

구두충(*Longicollum pagrosomi*)에 감염된 참돔(*Pagrus major*)의 Heat Shock Protein 70 (Hsp70) 발현

박형준 · 민병화^{1*}

국립수산과학원 양식관리과, ¹동해수산연구소 양식산업과

Expression of a Heat Shock Protein 70 (Hsp70) in Red Seabream *Pagrus major* Infected with *Longicollum pagrosomi*

Hyung-Jun Park and Byung-Hwa Min^{1*}

Aquaculture Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

¹Aquaculture Industry Research Division, East Sea Fisheries Research Institute, Gangneung 25435, Korea

This study examined the expression of heat shock protein 70 (Hsp70) in red seabream *Pagrus major* infected by the, acanthocephalan parasites *Longicollum pagrosomi*. We cloned the full-length Hsp70 cDNA from the liver of the red seabream. The full-length cDNA had a 1,950 bp open reading frame (ORF) that encoded a protein of 650 amino acids. The deduced amino acid sequence of Hsp70 contained all of the conserved Hsp70 family signature sequences and an adenosine triphosphate (ATP)/guanosine triphosphate (GTP) binding motif, including the EEVD (consensus sequence that terminates in Hsp70 family) consensus sequence. The expression of Hsp70 mRNA was upregulated in the fish head-kidney and liver, as determined by quantitative real-time PCR. We quantified the Hsp70 mRNA expression in normal red seabream and fish infected fish by *L. pagrosomi*. The expression of Hsp70 mRNA was significantly higher in the infected red seabream. These results suggest that Hsp70 play a role of protection against stress and inflammation caused by the parasite and may help maintain homeostasis.

Key words: *Pagrus major*, RACE PCR, Hsp70, *Longicollum pagrosomi*, qPCR

서 론

Heat shock protein (Hsp)은 모든 생물에서 계통발생학적으로 잘 보존되어 있고, 온도뿐만 아니라 염분, 중금속, 활성산소 및 미생물의 감염을 비롯한 여러 가지 스트레스 요인에 의해 높은 발현을 보이는 스트레스 단백질로 알려져 있다(Beckmann et al., 1990). Hsps는 스트레스 요인에 의해 나타나는 충격으로부터 자신을 보호함으로써 항상성(homeostasis)을 유지하는 중요한 역할을 담당하며, 분자량을 기초로 하여 Hsp90 (85-90 kDa), Hsp70 (68-73 kDa) 및 저분자 Hsps (16-47 kDa) 등 3개의 그룹으로 나누어진다(Forsyth et al., 1997; Iwama et al., 1998; Basu et al., 2002). 이 중, Hsp70은 Hsp family 중 가장 널리 알려져 있는 단백질 중 하나로, 인간(*Homo sapiens*)뿐만 아니라 제브라피쉬(*Danio rerio*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), humphead snapper *Lutjanus sanguineus* 등 여러 경골

어류에서 보고되어진 바 있으며, 환경조건의 변화나 미생물의 감염으로 인해 손상된 세포나 단백질의 회복을 돕는다(Hutchinson et al., 1994; Graser et al., 1996; Roux et al., 1996; Ojima et al., 2005; Zhang et al., 2011).

구두충은 작은 연충 모양의 장내 기생충으로 1,150종을 포함하고 있으며, 어류에 있어 구두충은 뱀장어의 장에 기생하고 있는 것을 최초로 보고하였고, 이것을 Leewenhock이 *Acanthocephalus anguillae*라고 명명하였다(Alava and Aguirre, 2005). 구두충의 생활사 중 소형 갑각류와 절지동물을 중간숙주로 하는데, 이러한 중간숙주를 먹이로 하는 어류가 감염되는 것으로 알려지고 있다(Kim et al., 2011). 이는 갈고리를 가진 proboscis를 숙주의 장관벽에 침투시켜 광범위한 조직손상을 일으키면서 다양한 척추동물에게 잠재적인 폐사를 유발하고 있으며, 염증 반응을 유발하며 어류에 스트레스로 작용하고 있다(Nickol and Crompton, 1985; Hatai et al., 1987). 특히, 어류는 구두충에 감

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0163>



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, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 51(2) 163-169, April 2018

Received 18 January 2018; Revised 8 February 2018; Accepted 19 March 2018

*Corresponding author: Tel: +82. 33. 660. 8542 Fax: +82. 33. 661. 8514

E-mail address: pkmbh@korea.kr

염이 되면 대부분 소화관에만 국한되어 기생하고 있다는 것으로 미루어 보아, 구두충은 먹이활동 중 경구를 통해 감염되고 여러 조직 중에서도 소화관이 타겟 장기로 보고 되어있다(Zeng and Wang, 2007). 따라서 숙주는 소화기능장애를 유발하고, 장기간의 기능장애와 식욕저하로 인하여 면역력이 감소함으로써 심하게는 폐사에 이르게 한다(Mehlhorn, 2008). 기생충의 감염으로 발생하는 스트레스로 인해 어류의 생리 및 생태학적으로 영향을 미치게 되면서 세포 내 Hsp70의 합성과 더불어 다양한 생리적 변화가 일어나게 된다(Frank et al., 2013).

