

시베리아 철갑상어(*Acipenser baerii*) 부화 자어에서 미세주입 조건의 검증과 초기 선천면역 마커 유전자의 발현 반응

김은정 · 남윤권*

국립부경대학교 수산생명과학부 양식응용생명과학전공

Microinjection Assay Validation and Early Innate Immune Marker Gene Expression Responses in Newly Hatched Siberian Sturgeon *Acipenser baerii* Prelarvae

Eun Jeong Kim and Yoon Kwon Nam*

Major of Aquaculture and Applied Life Sciences, Faculty of Fisheries Life Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

Hatching mark the transition of oviparous fish embryos from protection within egg envelope to direct exposure to aquatic microorganisms. In sturgeons, this occurs at the beginning of an extended yolk-dependent prelarval stage, when immune organs remain underdeveloped. However, the inducible innate defence capacity of newly hatched sturgeon prelarvae remains poorly characterized. This study examined acute immune-related transcriptional responses in newly hatched Siberian sturgeon *Acipenser baerii* prelarvae using microinjection-based stimulation model. Handling, anesthesia, non-injection, and saline injection produced no consistent changes in basal *hamp* or *il1b* expression, validating saline injection as a procedural control. Both LPS and poly (I:C) triggered rapid *hamp* upregulation, stronger at 6 h than 12 h post injection, though not strictly dose-proportional. Live bacterial injection showed stimulus-dependent patterns: Pathogenic *Aeromonas hydrophila* induced approximately 15 fold *hamp* induction at 6 h post injection, and transiently elevated *il1b*. In contrast, non-pathogenic *Bacillus subtilis* produced expression patterns comparable to those of saline controls. Survival observations supported the biological distinction between the bacterial treatments. These findings suggest that newly hatched Siberian sturgeon prelarvae can initiate selected antimicrobial and inflammatory gene responses despite limited immune organ differentiation.

Keywords: Siberian sturgeon, Hatching, Microinjection conditions, Innate immune response

서론

난생 어류에서 부화는 배아가 난막(egg chorion)의 보호를 벗어나 외부 수계 환경에 직접 노출되는 최초 전환점으로서, 부화 직후 자어는 미생물 감염 및 외부 환경 변동으로부터 발달의 정상성과 생체 보호를 위한 기본 기능이 요구된다(Pérez-Atehortúa et al., 2023). 그러나 일반적으로 부화 자어는 획득 면역 기능을 온전히 보유하지 않은 미성숙 상태이므로 감염원에 대한 생체 방어는 선천성 면역(innate immune) 반응 및 훈련 면역(innate trained immunity)에 주로 의존할 가능성이 높

다(Castro et al., 2015; Zhang et al., 2019). 시베리아 철갑상어(Siberian sturgeon *Acipenser baerii*)는 현존하는 원시어류 분류군인 연질어아강(chondrosteian group)에 속하며, 자연 집단의 멸종위기 규제에 따라 인공종묘생산 단계를 포함한 양식 생산을 통해서만 캐비아 및 어육의 상업적 이용이 허용되고 있다(Park et al., 2013a; Tsessarsky, 2022; Brownstein and Near, 2025). 다른 철갑상어류와 유사하게 부화 직후 시베리아 철갑상어는 대부분의 면역기관 및 대사기관이 미분화 상태이며, 부화 후 비교적 긴 난황 의존성 prelarval stage를 거친다(Park et al., 2013b; Gradil et al., 2014). 이 기간 동안 시베리아 철갑상

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5918 Fax: +82. 51. 629. 5910

E-mail address: yoonknam@pknu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2026.0208>

Korean J Fish Aquat Sci 59(3), 208-216, June 2026

Received 2 May 2026; Revised 4 June 2026; Accepted 10 June 2026

저자 직위: 김은정(박사후 연구원), 남윤권(교수)

어 prelarvae는 성체의 외형 특징의 대부분을 갖추는 많은 형태 변화를 겪는 동시에 외부 먹이 섭취로의 전환 시기까지 소화기관을 포함한 다양한 내부 장기의 최초 형성이 이루어지고, 행동학적 특징 전환(상층 유영, 저서 유영, 주광성, 주류성, 군집 행동 등)에 맞춘 유영 기관의 발달이 순차적으로 이루어져야 하는 구간이다(Gisbert and Nam, 2018; Kim et al., 2020). 이와 같이 다각적인 구조적·생리적 발달 프로그램이 정밀하게 조절되어야 하는 민감한 구간이라는 점에서 prelarval stage는 철갑상어 어종을 대상으로 한 인공종묘생산의 성패에 큰 영향을 미치는 핵심 구간 중 하나이다. 그러나 철갑상어의 경우, prelarval stage 전 구간에서 일부 주요 면역 기관들이 형성되지 않는 등 면역 기능의 발달 및 성숙 시기가 일반적인 경골어류에 비해 상대적으로 현저히 지연된다고 알려져 있으며, 때문에 초기 prelarval 구간에서의 선천성 면역 기능 및 이를 담당하는 주요 작용자들에 대한 이해가 특히 중요시된다(Chesneau, 2018; Höhne et al., 2021). 그럼에도 불구하고 종래의 많은 관련 연구들은 대부분 치어기-준성어기에서 조직 특이적인 면역 및 방어 기능에 대한 연구들이 주를 이루고 있고, 실제 갓 부화한 초기 난황자어의 선천성 생체 방어 기구에 대한 실험적 근거는 매우 제한된 실정이다.

난황자어(prelarvae)를 대상으로 면역자극 시 전사발현 반응을 정확한 해석을 위해서는 계획된 정량적 방식으로 자극원(stimulant)을 노출하는 것이 중요하며, 따라서 미세주입 기법(microinjection)은 자극원의 종류, 양, 농도, 주입 위치의 인위적 통제를 통해 사전에 계획하지 않은 환경 요인의 비의도적 개입을 최소화할 수 있다는 측면에서 어류 자어를 대상으로 한 면역 기능 연구에 유용한 방법으로 알려져 있다(Kim and Nam, 2018; Darroch et al., 2023; Doszyn et al., 2025). 하지만 미세주입을 이용한 실험 결과의 정확한 해석을 위해서는 미세주입 처리와 관련한 다양한 어체 취급 조건(포획, 마취 등), 미세주입 자체에 따른 물리적 손상 또는 스트레스(주사 바늘 개체 통과 등), 그리고 통상 대조군 제작 시 이용되는 생리식염수(면역 자극원의 suspension medium) 주입이 선천성 면역 반응 마커 유전자의 기저 발현에 미치는 영향이 실무적으로 우선 평가되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 척추동물의 선천성 면역 관련 대표적 antimicrobial effector로 알려진 hepcidin 유전자(hamp) (Kim et al., 2019)와 초기 염증성 반응의 대표적 cytokine 지표인 interleukin 1b 유전자(il1b)를 이용하여 시베리아 철갑상어 갓 부화 난황자어를 대상으로 한 미세주입 관련 조작과 생리식염수 대조군 설정의 안정성 및 유효성을 평가하고자 하였으며, 이를 토대로 갓 부화 난황자어에서 다양한 면역자극원의 미세주입 처리시 두 대표적 마커 유전자들의 전사발현 유도 여부와 반응 양상을 조사하고자 하였다. 이를 위해 (1) 무처리 대조군을 포함한 자어 취급 관련 다양한 대조군을 설정한 후 서로 다른 가계로부터 생산한 갓 부화 난황자어 그룹을 대상으로 기저 발현

