



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

과급이에 의해 비만이 유도된
무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의
면역생리학적 반응 연구



2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

박 지 연

이 학 석 사 학 위 논 문

과급이에 의해 비만이 유도된
무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의
면역생리학적 반응 연구

지도교수 김 도 형

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

박 지 연

박지연의 이학석사 학위논문을 인준함.

2020년 8월 28일



위 원 장 약학박사 정 준 기 (인)

위 원 이학박사 김 광 일

위 원 이학박사 김 도 형

목 차

목차	i
Abstract	iv
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	4
2.1. 사료 과다 급여 실험 방법	4
2.1.1. Trial 1 실험 조건	4
2.1.2. Trial 2 실험 조건	5
2.1.3. Trial 3 실험 조건	6
2.2. 혈청학적 분석	7
2.3. Flow cytometry를 이용한 면역세포 분석	8
2.3.1. 백혈구 분리 및 배양	8
2.3.2. 세포 분포 분석	8
2.4. 조직학적 분석	9
2.5. 과다 투여 그룹에 대한 스트레스 저항성 분석	10
2.5.1. Trial 1 고수온 및 병원체 저항성 시험	10
2.5.2. Trial 2 병원체 저항성 시험	11
2.5.3. Trial 3 병원체 저항성 시험	11
2.6. Transcriptome analysis	12
2.6.1. RNA isolation	12

2.6.2. cDNA library 제작 및 sequencing	12
2.6.3. Sequencing data processing 및 differential gene expression(DEG) 분석	13
2.7. 통계분석	13
3. 결과	14
3.1. 사료 급이량과 어체중	14
3.1.1. Trial 1	14
3.1.2. Trial 2	16
3.1.3. Trial 3	18
3.2. 혈액학적 변화 분석	20
3.3. Flow cytometry를 통한 면역세포의 변화 분석	26
3.4. 사료 과다 투여에 따른 간의 조직학적 변화 분석	28
3.5. 사료 과다 투여에 따른 스트레스 저항성 비교	29
3.5.1. 고수온 스트레스에 따른 저항성 비교	29
3.5.2. <i>F. psychrophilum</i> 공격에 따른 감염률 차이 비교	31
3.5.3. Trial 2 에서 <i>A. salmonicida</i> 공격에 따른 폐사율 비교	32
3.5.4. Trial 3 에서 <i>A. salmonicida</i> 공격에 따른 폐사율 비교	35
3.6. Transcriptome analysis	38
3.6.1. Transcriptome data의 overview	38
3.6.2. Hierarchical clustering 및 K-means를 통한 유전자 발현 분석	41
3.6.3. Differential expressed genes (DEG) 분석	47
4. 고찰	53

5. 결론	60
6. 국문요약	61
7. 참고문헌	63



Studies on immunophysiological responses in overfeeding-induced obese rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Ji-yeon Park

Department of aquatic life medicine, The Graduate school,
Pukyong National University

Abstract

Inappropriate feeding strategies including overfeeding could cause decreasing the feed efficiency, increasing feed wastage and bacterial loads, and obesity, which is induced due to an imbalance between energy consumption and expenditure. Although overfeeding is rather common and thus overfeeding-induced obesity is likely to occur in fish farming industry, most studies have been conducted using fish with high-fat diet-induced obesity. Therefore, the purpose of this study was to understand physiological and immunological changes in rainbow trout with overfeeding-induced obesity. In this study, three independent trials were conducted. In trials 1 and 2, fish were divided into three groups (normal, intermediate and overfed groups) and fed for 8 weeks, and various serum parameters and gene expression were determined to evaluate the effect of overfeeding. In trial 3, fish in the control and overfed groups were sampled at week 4 for transcriptome analysis. In all trials, body mass index (BMI), hepatosomatic index (HSI), and feeding rate were determined at week 0, 2, 4, and/or 8. Five fish from trial 1 were challenged with 2.66×10^6 CFU/fish of *Flavobacterium psychrophilum* strain FPRT1 by intraperitoneal (ip) injection and twenty

fish exposure to heat stress by increasing water temperature (3°C/day, final temperature 25°C) for 10 days. Fish at week 4 and 8 in trial 2 were challenged with 4.06×10^6 CFU/fish and 1.78×10^6 CFU/fish of *Aeromonas salmonicida* strain 18KR23 by ip injection respectively. Fish at week 4 in trial 3 were challenged with 4.7×10^6 CFU/fish of *Aeromonas salmonicida* strain 18KR23 by ip injection. Overall, fish in the overfed groups showed significantly higher HSI, BMI, and values in serum parameters such as GOT and GPT. Also, fish in the overfed groups showed higher mortality and infection rate after they were challenged with bacterial pathogens. Granulocyte-macrophage/lymphocyte ratio from fish in the overfed group were significantly lower than those of fish in the control group. From histopathological analysis, fish in the overfed group sampled at week 4 harbor enlarged hepatocytes compared to control fish. From transcriptome analysis, genes involved in energy synthesis, fatty acid metabolism, and PPAR signaling and NOD-like receptor signaling were significantly up-regulated in overfed fish. This study demonstrates that overfeeding for even a short period of time could cause physiological and immunological imbalance in fish, leading them to be more vulnerable to infections. This study provides insights into systemic physiological changes in fish with overfeeding-induced obesity.

1. 서론

최근 발표된 국제연합식량농업기구 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 통계에 따르면 전 세계 수산물 총생산량은 2017년을 기준으로 2억 419만 톤으로 2000년 대비 연평균 2.4%씩 증가한 것으로 나타났다(FAO, 2019). 국내 수산물 총생산량은 2008년 3,361,300톤에서 2018년 3,791,000톤으로 매년 1.2-1.5% 정도 꾸준히 증가하고 있다. 2008년에서 2019년 사이 어업 생산량은 1,980,300톤에서 1,44,100톤으로 오히려 매년 평균적으로 3.1-3.2% 감소하고 있지만, 천해 양식 생산량은 1,381,000톤에서 2,384,000톤으로 매년 약 7.5% 씩 증가하는 것으로 나타나 우리나라 수산업에서 차지하는 양식산업의 중요성을 알 수 있다(KOSIS 어업생산통계 및 어류 양식 현황조사, 통계청 농어업통계과 2019). 이러한 변화는 잡는 어업에서 기르는 어업으로 수산물 생산 패러다임의 전환이 지속되고 있는 것을 의미하는 바이다. 집약적으로 수산생물을 수용하여 경제적 가치를 창출하는 양식산업의 특성상 필요 이상의 과도한 양의 사료를 급이하여 단기간에 빠른 성장을 유도하고 생산량을 늘리려는 시도는 빈번히 일어나고 만연되고 있다. 사료의 과다 투입에 따른 결과로 사료 찌꺼기와 배설물이 증가하며 이로 인하여 수질악화가 유발되고 수산생물의 건강도 저하 및 질병에 대한 감수성이 증가하고 있다(Kim et al., 2010). 양식 현장에서 단기간 빠른 성장을 추구하는 이러한 실태는 무조건적인 생산량의 증대로 이어질 것이라는 잘못된 인식에 의해 일어난다.

과다한 사료가 지속적으로 공급될 경우 필요 이상의 에너지가 축적이 되게 되고 이는 비정상적으로 과다한 지방이 축적되는 현상인 비만을 유도할 수 있다. 비만은 대사장애를 비롯한 제 2 형 당뇨병, 동맥경화

심지어 특정 암의 발생에도 영향을 주는 것으로 알려졌다(Engelgau et al., 2004; Huang et al., 2009) 이러한 이유로 인하여 비만은 지난 수십 년 동안 세계적인 문제로 대두되었다. 비만에대한 연구는 쥐를 모델로 하여 염증반응과 비만 사이의 상관관계 및 질병 발생 기전에 규명을 위해 수행되어 왔다(Speakman et al., 2007). 앞선 연구에 따르면 비만은 정도(low level)의 염증을 일으키며 일반적으로 만성염증의 원인인 것으로 알려져 있다 (Huang et al., 2009). 제브라피쉬(*Danio rerio*)를 이용한 비만 연구 결과에서도 트리글리세리드 과잉증(hypertriglyceridemia)과 지방간과 같은 대사장애를 유도하며 혈액 응고 경로(blood coagulation pathway)에 관여하는 유전자인 apoH, IL-6, IL-1 β 뿐만 아니라 지질대사에 관여한다고 알려진 SREBP1, PPAR α/γ , NR1H3 및 leptin이 고지방 식이를 먹은 제브라피쉬에서 발현이 된다고 보고되었다(Oka et al., 2010). 초어(*Ctenopharyngodon idella*)에 과다한 콜레스테롤을 급이 하였을 때 마크로파지의 기능이 손상되고 lysozyme 활성을 낮출 뿐만 아니라 두신과 비장에서 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 IL-6, IL-12p35, IL-17D와 TNF- α 의 발현이 증가하고 항염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)인 IL-10와 IL-11 등의 발현은 감소하여 염증반응을 유발하였다(Wang et al., 2018). 이처럼 포유동물에서뿐만 아니라 어류에서도 과다한 식이는 생리, 면역학적 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다.

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 경골아강(Osteichthyes), 연어목(Salmoniformes), 연어과(Salmonidae)의 냉수성 담수어종으로 성장이 빨라 세계적으로 많은 양식이 이루어진다. 우리나라에서도 1965년 미국으로부터 발안란 도입 이후로 약 50년간 양식이 지속적으로 이루어지고 있다. 최근 5년간의 무지개송어 국내 양식 생산량을 살펴보면 2015년 2,965톤에서 2019년 3,095톤으로 매년 꾸준히 증가하는 양상을 보였다(한국해양수산

개발원, 2020). 이는 우리나라 내수면 양식산업에서 뱀장어 다음으로 가장 생산량이 많고 지속적으로 3천 톤 이상을 생산하므로 우리나라의 내수면 주요 양식 생산 어종으로 볼 수 있다(Beak et al., 2016). 또한, 2020년 예상 송어 생산량은 2019년보다 소폭 증가한 3,120톤으로 생산이 꾸준히 증가할 것으로 보여진다(한국해양수산개발원, 2020).

늘어나는 생산량에도 불구하고 한국 주요 양식 종의 폐사 피해 모니터링 결과에 따르면 20개소의 무지개송어 양식장을 기준으로 연간 폐사량 중의 47.67%가 비감염성 질병에 의한 것이라고 보고하였다(Kim et al., 2012). 정확한 폐사의 원인은 알려져 있지않지만 스트레스를 유발할 수 있는 다양한 조건(e.g., 높은 수온, 과다 급이, 밀식)이 그 원인일 것으로 추정된다. 실제로 과도한 사료공급은 사료 효율을 떨어뜨릴 뿐만 아니라 사료의 낭비 및 수질악화와 미생물 증가의 원인으로 알려져 있다(Lovell et al., 2003). 본 연구에서는 국내 내수면 양식산업에서 많은 생산량을 차지하는 무지개송어를 이용하여 과다급이를 하였을 때 나타나는 면역·생리학적 반응과 세균성 질병에 대한 저항성과의 연관성 분석을 통하여 투여하는 사료의 양과 건강도 간의 상관관계를 이해하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사료 과다 급여 실험 방법

2.1.1. Trial 1 실험 조건

본 연구에 사용한 어류는 경북 상주시 양식장에서 질병에 노출이 없는 무지개송어($17.88 \pm 1.29\text{cm}$, $51.2 \pm 12.12\text{g}$)를 구입하였으며 부산 남구에 위치한 부경대학교 수산질병관리원의 500L 수조에 순치 후 사용하였다. 세 개의 500L 수조에 각각 40마리씩 옮긴 후 15°C 로 유지하여 실험을 실시하였다. Trial 1에서는 대조 그룹(C), 중간급여 그룹(IM), 과다급여 그룹(OF)을 두었으며 각각 어체중 g 당 1.5%, 2.5%, 3.09%(만복 급여)의 비율로 공급하였다. 모든 사료는 상업사료(Sajo Donga, Seoul, Korea)를 사용하였으며 하루에 최소 두 번 이상 급여를 실시하였다. 샘플링은 하루 전 절식 후 2주, 4주 8주차에 각 그룹별로 5마리씩 취하였다. MS-222(Sigma, Saint louis MO, USA)를 사용하여 마취 후 샘플링이 진행되었으며 어류 길이, 무게, 체질량지수(Body mass index; BMI; g/cm^2) 및 간중량지수(Hematosomatic index; HSI; $/$ (간무게/체중) $\times 100$)를 측정하였다. 간, 두신 조직은 trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 저장하여 RNA isolation 전까지 -80°C 에 보관하였다.