참돔(*Pagrus major*)은 한국의 주요 해산양식어류로서 고급어종으로 분류되고 있으며, 수요가 점점 증가되고 있을 뿐만 아니라, 활선어로서 수출되어 외화획득에도 상당한 몫을 차지하고 있다(Pyen and Jo, 1982). 주로 한국의 남해안에서 해상가두리 양식을 통해 생산량이 증가하고 있지만, 참돔 양식에 있어 종종 고수온, 밀식, 외상, 저산소(Hypoxia), 어병 세균 및 바이러스의 감염을 통한 스트레스로 인해 심각한 폐사를 유발하기도 하여 양식어가 소득에 많은 영향을 미치고 있다(Kader et al., 2012). 따라서, 본 연구에서는 참돔으로부터 분리된 Hsp70의 분자생물학적 특성과 발현분석을 통해 질병 및 스트레스로 인한 폐사를 막기 위한 기초적인 생체방어메커니즘을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

실험어 및 실험조건

감염어는 통영에 소재하고 있는 참돔 가두리 양식장으로부터 구두충 감염이 의심되는 실험어 100미를 제공받아 국립수산과학원(부산 기장군)으로 옮겨졌다. 이 중, 육안적 관찰을 통해 감염을 확인한 참돔 중 10미(30.7±4.8 cm, 체중 697.1±54.8 g)를 선발하여 실험어로 이용하였다. 대조구인 비감염어는 국립수산과학원 양식생물연구동 사육실내 원형수조(2톤)에서 상업용 사료를 급이하며, 사육수온 17±0.5℃ 광주기 10L:14D 조건하에서 사육중인 참돔을 이용하였다. 이 중, 감염이 확인되지 않은 참돔 10미(평균 전장 37.3±2.5 cm, 체중 818.6±124.7 g)를 선발하여 대조구로 이용되었다. 선발된 감염어 및 비감염어의 기타 세균 및 바이러스성 질병을 확인하기 위해 신장, 비장 및 간을 적출하여 국립수산과학원 병리연구과에 질병 검사를 의뢰하였다. 세균(비브리오, 연쇄구균 및 에드워드균) 및 바이러스(red seabream iridovirus, RSIV) 검사에서 모두 음성으로 판정되었으며, 감염어에 기생하고 있는 장내 구두충 수는 299.8±91.7 parasites/fish로 확인되었다.

조직샘플링

선발된 감염어와 비감염어의 Hsp70 mRNA 발현분석을 위해 조직샘플링을 실시하였다. 해수가 수용된 100 L 수조에 tricaine methane sulfonate (MS-222; Sigma, USA)를 150 mg/L의 농도가 되도록 첨가한 다음 실험어를 옮겨 마취시킨 후, 샘

플링을 수행하였다. 참돔의 Hsp70 full-length cDNA를 밝히기 위해 대조구인 참돔의 간 조직을 통해 RACE PCR에 이용되었고, 건강한 참돔의 Hsp70 mRNA 조직별 발현분석을 수행하기 위하여 간, 비장, 두신, 후신, 장, 아가미, 뇌하수체 및 근육을 적출하여 액체질소에서 급속 냉동시킨 다음 -80℃에서 실험 전까지 보관하였다. 또한, 구두충에 감염된 실험어는 두신, 간 및 장을 적출하여 대조구와의 Hsp70 mRNA 발현의 비교를 위해 이용되었다.

Total RNA분리 및 cDNA합성

참돔의 Hsp70의 primer를 제작하기 위해 앞서 선행된 연구에서 밝혀진 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*) Hsp70 (GenBank accession no. AAX07833)의 sequence를 토대로 합성시켰다. 이 primer set는 다음과 같다. Hsp70 forward primer (5' -AGA AGG ACA TCA GCG ACA AC-3'), Hsp70 reverse primer (5' -TCA GAC TTG TCA CCA GAC AG-3').

