

고수온에 의한 틸라피아 HSP70 유전자 발현과 Quercetin의 발현 억제 효과

권 준 영^{1,*} · 김 수 미²

¹선문대학교 수산생명의학과, ²국립수산과학원 서해수산연구소

Inhibitory Effect of Quercetin on the Expression of HSP70 Gene Induced by High Water Temperature in Tilapia

Joon Yeong Kwon^{1,*} and Su-Mi Kim²

¹Dept. of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea

²West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Incheon 400-420, Korea

ABSTRACT : Water temperature governs various biological events in many aquatic animals including fish. Temperature changes the rates of gametogenesis and development, in some cases, is even capable of reversing fish sex. Treatments of fish with unusually high temperature are known to induce the expression of HSP70 gene. Development of an effective inhibitor for HSP70 gene expression is, thus, crucial to study the role of HSP70 in the temperature sensitive biological events. We have investigated the inhibitory effect of quercetin, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon, a natural flavonoid, on the expressions of HSP70 gene induced by high temperature (36°C) in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, larvae and juveniles (10~13 cm in total length). The expression of HSP 70 gene was significantly decreased in tilapia larvae immersed in 50 µM or 100 µM quercetin solution for 6 hours before the exposure to high temperature ($P<0.05$). In particular, the level of HSP70 expression in fish treated with 100 µM was as low as that of fish without high temperature treatment. Juveniles of tilapia were individually injected with 0.1 ml of either 0.5 mM, 5 mM or 20 mM of quercetin solution before the exposure to high temperature. As the results, the expression of HSP70 gene in the gonad and brain of juvenile fish was significantly inhibited by the injection of 0.5 mM quercetin solution ($P<0.05$), but not by higher concentrations. We report, for the first time in the fish, that quercetin effectively inhibits the expression of HSP70 gene induced by high temperature and 100 µM for the immersion of larvae and 0.5 mM for the injection to juvenile can be used for the effective concentrations for the study of temperature sensitive biological events in tilapia.

Key words : Quercetin, Heat shock protein, HSP70, Gene expression, Water temperature, Brain, Gonad, Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

요 약 : 수온은 어류를 포함한 수중동물의 다양한 생물학적 사건에 영향을 미친다. 어류의 번식 및 발생도 수온의 변화와 밀접한 관련이 있다. 어류를 높은 수온에 노출시키면 HSP70 유전자 발현을 유도한다. 따라서, HSP70 유전자 발현을 효과적으로 차단할 수 있는 저해제의 개발은 온도에 민감한 생물학적 사건과 관련된 HSP70의 역할을 연구하는데 크게 기여할 수 있다. 본 연구에서는 고온(36°C)에 노출된 틸라피아 자어와 치어(전장 10~13 cm)에서 천연 flavonoid의 일종인 quercetin, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon의 “고온 유도 HSP70 유전자 발현” 억제효과를 조사하였다. 고온 노출 전에 50 µM 이상의 quercetin 용액에 6시간 동안 사전 침지한 실험어에서는 HSP70 유전자 발현이 유의하게 감소하였다($P<0.05$). 특히, 100 µM로 침지 처리한 개체에서는 고온 처리를 하지 않은 실험어에서 만큼 낮은 HSP70 유전자 발현을 나타내었다. 한편, 0.1 ml씩의 0.5 mM, 5 mM 또는 20 mM의 quercetin 용액을 치어에 주사한 결과, 고수온 유도 HSP70 유전자 발현은 0.5 mM의 quercetin을 주사한 치어의 생식소와 뇌에서 모두 유의하게 감소되었다($P<0.05$). 본 연구의 결과는 quercetin이 어류에서 고온에 의해 유도된 HSP70 유전자 발현을 효과적으로 차단할 수 있으며, 틸라피아 자어 침지의 경우 유효 농도 100 µM 그리고 치어 주사의 경우 유효 농도 0.5 mM로 원하는 효과를 얻을 수 있음을 제시한다.