2.1.2. Trial 2 실험 조건

본 연구에 사용한 어류는 경북 상주시 양식장에서 질병에 노출이 없는 무지개송어($16.64 \pm 1.31\text{cm}$, $44.6 \pm 9.95\text{g}$)를 구입하여 부산 남구에 위치한 부경대학교 수산질병관리원의 500L 수조에 순치하였다. 이후 3개의 500L 수조에 각각 35마리씩 옮긴 후 15°C 로 유지하여 실험을 실시하였다. Trial 2에서는 C그룹, IM그룹, OF그룹을 두었으며 각각 어체중 g당 1.7%, 2.55%, 3.59%(만복급여)의 비율로 공급하였다. 모든 사료는 상업사료(Sajo Donga)를 사용하였으며 하루에 최소 두번 이상 급여를 실시하였다. 샘플링은 하루 전 절식 후 2주, 4주 8주차에 각 그룹별로 5마리씩 취하였다. MS-222(Sigma)를 사용하여 마취 후 샘플링이 진행되었으며 어류 길이, 무게, 체질량지수(Body mass index; BMI; g/cm^2) 및 간중량지수(Hematosomatic index; HSI; $(\text{간무게}/\text{체중}) / \times 100$)를 측정하였다. 간, 두신 조직은 RNA later(Qiagen, Hilden, Germany)에 저장하여 RNA isolation 전까지 -80°C 에 보관하였다.

2.1.3. Trial 3 실험 조건

본 연구에 사용한 어류는 경북 상주시 양식장에서 질병에 노출이 없는 무지개송어($14.04 \pm 0.7\text{cm}$, $26.89 \pm 3.47\text{g}$)를 구입하여 부산 남구에 위치한 부경대학교 수산질병관리원의 500L 수조에 순치 후 사용되었다. 두 개의 500L 수조에 각각 93마리씩 옮긴 후 15°C 로 유지하여 실험을 실시하였다. Trial 3에서는 C와 OF그룹의 두었으며 각각 어체중 g당 2.17%, 3.95%(만복급이)로 투여하였다. 모든 사료는 상업사료(Sajo Donga)를 사용하였으며 하루에 최소 두번 이상 급이를 실시하였다. 샘플링 하루 전날은 절식을 하였고 샘플링은 하루 전 절식 후 1주, 2주 4주차에 각 그룹별로 7마리씩 취하였다. MS-222(Sigma)를 사용하여 마취 후 샘플링이 진행되었으며 어류 길이, 무게, 체질량지수(Body mass index; BMI; g/cm^2) 및 간중량지수(Hematosomatic index; HSI; $/ (\text{간무게}/\text{체중}) \times 100$)를 측정하였다. 간, 두신 조직은 RNA later(Qiagen)에 저장하여 RNA isolation 전까지 -80°C 에 보관하였다. 간조직은 10% 중성 포르말린에 고정하여 조직병리학적 분석을 실시하였다.

2.2. 혈청학적 분석

혈청 내 바이오마커 분석을 위하여 MS-222(Sigma)를 이용하여 마취 후 미부정맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 원심분리(6500rpm, 15분, 4℃)하여 혈청을 분리하였다. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), glucose (GLU), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), total protein (TP), calcium (Ca) 및 total cholesterol (TCHO)을 혈청분석기 (FUJI DRI-CHEM 3000, Fuji film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.



2.3. flow cytometry를 이용한 면역세포 분석

2.3.1. 백혈구 분리 및 배양

백혈구 분리를 위하여 MS-222(Sigma)를 이용하여 마취 후 어류의 두신을 분리하였다. 분리한 조직을 70 μ m nylon cell strainer에서 마쇄하였다. 마쇄한 조직액을 34%, 51% percoll 중층에 쌓고 400g, 4 $^{\circ}$ C에서 25분간 원심분리하였다. 분리된 백혈구 층을 L15 medium(Sigma) + 1% Antibiotic-Antimycotic, 100X(Gibco, Grand Island, NY, USA) + 2% FBS(Gibco) 1 ml을 이용하여 200 g, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 2번 세척하였다. Hemocytometer를 이용하여 cell count를 하고 세포의 수가 1×10^6 cells/ml이 되도록 L15 medium(Sigma) + 1% Antibiotic-Antimycotic, 100X(Gibco) + 10% FBS(Gibco)를 첨가하여 주었다.

2.3.2. 세포 분포 분석

flow cytometer(Accuri C6TM Flow Cytometer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 대식세포 및 림프구의 분포를 분석하고 과립구와 림프구의 비(Granulocytemacrophage/Lymphocyte ratio, G / L ratio)를 구하였다.

2.4. 조직학적분석

Trial 3에서 1, 2, 4주 샘플링 후 간조직은 조직병리 분석을 위하여 10% 중성 포르말린(BBC biochemical, Mount Vernon, WA, USA)으로 전고정시켰다. 그 후 전처리된 시료를 세절하여 동일한 고정액에 재고정하였다. 그 후 70%에서 100% 에탄올로 순차적인 탈수를 실시하였다. xylene으로 투명화, 파라핀 침투를 통하여 파라핀 포매를 제작한 후 박절기를 사용하여 각 장기를 4 μm 두께의 절편을 제작하여 H&E 염색(BBC biochemical)을 실시하였다. 그 후에 염색된 장기 절편을 광학현미경상에서 400배율로 관찰하였다.



2.5. 과다 투여 그룹에 대한 스트레스 저항성 분석

2.5.1. Trial 1 고수온 및 병원체 저항성 시험

첫 번째 실험의 8주차 샘플링 후 각 구간당 20마리, 5마리씩 무작위로 분류하여 고수온 스트레스 자극과 병원체 공격 실험을 실시하였다. 고수온 스트레스 실험에서 수온은 초기 15℃에서 시작하여 하루에 3℃씩 총 3일간에 걸쳐 최종적으로 25℃까지 수온을 상승시켜주었다. 25℃가 되는 시점을 기준으로 24시간, 120시간, 240시간째 각각의 수조에서 5마리씩 무작위로 선택하여 마취시킨 후 미부정맥으로부터 혈액을 채취 한 후 간을 적출하였다. 구간별로 무작위로 선정된 5마리는 *Flavobacterium psychrophilum* strain FPRT1을 2.66×10^6 CFU/fish 로 복강으로 공격하여 폐사율을 확인하였다. 생존 개체에 대해서는 접종 후 15일 차에 두신 조직으로부터 세균 감염 유무를 확인하였다.

2.5.2. Trial 2 병원체 저항성 시험

급이 후 4주 차 샘플링 후 각 구간당 5마리씩 무작위로 선정하여 *Aeromonas salmonicida* strain 18KR23을 4.06×10^5 CFU/fish 농도로 접종하여 폐사율을 확인하였다. 접종 후 수온은 15℃를 유지하였으며 환수는 48시간 마다 전량 환수해주었다. 폐사가 완화된 접종 후 9일 차에 생존개체의 두신 조직으로부터 세균 감염 유무를 확인하였다. 8주 차 샘플링 후 각 구간당 5마리에 3가지의 *A. salmonicida* 18KR23 농도($1.78 \times 10^{5-3}$ CFU/fish CFU)로 공격하여 폐사율을 확인하였다. 접종 후 수온은 15℃를 유지하였으며 48시간 마다 전량 환수하였다. 생존개체에 대해서는 접종 후 15일 차에 두신 조직으로부터 세균 감염 유무를 확인하였다.

2.5.3. Trial 3 병원체 저항성 시험

급이 후 4주차에 7마리씩 3반복으로 4.7×10^5 CFU/fish 농도의 *A. salmonicida* 18KR23을 복강으로 공격한 후 폐사율을 확인하였다. 또한, 동일 농도로 그룹별로 46마리씩 병원체 공격 후 1, 3, 7일차에 그룹별로 7마리씩 무작위로 샘플링을 실시하였다. 수온은 15℃를 유지하였으며 환수는 48시간 마다 전량 환수하였다. 샘플링은 MS222(Sigma)를 이용하여 안락사 후 미부정맥에서 혈액을 채취하였으며 간, 비장, 신장을 적출하였다. 비장조직으로부터 tryptic soy agar(TSA)를 이용하여 세균 배양을 시도하여 감염유무를 확인하고자 하였다. 생존 개체에 대해서는 접종 후 15일 차에 두신과 비장조직으로부터 세균 감염 유무를 확인하였다.

2.6. Transcriptome analysis

2.6.1. RNA isolation

전사체 분석에는 Trial 3의 1주, 4주 및 감염 후 1일 차의 C 그룹과 OF 그룹의 간조직을 이용하였다. Total RNA는 Trizol® method (Invitrogen)을 이용하였으며 제조사의 protocol에 따라 수행하였다. RNA추출 후 DNase I (Sigma)를 처리하여 DNA를 완전히 불활성화시켰다. RNA 순도 및 농도는 NanoDrop8000 분광 광도계 (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 확인하였다. Total RNA integrity는 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 Total RNA의 RNA Integrity Number (RIN) value를 확인하였다.

2.6.2. cDNA library 제작 및 sequencing

cDNA libraries는 Truseq stranded mRNA library prep kit(Illumina, Sna Diego, CA, USA)를 사용하여 제작되었으며 capillary electrophoresis(Agilent, USA)로 품질을 확인하였다. Sequencing은 Illumina NovaSeq 6000(2x100 bp paired-end reads)로 진행되었다.

2.6.3. Sequencing data processing 및 differential gene expression(DEG) 분석

Raw sequence reads는 FastQC(Andrews et al., 2010)를 이용하여 품질검사를 수행하였다. 각 raw reads의 adapter trimming를 위하여 Cutadapt Python package(Martin, 2011)를 사용하였다. 각각의 샘플에 대한 reads는 Tophat v2.0.13(<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/>)에 의해 무지개송어 reference genome에 mapping 하였다. 전사체 데이터 분석을 위하여 integrated Differential Expression and Pathway analysis.91(iDEP.91), (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) tool을 사용하였다. FPKM 값을 이용하여 하나 이상의 샘플에서 1 이상의 수준으로 발현된 유전자만 포함되도록 필터를 하였다. Differentially expressed genes(DEG)의 비교를 위하여 DESeq2(Love et al., 2014) 방법으로 p-value(FDR) < 0.15 그리고 log2 fold change 절댓값 1.5를 초과하는 값을 가진 gene을 DEG로 추출하여 분석에 사용하였다.

2.7. 통계분석

Trial 1과 trial 2에서 도출된 결과는 SPSS v20.0(IBM, NY, USA)에서 one-way analysis of variance(ANOVA) test로 확인하였고 사후검정은 Duncan's multiple range test 방법을 이용하였다($p < 0.05$). trial 3에서 도출된 결과는 SPSS v23.0(IBM)에서 student t-test로 통계적 유의성을 검정하였다($p < 0.05$). 병원체 접종 후 발생한 폐사율이 그룹 간에 유의미한 차이가 있는지 비교하기 위하여 SPSS v23.0(IBM)에서 생존분석 Kaplan-Meier법을 사용하였으며 log-rank test로 유의성을 비교하였다.

3. 결과

3.1. 사료 급여량과 어체중

3.1.1. Trial 1

실험기간 동안 Trial 1에서 OF 그룹, IM 그룹, C 그룹의 정확한 급여율은 각각 3.09%, 2.5% 및 1.5%로 나타났다. 특히 OF 그룹의 어류는 C 그룹에 비해 약 2배 이상의 사료를 섭취하였음을 확인할 수 있었다. 시간별(0, 2, 4 및 8주) 무지개송어에 대한 HSI를 비교한 결과, 급여 후 2주째 OF 그룹이 C, IM 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 급여 후 0, 2, 4, 8주에 측정된 전장과 체중을 이용하여 BMI를 산출한 결과, 4주와 8주의 OF 그룹이 C 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 1).