Total RNA는 실험어로부터 적출한 간 및 조직들로부터 TRizol Reagent (Gibco/BRL, USA)를 이용하여 추출하였다. Total RNA를 주형으로 하여 oligo-d (T)₁₈ anchor primer와 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 Takara Taq (Takara, Japan)을 이용하여 수행하였으며, 그 조건은 다음과 같다. 95℃에서 2분 동안 initial denaturation 과정을 거친 후에, 95℃에서 20초 동안 denaturation, 56℃에서 40초 동안 annealing, 72℃에서 30초 동안 extension 반응을 30 주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 30초 동안 extension 반응을 시켰다. 증폭된 PCR 산물은 agarose gel에 전기영동 하여 얻어진 DNA 밴드를 잘라내고 정제하였다. 준비된 DNA 산물을 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)와 ligation 시킨 후, ligation시킨 반응물은 DH5α competent cells (RBC Life Sciences, Korea)를 이용하여 형질전환하였다. Plasmid DNA는 LaboPass plasmid DNA purification kit (Cosmo, Korea)를 이용하여 분리하였고, 추출된 plasmid DNA를 ABI DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 확인하였다.

Full-length Hsp70 cDNA 분리 (3' 및 5' RACE)

참돔의 Hsp70 full-length cDNA sequence를 얻기 위해 oligo (dT) anchor primer (5' -CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA T(T)₁₈-3')와 CapFishing™ adaptor (Seegene, Korea)를 이용하여 합성하였다. 간의 RACE-Ready cDNA를 template로 하여 target primer와 gene specific primer를 이용한 일련의 RACE-PCR을 진행하였다.

3' RACE분리는 5 μL의 3' RACE cDNA, 1 μL의 10 mM 3' RACE target primer (5' -CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA T-3'), 1 μL의 10 mM 3' RACE HSP70-specific primer (5' -GCC ATC CTG TCT GGT GAC AAG TCT GAG-3')와 25 μL의 SeeAmpTaq Plus Master Mix가 포함된 50 μL