의 간섭 또는 교란 가능성 여부를 조사하고, (2) 서로 다른 농도의 면역자극 화합물 주입에 대한 전사 발현의 차등적 표현 여부를 분석하였고, (3) 갓 부화 난황자어가 병원성 세균과 비병원성 세균에 노출 시 선택적 전사발현을 나타내는지를 비교하였다.

재료 및 방법

실험어 및 부화 직후 자어 확보

본 연구에 사용된 시베리아 철갑상어(*A. baerii*) 자어는 인공 수정으로 생산된 full-sib family로부터 확보하였다. 성숙한 암수 친어를 대상으로 Park et al. (2013a)에서 기술한 방법을 이용하여 산란유도 호르몬 주사, 채란, 채정을 실시한 후, 건식법으로 인공수정을 수행하였다. 수정란은 1 µm 여과 지하수를 이용하여 부화까지 관리하였으며 수온은 실험 전 구간에 걸쳐 18.5–19.5°C로 유지하였다. 발생 및 부화 단계 평가 및 부화 후 난황자어(prelarvae) 관리는 Park et al. (2013a, 2013b)에 따라 수행하였다. 부화 후 8–12시간 이내의 난황자어를 선별하여 실험에 이용하였으며 육안상 기형이나 비정상 유영 행동을 보이는 개체는 실험 대상에서 제외하였다. 실험 재료 확보와 이차 면역자극 관련 제반 실험은 국립부경대학교 동물실험윤리위원회의 규정과 가이드라인에 따라 수행되었다(승인번호 2018-16/18 및 2024-75).

미세주입 관련 처리 조건 및 대조군 검증

부화 직후 자어에서 마취 및 미세주입 과정 자체가 선천면역 마커 유전자 발현에 영향을 미치는지 여부를 평가하였다. 이를 위해 무처리 대조군(미세주입 후 유지 수조로만 이동; no handling, NH), 마취 처리 대조군(미세주입용 마취 처리 후 미세주입은 수행하지 않고 회복; anesthesia only, AO), 주사 바늘 처리 대조군(마취 후 용액 주입 없이, 미세주입 절차만 수행; needle insertion only, NI), 그리고 생리식염수 주입 대조군(마취 후 생리식염수 주입 대조군; saline injection, SI)을 설정하여 선정한 대표적 마커 유전자(hepcidin 및 interleukin 1b 유전자)의 차등적 발현이 유발되는 지를 조사하였다. 난황자어의 유전적 배경 영향을 고려하기 위해 4개의 독립 교배에 의해 생산한 난황자어를 대상으로 반복 조사를 수행하였다.

미세주입을 위한 난황자어의 마취는 연구실의 선행 연구 결과에 따라 MS-222 200 ppm 조건으로 마취를 수행하였으며 마취 난황자어의 미세주입 후 회복 유도 및 관리 역시 Kim and Nam (2018)에서 기술한 기본 조건을 이용하였다. 모든 미세주입은 Kim and Nam (2018)에서 기술한 glass capillary needle과 microinjector (Narishige Scientific Instrument, Tokyo, Japan)를 이용하여 수행하였고 주입 위치는 개체의 난황낭(yolk sac) 후 방부와 자어 배체(embryonic body)의 경계 부위로 고정하였다(Kim and Nam, 2018; Kim et al., 2021). 주입 용량은 시베리아 철갑상어 갓 부화 난황자어를 대상으로 평균 20 nL로 통일하였

다. 대조군 검증 실험의 경우 각 가계 당 조건 별로 36개체를 대상으로 미세주입을 실시하였고, 미세주입 후 6시간 및 12시간 후에(hours post injection, hpi) 6-8개체씩을 무작위 선발하여 드라이아이스에 급속 냉동 후 -85°C에서 유전자 발현 분석 이용 시점까지 보관하였다.

면역자극 화합물 미세주입 및 반응 분석

앞서 미세주입 조건 검증 실험을 토대로 갯 부화 난황자어가 면역자극 물질에 전사 발현 반응을 나타내는지, 그리고 그 반응이 노출 강도에 따라 차등으로 표현되는지 여부를 조사하기 위해서 서로 다른 농도의 lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* 0111: B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) endotoxin 및 viral mimic polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C); Sigma-Aldrich]를 미세주입 후 마커 유전자의 발현을 상대 정량 방식으로 분석하였다. LPS 및 polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] 모두 멸균 생리식염수를 이용하여 20, 40 및 80 µg g⁻¹ body weight (BW)의 최종 농도로 미세주입이 되도록 하였고, 이때 대조군은 생리식염수(saline)만을 이용한 미세주입을 통해 제조하였다. 대조군 포함, 각 농도 그룹을 위해서 각 36개체씩을 미세주입 하였고, 이어 각 실험구로부터 6 hpi 및 12 hpi에서 6개체씩을 무작위 선발, ribonucleic acid (RNA) 분석에 이용하였다.

