 따른 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 성장호르몬, 프로락틴 및 수용체 유전자의 발현변화

조영민 · 신지혜 · 손영창*

강릉대학교 해양생명공학부 · 대학원 해양응용생명공학과

Gene Expression Levels of Growth Hormone, Prolactin and Their Receptors of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* by Salinity Changes

Young Min CHO, Jihye SHIN and Young Chang SOHN*

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

To investigate the effects of environmental salinity on the expression of the genes for growth hormone (GH) and prolactin (PRL) in the pituitary, and their receptors (GHR, PRLR) in the kidney, intestine, and gills in teleosts, we acclimated juvenile olive flounders (*Paralichthys olivaceus*) to different salinities (5, 15, 25, or 32 psu) for 3 days and examined their mRNA levels using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). In the fish adapted to low salinity, the PRL mRNA levels in the pituitary were elevated dramatically, whereas the GH mRNA levels did not differ significantly. PRLR mRNA increased significantly in fish exposed to low salinity, whereas GHR mRNA levels did not differ. These results suggest that PRL is an important hormone for flounders that are acclimated to brackish water and it may control ion homeostasis with PRLR in the osmoregulatory organs.

Key words: Olive flounder, Prolactin, Growth hormone, Osmoregulation, RT-PCR, mRNA

서론

광염성 해산어류인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 한국 연안지역에서 널리 양식되는 경골어류이다. 여름철 집중호우로 인한 연안해역의 저염분 현상에 대한 기초 자료로서 사육수의 염분변화에 따른 어체의 삼투압변화에 대한 생리적 상태와 생존에 미치는 영향, 스트레스 반응에 대해서는 보고된 바가 있지만 (Morgan et al., 1991; Sampaio and Bianchini, 2002), 염분변화에 따른 삼투압조절 및 항상성유지에 관련된 연구는 많지 않다. 성장호르몬 (growth hormone: GH)과 프로락틴 (prolactin: PRL)은 공통의 선조 유전자로부터 진화되어 왔지만 (Kawachi and Sower, 2006), 광염성 경골어류에서 각각 PRL은 담수적응에, GH는 해수적응에 관여하는 서로 분화된 기능을 가지고 있다 (Madsen and Bern, 1992; Manzon, 2002; Power, 2005). 광염성 경골어류인 틸라피아 (*Oreochromis mossambicus*)를 해수에서 저염분 환경수로 옮겼을 경우 뇌하수체에서 분비되는 PRL은 크게 증가되었으며, GH는 담수에서 해수로 옮겼을 경우 일시적으로 증가되었다 (Seale et al., 2002; Yada et al., 1994). In vitro 실험에서도 뇌하수체 세포를 배양한 배지에서 GH의 분비는 배지의 삼투압이 높을 때 증가되었다 (Helms et al., 1991). 넙치에서 프로락틴 수용체 (prolactin receptor: PRLR)는 신장, 장, 아가미에서 주로 발현된다고 알려져 있으며 (Higashimoto et

al., 2001), 성장호르몬 수용체 (growth hormone receptor: GHR)는 거의 모든 조직에서 발현되지만, 간에서 높은 수준으로 발현된다 (Nakao et al., 2004). 또한 발생 단계에 따라서 PRL과 PRLR의 일시적인 발현증가는 PRL이 난과 초기유생의 발달에서 삼투압조절과 초기면역 기구에 관여한다고 보고되었다 (Power, 2005).

본 연구의 목적은 저염분 환경조건에 일시적으로 순치된 넙치의 PRL과 GH mRNA 발현변화를 분자 수준에서 밝히고, 삼투압조절 기관의 PRLR과 GHR의 mRNA 발현양상을 조사하는데 있다. 본 연구는 넙치의 염분변화에 따른 항상성유지에 필요한 삼투압조절기구에 관한 있는 기초자료를 제공할 것이며, 광염성 어류의 PRL과 GH의 기능 해석 및 작용기전 연구에도 도움이 될 것으로 판단된다.

재료 및 방법

실험어와 실험조건

실험에 사용된 넙치치어는 해동수산 (강릉시, 강원도)으로부터 제공 받았으며 (32마리, 평균전장 17.5±0.8 cm, 평균체중 28±0.4 g), 국립수산물과학원 동해수산연구소 연어연구센터에서 자연일장조건 및 수온 17°C로 조정된 원통형수조 (200 L) 4개에 수조당 8마리씩 수용하였다. 이후 지하수를 이용하여 1일 간격으로 염분농도 32 psu, 25 psu, 15 psu 및 5 psu로 각각 맞추었으며, 3일 동안 소형 폭기장치로 산소를 동일하게 공급

*Corresponding author: ycsohn@kangnung.ac.kr

하며 무급이 상태로 수용하였다.