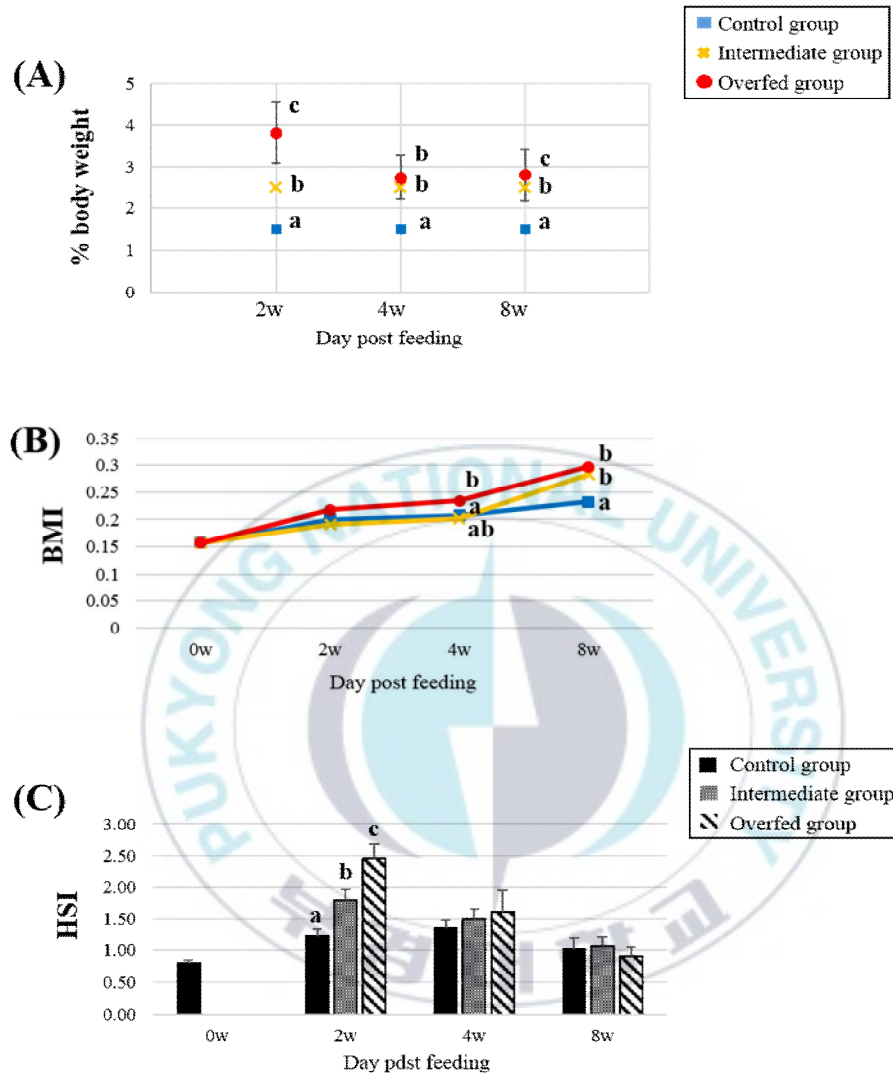


Fig. 1. Daily feed intake rate (% of body weight) for 8 weeks in the control (C), intermediate (IM) and overfed (OF) group (A). Body mass index (BMI) and hepatosomatic index (HSI) of rainbow trout in the C, IM, OF groupssampled at week 2, 4 and 8 (B), (C). Different letters indicate statistically significant differences determined by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

3.1.2. Trial 2

실험기간 동안 Trial 2에서 OF, IM 및 C 그룹의 굵이량은 각각 3.59%, 2.55%, 1.7%로 나타났다. 특히 OF 그룹의 어류는 C 그룹에 비해 평균적으로 2배 이상의 사료를 섭취하였음을 확인하였다. 시간별(0, 2, 4 및 8주)로 무지개송어에 대한 HSI를 비교한 결과, 굵이 후 2, 4, 8주째 OF 그룹이 C, IM 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다. BMI는 C 그룹에서 초기 0.16에서 8주 후 0.23으로 약 1.5배 증가하였고 IM 그룹에서 0.16에서 0.27로 약 1.7배 증가하였으며 OF 그룹에서는 0.16에서 0.32로 2배 이상 증가하였음을 확인할 수 있었다. 0, 2, 4, 8주의 전장과 체중으로부터 BMI를 산출한 결과, 4주와 8주의 OF 그룹이 C 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 2).

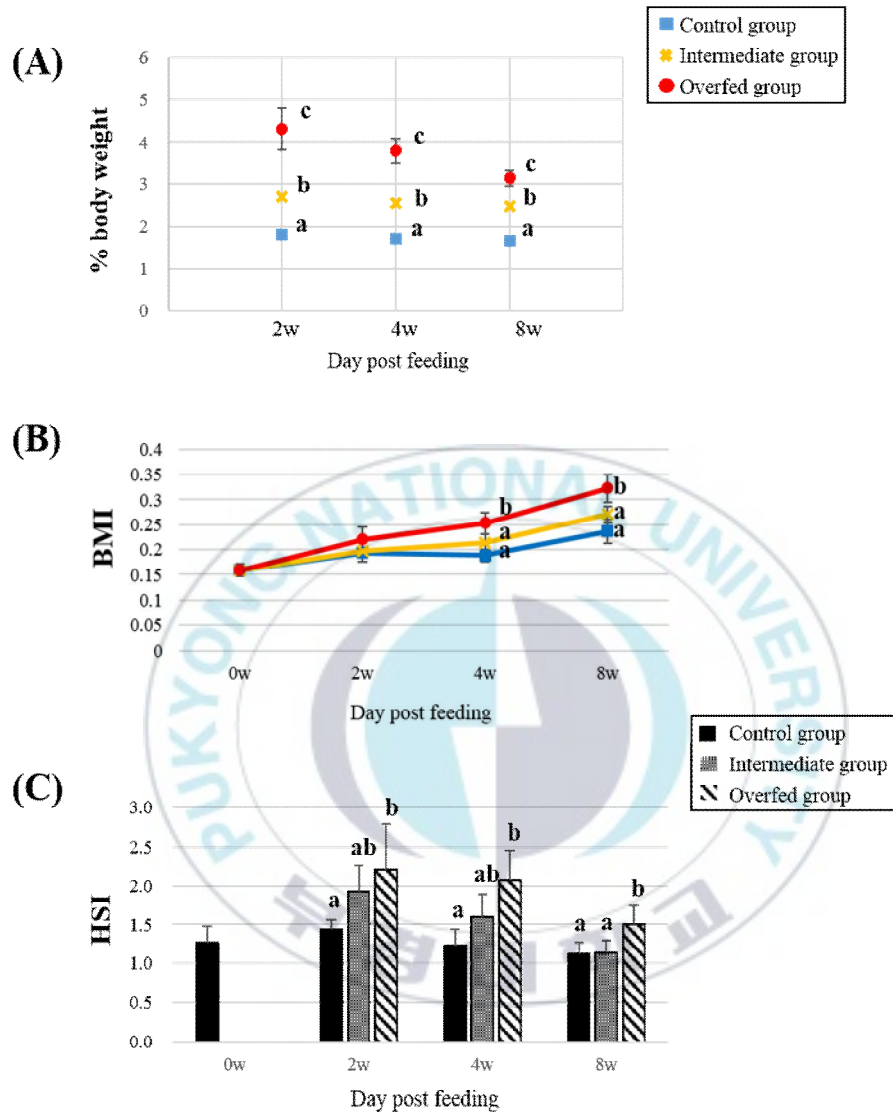


Fig. 2. Daily feed intake rate (% of body weight) for 8 weeks in the control (C), intermediate (IM) and overfed (OF) groups (A). Body mass index (BMI) and hepatosomatic index (HSI) of rainbow trout in the C, IM, OF groups sampled at week 2, 4 and 8 (B), (C). Different letters indicate statistically significant differences determined by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

3.1.3. Trial 3

실험기간 동안 Trial 3에서 OF 그룹, C 그룹의 급이량은 각각 3.95%와 2.12%로 나타났다. 기간별(0, 1, 2 및 4주) 무지개송어의 HSI를 비교한 결과, 급이 후 1 및 2주째에 샘플링한 OF 그룹이 C 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 0, 1, 2, 4주의 전장과 체중으로부터 BMI를 산출한 결과, 1, 2주와 4주의 OF 그룹이 C 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 3).



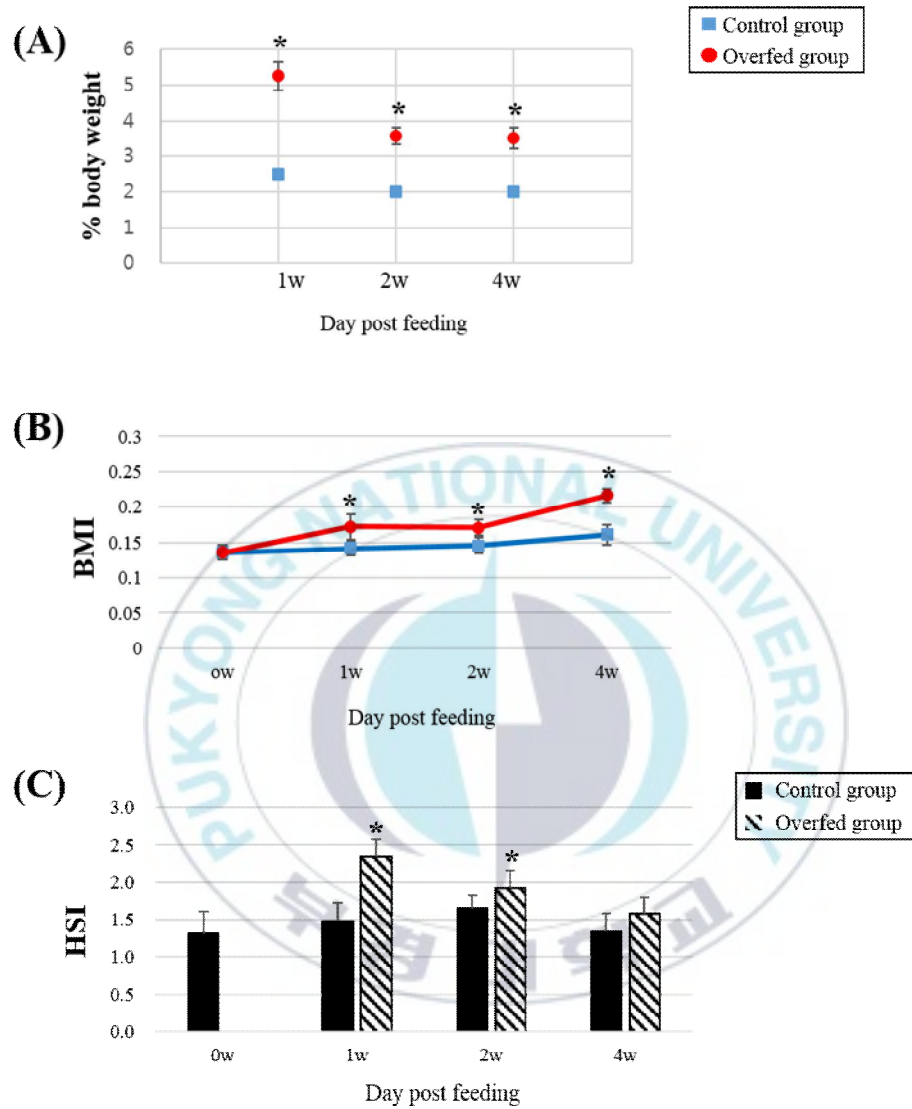


Fig. 3. Daily feed intake rate (% of body weight) for 4 weeks in the control (C) and overfed (OF) group (A). Body mass index (BMI) and hepatosomatic index (HSI) of rainbow trout in the C and OF groups sampled at week 1, 2 and 4 (B), (C). Asterisk (*) indicated significant difference ($P < 0.05$ based on student's t-test).

3.2. 혈액학적 변화 분석

세 번의 실험에서 혈청학적 수치의 비교는 Table 1, 2, 3에서 보는 바와 같다. Trial 1에서 2주 차 C, IM 및 OF 그룹의 GOT 평균은 각각 282 ± 58.41 U/L, 251.6 ± 68.9 U/L, 446.4 ± 130.3 U/L로 OF 그룹이 유의적으로 높게 나타났다. 4주 차도 마찬가지로 OF 그룹의 GOT 평균이 423.4 ± 72.35 U/L로 나타나 C 그룹에 비해 유의적으로 높았다. C, IM 및 OF 그룹의 GPT 수치는 2주 차에 각각 7.8 ± 3.97 U/L, 8.6 ± 3.14 U/L, 11.4 ± 1.85 U/L로 나타났으며, 4주 차에는 각각 10.8 ± 1.47 U/L, 11.4 ± 1.2 U/L, 15.6 ± 3.44 U/L로 나타나 GOT와 마찬가지로 모두 OF 그룹의 물고기가 유의적으로 높음을 알 수 있었다. 4주 차 C, IM 및 OF 그룹의 TP 평균은 각각 4.12 ± 0.34 g/dl, 4.7 ± 0.43 g/dl, 4.88 ± 0.31 g/dl로 OF 그룹이 유의적으로 높게 나타났다. 8주 차에는 3.58 ± 0.9 g/dl, 4.66 ± 0.45 g/dl, 5.1 ± 0.28 g/dl로 IM그룹과 OF그룹이 유의적으로 높게 나타났다.