병원성 및 비병원성 세균 미세주입 및 반응 분석

갯 부화 난황자어가 실제 살아있는 세균에 노출되었을 때, 병원성 및 비병원성 세균에 대한 선택적 또는 차등적 발현 반응이 관찰되는지 여부를 조사하기 위해서 시베리아 철갑상어에서 병원성 세균으로 알려진 *Aeromonas hydrophila* (KCTC2358) (Kim et al., 2021; Kim and Nam, 2024)와 비병원성 세균 *Bacillus subtilis* (KCTC1021)를 동일 농도로 미세주입 후 시간 경과에 따른 두 마커 유전자의 차등 발현 양상과 누적 폐사율을 비교하였다. *A. hydrophila* 및 *B. subtilis*는 tryptic soy broth (TSB)를 이용 30°C, 200 rpm 진탕 조건에서 배양하였고, 접종 후 지수증식기(OD 600 nm=1.0) 시점에서 배양액을 원심분리 회수 후 생리식염수로 세척한 뒤 최종 1×10⁴ CFU g⁻¹ BW으로 미세주입 하였으며, 각 단위 실험에서 사용한 주입 현탁액을 이용하여 계획한 colony forming unit (CFU)가 주입되었음을

고체 배지 배양 및 plate counting을 통해 검증하였다. 얼음에서 세균 현탁액을 보관 시 CFU의 감소가 일어나지 않는 시간을 예비 실험을 통해 확인하였고(약 90 min), 이를 토대로 미세주입 실험 시 농도와 활성 유지를 위한 세균 현탁액의 주기적 배양액 준비 및 교체 시기를 결정하였다. 세균 공격 직전 시점(0 hpi), 미세주입 후 6, 12, 24 hpi 시점에서 상기와 같은 방법으로 난황자어의 샘플링 및 보관하였다. 한편 세균 감염의 병원성 및 비병원성을 확인하기 위해서 미세주입 후 샘플링용 난황자어 그룹과는 별도로 독립된 3개 그룹[SI, *B. subtilis* 주입군(BS) 및 *A. hydrophila* 주입군(AH)]을 동일 미세주입 조건을 통해 생산하고(n=36 each) 그룹간 누적 생존율을 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 및 96 hpi 시점에서 비교하였다.

마커 유전자, RNA 추출 및 cDNA 합성

난황자어의 면역자극에 대한 전사활성을 측정하기 위한 마커 유전자로서 다양한 자카원 노출 및 세균 감염 시 신속한 상향 발현을 보이는 항균활성 작용자로 알려져 있는 *hamp*와 염증성 반응 지표로서 cytokine interleukin 1b 유전자(*il1b*)를 이용하였다. *Hamp*의 경우 선행 연구를 통해 본 철갑상어 어종에서 유전자 분석과 발현 검출에 관하여 정립된 조건을 이용하였으며(Kim et al., 2019; accession no. MK024330), *il1b*의 경우 NCBI GenBank (accession no. MZ467298) 데이터베이스 및 연구실 보유 시베리아 철갑상어 NGS transcriptome 데이터베이스로부터 추출 후 full open reading frame 서열을 검증한 isoform 클론들을 대상으로 공통의 보존된 영역을 중심으로 quantitative polymerase chain reaction (qPCR)용 primer를 설계하여 분석에 이용하였다. 반면, normalization reference의 경우 예비 선정 평가 연구를 통해 난황자어 초기 구간(early prelarval interval)을 중심으로 다양한 실험 자극에 민감하게 반응하지 않는 유전자로서 ribosomal protein L5 (*rpl5*)를 이용하였다(Kim and Nam, 2024; Kim et al., 2025). 본 연구에서 사용한 각 유전자의 증폭 검출에 이용한 primer들의 서열과 열순환 반응 조건은 Table 1에 나타내었다.

난황자어를 대상으로 한 total RNA 추출은 TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 1차 추출 후 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA 제거 및 순수분리 과정을 거쳐 최종 RNA 시료

Table 1. Oligonucleotide primers and thermal cycling conditions used in this study

Gene	Primer sequence (5'-3')	Purpose (Amplicon size)	Thermal cycling conditions
<i>hamp</i>	F: GACAGAAGACCAGGATAGAC R: TAAGTCCGACAGCAGTAGCC	Antimicrobial response marker (189 bp)	94°C for 2 min (initial denaturation) followed by 45 cycles at 94°C for 20 s, 58°C for 20 s and 72°C for 20 s
<i>il1b</i>	F: TGAAGACGATCAGCATGAGC R: GATTGAACTCGGTGACGCTT	Inflammatory response marker (189 bp)	
<i>rpl5</i>	F: CAAGAAGCAGTTCTCCAGGT R: TCTGAGCCAGAGACAACCTTG	Reference for RT-qPCR normalization (170 bp)	

를 마련하였다. RNA의 농도와 순도는 분광광도계(NanoDrop ND-1000; Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 확인하였고 (260/280 nm 1.9 및 260/230 nm 2.0 이상), RNA integrity는 ethidium-bromide stained MOPS 1% agarose 전기영동 상에서 28S rRNA와 18S rRNA band intensity (2:1 근접)를 측정하여 검증하였다. 역전사반응(reverse transcription)은 2 µg의 total RNA를 주형으로 Omniscript RT Kit (Qiagen)와 oligo(dT)₂₀ 프라이머 및 random nonamers를 이용하여 제조사의 권고 방법대로 수행하였으며 역전사 산물(cDNA)는 nuclease-free 멸균 증류수를 이용하여 10배 희석 후 -85°C에서 qPCR 이용 시점까지 보관하였다.

Quantitative real-time PCR 분석, 자료 처리 및 통계 검증

qPCR 반응은 자동 열순환 증폭 장비 LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Life Science, Penzberg, Germany)와 LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Life Science)를 이용하여 수행하였다. 각 유전자의 PCR 효율은 cDNA의 5 log 연속 희석물을 이용하여 제작한 표준곡선을 토대로 계산하였고(92–101%) primer의 특이성은 melting curve 분석과, PCR 산물(end-point product)의 전기영동을 통해 재확인하였다.

상대발현 정량은 *rpl5* reference gene을 기준으로 $2^{-\Delta CT}$ 및 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법(Schmittgen and Livak, 2008)을 이용하여 normalized relative quantity (NRQ) 또는 대조군 대비 fold change (FC)로 산출하였으며 발현 반응의 정규화된 시각화를 위해 $\log_2$ -transformed NRQ 또는 $\log_2$ -transformed FC를 사용하였다. 유전자 발현 자료는 생물학적 반복구(biological replicate; $n \geq 3$) 단위로 분석하였으며, 각 생물학적 반복구 시료 당 3개 기술적 반복구(technical replicate)의 평균값을 측정, 대표 값으로 사용하였다. 실험군 간 차이의 유의성 검증은 IBM SPSS 프로그램(version 29.0.2; IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 실험 설계, 자료 분포 및 등분산성 충족 여부에 따라 student-t-test/one-way ANOVA 또는 Mann-Whitney t-test/Kruskal-Wallis test를 이용하였고, 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정하여 판정하였다.