Sample의 채취

각각의 염분농도에 3일간 순치된 넙치치어의 뇌하수체, 신장, 장, 아가미 조직을 채취한 다음 즉시 액체질소에 급속 동결하였으며, -80℃에서 조직별 total RNA를 추출하기 전까지 보관하였다 (n=4). 조직으로부터 total RNA는 RNA prep kit (Bioneer, Daejeon, Korea)로 추출한 후 (각 1 μg), M-MLV reverse transcriptase (Bioneer)를 사용하여 역전사반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다.

RT-PCR 분석

염분변화에 따른 GH, PRL, GHR 및 PRLR 유전자발현 변화는 semi-quantitative RT-PCR 방법으로 확인하였다. 사용된 Oligoprimers는 각 유전자에 특이적으로 보존된 영역을 기초로 주문·제작되었다 (Bioneer) (Table 1). PCR반응의 로그함수적 분석을 위하여 total volume 10 mL에 template 100 ng, oligo primer 각 10 mM 농도를 사용하여 뇌하수체 PRL, GH, β-actin 및 신장, 장, 아가미 PRLR, GHR, β-actin의 적정 cycle수를 조사한 후, RT-PCR을 수행하였다 (Fig. 1). 각각의 PCR산물에 대한 예상되는 크기는 β-actin은 350 bp, PRL은 529 bp, GH는 376 bp, PRLR은 287 bp 그리고 GHR은 328 bp이며. PCR조건은 95℃ (30 sec), 52℃ (30 sec), 72℃ (30 sec)로 하였다. 증폭된 RT-PCR산물은 1.5% agarose gel에서 확인하였으며, band intensity는 BioCapt 전기영동장치 (V L, France)로 측정하였다. 또한 증폭된 cDNA band는 제한효소로 절단하여 확인한 후, TA cloning방법으로 TOPO vector (Invitrogen, CA, USA)에 삽입하여 염기서열을 분석하여 확인하였다.

통계처리

실험결과로부터 얻어진 자료 값 사이의 유의성 검정은 SPSS 통계 패키지 (V.12)에 의한 ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 검정하였다 (P< 0.05).

결 과

뇌하수체의 PRL, GH 발현변화

뇌하수체 PRL, GH, β-actin을 15, 20, 25, 30, 35 및 40 PCR cycle을 실시한 결과, PRL은 30 cycles, GH는 23 cycles, β-actin

은 30 cycles전후에서 지수함수적으로 증가하였다 (Fig. 1). 염분변화에 따른 넙치의 뇌하수체 PRL 및 GH의 mRNA level은 optimized cycle에 따라 semi-quantitative RT-PCR 분석법으로 측정하였다. 각각의 PCR 산물의 염기서열을 무작위 분석한 결과, 기존의 넙치 염기서열이 확인되었다 (data not shown). 넙치치어의 뇌하수체 PRL mRNA level은 대조군 해수 (32 psu)와 비교하였을 때, 어체가 수용된 사육수의 염분농도에 반비례하여 유의적으로 증가하였으며, 25 psu에서는 약 2.3배, 15 psu와 5 psu 에서는 4배 이상 증가하였다 (Fig. 2). 한편, 뇌하수체 GH mRNA의 발현은 염분농도에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

삼투압조절기관의 PRLR 및 GHR 발현변화

경골어류의 대표적인 삼투압조절기관으로 알려진 장, 신장 및 아가미의 PRLR, GHR, β-actin을 20, 25, 30, 35, 40 및 45 PCR cycle을 실시한 결과, PRLR은 35 cycles, GHR는 35 cycles, β-actin은 30 cycles 전후에서 지수함수적으로 증가하였다 (Fig. 1). 조직별 PRLR과 GHR의 mRNA level은 optimized 된 조건과 동일한 RT-PCR방법으로 조사하였다. 장의 PRLR mRNA 발현변화는 32 psu 대조군 보다 15 psu와 5 psu의 저염분 환경에서 약간 증가하는 경향이 관찰되었으나, GHR mRNA는 염분에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). 신장에서도 PRLR mRNA 발현양상은 저염분 환경수에서 약간 증가하였으며, GHR mRNA는 유의적인 변화가 없었다 (Fig. 4). 아가미에서도 이와 유사한 결과로 저염분 환경에 수용한 넙치에서 PRLR mRNA 발현이 증가되었고, GHR의 발현은 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 5).