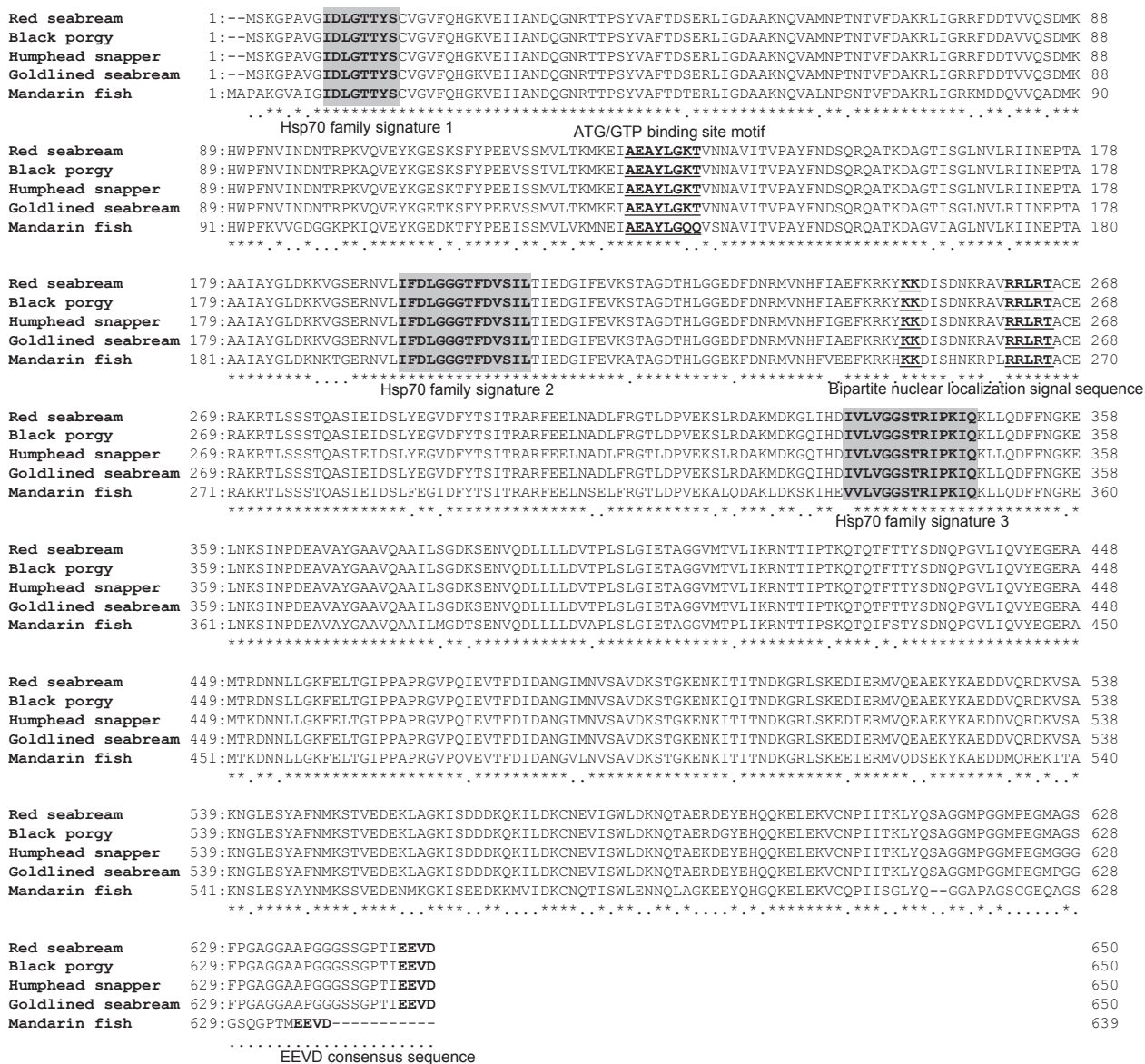


Fig. 1. Comparison of Hsp70 amino acid sequence of red seabream *Pagrus major* Hsp70, black porgy *Acanthopagrus schlegeli* (AAX07834), humphead snapper *Lutjanus sanguineus* (ADO32584), goldlined seabream *Rhabdosargus sarba* (AAR97293) and mandarin fish *Siniperca chuatsi* (AHK25484) optimally aligned to match identical residues. The sequences were taken from the GenBank/EMBL/DBJ sequence database. The Hsp70 family signature are grey shaded. The ATP-GTP binding site motif and bipartite nuclear localization signal sequence are underlined. The EEVD consensus sequence is bolded. Hsp70, heat shock protein 70; EMBL, European molecular biology laboratory; DBJ, DNA data bank of Japan; ATP, adenosine triphosphate; GTP, guanosine triphosphate; EEVD, consensus sequence that terminates in Hsp70).

PCR시약을 이용하여 분리하였다. PCR 조건은94℃에서 5분 간 denaturation 과정을 거친 후에, 94℃에서 40초 동안의 denaturation, 62℃에서 40초 동안의 annealing, 72℃에서1분 동안의 extension반응을 40주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 5분동안 extension 반응을 시켰다.

5' RACE분리는 5 μL의 5' RACE cDNA, 1 μL의10mM 5' RACE target primer (5' -GTC TAC CAG GCA TTC GCT TCA T-3'), 1 μL의10mM 5' RACE HSP70-specific primer (5' -CAG CTC TCT TGT TGT CGC TGA TGT CCT TC-3')와 25μL의SeeAmpTaq Plus Master Mix가 포함된 50

μ L PCR시약을 이용하여 분리하였다. PCR조건은 94°C에서 5분 동안 initial denaturation 과정을 거친 후에, 94°C에서 40초 동안 denaturation, 62°C에서 40초 동안 annealing, 72°C에서 1분간 extension 반응을 40주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 5분 동안 extension 반응을 시켰다.

증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel을 이용한 전기영동을 통해 분리하였으며, 그 다음 과정은 앞에서 서술한 cDNA의 합성 방법과 동일하다.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

참돔 Hsp70 mRNA의 발현을 확인하기 위하여, 분리된 RNA

를 사용하여 qPCR을 이용하여 분석하였다. qPCR의 수행을 위한 primer는 밝혀진 참돔 Hsp70 full-length cDNA sequence를 통해 설계하였다(Table 1). qPCR은 BIO-RAD iCycleriQ Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) 과 iQTMSYBR green Supermix (Bio-Rad, USA)를 이용하여 95°C에서 5분 동안 denaturation 과정을 거친 후에, 95°C에서 20초 동안 denaturation, 55°C에서 20초 동안 annealing을 총 40회 실시하였다. 대조구의 유전자로는 House-keepieng gene 으로 알려진 참돔 β -actin을 사용하였고, qPCR을 통해 calculated threshold cycle (Δ Ct) 값을 결정하여 β -actin에 대한 발현량을 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ Method, [$\Delta \Delta Ct = 2^{-(\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{internalcontrol}})}$]

Table 1. Primers used for qPCR amplification

Genes (Accession no.)	Primer	DNA sequences
Hsp70 (KT334554)	Forward	5' -AGC TCA ATG CTG ACC TCT TC-3'
	Reverse	5' -GGA TCA GCC CTT TAT CCA TCT T-3'
β -actin (JN226150)	Forward	5' -GAT CTG GCA TCA CAC CTT CTA C-3'
	Reverse	5' -TCT TCT CCC TGT TGG CTT TG-3'