Table. 1. Serum biochemical changes in rainbow trout after overfeed in Trial 1

week		GOT(u/l)	GPT(u/l)	ALP(u/l)	BUN(mg/dl)	GLU(mg/dl)	TCHO(mg/dl)	TP(g/dl)	LDH(u/l)	Ca(mg/dl)
0	Control	387.6±91.57	8±1.67	399±177.5	2.2±0.11	78±9.84	269.4±57.34	4.26±0.5	764.8±122.54	11.84±0.54
2	Control	282±58.41 ^a	7.8±3.97 ^a	382.2±102.43	2.5±0.19 ^b	81±8.1	233±43.67	4.02±0.55 ^a	1255.2±344.69	11.44±0.41
	Intermediate	251.6±68.9 ^a	8.6±3.14 ^{ab}	361.8±90.21	2.4±0.24 ^b	92.8±8.47	201±43.67	4.62±0.55 ^b	1080±470.91	11.12±0.47
	Overfed	446.4±130.3 ^b	11.4±1.85 ^b	681.4±371.26	2.34±0.14 ^a	70±3.69	179.4±8.62	4.26±0.27 ^{ab}	1033.6±265.66	12.64±1.83
4	Control	304.4±47.48 ^a	10.8±1.47 ^a	589±126.97	2.4±0.11	89.8±12.89	258.4±34.37 ^a	4.12±0.34 ^a	900±144.55	11.76±0.54
	Intermediate	359±85.81 ^{ab}	11.4±1.2 ^a	739.2±151.21	2.46±0.2	86.6±8.16	370.8±50.51 ^b	4.7±0.43 ^b	1258.4±252.51	11.92±0.69
	Overfed	423.4±72.35 ^b	15.6±3.44 ^b	694.2±134.71	2.6±0.24	90.8±9.77	336.4±28.36 ^b	4.88±0.31 ^b	2091.2±2284.18	12.32±0.59
8	Control	301.8±111.15	10±1.67	418.6±221.78	2.66±0.19	80.4±17.13	220.8±87.52	3.58±0.9 ^a	1014.4±294.45	12.32±1.17
	Intermediate	320.2±49.4	8.2±1.31	508.6±58.23	2.42±0.19	84.8±4.83	325.6±69.34	4.66±0.45 ^b	844±333.11	11.92±0.78
	Overfed	352.6±99.49	11.4±4.88	568.2±201.95	2.7±0.32	84.4±10.93	329.8±38.25	5.1±0.28 ^b	1700±1326.3	12.24±0.6

Different letters indicate statistically significant difference determined by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$)

Trial 2 결과, 2주 차 C, IM, OF 그룹에서 GOT는 각각 $175.4 \pm 37.42 \text{ U/L}$, $211.6 \pm 41.71 \text{ U/L}$, $338.4 \pm 110.5 \text{ U/L}$ 으로 나타났다. 4주 차에는 각각 $208.4 \pm 90.34 \text{ U/L}$, $248 \pm 29.83 \text{ U/L}$, $536.6 \pm 153.44 \text{ U/L}$ 으로 나타났다. 4주 차에는 각각 $301.4 \pm 6.71 \text{ U/L}$, $367.6 \pm 44.96 \text{ U/L}$, $576.6 \pm 83.04 \text{ U/L}$ 으로 나타났으며, 2주와 4주, 8주차 모두 OF그룹에서 유의적으로 높음을 알 수 있었다. GPT에서도 GOT와 마찬가지로 8주동안 OF그룹에서 유의적으로 높은 값을 가졌다. C, IM, OF 그룹에서 GPT는 각각 $12.2 \pm 4.75 \text{ U/L}$, $18.2 \pm 5.19 \text{ U/L}$, $25.4 \pm 8.45 \text{ U/L}$ 으로 나타났다. 4주 차에는 각각 $10.60 \pm 3.88 \text{ U/L}$, $13.00 \pm 1.26 \text{ U/L}$, $26 \pm 6.03 \text{ U/L}$ 으로 나타났다. 8주 차에는 각각 $15 \pm 2.9 \text{ U/L}$, $14.6 \pm 1.36 \text{ U/L}$, $23.4 \pm 3.14 \text{ U/L}$ 으로 관찰되었다. 또한, 4주 차에 ALP, TP, TCHO에서 C그룹과 비교하였을 때 OF그룹에서 유의적으로 높게 나타났다.

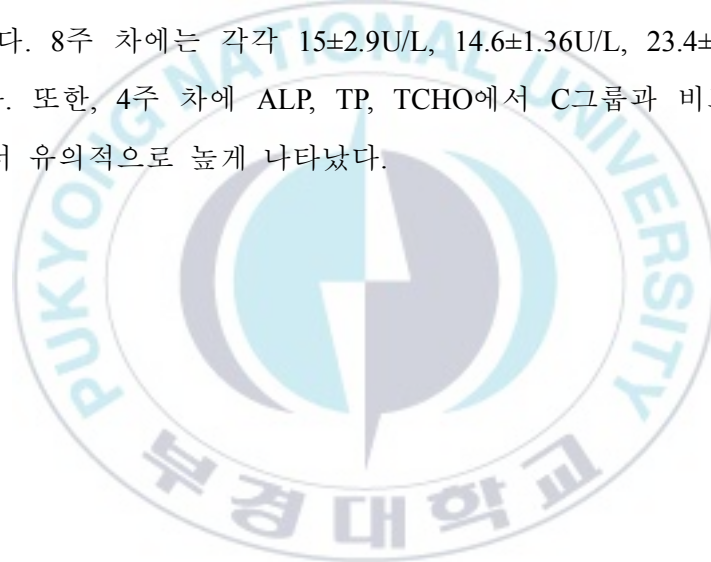


Table. 2. Serum biochemical changes in rainbow trout after overfeed in Trial 2

week		GOT(u/l)	GPT(u/l)	ALP(u/l)	GLU(mg/dl)	TCHO(mg/dl)	TP(g/dl)	LDH(u/l)	Ca(mg/dl)
0	Control	254.4±158.06	13.2±3.54	163.8±85.52	100.6±8.69	130±64.84	2.88±0.95	790.4±221.48	12.32±0.47
	Control	175.4±37.42 ^a	12.2±4.75 ^a	302.8±108.71	32.4±25.94	220±47.34	3.82±0.52	824.8±90.24 ^a	13.04±0.48 ^a
2	Intermediate	211.6±41.71 ^a	18.2±5.19 ^{ab}	338.6±79.08	38.2±11.09	240.2±9.28	4.2±0.37	1033.6±408.11 ^{ab}	13.04±0.54 ^a
	Overfed	338.4±110.5	25.4±8.45	325.4±127.22	51±19.83	218±46.4	4.44±0.4	1307.2±105.33 ^b	14.16±0.65 ^b
4	Control	208.4±90.34 ^a	10.60±3.88 ^a	294.2±128.55 ^a	90.2±21.38	162.8±52.03 ^a	3.4±0.65 ^a	816.8±259.05	15.20±0.67 ^a
	Intermediate	248.0±29.83 ^a	13.00±1.26 ^a	536.6±100.8 ^b	93.0±8.05	327.2±164.59 ^b	4.38±0.37 ^b	1215.2±466.68	15.68±0.47 ^a
4	Overfed	536.6±153.44 ^b	26.00±6.03 ^b	572.8±132.28 ^b	93.8±17.55	323.8±27.12 ^b	5.04±0.22 ^b	1212.8±197.59	16.64±0.6 ^b
	Control	301.4±6.71 ^a	15±2.9 ^a	413.2±63.77	60.2±11.89 ^a	336.6±21.57	4.36±0.57 ^a	967.2±263.7	15.92±0.39 ^a
8	Intermediate	367.6±44.96 ^a	14.6±1.36 ^a	443±103.24	72.4±18.78 ^a	340.8±33.72	4.38±0.24 ^b	837.6±162.98	16.4±0.44 ^{ab}
	Overfed	576.6±83.04 ^b	23.4 ±3.14 ^b	465.6±51.15	101.4±9.31 ^b	327.4±33.82	5.08±0.45 ^b	1251.2±226.73	16.8±0.84 ^b

Different letters indicate statistically significant difference determined by Duncan's multiple range test (P < 0.05)

Trial 3에서 혈청분석 결과, 1주 차와 4주 차에서 대부분의 수치에서 유의미한 차이를 보였다. 급이 1주 후 C 및 OF그룹의 GOT는 각각 $277.4 \pm 32.84 \text{ U/L}$, $383 \pm 50.39 \text{ U/L}$ 였으며 4주 차에는 $328.2 \pm 31.33 \text{ U/L}$, $484.2 \pm 36.35 \text{ U/L}$ 로 OF그룹에서 유의적으로 높게 나타났다. GPT는 1주 차에 C 및 OF 그룹에서 각각 $18.0 \pm 2.61 \text{ U/L}$, $28.4 \pm 6.74 \text{ U/L}$ 값을 나타냈다. 4주 차에는 각각 $15.8 \pm 2.48 \text{ U/L}$, $22.2 \pm 2.64 \text{ U/L}$ 으로 나타났으며 OF그룹에서 유의적으로 높음을 알 수 있었다. ALP는 1주 차 C 및 OF그룹에서 각각 $300.4 \pm 63.42 \text{ U/L}$, $429.8 \pm 30.62 \text{ U/L}$ 로 유의적으로 높았다. 4주 차에서는 각각 $495.8 \pm 92.45 \text{ U/L}$, $615.8 \pm 121.99 \text{ U/L}$ 로 OF그룹에서 증가를 보였지만 유의적인 차이는 나지 않았다. TP는 trial 1, 2와 마찬가지로 OF그룹에서 증가하는 수치를 보였다. 1주차 C 및 OF그룹에서 각각 $3.24 \pm 0.2 \text{ g/dl}$, $3.76 \pm 0.08 \text{ g/dl}$ 였다. 2주 차에서는 각각 $3.04 \pm 0.22 \text{ g/dl}$, $3.8 \pm 0.4 \text{ g/dl}$ 로 나타났다. 4주 차에서는 각각 $3.48 \pm 0.24 \text{ g/dl}$, $4.64 \pm 0.08 \text{ g/dl}$ 로 나타났으며 1, 2, 4주 모두 OF그룹이 C그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

Table. 3. Serum biochemical changes in rainbow trout after overfeed in Trial 3

Week	Groups	GOT(u/l)	GPT(u/l)	ALP(u/l)	BUN(mg/dl)	GLU(mg/dl)	TCHO(mg/dl)	TP(g/dl)	LDH(u/l)	Ca(mg/dl)
0	Control	324.57±104.45	15.14±3.83	267.43±105.16	2.64±0.18	137.29±32.47	221±47.44	3.44±0.32	1374.86±355.91	14.51±0.18
1	Control	277.4±32.84	18.0±2.61	300.4±63.42	3.08±0.19	72.8±5.31	161.4±26.46	3.24±0.2	1144.8±235.39	14.4±0.25
	Overfed	383.0±50.39 ^{**}	28.4±6.74 [*]	429.8±30.62 [*]	3.36±0.23	63.0±10.66	202.0±14.31 [*]	3.76±0.08 ^{***}	1313.6±163.69	15.04±0.41 [*]
2	Con	299.6±23.74	18.0±1.26	480.4±188.34	2.58±0.16	81.4±7.39	229.4±33.95	3.04±0.22	966.4±325.05	15.04±0.32
	Overfed	320.2±23.66	20.4±3.44	490.4±72.11	3.42±0.31 ^{***}	93.6±10.48	219.8±43.75	3.8±0.4 [*]	1107.2±274.13	15.84±0.32 ^{**}
4	Control	328.2±31.33	15.8±2.48	495.8±92.45	2.77±0.29	64.4±10.48	286.8±59.23	3.48±0.24	1349.6±397.36	15.84±0.54
	Overfed	484.2±36.35 ^{***}	22.2±2.64 ^{**}	615.8±121.99	3.97±0.47 ^{***}	93.0±11.3 ^{**}	336.4±42.4	4.64±0.08 ^{***}	898.4±239.31	16.56±0.54

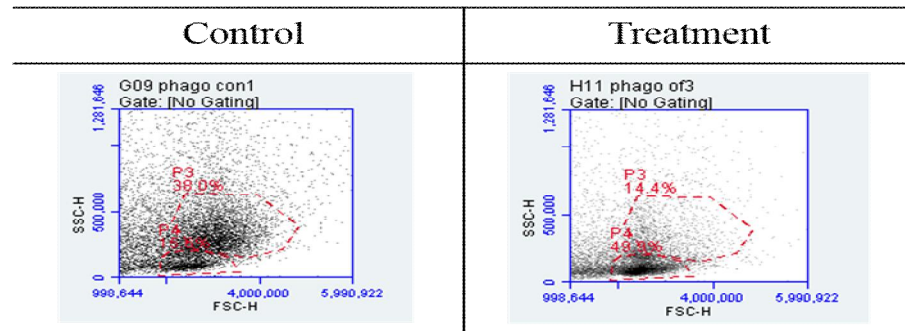
Asterisk (*), P<0.05, Asterisks (**), P<0.01 and Asterisks (***), P<0.001 indicated significant difference based on student's t-test

3.3. Flow cytometry을 통한 면역세포의 변화 분석

Trial 3에서 4주 동안 사료를 과다 공급한 OF 그룹과 정상 급이를 한 C 그룹으로부터 각각 5마리의 무지개송어를 무작위로 채취하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구는 flow cytometer를 이용하여 FSC-H와 SSC-H로 분포를 확인하였으며 lymphocyte와 granulocyte · macrophage를 P4와 P3으로 gating 하여 분석하였다. G/L ratio는 4주간의 급이 실험 (Trial 3)에서 C 그룹은 $197 \pm 100\%$, OF 그룹은 $36 \pm 11\%$ 로 나타나 두 그룹 간에 큰 차이가 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).