* 교신저자: 권준영, 충청남도 아산시 탕정면 갈산리 100번지 선문대학교 수산생명의학과. (우) 336-708, (전) 041-530-2284, (팩) 041-530-2917, E-mail: jykwon@sunmoon.ac.kr

서 론

어류가 살고 있는 물의 온도는 대기 온도의 영향을 받아 늘 변화하고 있으며, 변온동물인 어류의 체온은 주변 수온의 변화에 따라 함께 변화한다. 따라서, 수온의 일변화(daily changes) 및 계절적 변화(seasonal changes)는 어류의 발생, 성장, 번식, 질병에 대한 면역성 등의 중요한 생물학적 현상에 강력하고도 광범위한 영향을 미친다. 어류 양식가들은 많은 경험과 꾸준한 실험적 관찰을 통하여 각 양식대상 어종에 대한 성장적수온, 생존한계수온 등을 파악하여 왔다. 그리고 수온의 인위적인 조절을 통하여 번식시기를 조절하는가 하면 (Chang et al., 2001), 심지어는 성의 전환을 유도(Abucay et al. 1999; Kwon et al., 2002)하기까지 하였다. 그러나, 수온이 갖는 효과에 대한 많은 관심에도 불구하고, 아직까지 수온이 어떠한 생물학적/생화학적인 경로를 거쳐 성장, 생존, 번식 등에 변화를 초래하는 지는 깊이 이해되지 못하고 있다.

Heat Shock Protein(열충격 단백질, HSP)은 1962년 열충격 스트레스에 노출된 초파리에서 최초로 보고되어진 이후 (Ritossa, 1962), 포유류(Hunt & Morimoto, 1985; Hunt & Calderwood, 1990)와 어류(Oda et al., 1991)를 포함한 다양한 생물군에서 그 존재가 확인되었다. 이 단백질은 온도를 포함한 다양한 환경스트레스에 반응하여 생물 세포내에서 생성되어질 뿐만 아니라(Iwama et al., 1998), steroid hormone receptor 복합체의 구성요소로서 DNA와의 결합 활성을 높이는(Schowalter et al., 1991; Smith & Toft, 1993) 것으로 밝혀졌다. 또한 개구리(*Xenopus laevis*)에서는 HSP 중 하나인 HSP70의 결합 단백질 유전자 발현이 이 종의 성분화 시기에 맞추어 크게 증가하였으며, Akatsuka et al.(2004)은 이러한 연구결과 등을 바탕으로 HSP가 이 종의 성분화 과정에 연관되어 있을 가능성을 제기하였다.

Nile tilapia(나일 틸라피아 *Oreochromis niloticus*)는 세계적으로 광범위한 영역에 걸쳐 양식되고 있는 중요한 식용 어류의 하나로, 성분화 및 산란주기가 온도의 영향을 크게 받는 어종이다(온도의존성 성분화 temperature dependent sex determination: TSD)(Abucay et al., 1999; Kwon et al., 2002). 최근 Kwon & Kim(2010)은 나일 틸라피아의 HSP70과 HSP90 유전자를 cloning하여 염기서열을 밝히고, 고수온에 노출된 틸라피아의 생식소 및 간 조직에서 HSP70 유전자 발현이 크게 증가하였음을 제시하면서 온도에 민감한 생식소 분화 및

발달에 HSP70이 중요한 역할을 할 수 있음을 제안하였다. 그러나, 고수온에 의한 HSP70 유전자 발현 유도가 환경 스트레스에 대한 반응으로 초래된 독립된 사건인지 이 종의 성분화 및 성발달과 깊이 연관되어 있는지는 아직 명확하지 않다. 수온 변화와 HSP70 유전자 발현 그리고 성현상 사이의 연관성을 밝히기 위해서는 HSP70 발현을 억제된 상태에서 수온 변화에 따른 성분화 및 성발달을 유도하여 보아야 한다. 그리고 이를 위해서는 HSP70 유전자 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 방법의 확립이 필수적으로 요구된다.