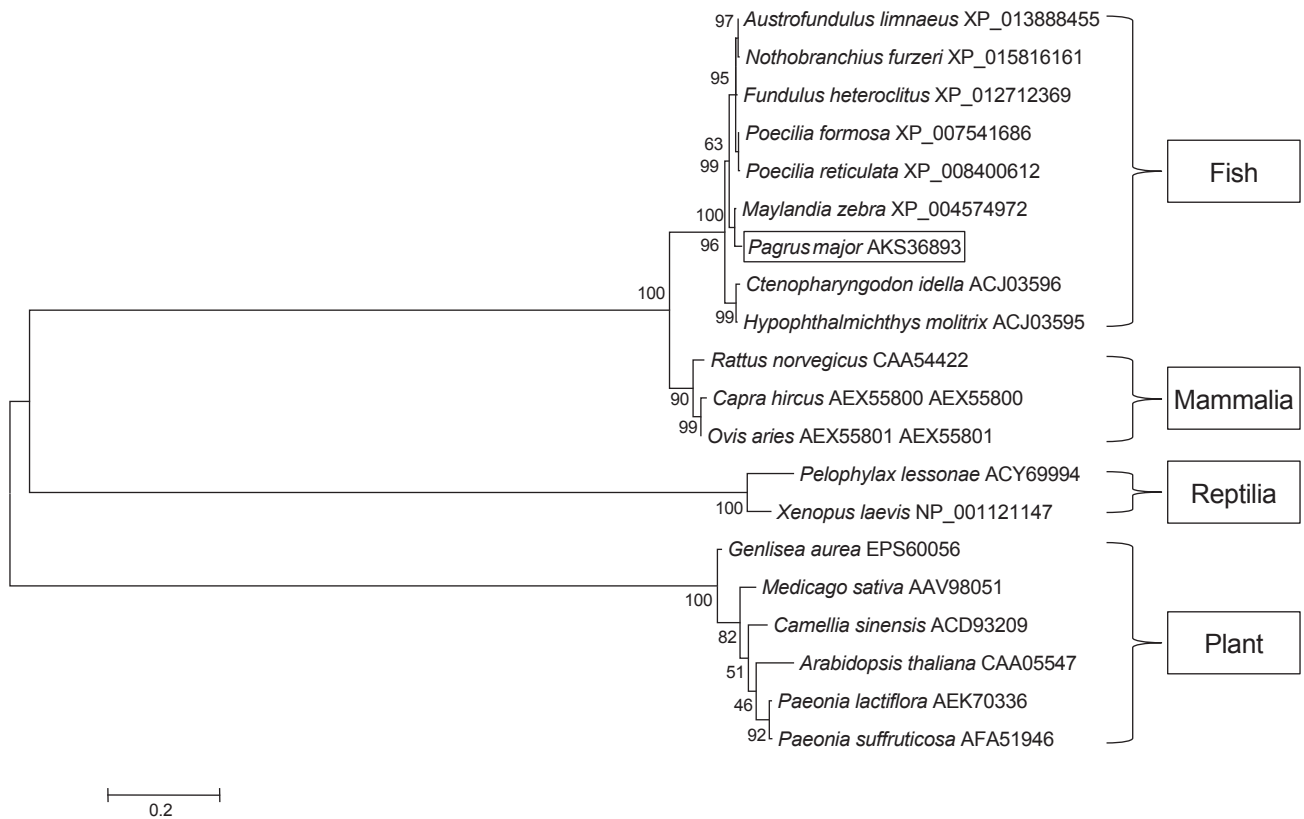


Fig. 2. Neighbour-joining tree of Hsp70 members constructed with MEGA4. The bootstrap confidence values presented at the nodes of the tree are based on 2,000 bootstrap replications. GenBank accession numbers of selected genes are indicated within brackets. Hsp70, heat shock protein 70; MEGA4, multiple-sequence software.