결과 및 고찰

미세주입 실험 취급 조건에 따른 *hamp* 및 *il1b* 기저 발현의 안정성

갯 부화 난황자어를 대상으로 NH, AO, NI 및 SI를 설정하고, 6 및 12 hpi 시점에서 *hamp*와 *il1b*의 상대 발현을 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 보듯이 *hamp*와 *il1b*의 NRQ 값은 모든 실험 취급 조건에서 비교적 좁은 범위 내에 분포하였다. 두 유전자 모두에서 특정 조건에 의한 급격한 발현

증가나 감소는 관찰되지 않았으며($P > 0.05$), 이러한 양상은 개별 NRQ 분석과 heatmap 표현에서 공통적으로 확인되었다. 특히 SI 조건에서도 *hamp* 또는 *il1b*가 일관되게 상승하거나 감소하는 양상은 나타나지 않아, 생리식염수 주입 자체가 본 분석 유전자들의 기저 발현을 강하게 유도하지는 않는 것으로 판단되었다.

Family 간 기저 발현 수준의 차이는 일부 관찰되었다. 이는 초기 발생 단계에서 나타날 수 있는 가계 특이적 유전적 배경(family-specific background), 모계 유래 요인 또는 생물학적 변동성을 반영할 가능성이 있다. 그러나 family 간 편차에도 불구하고, NH, AO, NI 및 SI 중 어느 특정 취급 조건이 모든 family에서 공통적으로 발현을 증가 또는 감소시키는 양상은 뚜렷하지 않았다. 따라서 본 실험 조건에서 갯 부화한 난황자어의 미세주입을 위한 기술적인 취급은 *hamp*와 *il1b*에 대해 뚜렷한 스트레스성 또는 염증성 전사 반응과 연계되지 않는 것으로 보인다. 다만 본 결과는 *hamp*와 *il1b* 두 유전자에 근거한 해석이므로, 다른 스트레스 관련 유전자, 대사 관련 유전자 또는 보다 넓은 범위의 염증성 지표에서 취급 조건에 따른 반응이 나타날 가능성까지 배제할 수는 없다(Maekawa et al., 2019). 그럼에도 본 연구의 분석 대상인 두 선천성 면역 관련 유전자에서는 SI에서 일관된 발현 유도나 강한 변동이 확인되지 않았으며, 이는 갯 부화 난황자어를 이용한 선천성 면역 자극 실험에서 생리식염수를 이용한 대조군(saline-injected control)이 비교적 안정적인 조건으로 설정될 수 있음을 시사한다(Cianciolo Cosentino et al., 2010; Kim and Nam, 2018). 한편, 본 연구에서 발현 정규화를 위해 사용한 *rpl5* reference gene은 모든 시험구에서 낮은 변동성을 보였으며, 시베리아 철갑상어 초기 난황자어 구간의 다양한 실험 자극 조건에서도 비교적 높은 전사 안정성을 유지한다는 선행 연구와 일치하였다(Kim and Nam, 2024; Kim et al., 2025).

면역자극 화합물 처리에 대한 부화자어의 *hamp* 유도 발현 반응

SI의 안정성을 바탕으로, 세균성 pathogen-associated molecular pattern (PAMP) 유사 자극원인 LPS와 dsRNA mimic으로 사용되는 poly(I:C)를 각각 농도별로 주입하고, 6 및 12 hpi에서 *hamp* 발현 변화를 분석하였다(Fig. 2). LPS 주입군에서는 6 hpi에서 20, 40 및 80 µg g⁻¹ BW 처리군 모두 0 µg g⁻¹ BW 대조군에 비해 높은 발현 수준을 보였으나, 개체간 편차 등에 의해 농도 그룹간 통계적 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 2A). 12 hpi에서도 LPS 처리군의 *hamp* 발현은 대조군보다 높은 수준을 보였으나, 6 hpi에 비해서는 전반적으로 낮았다. 이는 LPS에 대한 *hamp* 반응이 부화 직후 빠르게 유도된 후 시간 경과에 따라 일부 완화되는 양상을 보였으며 *hamp* 유전자의 초기 신속 반응성을 반영한다고 판단된다.

Poly(I:C) 주입군에서도 *hamp* 유도 발현이 확인되었다(Fig.

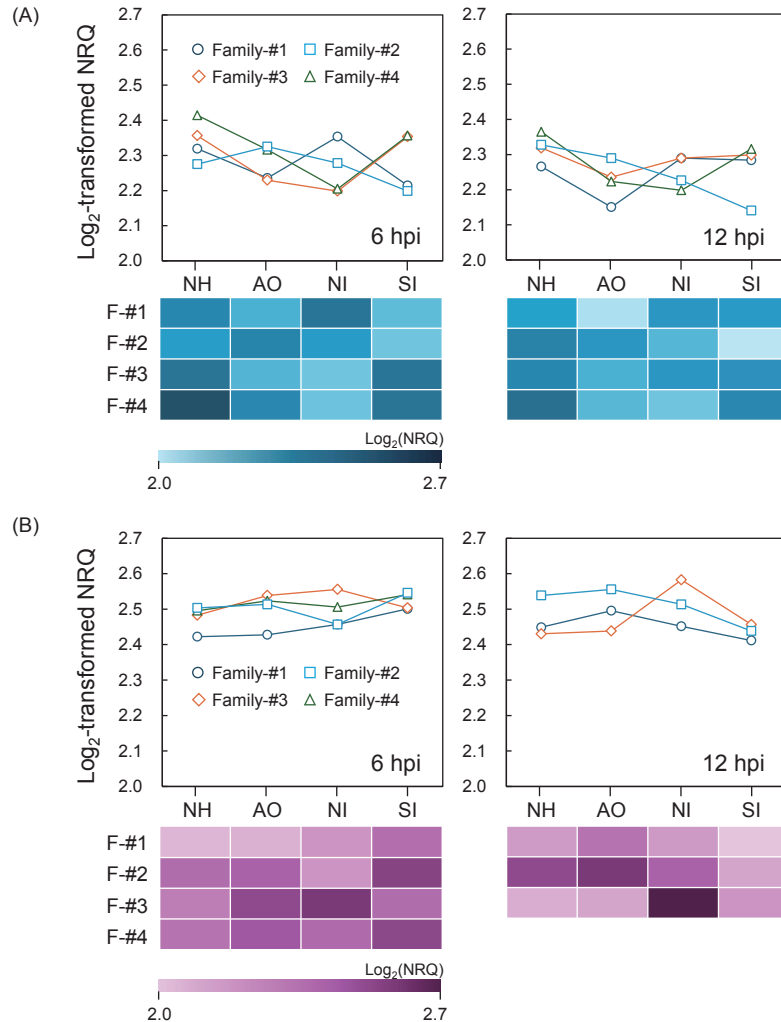


Fig. 1. Stability of innate marker gene expression after procedural control treatments in newly hatched Siberian sturgeon *Acipenser baerii* prelarvae. Expression levels of *hamp* (A) and *il1b* (B) were compared among no handling (NH), anesthesia only (AO), needle insertion only (NI), and saline injection (SI) groups at 6 and 12 h after treatment or injection. Values are presented as log₂-transformed normalized relative quantity [log₂(NRQ)]. The upper line plots connect values obtained from the same full-sib family-based independent trial, whereas the lower heatmaps summarize the same data distribution. Four independent trials were included for *hamp* at both time points and for *il1b* at 6 h, whereas three independent trials were available for *il1b* at 12 h because one family was excluded after RNA quality-control assessment. No significant differences were detected among the procedural control groups within each gene and time point ($P > 0.05$).