Quercetin(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon)은 많은 과일과 야채에 함유되어 있는 flavonoids의 하나이며, 강력한 항산화제이다(Kühnau, 1976). 이 flavonid는 COLO320 DM 세포와 HeLa 세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 “heat shock에 의해 유도된 HSP70 합성”을 억제하는 능력이 확인된(Hosokawa et al., 1990) 이후, 포유류의 여러 종양세포에서 유사한 효과가 재현되었으며(Hosokawa et al., 1992; Nagai et al., 1995; Hansen et al., 1997; Jakubowicz-Gil et al., 2002; Nonaka et al., 2003), 개구리 신장 세포에서도 동일한 억제 효과가 관찰되었다(Manwell & Heikkila, 2007). 본 연구에서는 어류 체내에서 HSP70 유전자 발현을 효과적으로 차단할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 quercetin이 틸라피아 자어 및 치어에서도 동일한 억제 효과를 나타내는지, 그리고 유효한 농도는 얼마인지 등을 알아보는 일련의 실험을 실시하였다. 본 논문은 어류에서 quercetin의 HSP70 유전자 발현 억제 효과를 조사한 최초의 연구 보고이다.

재료 및 방법

1. 실험어

선문대학교 어류사육시설(충청남도 아산)에서 생산한 수정 후 15일된 틸라피아(*O. niloticus*) 자어와 전장 10~13 cm 인 틸라피아 치어를 실험에 이용하였다. 자어와 치어는 각각 한 어미로부터 얻어진 것을 사용하였으며, 실험 전까지 실험어는 수온 28℃의 순환여과식 수조에 수용하여 사육하였다.

2. Quercetin이 틸라피아 자어의 고수온 유도 HSP70 유전자 발현에 미치는 영향

Quercetin(Sigma)을 1 M NaOH에 250 mM 농도로 녹여 stock solution을 만든 다음, 실험수에 필요한 양만큼 넣어 실

험 농도를 만들었다. HSP70 유전자 발현을 억제할 수 있는 유효 quercetin 농도를 파악하기 위하여 6개의 용기에 각각 500 ml씩의 실험수를 넣고 quercetin stock solution을 첨가하여 각각의 quercetin 농도를 0, 0, 10, 50, 100, 500 μM 로 조정하였다. 이 때, quercetin 0 μM 인 두 개의 용기에는 quercetin을 녹이는데 이용한 1 M NaOH만 200 μl 씩 넣어주었다. 그런 다음 각각의 용기에 10마리씩의 틸라피아 자어를 수용하여 28°C에서 6시간 동안 침지시켰다. 침지 처리 직후 각 처리구의 실험어를 깨끗한 사육수로 옮긴 다음, vehicle만 넣고 침지시킨 실험구 하나는 계속해서 28°C를 유지하였으며(28°C vehicle), vehicle만 넣고 침지시킨 다른 하나(36°C vehicle)는 농도를 달리한 quercetin 용액에 침지한 다른 네 개의 실험구와 함께 36°C의 고수온에 노출시켰다(quercetin 10 μM : 36°C+Q10, quercetin 50 μM : 36°C+Q50, quercetin 100 μM : 36°C+Q100, quercetin 500 μM : 36°C+Q500). 고수온 노출 실험구의 온도는 약 1시간에 걸쳐 28°C에서 36°C로 상승시켰으며, 이후 이 온도에서 2시간 동안 더 고온 처리하였다. 고수온 처리 종료 직후 모든 실험구에서 실험어를 잡아내어 전어체를 급속 냉동하였다가 개체별로 total RNA를 추출하여 유전자 분석에 사용하였다.

TRI reagent(MRC Inc.)를 이용하여 개체별로 전어체에서 total RNA를 추출하였으며, 추출한 각각의 RNA(2 μg)로부터 M-MLV reverse transcriptase(Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 얻어진 cDNA(1 μl)를 template로 하여 HSP70 유전자와 β -actin 유전자(control) 발현을 조사하기 위한 PCR을 수행하였다. PCR을 위한 HSP70 유전자(forward: AGATGTCTGCAGCTAAAGGT, reverse: CGCTGGGAGTCGTTGAAGTA, 5'→3', product size 472 bp)와 β -actin 유전자(forward: AATCGTGCGTGACATCAAGG, reverse: AGTATTTACGCTCAGGTGGG, 5'→3', product size 392 bp)의 primer들은 선행 연구(Kwon & Kim, 2010)에서 사용한 것과 동일하게 제작하여 사용하였다. HSP70 유전자 발현 조사를 위한 PCR 조건은 94°C에서 2분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 반응시켜 1 cycle 후, 다시 94°C에서 1분, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 반응시켜 24 cycle한 다음, 마지막으로 72°C에서 6분간 1 cycle 반응시켰다. Control gene인 β -actin 유전자 발현 조사를 위한 PCR 조건은 94°C에서 2분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 반응시켜 1 cycle 후, 다시 94°C에서 1분, 57°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 반응시켜