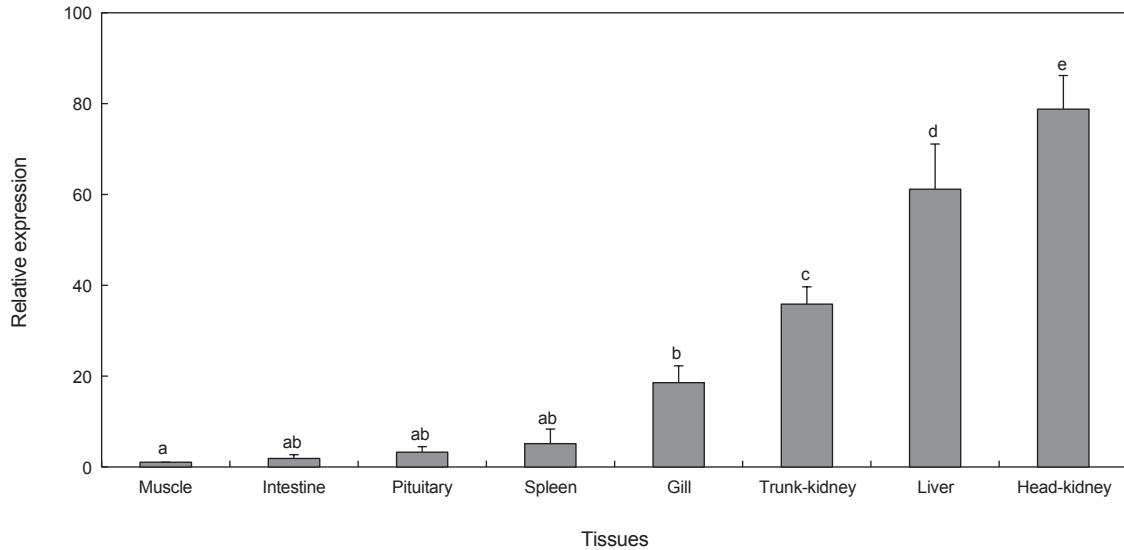


Fig. 3. The Hsp70 mRNA expression in various tissues of healthy red seabream *Pagrus major*, gill, head kidney, intestine, muscle, pituitary, spleen and trunk kidney. Hsp70 transcript levels were quantified and expressed relative to the β -actin transcript level. Values with different characters are significantly different between control and infection ($P < 0.05$). All values are means \pm SD ($n = 10$). Hsp70, heat shock protein70.

(Livak and Schmittgen, 2001)를 이용하여 정량화하였다.

통계분석

각 실험결과로부터 얻어진 자료값 사이의 유의차 유무는 SPSS 통계처리프로그램(version 10.0; SPSS Inc, USA)에 의한 One-way ANOVA 및 Duncan's multiple range test를 실시하여 참돔의 정상개체와 감염 개체간의 수치를 평균간의 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 참돔으로부터 Hsp70 full-length cDNA를 건강한 어체의 간으로부터 RACE법을 통해 밝혔으며, 구두충이 참돔의 스트레스에 미치는 영향을 확인하기 위하여 대조구인 미감염 개체와 구두충에 감염된 실험어를 비교하여 Hsp70 mRNA 발현 분석을 수행하였다. 우선, 예상 크기의 단일 PCR 산물(Hsp70: 408 base pairs, bp)은 RT-PCR에 의해 분리되었고, 분리된 단일 PCR 산물을 이용하여(3' 및 5' RACE) Hsp70 full-length cDNA를 분리하였다. Open reading frame (ORF)이 포함된 전장의 Hsp70 cDNA는 650개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 이루어져 있었으며, NCBI의 Blast algorithm (Blastp)을 이용하여 타 어종과의 아미노산 배열을 비교한 결과, 참돔의 Hsp70 아미노산 배열은 다른 어종과 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 참돔 Hsp70 full-length cDNA의 계통발생학적 분석은 Mega 4 software package와 neighbor joining (NJ)법을 사용하여 분석하였다. 다른 어종들과의 계통수 분석 결과 다양한 경골어류들과 cluster를 형성했고, 이들 중 zebra

umbuna *Maylandia zebra*와는 98.6%, mummichog *Fundulus heteroclitus* 97.8%의 높은 상동성을 보였다(Fig. 2).

Zhang et al. (2011)의 보고와 마찬가지로, 참돔의 Hsp70 아미노산 배열에서도 3가지 Hsp70 family signature (1, IDLGT-TYS; 2, IFDLGGGTFDVSIL; 3, IVLVGGSTRIPKIQ)와 ATP-GTP binding site로 추정되는 AEAYLGKT (aa 129-136), consensus sequence (EEVD)가 포함되어 있었다. 본 연구에서 밝혀진 참돔의 Hsp70도 Hsp70 family signature, ATP-GTP binding site, consensus sequence, N-terminal 및 C-terminal이 존재함은 물론, 타 어종과도 높은 상동성을 보이는 점으로 보아, Hsp70 family와 일치하는 것으로 판단된다.

참돔 full-length Hsp70 sequence를 바탕으로, 본 연구에서는 참돔의 조직별 Hsp70 mRNA 발현을 분석하였다. Hsp70 mRNA 발현은 건강한 참돔의 두신과 간 조직에서 주요하게 높은 값을 나타내었고(Fig. 3), 구두충에 감염된 실험어의 두신, 간 및 장 조직에서 Hsp70 mRNA 발현을 조사한 결과, 모든 조직에서 대조구인 미감염 개체보다 유의적으로 높은 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

두신은 어류의 장기에 있어 주요 조혈기관이며(Zapata, 1979), 다량의 식세포(호중구 및 단핵세포)가 두신에 자리하고 있어 주변의 백혈구들은 물리적인 자극이나 미생물의 감염 시 침입된 항원의 인식을 통해 제거를 위한 염증반응을 유도한다(Grinde, 1989; Ellis, 1990; Alexander and Ingram, 1992; Dalmo et al., 1997). Black bullhead *Ameiurus melas*와 bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*를 이용한 연구에서 Hsp70 mRNA는 계절적인 변화에 따라 두신에서의 발현이 지속적인