고 찰

넙치는 광염성 해산어로서 수온, 수심 감소, 수송, 염분변화에 따른 스트레스에 비교적 강한 어종으로 알려져 있지만 (Chang et al., 2002), 염분변화는 장마 기간 중 집중호우로 인한 저염분 현상이 동반될 경우, 양식어류에게 심각한 피해를 주기도 하기 때문에, 어류의 생리 상태와 생존에 미치는 영향은 양식현장에서 중요한 요인으로 고려되어야 한다. 그러나, 염분농도의 변화에 따른 체내 항상성유지 및 삼투압조절에 관련된 조직의 호르몬 및 호르몬 수용체에 대한 연구는

Table 1. Oligo primers used in the polymerase chain reactions

Primers	Direction	Accession numbers	Sequences (5'-3')
β-actin	Forward	AF012125	GACATCAAGGAGAAGCTGTG
β-actin	Reverse	AF012125	ATGATCTTGATCTTCATGGTG
PRL	Forward	AFO47616	CGTSCCATCAAYGACCTGC
PRL	Reverse	AFO47616	GCGYAGGAYTTTCAGGAAGC
GH	Forward	X15055	GCGTGTCTCTCAGCCAATCAC
GH	Reverse	X15055	TGATTGGCCTCTATCAGCTT
PRLR	Forward	ABO49722	CTGAAGCATTGTATTCTGCCACC
PRLR	Reverse	ABO49722	CTGTCTCAGCTSCCCCKGCC
GHR	Forward	ABO58418	GTCATGGTCAACTGGGAGC
GHR	Reverse	ABO58418	GATGAGTATGAGGATGCC