24 cycle한 다음, 마지막으로 72°C에서 6분간 1 cycle 반응시켰다. PCR을 위한 reagents는 SunGenetics사의 제품을 구입하여 이용하였다.

PCR 생성물은 1× TBE buffer와 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하였고, UV transilluminator와 gel documentation system(Kodak ID)을 이용하여 DNA band의 intensity를 측정하여 유전자 발현 정도를 파악하였다. HSP70 유전자의 발현 정도는 β -actin 유전자 발현에 대한 상대값을 계산하여 구하였다. 얻어진 모든 data는 mean±SEM(n=4)으로 표현하였으며, Kruskal-Wallis test 실시 후 control(36°C vehicle)과 각 처리구 사이의 유의차 유무를 비모수적 비교를 통해 검정하였다($P<0.05$).

3. Quercetin이 틸라피아 치어의 고수온 유도 HSP70 유전자 발현에 미치는 영향

Quercetin을 0.1% demethyl sulfoxide(DMSO, Sigma) 용액에 녹여 틸라피아 치어의 복강에 주사하였다(처리구별로 각각 4마리씩 주사). Quercetin 농도별 차이를 보기 위하여 세가지 농도(Quercetin 0.5 mM: 36°C+Q0.5, Quercetin 5 mM: 36°C+Q5, Quercetin 20 mM: 36°C+Q20)의 quercetin 용액을 어체 1마리당 각각 0.1 ml씩 주사하였다. Quercetin 처리시간과 온도 상승 절차, 고온 처리 시간 등은 자어 침지 실험의 경우와 같았다. 세 가지 농도 실험구 이외에 vehicle (0.1% DMSO)만을 동일한 양으로 주사한 28°C 대조구(28°C vehicle)와 36°C 대조구(36°C vehicle)를 각각 포함시켰다. Quercetin 처리 실험구는 모두 36°C에 2간 노출시켰다. 그런 다음 각 실험어들을 모두 50 ppm의 benzocaine 용액에 마취시킨 후 해부하여 생식소(gonad)와 뇌(brain)를 채취하였고, 이 조직들로부터 total RNA를 추출하여 HSP70 및 β -actin 유전자 발현을 PCR에 의해 조사하였다. Total RNA 추출과정, cDNA 합성과정, PCR, 전기영동, 통계처리 등 나머지 실험 및 분석 절차는 자어 침지실험의 경우와 동일하게 실시하였다.

결 과

1. Quercetin이 틸라피아 자어의 고수온 유도 HSP70 유전자 발현에 미치는 영향

침지 및 고온 처리 중 quercetin 100 μM 이하의 모든 실

험구에서는 폐사 개체가 관찰되지 않았으나, quercetin 500 μM 에 침지시킨 후 고온에 노출시킨 실험어는 실험 종료 전에 모두 폐사하였다. 따라서, HSP70 유전자 발현은 28°C vehicle, 36°C vehicle, 36°C+Q10, 36°C+Q50 및 36°C+Q100의 5개 실험구에서만 조사하였다. Quercetin에 침지하지 않은 자어들에서는 28°C vehicle보다 36°C vehicle 처리구에서 HSP70 유전자 발현량이 유의하게 높았다($P<0.05$)(Fig. 1). 그러나 고온 노출 전에 50 μM 이상의 quercetin 용액에 6시간 동안 사전 침지한 실험구에서는 HSP70 유전자 발현이 유의하게 감소하였다($P<0.05$). 한편, 10 μM 의 농도는 HSP70 유전자 발현을 억제시키는데 충분치 못하였고, 100 μM 에서는 고온 처리를 하지 않은 실험구와 비슷한 수준으로까지 HSP70 유전자 발현을 억제하여 quercetin의 작용이 농도의 존적임을 알 수 있었다.