2B). Poly(I:C)에 대한 반응은 6 hpi에서 가장 뚜렷하였으며, 특히 40 µg g⁻¹ BW 처리군에서 가장 높은 발현 수준을 보였다. 그러나 80 µg g⁻¹ BW 처리군에서는 40 µg g⁻¹ BW 처리군보다 발현 수준이 낮아, 최고 농도에서 단순한 비례적 증가가 나타나지는 않았다. 12 hpi에서는 전반적으로 6 hpi보다 낮은 발현 수준을 보였으며, 이러한 경향은 log₂ fold change 기반 heatmap에서도 확인되었다(Fig. 2C). 따라서 LPS 및 poly(I:C)에 대한 *hamp* 반응은 신속하게 유도되지만, 모든 조건에서 자극 농도에 비례하여 증가하는 단순 선형 반응으로 표현되지는 않았다. 본 결과는 조직 및 면역 관련 기관의 분화가 거의 진행되지 않

은 갯 부화 난황자어에서도 LPS 및 poly(I:C)와 같은 선천성 면역 자극에 대해 *hamp* 발현이 빠르게 유도될 수 있음을 보여준다(García-Navarro et al., 2025). LPS에 대한 반응은 세균성 PAMP 유사 자극에 대한 antimicrobial peptide (AMP) effector 반응 가능성을 시사하며, poly(I:C)에 대한 반응은 *hamp* 유도가 난황자어에서 세균성 자극에만 국한되지 않을 수 있음을 시사한다(Sun et al., 2014). 그러나 poly(I:C) 최고 농도에서 발현 증가가 감소한 양상은 고강도 자극에 면역 조절성 또는 억제성 항염증 반응(anti-inflammatory modulation)과 관련된 가능성이 있으나(Wang et al., 2024), 본 자료만으로 그 기작을 단정하

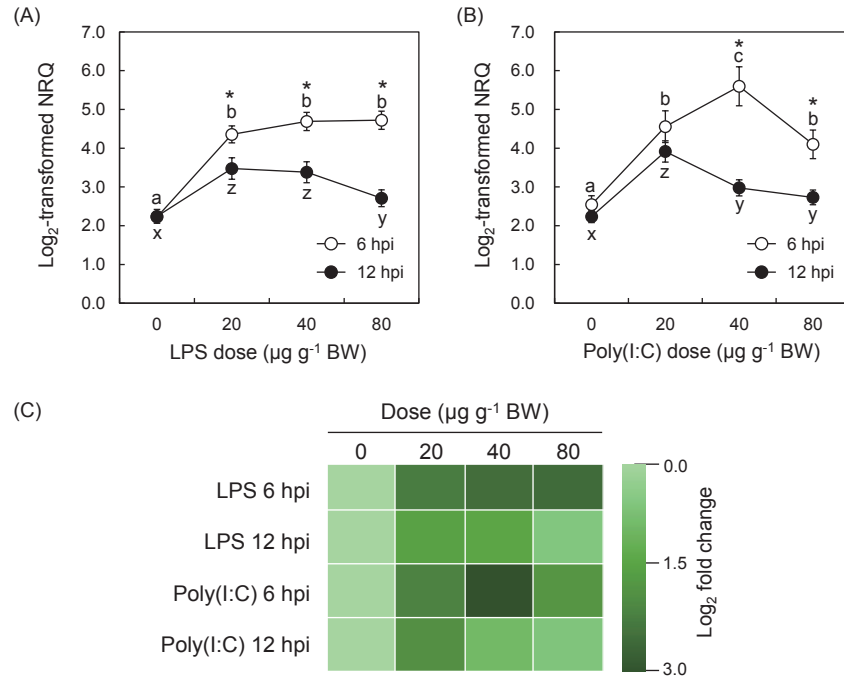


Fig. 2. Early induction of hepcidin (*hamp*) expression following microinjection of chemical immunostimulants. Newly hatched Siberian sturgeon *Acipenser baerii* prelarvae were microinjected with LPS or poly(I:C) at 0, 20, 40, and 80 $\mu\text{g g}^{-1}$ BW, and hepcidin expression was analyzed at 6 and 12 hpi. Panels (A) and (B) show the mean $\pm$ SD of $\log_2$ -transformed NRQ values for LPS and poly(I:C), respectively. Panel (C) summarizes the same data as $\log_2$ fold change relative to the corresponding saline control (0 $\mu\text{g g}^{-1}$ BW). Different lowercase letters (a–c) indicate significant differences among doses within the 6 hpi group, whereas different lowercase letters (x–z) indicate significant differences among doses within the 12 hpi group. Asterisks indicate significant differences between 6 and 12 hpi at the same dose. In all cases, stimulant-treated groups were significantly higher than the saline control ($P < 0.05$).

기는 어렵다. 다만, 최고 농도 처리의 경우 상대적 저농도 처리와 달리 실험 처리에 따라서 일부 개체에서 육안으로 확인 가능한 행동 발달 장애와 경우에 따라 일부 폐사가 관찰되므로(data not shown), 해당 현상은 최고 농도에서 난황자어의 대응 용량(responsive carrying capacity)을 넘어선 immune suppression 유발일 가능성이 크다(Li et al., 2023).