(A)



(B)

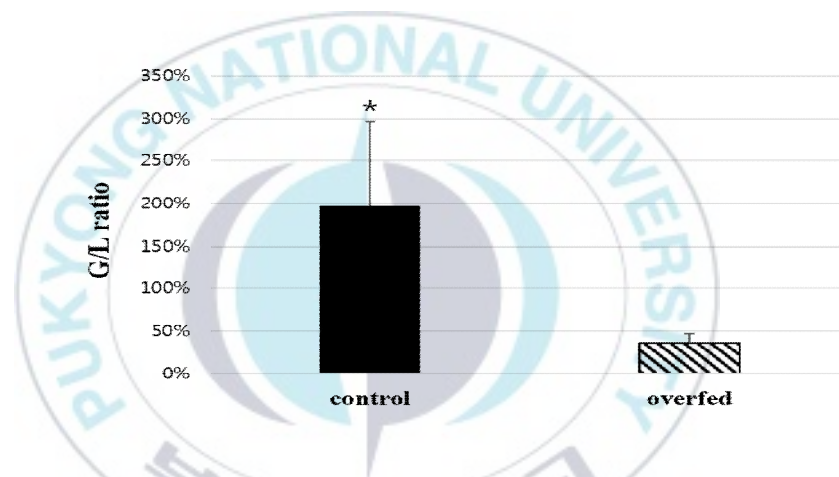


Fig. 4. Scattergram of side scatter (SSC) plotted against forward scatter (FSC) of leukocytes isolated from the head-kidney of control and overfed rainbow trout (A). Granulocyte-macrophage/lymphocyte ratio of fish in each group are shown in (B). The results are presented as the mean $\pm$ S.D., and asterisk (*) indicates statistical significance ($P < 0.05$ based on student's t-test)

3.4. 사료 과다 투여에 따른 간의 조직학적 변화 분석

본 실험에서 사용한 무지개송어의 간조직을 관찰한 결과 C 그룹의 어류에서는 간세포 크기의 변화를 관찰할 수 없었던 반면(Fig. 5-a, b, c), OF 그룹 어류의 간세포는 그 크기가 증가된 간세포 비대증을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-d, e, f).

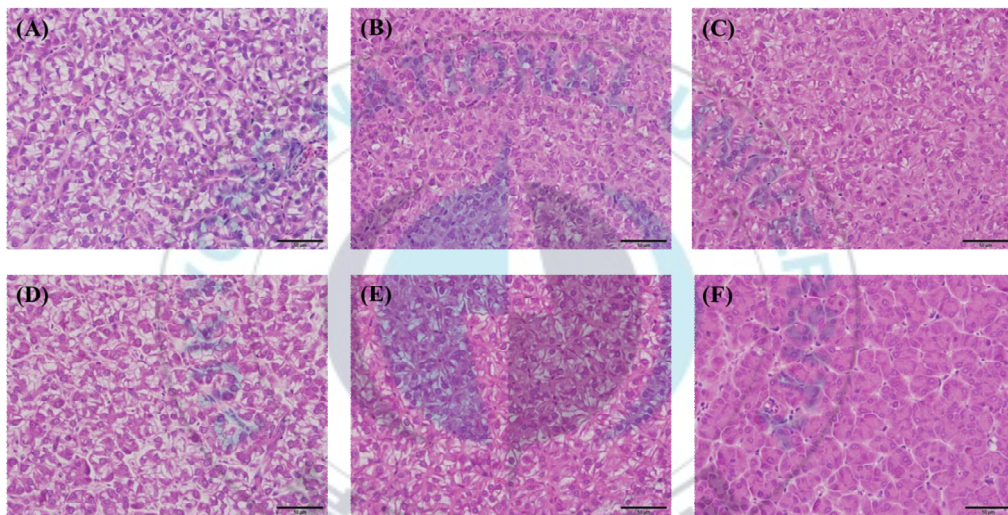


Fig. 5. Histological analysis of the liver of control (A, B, and C) and overfed (D, E, and F) rainbow trout sampled at week 1, 2, and 4.

3.5. 사료 과다 투여에 따른 스트레스 저항성 비교

3.5.1. 고수온 스트레스에 따른 저항성 비교

Trial 1에서 8주 간의 굵이 실험 후 3일에 걸쳐 서서히 수온을 올려 25℃의 수온에 240시간 동안 노출 시켰다. 노출 기간 동안 누적 폐사는 C그룹이 5%, IM그룹은 0%였으며 OF그룹이 15%로 가장 높게 나타났다. 혈청분석 결과, 0시간 C그룹에서 GOT는 301.8 ± 111.15 U/L였다. 24시간 노출 후 GOT는 C, IM 및 OF그룹에서 각각 316.4 ± 34.42 U/L, 455.2 ± 38.94 U/L, 2993.6 ± 3148.16 U/L로 증가를 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 240시간 노출 후 C그룹은 984.4 ± 688.56 U/L, OF그룹은 4067.75 ± 2735.03 U/L로 240시간에 걸쳐 전반적으로 증가하는 양상을 보였으며 OF그룹에서 유의적으로 높게 나타났다. GPT는 0시간 C그룹에서 10 ± 1.67 U/L였다. 24시간 노출 후 GOT는 C, IM 및 OF그룹에서 각각 10.4 ± 2.42 U/L, 16.6 ± 1.36 U/L, 42.2 ± 31.82 U/L로 증가를 보였으며 OF그룹이 유의적으로 높음을 보였다. 120시간 노출 후 OF그룹은 44 ± 31.52 U/L, 240시간 노출 후 175 ± 151.27 U/L으로 지속적으로 증가하였으며 유의적으로 높음을 알 수 있었다(Table. 4).

Table. 4. Serological changes of rainbow trout in a high temperature stimulation after 8 weeks of overfeed in Trial 1

Hour	Groups	GOT(u/l)	GPT(u/l)	ALP(u/l)	BUN(mg/dl)	GLU(mg/dl)	TCHO(mg/dl)	TP(g/dl)	LDH(u/l)	Ca(mg/dl)
0	Control	301.8±111.15	10±1.67	418.6±221.78	2.66±0.19	80.4±17.13	220.8±87.52	3.58±0.9 ^a	1014.4±294.45	12.32±1.17
	Intermediate	320.2±49.40	8.2±1.31	508.6±58.23	2.42±0.19	84.8±4.83	325.6±69.34	4.66±0.45 ^b	844±333.11	11.92±0.78
	Overfed	352.6±99.49	11.4±4.88	568.2±201.95	2.7±0.32	84.4±10.93	329.8±38.25	5.1±0.28 ^b	1700±1326.3	12.24±0.6
24	Control	316.4±34.42	10.4±2.42 ^a	311.8±109.31	2.42±0.15 ^{ab}	114.2±10.53 ^b	281±74.64	3.98±0.58	1844.8±181.89 ^a	11.68±0.85 ^a
	Intermediate	455.2±38.94	16.6±1.36 ^{ab}	364.8±75.79	2.26±0.14 ^a	94.6±10.27 ^a	317.6±46.53	4.32±0.24	3189.6±1221.59 ^b	11.44±0.32 ^a
	Overfed	2993.6±3148.16	42.2±31.82 ^b	353.6±60.18	2.78±0.35 ^b	108.4±10.21 ^{ab}	382.6±125.21	4.84±0.86	2799.2±386.32 ^{ab}	12.88±0.53 ^b
120	Control	636.6±156.97	22.4±5.57	157.6±43.72	2.6±0.13 ^b	58.6±15.69 ^a	196±44.74	3.54±0.38 ^a	2087.2±487.12	13.28±0.39
	Intermediate	779.2±322.36	26.2±3.66	235.8±68.99	2.66±0.21 ^b	80.8±16.03 ^b	437.4±142.83	5.42±1.06 ^b	3666.4±2029.47	13.76±0.9
	Overfed	1207.75±1088.77	44±31.52	274.4±98.87	2.3±0.13 ^a	79.4±5.54 ^b	418.8±79.88	4.94±0.62 ^b	1937.6±763.74	13.2±1.86
240	Control	984.4±688.56 ^a	24±13.08 ^a	108.8±37.98 ^a	2.66±0.1 ^c	99.2±21.82 ^b	230±59.58	3.94±0.29 ^a	2299.2±658.37	13.84±1.3 ^a
	Intermediate	694.8±387.82 ^{ab}	26±20.07 ^a	212.4±67.59 ^b	2.42±0.15 ^b	68.6±12.78 ^a	368.2±26.75	4.66±0.28 ^b	1612.8±708.55	13.04±0.41 ^a
	Overfed	4067.75±2735.03 ^b	175±151.27 ^b	164.8±58.02 ^{ab}	2.2±0.13 ^a	105.2±17.77 ^b	326±70.76	4.66±0.26 ^b	4090±1500.96	13.36±0.32 ^b

Different letters indicate statistically significant difference determined by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

3.5.2. *E. psychrophilum* 공격에 따른 감염률 비교

2.66×10^6 CFU/fish의 농도로 FPRT1 균주를 접종하였고 14일간 3구간 모두 폐사가 발생하지 않았다. 접종 후 15일차에 진행한 autopsy 결과 C그룹에서 5.4×10^4 CFU/g으로 전체 중에서 20%의 감염률을 보였다. IM그룹에서는 0%의 감염률을 나타내었다. 반면 OF그룹에서는 전체 중 60%의 감염률을 나타내었으며 감염 농도는 각각 4.3×10^3 CFU/g, 8.4×10^3 CFU/g, 7.3×10^3 CFU/g으로 나타났다.



3.5.3. Trial 2 에서 *A. salmonicida* 공격에 따른 폐사율 비교

급이 4주 후 각 구간별로 5마리씩 무작위로 선정하여 LD₅₀ 농도로 18KR13 균주를 접종하였다. Plate counting 결과 실제 접종농도는 4.06×10^5 CFU/fish으로 확인되었다. OF그룹에서 접종 후 3일차 전량 폐사하였다. IM그룹에서는 3일차 첫 폐사가 나타났고 누적폐사율은 80%로 나타났다. C그룹에서는 4일차에 첫 폐사가 나타났고 누적폐사율은 60%로 나타났으며 이를 바탕으로 생존분석을 실시하였을 때 C그룹과 IM그룹에 비해 OF그룹에서 유의적으로 높은 폐사율로 나타났다(Fig. 6).