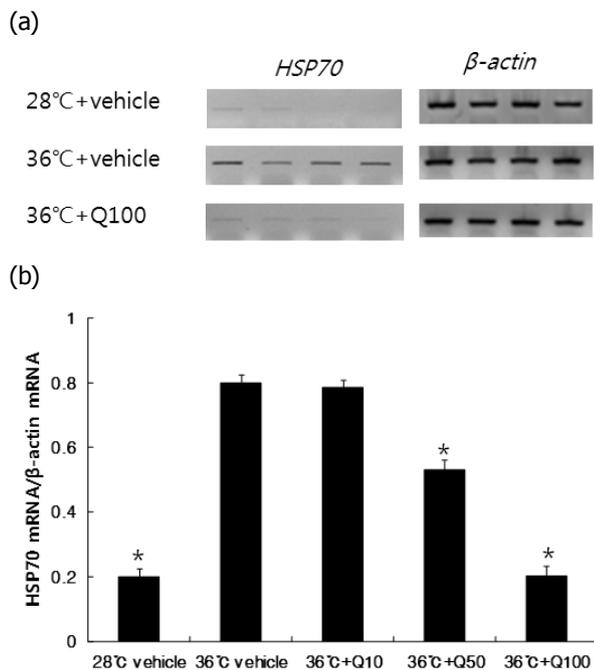


Fig. 1. Changes of HSP70 gene expression in the larvae of Nile tilapia at two water temperatures (28°C and 36°C) after the immersion either in the vehicle alone or in the quercetin (Q) solutions (10, 50, 100 μM). The expressions of HSP70 gene and β -actin gene (as a control) were examined by using semi-quantitative RT-PCR analysis ($n=4$). PCR products were run in a 1% agarose gel. * indicates significant difference from control (36°C vehicle).

2. Quercetin이 틸라피아 치어의 고수온 유도 HSP70 유전자 발현에 미치는 영향

자어 침지 실험에서와는 달리, 치어를 대상으로 한 실험 중에는 quercetin 주사에 의한 어체의 특이 행동이나 폐사는 관찰되지 않았다. 자어의 경우와 마찬가지로 고온 처리(36°C)는 치어의 생식소와 뇌에서 생식소와 뇌에서 HSP70 유전자의 발현을 유의하게 증가시켰다($P<0.05$)(Fig. 2a, b). 이 고수온 유도 HSP70 유전자 발현은 0.5 mM의 quercetin을 주사한 치어의 생식소와 뇌에서 모두 유의하게 감소되었지만