병원성 및 비병원성 세균 주입에 대한 *hamp* 및 *il1b*의 선택적 유도 반응

병원성 세균인 AH, BS, 그리고 SI를 설정하고, 미세주입 후 0, 6, 12 및 24 hpi에서 *hamp*와 *il1b*의 발현 변화를 분석하였다(Fig. 3A, 3B). AH 주입군에서는 *hamp* 발현이 6 hpi에서 급격히 증가하였으며, 대조군 대비 약 15배에 달하는 강한 유도 반응을 보였다(Fig. 3A). 이후 12 hpi에는 발현 수준이 감소하였으나 SI 및 BS 주입군보다 여전히 높은 수준을 유지하였고, 24 hpi에서도 유의적으로 높은 발현 양상이 지속되었다. $\log_2$ fold change 기반 heatmap에서도 AH 주입군의 *hamp* 유도는 6 hpi에서 가장 강하게 나타났으며, 12 및 24 hpi에서도 일부 상향 발현 유도 상태가 유지되는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 3C). 이

는 병원성 세균 주입에 의해 갖 부화 난황자어의 *hamp* 반응이 신속하게 유도되는 전형적인 ‘early acute response’ 양상을 보이며, 초기 peak 이후에도 초기 대비 감소에도 불구하고 일정 수준 이상으로 조절되는 시간적 지속성을 나타냄을 알 수 있다.

반면 BS 주입군의 *hamp* 발현 양상은 SI 주입군과 대체로 유사하였다(Fig. 3B). BS 주입군은 6, 12 및 24 hpi 전 구간에서 AH 주입군과 같은 급격한 발현 증가를 보이지 않았으며, SI와 비교해도 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다. 이는 본 AH 주입 조건에서 *hamp* 유도가 단순한 세균 세포의 주입, 물리적 주입 조작 등의 비특이적 반응이 아닌 병원성 감염원 노출과 밀접한 연관 반응을 잘 보여주고 있다.

Cytokine 유전자 *il1b*는 AH 주입군에서 6 hpi에 신속한 증가 후 12 및 24 hpi에는 다시 대조군 수준에 가까워지는 양상을 보여 6 hpi에서 *hamp*의 강한 유도 발현을 나타낸 AH 주입군에서의 결과와 맥락을 같이 하였지만, BS 주입군의 경우 *il1b* 역시 *hamp*와 마찬가지로 전 조사 시점에서 유의적인 발현 변화를 나타내지 않았다(Fig. 3B, 3C).

본 연구에서 0 days post hatching (dph) 난황자어는 병원성 세균인 *A. hydrophila* 주입에 대해 *hamp*와 *il1b*의 뚜렷한 상향

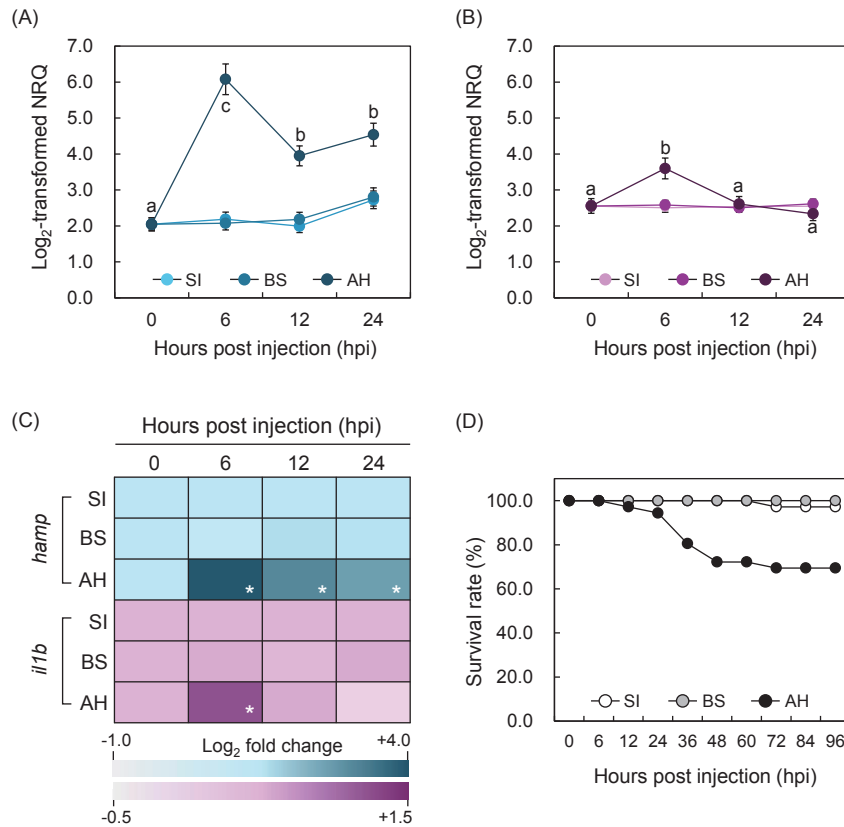


Fig. 3. Early marker gene expression responses and survival outcomes following pathogenic and non-pathogenic bacterial stimulation. Newly hatched Siberian sturgeon *Acipenser baeri* prelarvae were microinjected with saline injection (SI), *Bacillus subtilis* (BS), or *Aeromonas hydrophila* (AH), and expression of *hamp* (A) and *il1b* (B) was analyzed at 0, 6, 12, and 24 hpi. The 0 hpi sample represents the pre-injection baseline. Panels (A) and (B) show the mean $\pm$ SD of $\log_2$ -transformed NRQ values. Different letters indicate significant differences among time points within the AH group ($P < 0.05$), whereas no significant temporal differences were detected in the SI or BS groups. Panel (C) summarizes the expression changes of *hamp* and *il1b* as a $\log_2$ fold-change heatmap. Asterisks indicate significant differences from the SI and/or BS group at the corresponding time point ($P < 0.05$). Panel (D) shows cumulative survival curves for SI, BS, and AH groups. Cumulative mortality became evident in the AH group from 24 hpi onward, whereas SI and BS groups maintained nearly complete survival throughout the observation period.