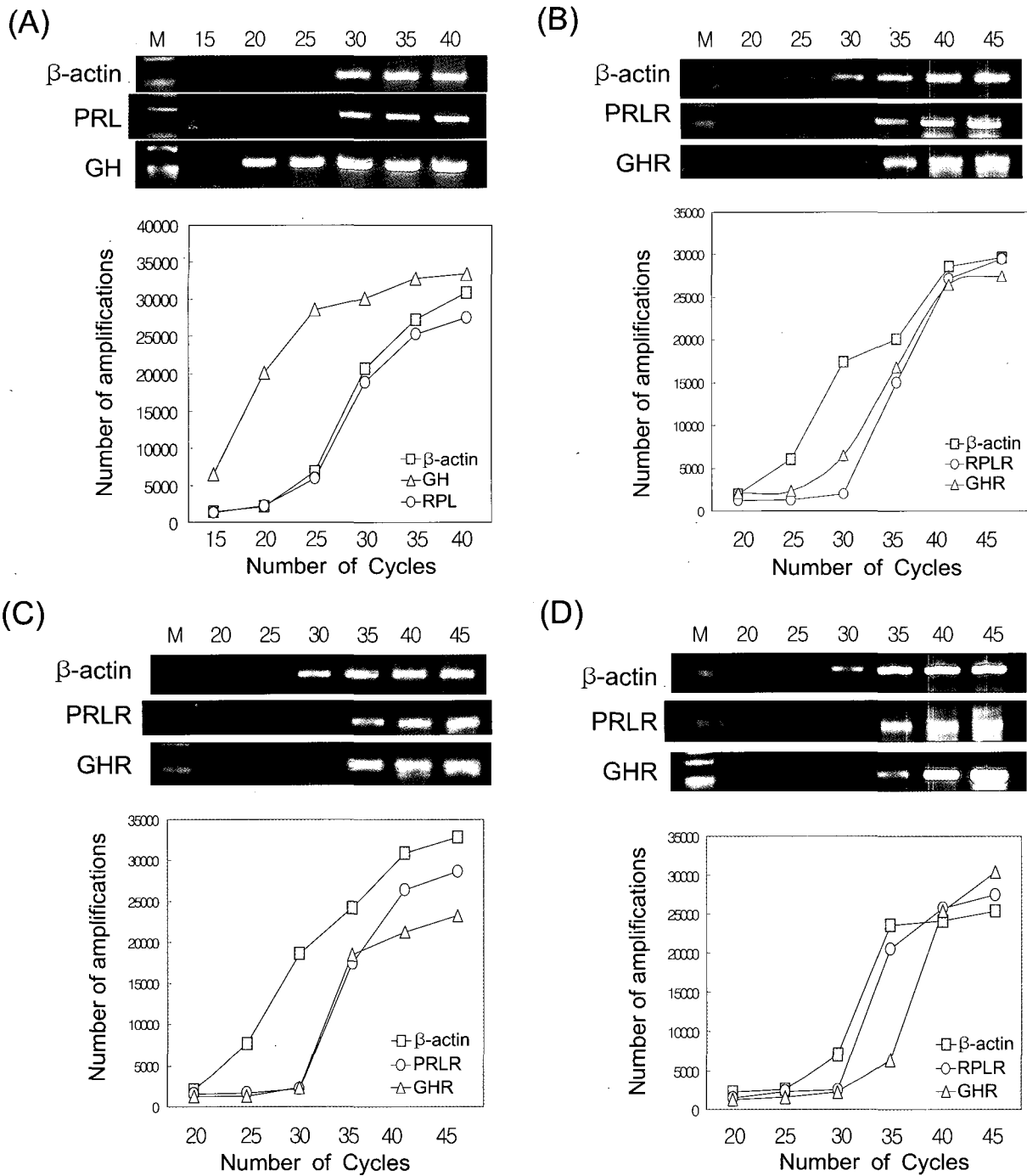


Fig. 1. Cycle optimization for semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). (A, Pituitary; B, Intestine; C, Kidney; D, Gill)

부족한 실정이다.

경골어류의 뇌하수체로부터 생산되고 분비되는 PRL은 낮은 삼투압환경에 적용할 때 분비가 촉진된다 (Hirano, 1986; Ayson et al., 1993; Auperin et al., 1994). 틸라피야를 담수에서 해수로 순치시키면, 혈장내 GH농도는 6시간 후에 급격히 증가하고, 해수에서 담수로 다시 옮겼을 경우 또는 80% 해수에

오랫동안 순치시켰을 경우 큰 변화는 나타나지 않았다 (Seale et al., 2002). 본 연구에서도 넙치를 저염분 환경에 3일 동안 순치시킨 후 뇌하수체로부터 PRL mRNA 발현수준을 조사한 결과, 염분농도가 낮을수록 증가하는 경향을 보였다. 따라서, 넙치의 담수적응에 PRL이 중요한 역할을 하고 있다고 판단된다. 반면, GH의 발현변화는 순해수와 낮은 염분의 해수에