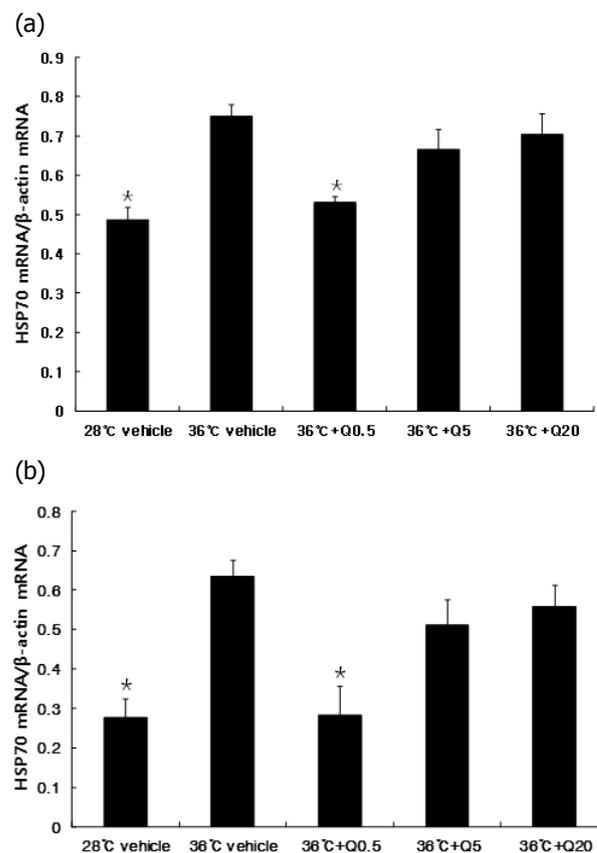


Fig. 2. Changes of HSP70 gene expression in the gonad (a) and brain (b) of young Nile tilapia after the injection of either vehicle alone or quercetin (Q) with different concentrations (0.5, 5, 20 mM) at two water temperatures (28°C and 36°C). The expressions of HSP70 gene and β -actin gene (as a control) were examined by using semi-quantitative RT-PCR analysis ($n=4$). PCR products were run in a 1% agarose gel. * indicates significant difference from control (36°C vehicle).

($P < 0.05$), 더 높은 농도인 5 mM과 20 mM의 quercetin을 주사한 치어에서는 통계적으로 유의한 억제 효과가 나타나지 않았다($P > 0.05$).

고찰

틸라피아 자어와 치어를 고온에 노출하여 HSP70 유전자 발현 유도를 재현함으로써 선행 연구(Kwon & Kim, 2010)와 일치하는 결과를 얻었으며, 고온에 의한 이 유전자 발현이 flavonoids의 한 종류인 quercetin에 의해 효과적으로 제어될 수 있음을 *in vivo* 실험을 통해 확인하였다. Quercetin이 “heat shock에 의해 유도된 HSP70 합성”을 억제할 수 있다는 것은 포유류의 여러 종양세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 밝혀졌으며(Hosokawa et al., 1990; Hosokawa et al., 1992; Nagai et al., 1995; Hansen et al., 1997; Jakubowicz-Gil et al., 2002; Nonaka et al., 2003), 개구리 신장 세포에서도 동일한 억제 효과가 관찰되었지만(Manwell & Heikkila, 2007), 어류에서 확인된 것은 이번이 최초이다.

본 연구에서 자어와 치어를 연구대상으로 정한 것은 이 때가 틸라피아에서 각각 성분화 및 최초 성숙이 진행되는 시기이며, 이러한 생물학적 사건들이 수온에 매우 민감하기 때문이다. 본 연구에서 확인된 quercetin의 “고온 유도 HSP70 합성” 억제 효과는 이 종의 성분화 및 최초 성숙 시 HSP70의 역할 및 수온의 작용 경로를 연구하는데 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것이다. 그러나, 이 물질을 HSP70의 차단제로 활용하기 위해서는 유효 농도 및 부작용을 배제할 수 있는 안전 농도의 설정을 위해 다음의 몇 가지 사항을 고려할 필요가 있다.

포유류 및 개구리 세포를 이용한 실험에서 얻어진 결과에 따르면, quercetin은 고온 처리 시 HSP70의 신생합성을 막아 온도저항성(thermotolerance)을 저하시키고, 그 결과 세포사멸(apoptosis)을 증가시킨다(Wei et al., 1994; Manwell & Heikkila, 2007). 따라서, 과도하게 높은 농도의 quercetin은 세포 또는 개체의 온도저항성을 저하시켜 폐사에 이르게 할 가능성이 있다. 본 연구의 자어 침지 실험에서 500 μM 에 침지한 자어들이 고온 처리 시 전량 폐사한 것은 이러한 가능성을 뒷받침한다. 틸라피아 자어에서는 100 μM 의 quercetin이 HSP70의 발현을 일상적인 온도(28°C)에서의 발현 수준으로 떨어뜨렸기 때문에 이보다 높은 농도를 사용할 필요는 없

을 것으로 판단된다. 개구리 신장 세포를 이용한 연구에서도 - *in vitro* 실험이라 직접 비교는 어렵지만 - 100 μM 의 quercetin이 HSP70의 발현을 효과적으로 억제하였다(Manwell & Heikkila, 2007).