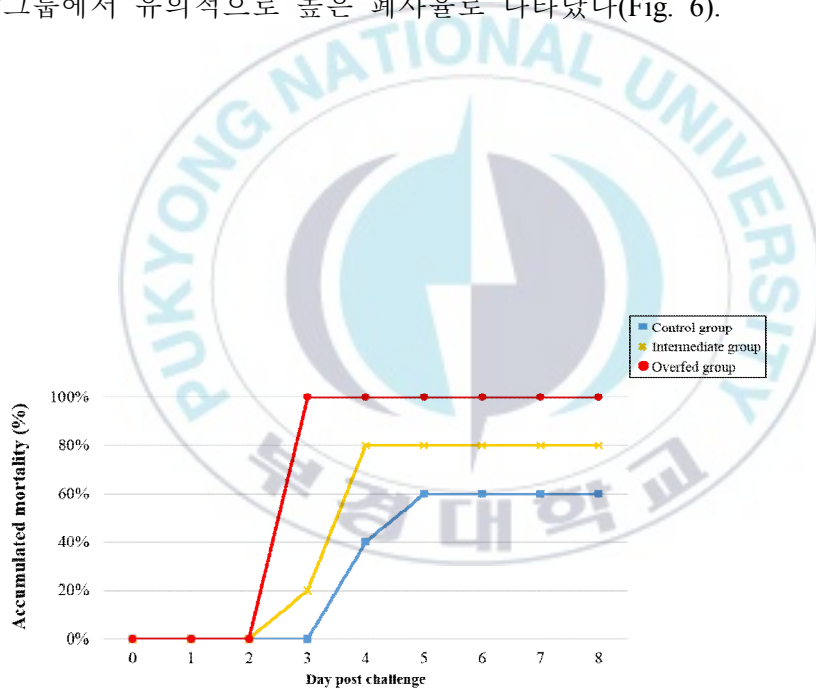


Fig. 6. Cumulative mortality for *A. salmonicida* strain 18KR23 after 4 weeks of overfeeding in trial2. Blue for control, yellow for intermediate, and red for overfed groups

급이 8주 후 각 구간 당 15마리에 대하여 LD₅₀, LD₅₀ 보다 10배 낮은 농도, LD₅₀ 보다 100배 낮은 농도로 5마리씩 접종하여 폐사율을 확인하였다. Plate counting 결과 실제 접종 농도는 1.78×10^5 CFU/fish, 1.78×10^4 CFU/fish, 1.78×10^3 CFU/fish으로 확인 되었다. LD₅₀ 농도에서 OF그룹에서 7일차에 첫 폐사가 나타났으며 10일차에 전량 폐사하였다. C그룹과 IM그룹에서는 각각 11일, 6일차에 첫 폐사가 나타났으며 그 이후로는 폐사가 발생하지 않아 20%의 누적 폐사율을 보였다. LD₅₀ 보다 10배 낮은 접종농도에서는 9일차에 OF그룹에서 첫 폐사가 나타났으며 10일차에 전량 폐사하였다(Fig. 7 A). C그룹에서는 3일차 첫 폐사 이후로 폐사가 나타나지 않아 20%의 누적폐사율을 보였다(Fig. 7 B). LD₅₀ 보다 100배 낮은 접종농도에서는 OF그룹에서 12일차 첫 폐사를 발생으로 60%의 누적 폐사를 나타내었다. 반면 C그룹에서는 0%의 폐사를 나타내었다(Fig. 7 C). 또한, 이를 바탕으로 생존분석을 실시하였을 때 모두 OF그룹에서 유의적으로 높은 폐사를 나타내었다.

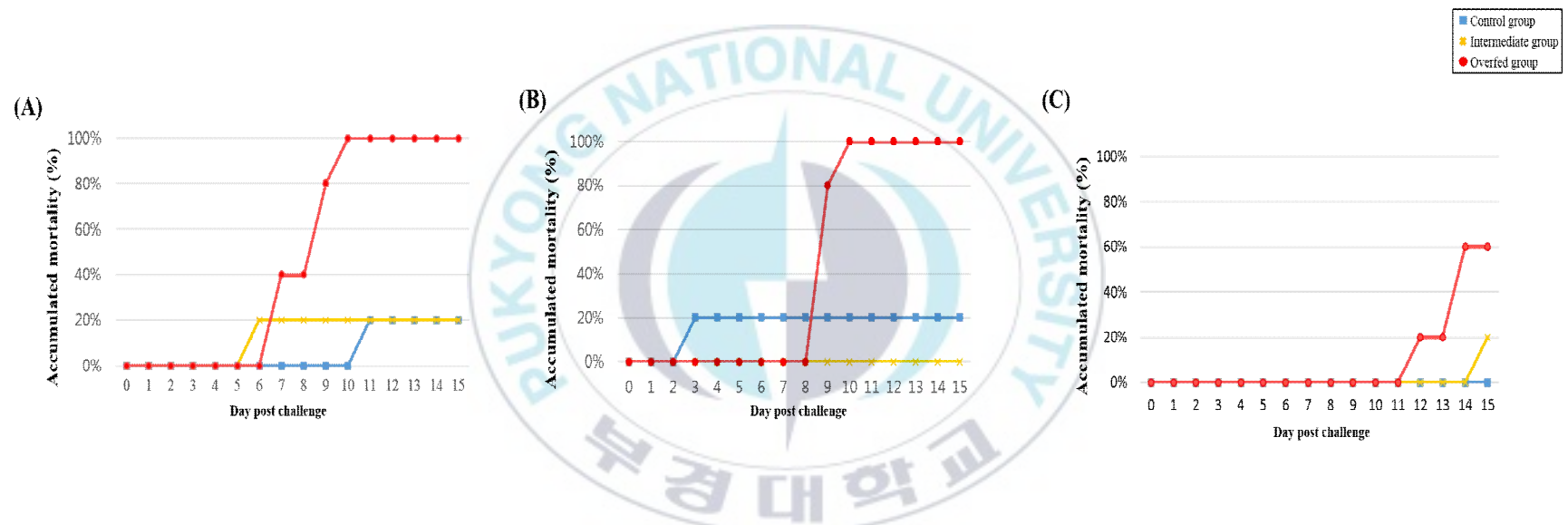


Fig. 7. Cumulative mortality for *A. salmonicida* strain 18KR23 after 4 weeks of overfeeding in trial2. Blue for control, yellow for intermediate, and red for overfed groups

3.5.4. Trial 3 에서 *A. salmonicida* 공격에 따른 폐사율 비교

급이 4주 후 LD₅₀ 농도로 18KR13을 접종하였다. Plate counting 결과 실제 접종 농도는 4.7×10^5 CFU/fish으로 확인 되었다. OF그룹에서는 3일차에 첫 폐사가 나타났으며 4일 차 전량 폐사하여 100%의 누적폐사율을 나타내었다. 마찬가지로 C그룹에서도 3일 차에 첫 폐사가 나타났지만 15일 차까지 평균적으로 57%의 누적 폐사율을 나타내었다 (Fig. 8). 감염 후 1, 3, 7일 차 혈청 분석 결과는 table 5에 나타내었다. GOT의 경우 OF그룹에서 484.2 ± 36.35 U/L였으며 감염 후 1일차에는 563.2 ± 114.54 U/L로 증가하였다. 감염 후 3일 차에는 627.6 ± 464.31 U/L, 7일 차는 711.33 ± 49.89 U/L로 지속적으로 증가하는 경향을 보였다. 반면 C그룹에서는 328.2 ± 31.33 U/L였으며 감염 후 1일 차는 247.6 ± 109.42 U/L, 3일 차에는 191.4 ± 62.72 U/L, 7일 차는 275.67 ± 18.57 U/L로 감염 후에도 큰 변화를 나타내지 않았다. GPT는 OF그룹에서 22.2 ± 2.64 U/L였으며 감염 후 1일 차에는 28.2 ± 3.43 U/L, 감염 후 3일 차에는 39.2 ± 15.2 U/L, 7일 차는 31 ± 4.08 U/L로 나타났다. C그룹에서는 15.8 ± 2.48 U/L였으며 감염 후 1일 차는 17 ± 5.14 U/L, 3일 차에는 20 ± 4 U/L, 7일 차는 15.25 ± 1.92 U/L로 나타났다. GOT, GPT 모두 과다급이 후 감염구간에서 유의적으로 높게 나타났다.

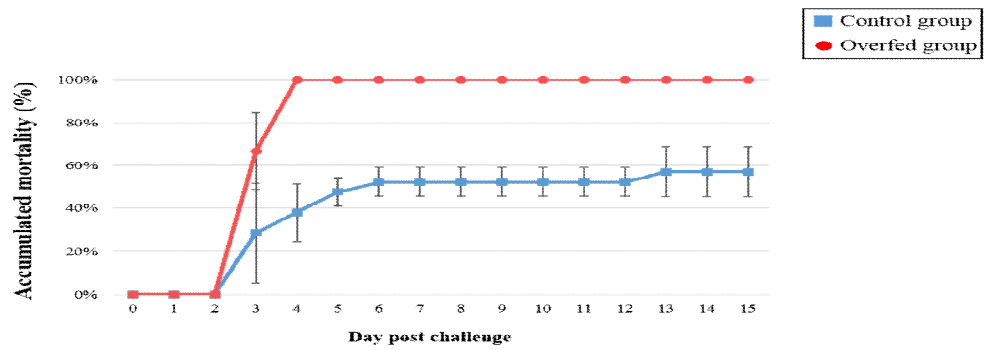


Fig. 8. Cumulative mortality for *A. salmonicida* strain 18KR23 after 4 weeks of overfeeding in trial 3.



Table. 5. Serum biochemical changes in rainbow trout during *A. salmonicida* infection after 4 weeks of overfeed in trial 3

Day	Groups	GOT(u/l)	GPT(u/l)	ALP(u/l)	BUN(mg/dl)	GLU(mg/dl)	TCHO(mg/dl)	TP(g/dl)	LDH(u/l)	Ca(mg/dl)
0	Control	328.2±31.33	15.8±2.48	495.8±92.45	2.77±0.29	64.4±10.48	286.8±59.23	3.48±0.24	1349.6±397.36	15.84±0.54
	Overfed	484.2±36.35 ^{***}	22.2±2.64 ^{**}	615.8±121.99	3.97±0.47 ^{***}	93.0±11.3 ^{**}	336.4±42.4	4.64±0.08 ^{***}	898.4±239.31	16.56±0.54
1	Control	247.6±109.42	17.0±5.14	161.4±65.39	3.24±0.17	32.0±6.1	161.2±54.3	2.98±0.72	1222.4±411.37	16.0±0.25
	Overfed	563.2±114.54 ^{**}	28.2±3.43 ^{**}	505.0±213.75 [*]	3.74±0.36 [*]	61.6±12.67 ^{**}	328.6±44.27 ^{***}	4.38±0.29 ^{**}	1554.4±450.7	15.36±0.2
3	Control	191.4±62.72	20.0±4.0	66.2±563.2	3.9±1.4	26.4±10.29	94.6±36.03	2.22±0.42	1494.4±967.53	15.6±0.44
	Overfed	627.6±464.31	39.2±15.2 [*]	73.6±22.08	5.06±0.28	50.4±35.8	91.4±25.66	2.22±0.28	7016.8±6435.25	16.72±0.47 ^{**}
7	Control	275.67±18.57	15.25±1.92	163.33±74.79	3.47±0.26	40.67±2.87	203.0±333.79	3.77±0.4	625.33±69.0	16.93±0.19
	Overfed	711.33±49.86 ^{***}	31.0±4.08 ^{**}	323.0±57.78	3.57±0.24	56.33±5.56 [*]	269.67±4.03 [*]	4.13±0.26	1253.33±443.19	17.07±0.19

Asterisk (*), P<0.05, Asterisks (**), P<0.01 and Asterisks (***), P<0.001 indicated significant difference based on student's t-test.

3.6. Transcriptome analysis

3.6.1. Transcriptome data의 overview

OF그룹과 C그룹 1주 차, 4주 차, 급이 후 *A. salmonicida* 공격 1일 차 OF그룹과 C그룹의 간 조직 샘플에 대한 전사체 수행 결과 57,113,260bp의 reads를 생산하였다. Sequencing data에 대한 quality check를 실시하여 Q30이상의 data를 94.73 - 96.84%만큼 확보하였다. trimming 및 reference genome mapping 수행 결과, 최종 mapping rate는 83.67 - 86.63%로 평균 85.52%였다(table. 6). iDEP 91 tool을 사용하여 filtering 후 Ensembl gene ID로 변환된 9876개의 gene을 획득하였다. 9876개의 유전자로 각 주차 및 구간별 샘플 발현량으로 Principle component analysis (PCA)를 분석하였다. PCA 결과 실험 그룹의 반복구 사이의 clustering을 Fig. 9와 같이 확인할 수 있었다. PCA에서 과다 급이가 이루어진 구간과 정정상급이가 이루어진 구간에서 clustering이 명확하게 구분되었다. 1주 차와 4주 차 C그룹 사이에서 구분은 명확하지 않았지만 OF그룹간에서 1주와 4주 차 사이의 구분은 뚜렷하게 이루어졌다. 또한, 공격 구간에서 C그룹과 OF그룹의 구분이 명확하게 나타났다.

Table. 6 . Summary RNA-Sequencing statistics.