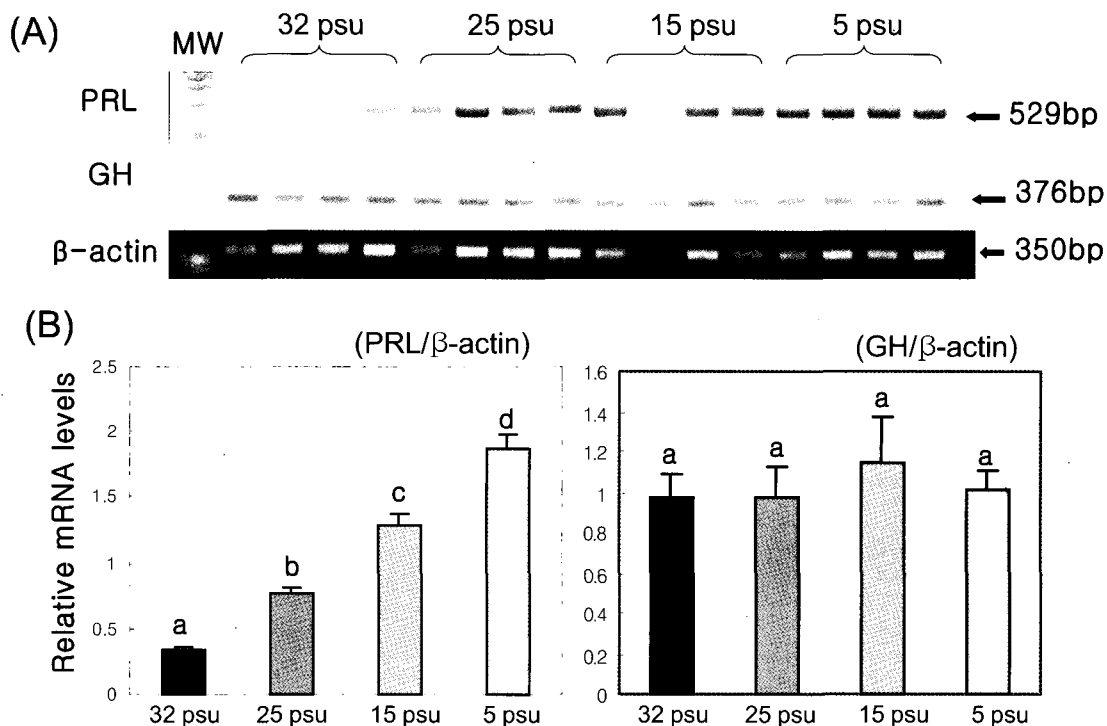


Fig. 2. Expression levels of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) mRNA in the pituitary of olive flounder that were adapted in different salinities for 3 days. (A) RT-PCR analysis of PRL and GH (upper two panels) and β -actin (lower panel) in total RNA prepared from the pituitary of olive flounder (n=4). The molecular markers (MW) are shown on left sides. Arrows indicate molecular sizes of PRL (529 bp), GH (376 bp) and β -actin (350 bp) (B) The relative PRL and GH mRNA levels were normalized by β -actin values.

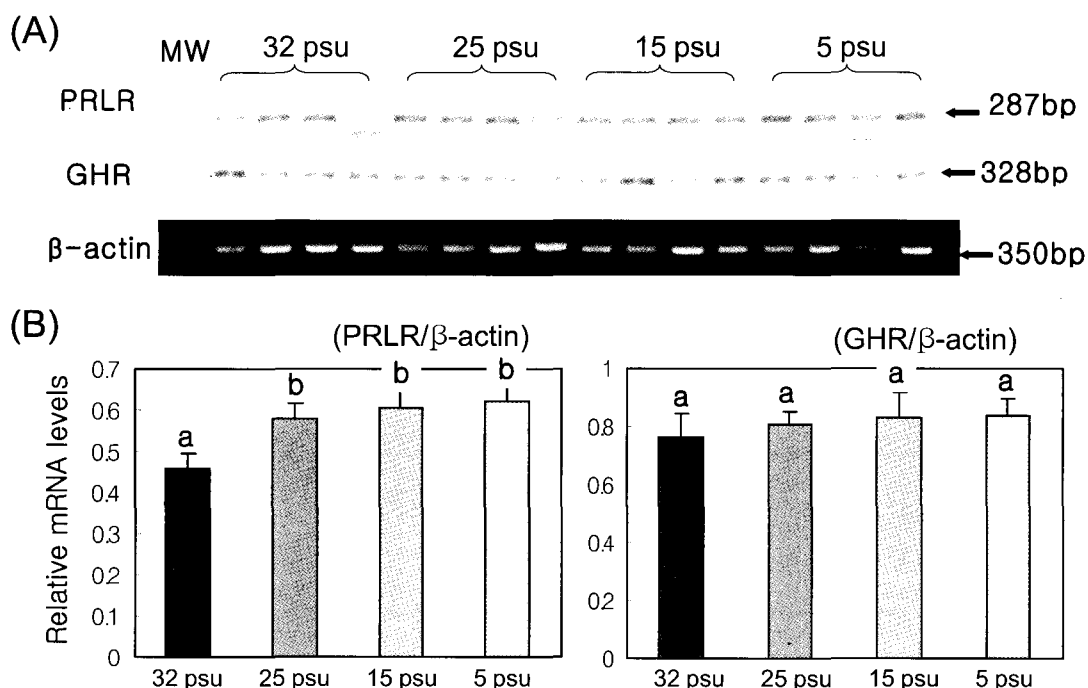


Fig. 3. Expression levels of prolactin receptor (PRLR) and growth hormone receptor (GHR) mRNA in the intestine of olive flounder that were adapted in different salinities for 3 days. (A) RT-PCR analysis of PRLR and GHR (upper two panels) and β -actin (lower panel) in total RNA prepared from the intestine of olive flounder (n=4). The molecular markers (MW) are shown on left sides. Arrows indicate molecular sizes of PRLR (287 bp), GHR (328 bp) and β -actin (350 bp) (B) The relative PRLR and GHR mRNA levels were normalized by β -actin values.