Quercetin의 세포에 대한 독성은 강하지 않은 것으로 알려져 있다. HSP와 연관된 연구는 아니었지만, Plakas et al.(1985)는 무지개 송어(rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*)에 장기간 quercetin이 포함된 사료를 먹인 후 조직학적 변화를 조사한 결과, 유의한 독성효과를 발견할 수 없었다고 보고하였다. 또한, 무지개 송어의 간세포를 quercetin을 비롯한 여러 가지 flavonoids에 낮은 농도(25 μM)로 노출시킨 결과, quercetin의 세포 독성은 다른 flavonoids에 비교할 때 무시할 수 있을 정도로 적었다(Tsuji & Walle, 2008). 그러나 quercetin은 포유류 및 어류 세포에서 aromatase 저해 활성을 가지고 있는 것으로 의심되고 있어서(Kellis & Vickery, 1984; Pelissero et al., 1996), 스테로이드 호르몬이나 스테로이드 합성 효소와 관련된 연구를 진행할 때는 특별한 주의가 요구된다. 특히 quercetin을 6주간 장기적으로 처리한 Japanese medaka (*Oryzias latipes*)에서는 난소 여포의 퇴행성 변화가 관찰되었다는 보고도 있다(Weber et al., 2002).

틸라피아 치어에 대한 quercetin 주사는 예상했던 것과는 다소 다른 결과를 보였다. 침지실험에서는 quercetin 농도 증가에 따라 HSP70 유전자 발현 억제 효과가 증가하였지만, 치어 주사에서는 가장 낮은 농도인 0.5 mM 처리구에서만 유의한 억제 효과가 나타났고, 더 높은 농도인 5 mM과 20 mM 처리구에서는 조사한 모든 조직에서 유의한 억제 효과가 나타나지 않았다. 자어 침지 실험에서 가장 높은 농도인 500 μM 에 침지한 자어들이 고온 처리 시 전량 폐사한 것이나, 치어 실험에서 고농도 처리구가 효과가 없었던 점은 현재로서는 설명하기 힘든 부분이다. Quercetin이 비록 인체용 약품으로 개발되고 있기는 하지만(Wang et al., 2009), HSP70을 억제하는 정확한 작용 메커니즘은 아직 완전히 밝혀져 있지 못하다. 최근까지의 연구를 종합해 보면, quercetin의 처리는 고온 처리 시 CK2(casein kinase 2)와 CamKII(calcium/calmodulin kinase II) 등의 효소 활성을 저해하고, 그 결과, 고온에 의해 유도되는 HSF1(heat shock transcription factor 1)의 인산화 반응(phosphorylation)을 저해하여 HSP70 유전자 발현 및 합성을 억제하는 것으로 추정되고 있다(Wang et al., 2009). 이는 quercetin이 다양한 kinase 활성을 저해하여

세포내 여러 인산화 과정 경로를 교란할 수 있고, 예측하지 못한 결과를 초래할 수 있음을 시사한다. 따라서, 어류 생물학 연구를 위해 quercetin을 사용하고자 할 때는 유효 농도와 안전 농도를 충분히 고려하여 접근할 필요가 있다.

결론적으로, 본 연구의 결과는 quercetin이 어류에서 고온에 의해 유도된 HSP70 유전자 발현을 효과적으로 차단할 수 있으며, 틸라피아 자어 침지의 경우 유효 농도 100 μ M 그리고 치어 주사의 경우 유효 농도 0.5 mM로 원하는 효과를 얻을 수 있음을 제시한다. 그러나 안전 농도의 확립이나 타 어종에 적용하기 위해서는 추가적인 연구가 뒤 따라야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-311-F00094).