Sample	Group	Replication	Total read	Mapped read	Mapping rate (%)
1w	Con	1	89,695,072	75,943,819	84.67
		2	48,011,564	40,896,931	85.18
		3	62,050,246	53,054,505	85.50
1w	Overfed	1	44,909,418	38,710,456	86.20
		2	58,455,778	50,642,937	86.63
		3	42,108,782	36,251,003	86.09
4w	Con	1	57,719,894	48,293,115	83.67
		2	61,439,422	51,568,058	83.93
		3	55,361,568	47,354,902	85.54
4w	Overfed	1	54,446,152	46,735,930	85.84
		2	53,698,916	45,980,229	85.63
		3	45,052,678	38,846,865	86.23
dpc1	Con	1	65,753,972	55,661,880	84.65
		2	60,606,164	51,241,208	84.55
		3	58,584,018	50,521,521	86.24
dpc1	Overfed	1	53,228,018	45,942,757	86.31
		2	60,893,484	52,560,486	86.32
		3	56,023,540	48,257,215	86.14

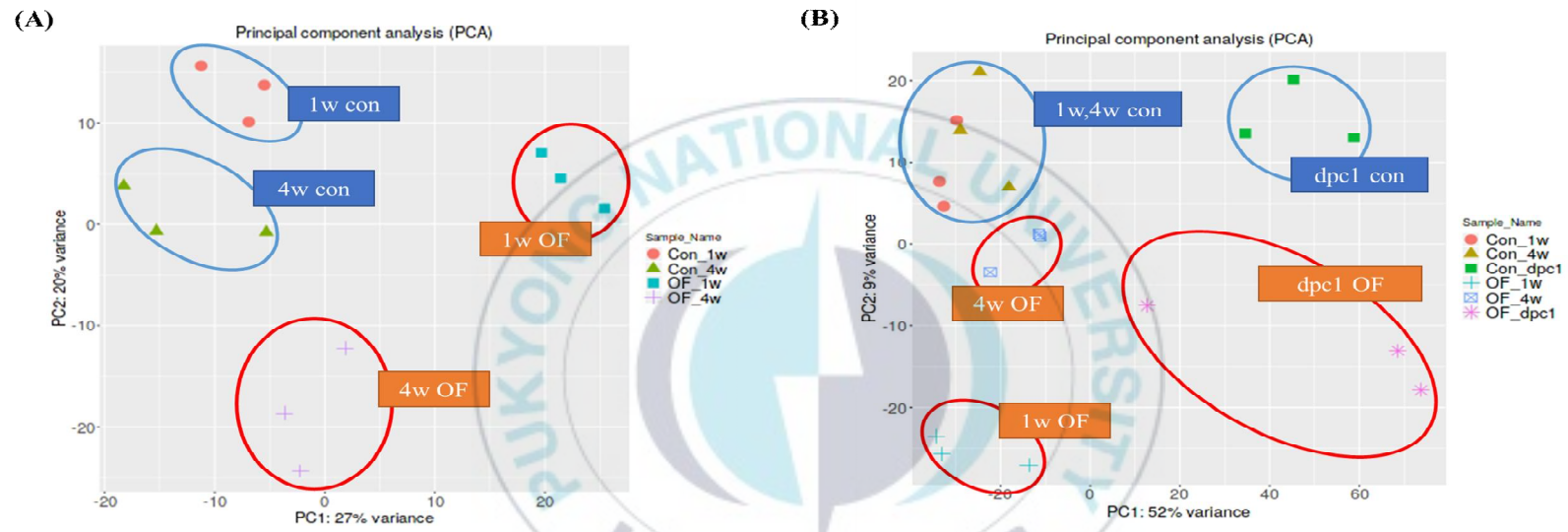


Fig. 9. Principle component analysis (PCA) plot expression of RNA-sequencing data: This figure shows transcriptome differences between control and overfeeding group. The PCA plot captures the variance in a dataset in terms of principal components and percentage of the total variation shows on the x- and y - axes.

3.6.2. Hierarchical clustering 및 K-means를 통한 유전자 발현 분석

과다한 급이 시 변화되는 유전자들의 변화 양상을 확인하고자 1주 차와 4주 차 전사체 데이터를 기반으로 Hierarchical clustering을 실시하였다. 가장 많이 변화하는 top 1000 genes를 대상으로 분석을 실시한 결과 C그룹과 OF그룹의 clustering이 명확히 나누어지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10). Hierarchical clustering에서 나타난 발현을 세부적으로 분석하고 분류하고자 가장 많이 변화하는 top 3000 genes로 k-means clustering 분석을 실시하였다. Clustering 결과는 Fig. 11에서 보는 바와 같다. 총 6개의 군집에서 C그룹과 OF그룹에서의 발현 양상이 다르게 나타났다. 또한, 과다 급이 1주 차와 4주 차의 발현 양상에서도 차이가 나타났다. 과다 급이 1주 차에 cluster F의 발현이 상향 조절되었으며 cluster A와 C의 발현은 하향 조절된 것을 확인할 수 있었다. 과다 급이 4주 차에는 cluster A의 발현이 상향 조절되었으며 cluster D의 발현은 하향 조절된 것을 확인할 수 있었다. cluster E는 과다 급이에 의해 공통적으로 상향 발현되었으며 지방산의 대사와 합성에 관여하는 PPAR signaling pathway, Metabolic pathways, Fatty acid metabolism, Fatty acid biosynthesis, Biosynthesis of unsaturated fatty acid pathway를 확인할 수 있었다. 또한, PPAR signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway 또한 공통적으로 상향 발현을 확인할 수 있었다. 4주차에만 상향 발현된 유전자는 Insulin signaling pathway이 포함되어 있었다. 또한, 과다급이 시 공통적으로 하향 발현되는 유전자에는 Blood coagulation, Proteolysis과 같은 유전자가 존재했다(Table .7, Table. 8).

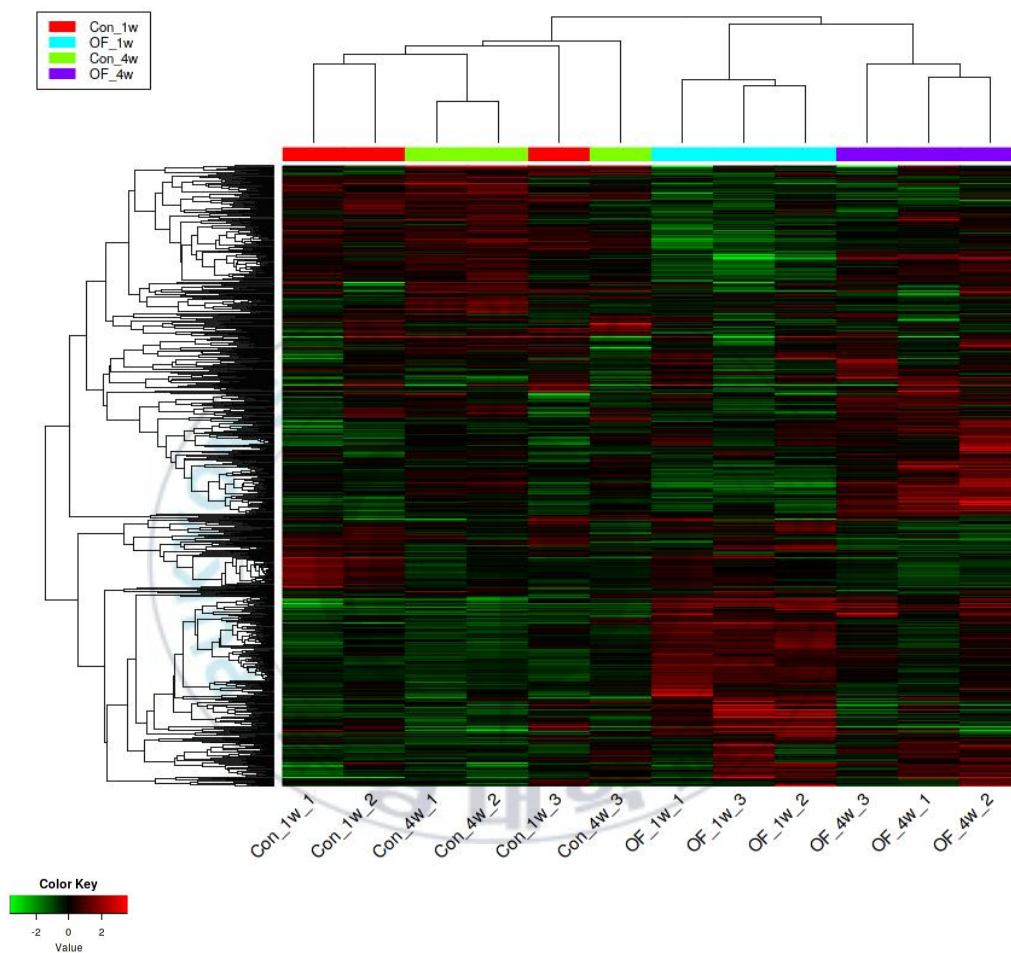


Fig. 10. Heatmap shows differentially expressed genes expression pattern. Analyzed using top 1000 genes are used in hierarchical clustering with the average linkage method.

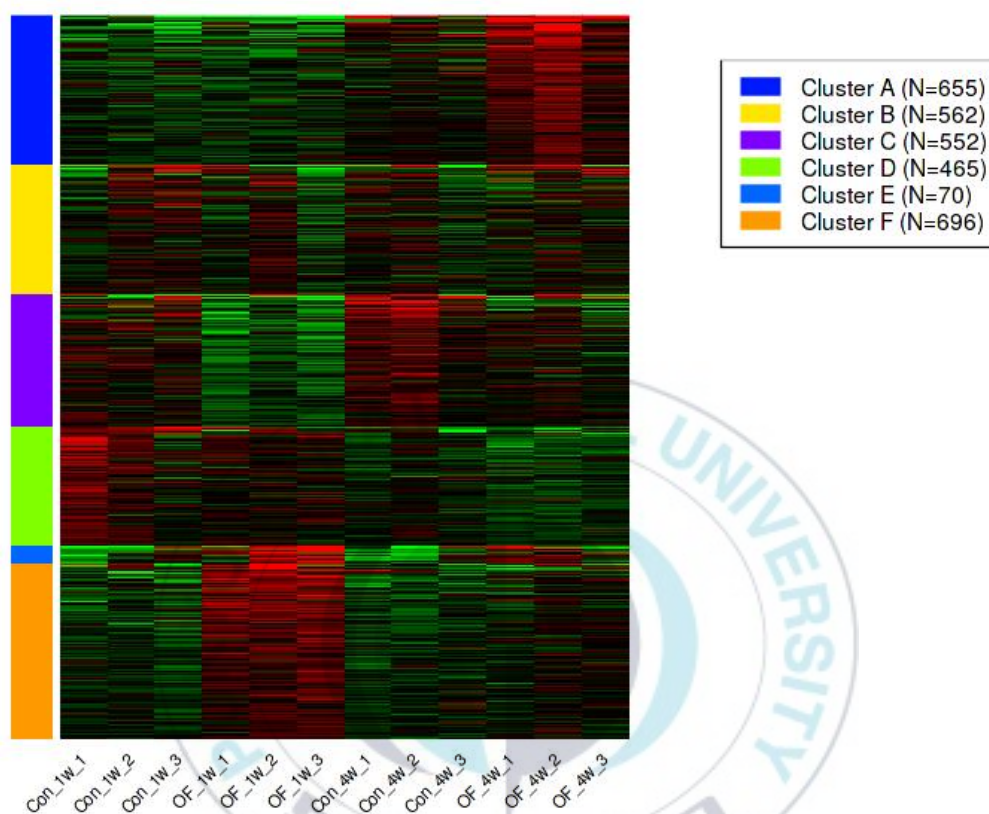


Fig. 11. Results from K-means clustering. Using $k=6$, iDEP classified top 3000 genes into 1, 4weeks control and overfed group.