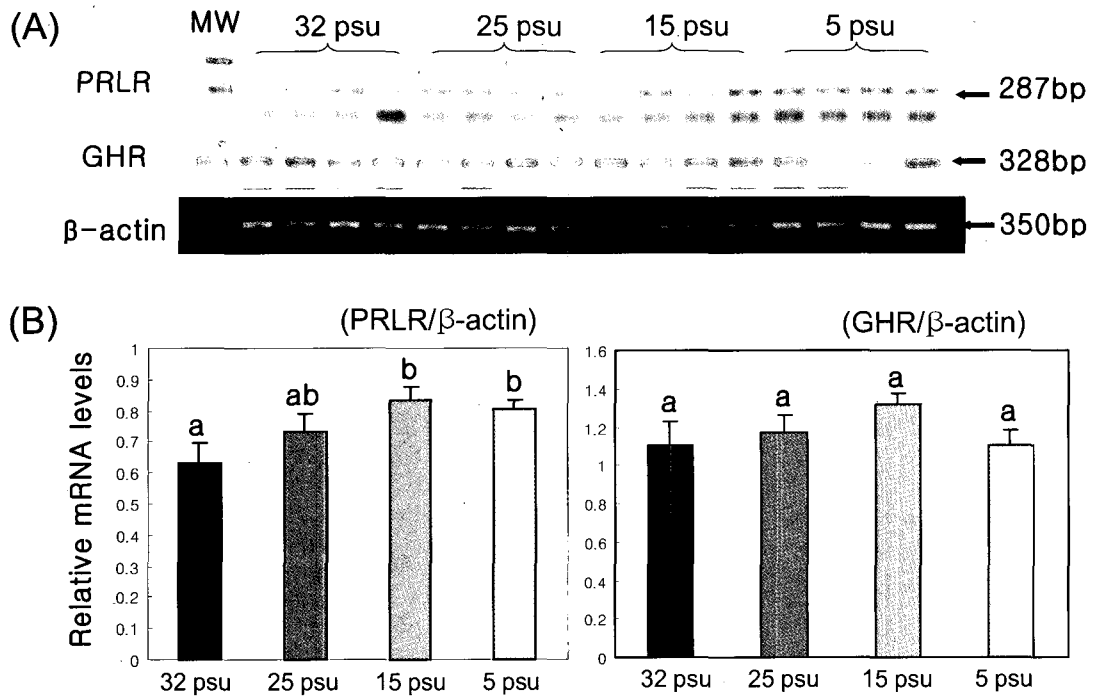


Fig. 4. Expression levels of PRLR and GHR mRNA in the kidney of olive flounder that were adapted in different salinities for 3 days. (A) RT-PCR analysis of PRLR and GHR (upper two panels) and β -actin (lower panel) in total RNA prepared from the kidney of olive flounder (n=4). The molecular markers (MW) are shown on left sides. Arrows indicate molecular sizes of PRLR (287 bp), GHR (328 bp) and β -actin (350 bp) (B) The relative PRLR and GHR mRNA levels were normalized by β -actin values.