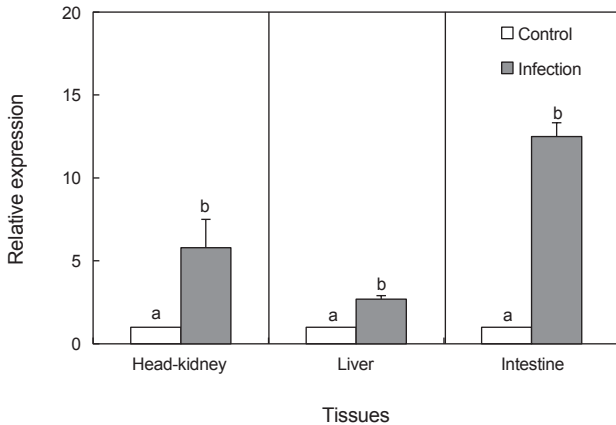


Fig. 4. Hsp70 mRNA expression in head-kidney, liver and intestine tissues from red seabream *Pagrus major* infected by *Longicollum pagrosomi*. Hsp70 transcript levels were quantified and expressed relative to the β -actin transcript level. Values with different characters are significantly different between control and infection ($P < 0.05$). All values are means \pm SD ($n = 10$). Hsp70, heat shock protein 70.

로 증가하였고(Yoo and Janz, 2003), silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, grass carp *Ctenopharyngodon idellus* 및 Nile tilapia *Oreochromis nilotica*에서는 독성물질인 마이크로시스틴(microcystin)의 노출에 의해 간에서 높은 발현을 보였다(He et al., 2010).

Roubal (1993)의 보고에 의하면, 구두충에 감염된 어류의 장에서 lymphocytes와 macrophage-like cells를 동반한 세포성 염증반응이 관찰되어, 장내 기생충 감염 시 숙주는 mast cell, rodlet cell, eosinophilic granule cells 등 다양한 염증반응 세포를 형성하며(Reite, 1997), 구두충에 감염된 어류는 숙주의 특이적인 granulocyte, macrophage 등의 생성과 구두충의 proboscis의 hook 구조와 외피에 의해서 면역반응이 나타난다고 보고된 바 있다(Mehlhorn, 2011). 또한, Hatai et al. (1987)은 구두충에 감염된 참돔의 장에 세포적 침투 및 염증반응이 나타났으며, 이는 세포의 necrosis와 밀접한 연관성이 있음을 의미한다(Chaicharn and Bullock, 1967). 이러한 연구보고에 따르면 기생충 감염에 따른 염증반응이 생성되어 이에 대한 면역반응이 일어나게 되는데 이 때, Hsp70이 강한 매개체와 같은 면역반응을 자극시키는 것으로 알려져 있다(Basu et al., 2001). 이와 같이 Hsp70은 감염질환에 대한 면역반응을 일으키는데 주요한 역할을 수행함에 따라(Suzue and Young, 1996), 본 연구에서도 구두충에 감염됐을 때 이에 대한 면역반응을 유도하기 위하여 Hsp70 mRNA 발현이 유의적으로 증가한 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구결과를 요약하면 구두충에 감염된 참돔은 감염으로 인한 염증반응으로 체내 유의적인 스트레스를 유도하는 것으로 보이면서 스트레스로 인한 Hsp70 mRNA의 높은 발현

이 확인됨에 따라, 구두충 감염에 따른 참돔의 생체 유지 및 방어기작의 조절을 수행하는 것으로 여겨진다. 본 연구는 이러한 결과를 바탕으로 기생충 감염에 의한 어류의 분자생물학적 메커니즘을 밝히는데 기초적인 연구보고가 될 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 국립수산물과학원 수산과학연구소 동해특성품종양식기술개발(R2018012)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Alava JJ and Aguirre WE. 2005. Scanning electron microscopy of *Neoechinorhynchus* sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae), a possible new species of intestinal parasite of the tallfin croaker *Micropogoni asaltipinnis* (Günther, 1864). *Parasitol Latinoam* 60, 48-53. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122005000100007>.
- Alexander JB and Ingram GA. 1992. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. In: Faisal M, Hetrick FM (Eds), *Ann Rev Fish Dis* 2, 249-279. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90066-7](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90066-7).
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T and Srivastava PK. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14, 303-313. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00111-X).
- Basu N, Todgham, AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM and Iwama K. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295, 173-183. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00687-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00687-X).
- Beckmann RP, Mizzen LE and Welch WJ. 1990. Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854.
- Chaicharn A and Bullock WL. 1967. The histopathology of acanthocephalan infections in suckers with observations on the intestinal histology of two species of catostomid fishes. *Acta Zool* 48, 19-42. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1967.tb00130.x>.
- Dalmo RA, Ingebrigtsen K and Bogwald J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis* 20, 241-273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00302>.
- Ellis AE. 1990. Lysozyme assays. *Tech Fish Immunol* 1, F1101-103.
- Forsyth RB, Candido EPM, Babich SL and Iwama GK. 1997. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease. *J Aquat Anim Health* 9, 8-25.
- Frank SN, Godehardt S, Nachev M, Trubiroha A, Kolas W and Sures B. 2013. Influence of the cestode *Ligula intestinalis* and the acanthocephalan *Polymorphus minutus* on levels of heat shock proteins (HSP70) and metallothioneins in their fish and crustacean intermediate hosts. *Environ Poll* 180,