발현을 보인 반면, 비병원성 세균인 BS 주입에서는 이러한 반응이 관찰되지 않았다. 이는 갯 부화한 철갑상어 난황자어가 모든 세균성 자극에 대해 유사하게 반응하는 것이 아니라, 병원성 감염원에 의해 유발되는 감염 관련 신호를 일정 수준 구분하여 인식할 수 있음을 시사한다(Charlie-Silva et al., 2019). 제브라피시 배아에서도 병원성 *Edwardsiella tarda*와 비병원성 또는 비치사성 세균 자극에 대한 전사 반응은 노출 경로와 감염 진행 단계에 따라 달라지는 것으로 보고된 바 있다(van Soest et al., 2011). 일반적으로 어류의 초기 선천면역 반응은 세균 유래 PAMP/microbe-associated molecular pattern의 인식에 의해 개시되지만, 병원성 감염원에 대한 반응은 단순한 세균 성분의 존재뿐만 아니라 숙주 내 세균의 생존성, 지속성, 조직 침투성, 세포 손상 및 이에 따른 DAMP/stress signal의 발생 여부

에 따라 질적으로 달라질 수 있으며, 제브라피시 유생 감염 모델에서는 microbial infection 과정에서 조직 손상 신호가 보호적 백혈구 동원과 생존에 필수적으로 작용할 수 있음이 보고되었다(Huang and Niethammer, 2018). 따라서 본 연구에서 관찰된 *A. hydrophila* 특이적 *hamp* 및 *il1b* 유도는 단순한 bacterial cue에 대한 일반적 반응이 아닌, 병원성 세균 자극에 의해 활성화된 초기 염증성-항균성 반응 축을 반영하고 있음을 알 수 있다(van der Vaart et al., 2013). 다만 비병원성 세균이라 하더라도 숙주 내부 특정 조직 공간에 주입되거나 제거되지 않고 지속될 경우 염증성 반응을 유도할 수 있음이 보고되어 있으므로 (Nguyen-Chi et al., 2014), 본 결과는 BS 자체의 보편적 무반응성을 의미하기보다는 본 연구의 0 dph 난황자어, 주입량 및 관찰 시간 조건에서 AH와 BS 사이에 나타난 질적 반응 차이로 해

석하는 것이 타당하다.

생존율 관찰 실험은 두 세균의 병원성 및 비병원성 특징을 선명하게 보여주었는데(Fig. 3D), SI 및 BS 주입군은 관찰 기간 동안 거의 100%에 달하는 높은 생존율을 유지한 반면, AH 주입군에서는 24 hpi 이후 누적 폐사가 빠르게 나타나기 시작하였다. 특히 AH 주입 후 초기 생존율 차이가 아직 뚜렷하지 않은 6 hpi 시점에서 *hamp*와 *il1b*의 유도 반응이 관찰된 점은, 0 dph 부화자어가 병원성 세균 자극에 대해 빠른 전사 수준의 방어 반응을 개시할 수 있음을 보여준다. 그러나 *A. hydrophila* 주입 후 *hamp*와 *il1b*가 상향 발현되었음에도 불구하고 폐사가 일정 누적되었다는 점은, 이러한 전사적 반응이 곧 완전한 생체 방어능의 확보를 의미하지는 않음을 보여준다. 세균 감염에 대한 효과적인 방어는 병원체 인식과 염증성 cytokine 유도와 아울러 면역세포 동원, 세포의 포식·살균 기능, 체액성 방어, 철 제한 반응, 산화적 살균, 항산화 보호 등 다양한 세포 경로의 작동이 유기적으로 연계되어야 한다(Mackawa et al., 2019; Höhne et al., 2021). 그러나 갯 부화 난황자어는 내부 기관과 면역 관련 세포·조직 체계가 아직 충분히 분화·성숙되지 않은 단계이므로, *hamp*와 *il1b*의 유도는 병원성 자극에 대한 초기 alarm response를 나타낼 수는 있으나, 세균 제거와 염증 조절을 모두 수행할 수 있는 통합적 방어체계는 아직 미완성 상태일 가능성이 높다. 또한 초기 염증 반응이 유도되더라도 이를 적절히 제한하거나 완화 또는 해소 단계로 전환하는 항염증성 보호 기작이 충분히 작동하지 못할 경우, 염증성 손상 자체도 폐사에 기여할 수 있다(Mackawa et al., 2019; Wang et al., 2024). 따라서 본 연구결과를 토대로 갯 부화 난황자어의 선천성 면역 관련 생체 방어에 관한 다양한 축의 통합적 연계에 관한 비교 연구가 뒤따라야 할 것이다.

종합하면, 본 연구는 시베리아 철갑상어 갯 부화 난황자어가 미세주입 관련 취급 및 생리식염수 주입 조건에서는 *hamp*와 *il1b*의 기저 발현을 비교적 안정적으로 유지하는 반면, LPS, poly(I:C) 및 병원성 세균 AH와 같은 선천성 면역 자극에 대해서는 염증성 반응 경로의 빠른 유도와 전사 반응을 나타낼 수 있음을 보여준다. 또한 자극 강도에 따른 양적 반응성과 함께, 병원성 세균과 비병원성 세균에 대한 질적 차등 반응성이 확인됨으로써 갯 부화 난황자어가 아직 조직 및 면역 기관의 분화가 거의 진행되지 않은 상태임에도 불구하고, 일부 innate immune effector response를 가동할 수 있는 분자적 기초 기반을 보유하고 있음을 시사한다. 다만 본 연구는 *hepcidin*을 중심으로 한 AMP effector 반응과 *il1b*를 통한 초기 염증성 반응을 분석한 것이므로, 이를 최초 부화자어의 전체 선천성 면역 능력으로 일반화하기에는 한계가 있다. 향후 자극원의 인식에 관여하는 pattern-recognition receptor 관련 경로 및 후성유전학적 조절에 관여하는 분자들을 포함한 분석을 통해서 시베리아 철갑상어 부화 자어가 보유한 선천성 면역 대응의 능력과 용량에 대한 보다 체계적인 실험 디자인으로의 연계가 요구된다. 더불어

본 연구는 갯 부화 난황자어의 생애 최초 시점에서의 능력 평가에 초점을 맞추었으므로, 이러한 유도성 전사 반응과 병원성/비병원성 세균에 대한 차등 반응성의 유지 또는 변동 여부에 관하여 발달 단계에 따른 비교 연구가 뒤따라야 할 것이다.

사 사

본 연구는 부경대학교 자율창의연구사업(2024년)의 지원에 의해 수행되었음.