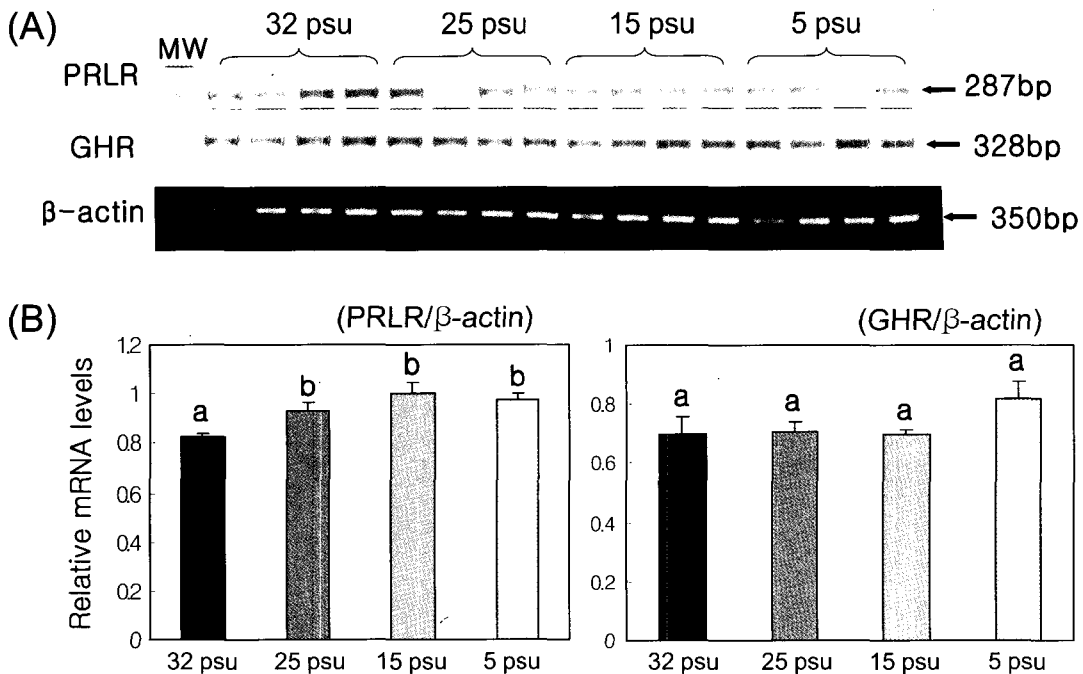


Fig. 5. Expression levels of PRLR and GHR mRNA in the gill of olive flounder that were adapted in different salinities for 3 days. (A) RT-PCR analysis of PRLR and GHR (upper two panels) and β -actin (lower panel) in total RNA prepared from the gill of olive flounder (n=4). The molecular markers (MW) are shown on left sides. Arrows indicate molecular sizes of PRLR (287 bp), GHR (328 bp) and β -actin (350 bp) (B) The relative PRLR and GHR mRNA levels were normalized by β -actin values.

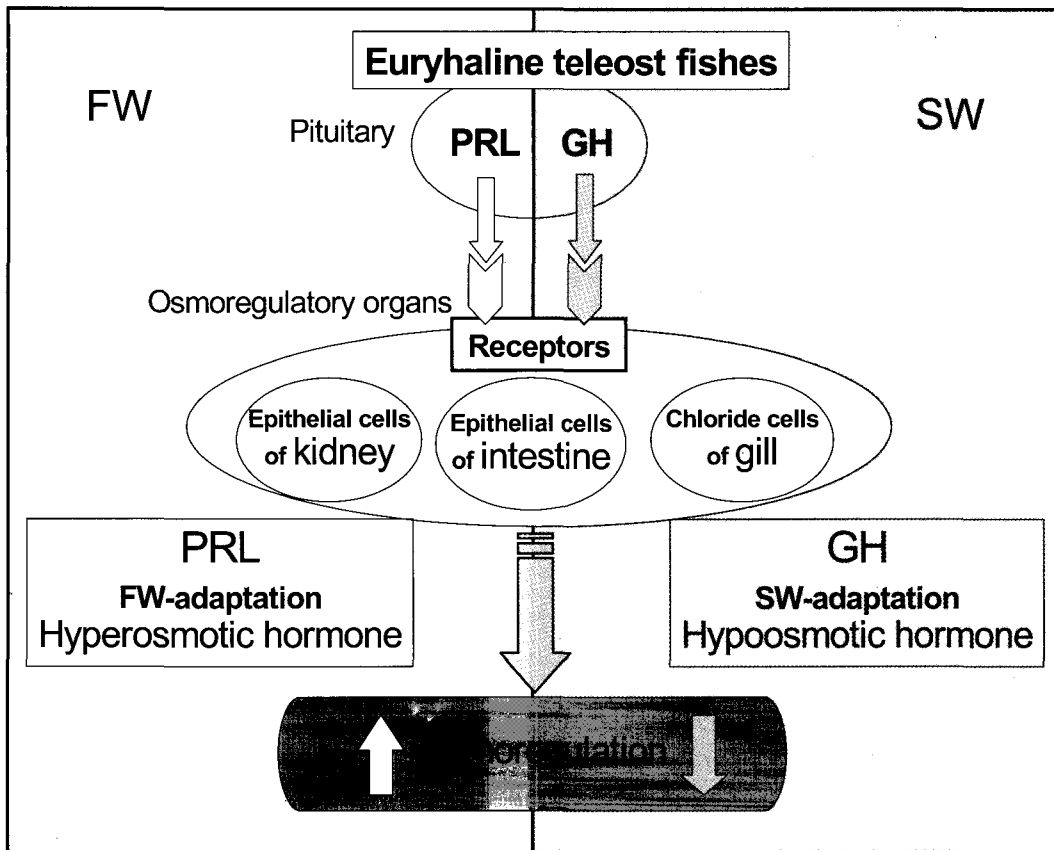


Fig. 6. Schematic representation for endocrine effects of PRL and GH on osmoregulation system in olive flounder (FW, fresh water; SW, sea water).

순치된 넙치사이에 큰 차이가 없었으며, 본 결과는 넙치가 낮은 삼투압환경에 적응할 때 GH는 깊이 관여하지 않음을 간접적으로 시사하고 있다.