- 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.014>.
- Graser RT, Malnar-Dragojevic D and Vincek V. 1996. Cloning and characterization of a 70 kd heat shock cognate (hsc70) gene from the zebrafish (*Danio rerio*). *Genetica* 98, 273-276.
- Grinde B. 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogen. *J Fish Dis* 12, 95-104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1989.tb00281.x>.
- Hatai K, Horita Y and Kubota SS. 1987. A histological study of longicollosis in cultured red seabream, *Pagrus major*. *Fish Pathol* 33, 31-32. <https://doi.org/10.3147/jsfp.22.31>.
- He S, Liang XF, Li RQ, Li GG, Wang L and Shen D. 2010. Molecular characterization of heat shock protein 70 genes in the liver of three warm freshwater fishes with differential tolerance to microcystin-LR. *J Biochem Mol Toxicol* 24, 293-302. <https://doi.org/10.1002/jbt.20338>.
- Hutchison KA, Dittmar KD, Czar MJ and Pratt WB. 1994. Proof that hsp70 is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a heterocomplex with hsp90. *J Bio Chem* 269, 5043-5049.
- Iwama GK, Thomas PT, Forsyth RB and Vijayan MM. 1998. Heat shock protein expression in fish *Rev Fish Biol Fisher* 8, 35-36.
- Kader MA, Bulbul M, Koshio S, Ishijkawa M, Yokoyama S, Nquyen BT and Komilus CF. 2012. Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red seabream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 20, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.009>.
- Kim SR, Lee JS, Kim JH, Oh MJ, Kim CS, Park MA and Park JJ. 2011. Fine structure of *Longicollum pagrosomi* (Acanthocephala: Pomphorhynchidae) and intestinal histopathology of the red seabream, *Pagrus major*, infected with acanthocephalans. *Parasitol Res* 109, 175-184.
- Mehlhorn H. 2008. *Encyclopedia of parasitology*. Springer, Berlin, Germany, 3-39.
- Mehlhorn H. 2011. *Encyclopedic reference of parasitology: Diseases In: Treatment, Therapy*, 2nded. Springer, Berlin, Germany, 10-25.
- Nickol BB and Crompton DWT. 1985. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, London, U.K., 330-340.
- Ojima N, Yamashita M and Watabe S. 2005. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.097>.
- Pyen CK and Jo JY. 1982. Seed production of red sea-bream, *Chrysophrys major*. *J Kor Soc Fish Aqua Sci* 15, 161-170.
- Reite OB. 1997. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish Shellfish Immunol* 7, 567-584. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0108>.
- Roubal. 1993. Comparative histopathology of *Longicollum* (Acanthocephala: Pomphorhynchidae) infection in the alimentary tract and spleen of *Acanthopagrusaustralis* (Pisces: Sparidae). *Int J Parasitol* 23, 391-397. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(93\)90015-Q](https://doi.org/10.1016/0020-7519(93)90015-Q).
- Roux T, Saker A, Leroy C, Frantz C and Michel H. 1996. Low temperature nitriding mechanisms of austenitic stainless steels in N₂. *International J Fatigue* 291-299.
- Suzue K and Young RA. 1996. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *J Immunol* 156, 873-879.
- Yoo JL and Janz DM. 2003. Tissue-specific HSP70 levels and reproductive physiological responses in fishes inhabiting a metal contaminated creek. *Arch Environ Contam Toxicol* 45, 110-120.
- Zapata A. 1979. Ultrastructure study of the teleost fish kidney. *Dev Comp Immunol* 3, 55-65. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(79\)80006-3](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(79)80006-3).
- Zeng B and Wang W. 2007. Seasonal population dynamics of *Pallisentis* (Neosentis) *celatus* (Acanthocephala: Quadrigyriidae) in the intestine of the rice-field eel *Monopterus albus* in China. *J helminthol* 81, 415-420.
- Zhang X, Pang H P, Wu Z and Jian J. 2011. Molecular characterization of heat shock protein 70 gene transcripts during *Vibrio harveyi* infection of humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*. *Fish Physiol Biochem* 37, 897-910.