인용문헌

- Abucay JS, Mair GC, Skibinski DOF, Beardmore JA (1999) Environmental sex determination: The effects of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 173:219-234.
- Akatsuka N, Kobayashi H, Watanabe E, Iino T, Miyashita K, Miyata S (2004) Analysis of genes related to expression of aromatase and estradiol-regulated genes during sex differentiation in *Xenopus* embryos. *Gen Comp Endocrinol* 136:382-388.
- Chang YJ, Lim HK, Kwon JY (2001) Changes in plasma steroid hormone level in rockfish (*Sebastes inermis*) by the controlled water temperature and photoperiod. *J Korean Fish Soc* 34:13-16.
- Hansen RK, Oesterreich S, Lemieux P, Sarge KD, Fuqua SAW (1997) Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 239:851-857.
- Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K, Nagata K (1992) Inhibition of heat shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids. *Mol Cell Biol* 12: 3490-3498.
- Hosokawa N, Hirayoshi K, Nakai A, Hosokawa Y, Marui N, Yoshida M, Sakai T, Nishino H, Aoike A, Kawai K, Nagata K (1990) Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct Func* 15:393-401.
- Hunt C, Calderwood S (1990) Characterization and sequence of a mouse hsp70 gene and its expression in mouse cell line. *Gene* 87:199-204.
- Hunt C, Morimoto RI (1985) Conserved features of eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6455-6459.
- Iwama GK, Thomas PT, Forsyth RB, Vijayan MM (1998) Heat shock protein expression in fish. *Rev Fish Biol Fish* 8:35-56.
- Jakubowicz-Gil J, Rzymowska J, Gawron A (2002) Quercetin, apoptosis, heat shock. *Biochem Pharmacol* 62:1591-1595.
- Kellis JT, Vickery LE (1984) Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science* 225:1032-1034.
- Kühnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *Wld Rev Nutr Diet* 24:117-191.
- Kwon JY, Kim J (2010) Responses of HSP gene expressions to elevated water temperature in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Dev Reprod* 14:179-184.
- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ (2002) Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. *J Fish Biol* 60:625-636.
- Manwell LA, Heikkila JJ (2007) Examination of KNK437- and quercetin-mediated inhibition of heat shock-induced heat shock protein gene expression in *Xenopus laevis* cultured cells. *Comp Biochem Physiol Part A* 148:521-530.
- Nagai N, Nakai A, Nagata K (1995) Quercetin suppresses heat shock response by down regulation of HSF1. *Bio-*

- chem Biophys Res Commun 208:1099-1105.
- Nonaka T, Akimoto T, Mitsunashi N, Tamaki Y, Yokota S, Nakano T (2003) Changes in the localization of heat shock protein 72 correlated with development of thermotolerance in human esophageal cancer cell line. *Anticancer Res* 23:4677-4687.
- Oda D, Mitani H, Naruse K, Shima A (1991) Synthesis of heat shock proteins in the isolated fin of the medaka, *Oryzias latipes*, acclimated to various temperatures. *Comp Biochem Physiol* 98B:587-591.
- Pelissero C, Lenczowski MJP, Chinzi D, Davail-Cuisset B, Sumpter JP, Fostier A (1996) Effects of flavonoids on aromatase activity, an *in vitro* study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57:215-223.
- Plakas SM, Lee TC, Wolke RE (1985) Absence of overt toxicity from feeding the flavonol, quercetin, to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Food Chem Toxicol* 23:1077-1080.
- Ritossa FM (1962) A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experimentia* 18:571-573.
- Schwalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson AD, Conneely OM, O'Malley BW, Toft DO (1991) Characterization of progesterone receptor binding to the 90- and 70 kDa heat shock proteins. *J Biol Chem* 266: 21165-21173.
- Smith DF, Toft DO (1993) Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11.
- Tsuji PA, Walle T (2008) Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. *Chemico-Biol Interact* 171:37-44.
- Wang RE, Kao JLF, Hilliard CA, Pandita RK, Roti JLR, Hunt CR, Taylor JS (2009) Inhibition of heat shock induction of heat shock protein 70 and enhancement of heat shock protein 27 phosphorylation by quercetin derivatives. *J Med Chem* 52:1912-1921.
- Weber LP, Kiparissis Y, Hwang GS, Niimi AJ, Janz DM, Metcalfe CD (2002) Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol Part C* 131:51-59.
- Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K, Uchida A (1994) Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res* 54:4952-4957.
-
- (Received 25 November 2011, Received in revised form 14 December 2011, Accepted 15 December 2011)