염분변화에 따른 어체내의 적절한 이온농도를 유지할 수 있는 생체기능은 관련된 호르몬뿐만 아니라 신장, 장, 아가미 등 삼투압 조절기관의 호르몬수용체 발현 정도에 따라 크게 영향을 받는다. 호르몬 신호는 삼투압 조절기관의 수용체를 매개체로 하여 세포내로 전달되어 기능을 하게 되고, 세포내에서 단백질들이 활성화되어 각 기관에서 이온 항상성을 유지하게 된다 (McCormick, 2001; Mancera et al., 2002). 본 연구에서는 삼투압 조절에 관여하는 호르몬과 수용체의 발현변화를 조사하여 호르몬유전자의 발현과 어떠한 상관관계가 있는지 알아보았다. 염분농도 차이에 따른 GHR의 mRNA 발현변화는 유의적인 차이가 없었으나, PRLR의 mRNA 발현은 저염분 환경에서 약간 증가되었다. 따라서, GHR은 넙치의 저염분 환경에 있어 큰 역할을 하고 있지 않으며, 삼투압조절기관에서 발현되는 PRLR은 뇌하수체에서 생산되는 PRL과 함께 저염분 환경에 적응할 때 중요한 역할을 담당하고 있을 가능성이 시사되었다. 광염성 해산어인 복어 (*Takifugu rubripes*)의 경우 100% 해수보다 25% 해수환경에서 PRL의 mRNA level이 증가되었고, 아가미의 염류세포에서는 저염분환경에 적응시

켰을 때 Na^+/K^+ -ATPase활성이 저하되고, 개구부의 크기는 작아지며, 그 수 또한 적어지면서 어체내의 이온유출이 억제되는 메커니즘이 알려져 있다 (Lee et al., 2006). 본 실험에서도 데이터로 나타내지는 않았지만, 혈장내 칼슘 및 인산염의 농도는 환경수중의 염분 농도에 관계없이 일정하였다. 향후, 광염성 해산어가 저염분 환경에 적응하는 과정에서 PRL과 GH의 역할을 더욱 잘 이해하기 위해서는 수용체에 대한 GH, PRL의 직접적인 작용을 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통하여 조사하여야 할 것이다.

이상의 결과를 정리하면, 넙치치어가 저염분 환경수에 3일간 순치되었을때 뇌하수체 PRL 및 신장, 장, 아가미의 PRLR 생산이 증가되었으나, GH 및 GHR은 큰 변화가 없었다. 따라서, PRL은 넙치의 저염분 해양환경에 적응하는 과정에 중요한 역할을 담당하는 호르몬으로 판단되며, 그 수용체인 PRLR의 발현과도 밀접한 관련이 있음을 시사하고 있다 (Fig. 6).

사 사

실험장소와 실험어를 할애해주신 해동수산 및 국립수산물학원 동해수산연구소 연어 연구센터 관계자 분들께 심심한 사의를 표합니다. 저자 신지혜는 교육인적자원부 2단계 BK21 핵심사업의 수혜학생임을 밝히며 사의를 표합니다.

참고 문헌

- 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.
- 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.
- Helms, L.M.H., 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.
- Higashimoto, Y., N. Nakao, T. Ohkubo, M. Tanaka and K. Nakashima. 2001. Structure and tissue distribution of prolactin receptor mRNA in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): conserved and preferential expression in osmoregulatory organs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 123, 170-179.
- Hirano, T. 1986. The spectrum of prolactin action in teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 112, 53-74.
- Kawachi, H. and S.A. Sower. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148, 3-14.
- Kelly, S.P., I.K. Chow and N.S. Woo. 1999. Effects of prolactin and growth hormone on strategies of hypoosmotic adaptation in a marine teleost, *Sparus sarba*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113, 9-22.
- Lee, K.M., T. Kaneko and K. Aida. 2006. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 143, 318-28.
- Mancera, J.M., R.L. Carrion and M.D.M. Riedel. 2002. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 129, 95-103.
- 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.
- Manzon, L.A. 2002. The prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 125, 291-310.
- McCormick, S.D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am. Zool.*, 41, 781-794.
- 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.
- Nakao, N., Y. Higashimoto, T. Ohkubo, H. Yoshizato, N. Nakai, K. Nakashima and M. Tanaka. 2004. Characterization of structure and expression of the growth hormone receptor gene of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Endocrinol.*, 182, 157-164.
- Power, D.M. 2005. Developmental ontogeny of prolactin and its receptor in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 142, 25-33.
- Sampaio, L.A. and A. Bianchini. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 269, 187-196.
- 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.
- 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.

2006년 6월 28일 접수

2006년 8월 23일 수리