References

- Brownstein CD and Near TJ. 2025. Toward a phylogenetic taxonomy of sturgeons (*Acipenseriformes:Acipenseridae*). Bull Peabody Mus Nat Hist 66, 3-23. <https://doi.org/10.3374/014.066.0101>.
- Castro R, Jouneau L, Tacchi L, Macqueen DJ, Alzaid A, Secombes CJ, Martin SAM and Boudinot P. 2015. Disparate developmental patterns of immune responses to bacterial and viral infections in fish. Sci Rep 5, 15458. <https://doi.org/10.1038/srep15458>.
- Charlie-Silva I, Klein A, Gomes JMM, Prado EJR, Moraes AC, Eto SF, Fernandes DC, Fagliari JJ, Corrêa Junior JD, Lima C, Lopes-Ferreira M, Conceição K, Manrique WG and Belo MAA. 2019. Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. Sci Rep 9, 4776. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41312-z>.
- Chesneau V. 2018. Immunology in sturgeons with a focus on the Siberian sturgeon mechanisms, responses to stress and stimulation. In: The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Volume 2-Farming. Williot P, Nonnotte G and Chebanov M, eds. Springer, Cham, Switzerland, 373-402. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61676-6_18.
- Cianciolo Cosentino C, Roman BL, Drummond IA and Hukriede NA. 2010. Intravenous microinjections of zebrafish larvae to study acute kidney injury. J Vis Exp 42, e2079. <https://doi.org/10.3791/2079>.
- Darroch H, Astin JW and Hall CJ. 2023. Microinjection of β -glucan into larval zebrafish (*Danio rerio*) for the assessment of a trained-like immunity phenotype. Bio Protoc 13, e4888. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4888>.
- Doszyn O, Dulski T and Zmorzynska J. 2025. Protocol for microinjection of rapamycin into the zebrafish habenula. STAR Protoc 6, 103566. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103566>.
- Garcia-Navarro L, Serna-Duque JA, Cuesta A and Esteban MA. 2025. Novel hepcidin genes in gilthead seabream: Implications for immune response and iron metabolism. Microb Pathog 205, 107695. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107695>.
- Gisbert E and Nam YK. 2018. Early ontogeny in the Siberian sturgeon. In: The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*

- rii, Brandt, 1869) Volume 1-Biology. Williot P, Nonnotte G, Vizziano-Cantonnet D and Chebanov M, eds. Springer, Cham, Switzerland, 131-157. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61664-3_8.
- Gradil AM, Wright GM, Wadowska DW and Fast MD. 2014. Ontogeny of the immune system in Acipenserid juveniles. *Dev Comp Immunol* 44, 303-314. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.01.006>.
- Höhne C, Prokopov D, Kuhl H, Du K, Klopp C, Wuertz S, Trifonov V and Stöck M. 2021. The immune system of sturgeons and paddlefish (Acipenseriformes): A review with new data from a chromosome-scale sturgeon genome. *Rev Aquac* 13, 1709-1729. <https://doi.org/10.1111/raq.12542>.
- Huang C and Niethammer P. 2018. Tissue damage signaling is a prerequisite for protective neutrophil recruitment to microbial infection in zebrafish. *Immunity* 48, 1006-1013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.020>.
- Kim CH, Kim EJ and Nam YK. 2019. Chondrosteian sturgeon hepcidin: An evolutionary link between teleost and tetrapod hepcidins. *Fish Shellfish Immunol* 88, 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.045>.
- Kim CH, Kim EJ and Nam YK. 2021. Superoxide dismutase multigene family from a primitive chondrosteian sturgeon, *Acipenser baerii*: Molecular characterization, evolution, and antioxidant defense during development and pathogen infection. *Antioxidants* 10, 232. <https://doi.org/10.3390/antiox10020232>.
- Kim EJ and Nam YK. 2018. Anesthetic protocol for microinjection-related handling of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*; Acipenseriformes) prolarvae. *PLoS One* 13, e0209928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209928>.
- Kim EJ and Nam YK. 2024. Expression characteristics of transferrin gene during embryo development and prolarval ontogeny in Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Korean J Fish Aquat Sci* 57, 41-52. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0041>.
- Kim EJ, Kim KH and Nam YK. 2025. Molecular characterization of hemopexin in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*): Evolutionary insights and differential expression under immune and thermal stresses. *Intl J Mol Sci* 26, 7934. <https://doi.org/10.3390/ijms26167934>.
- Kim EJ, Park CH and Nam YK. 2020. Behavioral characteristics of a chondrosteian sturgeon species *Acipenser baerii* prelarvae in response to different environmental light intensities in a diel photoperiodic cycle. *J Anim Reprod Biotechnol* 35, 245-257. <https://doi.org/10.12750/JARB.35.3.245>.
- Li K, Wei X and Yang J. 2023. Cytokine networks that suppress fish cellular immunity. *Dev Comp Immunol* 147, 104769. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104769>.
- Maekawa S, Wang PC and Chen SC. 2019. Comparative study of immune reaction against bacterial infection from transcriptome analysis. *Front Immunol* 10, 153. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00153>.
- Nguyen-Chi M, Phan QT, Gonzalez C, Dubremetz JF, Levraud JP and Lutfalla G. 2014. Transient infection of the zebrafish notochord with *E. coli* induces chronic inflammation. *Dis Model Mech* 7, 871-882. <https://doi.org/10.1242/dmm.014498>.
- Park CH, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2013a. Embryonic development of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* under hatchery conditions: An image guide with embryological descriptions. *Fish Aquat Sci* 16, 15-23. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.0015>.
- Park CH, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2013b. Effects of incubation temperature on egg development, hatching and pigment plug evacuation in farmed Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Fish Aquat Sci* 16, 25-34. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.0025>.
- Pérez-Atehortúa M, Hernández AJ, Dantagnan P, Silva M, Risopatrón J, Fariás J, Villalobos EF and Valdebenito I. 2023. Chorion in fish: Synthesis, functions and factors associated with its malformations. *Aquacult Rep* 30, 101590. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101590>.
- Schmittgen TD and Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Sun W, Li Z and Zhang S. 2014. Acute phase response in zebrafish embryo/larva with special emphasis on LPS-induced changes in expression pattern of acute phase protein genes. *J Mar Biol Assoc U K* 94, 1569-1580. <https://doi.org/10.1017/S0025315414000150>.
- Tsessarsky AA. 2022. Origin and diversification of Acipenseriforms. *J Ichthyol* 62, 1361-1380. <https://doi.org/10.1134/S0032945222060297>.
- van der Vaart M, van Soest JJ, Spaik HP and Meijer AH. 2013. Functional analysis of a zebrafish *myd88* mutant identifies key transcriptional components of the innate immune system. *Dis Model Mech* 6, 841-854. <https://doi.org/10.1242/dmm.010843>.
- van Soest JJ, Stockhammer OW, Ordas A, Bloembergen GV, Spaik HP and Meijer AH. 2011. Comparison of static immersion and intravenous injection systems for exposure of zebrafish embryos to the natural pathogen *Edwardsiella tarda*. *BMC Immunol* 12, 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-58>.
- Wang Z, You X, Zhang Y, Liu Q and Yang D. 2024. Poly(I:C) induces anti-inflammatory response against secondary LPS challenge in zebrafish larvae. *Fish Shellfish Immunol* 144, 109285. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109285>.
- Zhang Z, Chi H and Dalmo RA. 2019. Trained innate immunity of fish is a viable approach in larval aquaculture. *Front Immunol* 10, 42. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00042>.