Table. 7. Overall results of k-means 6 clusters based on GO biological database

Cluster	adj.Pval	nGenes	Pathways
A	1.90E-11	30	Ribosome biogenesis
	4.80E-11	35	Ribonucleoprotein complex biogenesis
	1.60E-10	76	Small molecule metabolic process
	8.30E-09	21	RRNA processing
	3.10E-08	44	Oxoacid metabolic process
	3.50E-08	43	Carboxylic acid metabolic process
	6.10E-08	45	Organic acid metabolic process
	1.70E-07	62	Nitrogen compound transport
	9.00E-07	71	Organic substance transport
	1.90E-06	20	Alpha-amino acid metabolic process
	2.10E-06	40	Intracellular protein transport
	2.10E-06	79	Cellular component biogenesis
	3.80E-06	24	NcRNA processing
	4.20E-06	49	Cellular protein localization
C	2.30E-07	19	Negative regulation of endopeptidase activity
	4.60E-07	13	Blood coagulation
	1.70E-06	20	Negative regulation of hydrolase activity
	3.80E-06	25	Negative regulation of protein metabolic process
	7.50E-06	48	Negative regulation of macromolecule metabolic process
	8.70E-06	23	Negative regulation of catalytic activity
	9.00E-06	24	Negative regulation of cellular protein metabolic process
D	9.60E-06	57	Proteolysis
	2.00E-18	50	Peptide metabolic process
	2.80E-18	56	Cellular amide metabolic process
	3.00E-18	45	Translation
	4.70E-18	48	Amide biosynthetic process
	1.90E-17	66	Cell cycle
	3.80E-16	27	Chromosome segregation
	4.60E-16	44	Cell cycle process
	2.90E-14	23	Nuclear chromosome segregation
	2.90E-14	32	Mitotic cell cycle process

	8.50E-13	46	Mitotic cell cycle
	1.00E-12	19	Sister chromatid segregation
	2.40E-12	45	Chromosome organization
	1.10E-11	62	Organonitrogen compound biosynthetic process
	2.20E-11	16	Mitotic sister chromatid segregation
E	1.60E-03	7	Monocarboxylic acid metabolic process
	3.30E-03	6	Response to bacterium
	3.30E-03	9	Carboxylic acid metabolic process
	3.60E-03	9	Organic acid metabolic process
	7.40E-03	9	Lipid metabolic process
	7.40E-03	6	Lipid biosynthetic process
	7.40E-03	5	Organic acid biosynthetic process
	7.40E-03	3	Response to estrogen
	7.40E-03	2	Response to (R)-carnitine
	9.20E-03	7	Multi-organism process
F	3.10E-28	51	Generation of precursor metabolites and energy
	6.10E-28	65	Nucleotide metabolic process
	6.10E-28	47	Nucleoside monophosphate metabolic process
	6.10E-28	45	Ribonucleoside monophosphate metabolic process
	6.10E-28	97	Oxidation-reduction process
	6.40E-28	56	Ribonucleotide metabolic process
	8.10E-28	43	Purine nucleoside monophosphate metabolic process
	8.10E-28	39	ATP metabolic process
	9.20E-28	57	Ribose phosphate metabolic process
	1.10E-27	54	Purine ribonucleotide metabolic process
	1.90E-27	69	Nucleobase-containing small molecule metabolic process
	4.40E-27	40	Purine ribonucleoside triphosphate metabolic process
	5.60E-27	41	Ribonucleoside triphosphate metabolic process

Table. 8 . Overall results of k-means 6 clusters based on KEGG database

Cluster	adj.Pval	nGenes	Pathways
A	7.8e-08	76	Metabolic pathways
	1.9e-04	10	Ribosome biogenesis in eukaryotes
	2.2E-04	12	Insulin signaling pathway
	2.0e-03	12	Oxidative phosphorylation
	8.2e-03	6	Glycine, serine and threonine metabolism
	8.2e-03	7	Arginine and proline metabolism
	9.1e-03	8	Biosynthesis of amino acids
B	5.60E-03	54	Metabolic pathways
D	1.10E-27	32	Ribosome
E	4.0e-05	5	PPAR signaling pathway
	6.1e-05	15	Metabolic pathways
	4.0E-04	10	NOD-like receptor signaling pathway
	2.4e-04	4	Fatty acid metabolism
	5.2e-03	2	Fatty acid biosynthesis
	5.2e-03	3	Drug metabolism
	9.2e-03	2	Propanoate metabolism
F	9.2e-03	2	Biosynthesis of unsaturated fatty acids
	7.0e-45	51	Oxidative phosphorylation
	4.2e-34	131	Metabolic pathways
	9.3e-09	19	Carbon metabolism
	8.6e-08	10	Citrate cycle (TCA cycle)
	1.0e-05	10	Proteasome
	1.1e-05	15	Cardiac muscle contraction
	2.9e-03	5	Butanoate metabolism

3.6.3. Differential expressed genes (DEG) 분석

Differential expressed genes (DEG) 분석을 통하여 각 stage 별로 up 또는 down regulated gene의 counts를 측정하였다. DEG분석 결과, 1주 차에서 C그룹과 OF그룹 간에 252개의 up-regulated 유전자와 134개의 down-regulated 유전자가 관찰되었으며 4주 차에서는 23개의 up-regulated 유전자와 12개의 down-regulated 유전자가 관찰되었다. 감염 1일 차 C그룹과 OF그룹에서는 255개의 up-regulated 유전자와 136개의 down-regulated 유전자가 확인되었다(Fig. 12). GO biological process 데이터베이스를 기반으로 분석 시 1주 차 OF그룹에서 에너지 합성과 관련된 ATP metabolic process, ATP biosynthetic process, Energy coupled proton transport, down electrochemical gradient의 유전자 pathway가 상향발현되는 것을 확인할 수 있었다. 4주에서도 Energy coupled proton transport, down electrochemical gradient처럼 1주 차와 유사한 pathway의 상향발현을 확인할 수 있었다(Table. 9). KEGG 데이터베이스를 기반으로 분석 시 단기간 5% 이상 과다한 급이가 이루어진 1주 차 OF그룹에서 Fatty acid metabolism, Metabolic pathways처럼 대사관련 유전자와 Fatty acid biosynthesis, Biosynthesis of unsaturated fatty acids, Glycolysis / Gluconeogenesis처럼 지방산 합성 및 지방합성과 관련된 유전자들의 상향발현을 확인할 수 있었다. 또한, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, PPAR signaling pathway의 발현의 증가를 확인할 수 있었다(Table. 10).

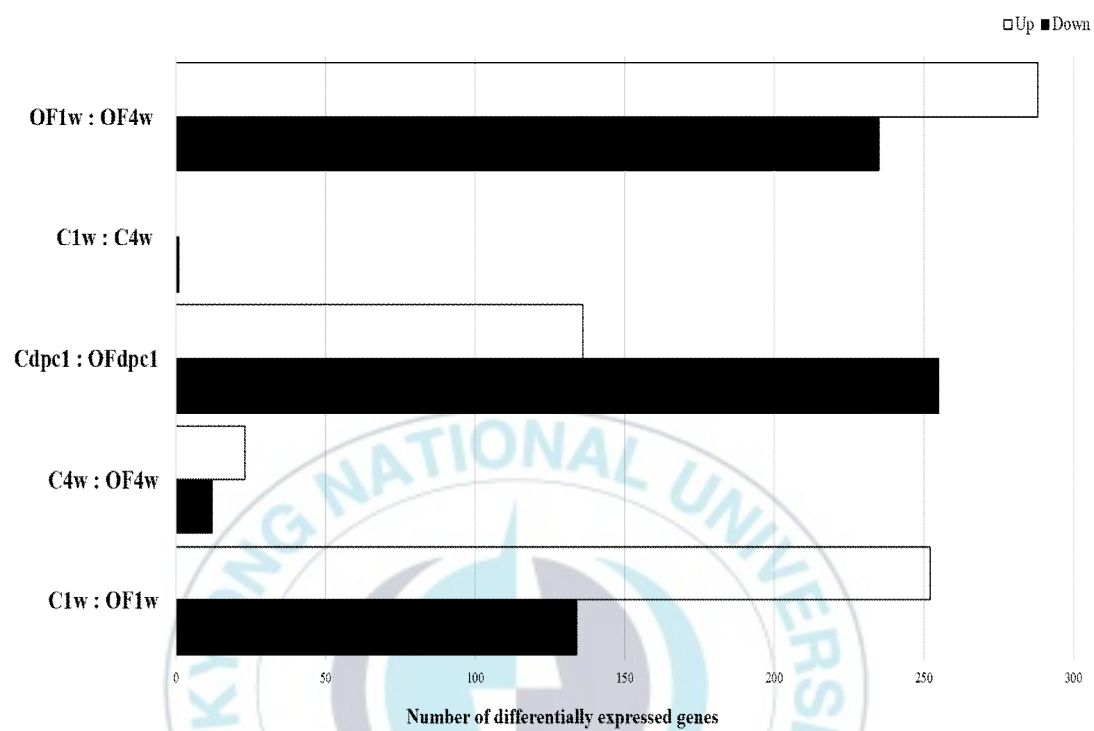


Fig. 12. Number of up-regulated and down-regulated differentially expressed genes in rainbow trout during the feed.

Table. 9 . The results of DEG based on GO biological database

	Direction	adj.Pval	nGenes	Pathways
C 1w vs OF 1w	Down regulated	1.20E-03	4	Blood coagulation
		5.30E-03	2	Regulation of blood coagulation
		5.30E-03	10	Proteolysis
	Up regulated	5.60E-22	12	Energy coupled proton transport, down electrochemical gradient
		5.60E-22	19	ATP metabolic process
		5.60E-22	16	ATP biosynthetic process
		6.70E-22	20	Purine nucleoside monophosphate metabolic process
		6.70E-22	17	Nucleoside triphosphate biosynthetic process
		9.10E-22	21	Nucleoside monophosphate metabolic process
		9.30E-22	17	Purine nucleoside monophosphate biosynthetic process
		9.30E-22	20	Nucleoside triphosphate metabolic process
C 4w vs OF 4w	Up regulated	5.60E-04	8	Small molecule metabolic process
		5.60E-04	2	Response to fatty acid
		5.60E-04	6	Organic acid metabolic process
		1.30E-03	3	Cellular amino acid catabolic process
		1.30E-03	3	Cellular response to xenobiotic stimulus
		1.80E-03	5	Carboxylic acid metabolic process
		1.80E-03	2	Energy coupled proton transport, down electrochemical gradient
		3.30E-03	4	Small molecule biosynthetic process

	Direction	adj.Pval	nGenes	Pathways
C dpc1 vs OF dpc1	Down regulated	5.40E-06	35	Organonitrogen compound biosynthetic process
		2.00E-05	24	Cellular amide metabolic process
		2.00E-05	21	Amide biosynthetic process
		2.20E-05	19	Peptide biosynthetic process
		5.00E-05	20	Peptide metabolic process
		3.70E-04	64	Biosynthetic process
		5.80E-04	7	Blood coagulation
		6.20E-04	62	Organic substance biosynthetic process
		6.30E-04	11	Organic hydroxy compound metabolic process
		8.50E-04	7	Alcohol biosynthetic process
	Up regulated	1.40E-03	8	Organic hydroxy compound biosynthetic process
		5.30E-05	20	Oxidation-reduction process
		2.50E-04	7	Response to xenobiotic stimulus
		1.20E-03	13	Carboxylic acid metabolic process
		1.20E-03	9	Organic cyclic compound catabolic process
		1.50E-03	19	Small molecule metabolic process
		2.30E-03	8	Generation of precursor metabolites and energy
		3.50E-03	8	Aromatic compound catabolic process
		3.60E-03	5	Cellular amino acid catabolic process
		3.60E-03	6	Organic acid catabolic process
		8.00E-03	9	Small molecule biosynthetic process
		8.10E-03	9	Drug metabolic process

Direction	adj.Pval	nGenes	Pathways
	8.60E-03	4	Response to hypoxia



Table. 10 . The results of DEG based on KEGG database

	Direction	adj.Pval	nGenes	Pathways
C 1w vs OF 1w	Down regulated	4.20E-04	3	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
		5.40E-03	3	Carbon metabolism
	Up regulated	6.00E-29	22	Oxidative phosphorylation
		1.60E-25	40	Metabolic pathways
		4.00E-08	8	Cardiac muscle contraction
		3.90E-06	7	Carbon metabolism
		2.00E-05	5	Fatty acid metabolism
		2.50E-05	5	PPAR signaling pathway
		6.40E-04	3	Biosynthesis of unsaturated fatty acids
		7.20E-04	4	Glycolysis / Gluconeogenesis
		8.00E-04	3	Citrate cycle (TCA cycle)
		8.00E-04	4	Biosynthesis of amino acids
		3.00E-03	4	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications
		5.50E-03	2	Fatty acid biosynthesis
C dpc1 vs OF dpc1	Down regulated	1.40E-11	15	Ribosome
		9.50E-08	24	Metabolic pathways
	Up regulated	2.60E-04	7	Protein processing in endoplasmic reticulum

4. 고찰

비만은 건강을 해칠 정도로 비정상적으로 과도한 지방질이 지방조직에 축적되는 상태를 말한다(Ogden et al., 2012). 비만의 원인은 에너지 섭취량이 소비량보다 더 많기 때문이다. 지난 30-40년 동안 세계적으로 현대인의 생활 식습관, 유전, 환경 및 다양한 요인으로 인하여 비만 인구의 비율은 급증하였다(Margaret et al., 2015; Forn-Cuni et al., 2015). 비만은 독립적인 질병으로 볼 수 있으며 다른 질병과 연관되어 건강 문제에 있어 심각한 원인 중 하나로 손꼽힌다. 특히, 비만은 심혈관 질환, 간경변/비알콜성지방간(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), 제 2형 당뇨병, 암 등 다양한 질병과 연관되어있는 것으로 나타났다(Adams et al., 2006). 따라서 비만은 인간 생활에 있어 심각한 문제로 대두되어왔다. 수산양식현장에서는 빠른 성장으로 경제성을 추구하기 때문에 단기간 과다한 양의 사료를 공급하는 것은 종종 일어나는 일이다. 과다한 양의 사료를 투여하고 또한 비만을 유도하는 것은 양식 환경의 악화를 유발하며 어류의 건강에 피해를 입힐 수 있다(Tsvi et al., 1992; Lovell et al., 2003). 따라서 본 연구는 사료 공급량에 따른 양식어류의 생리/면역학적 반응과 변화를 측정하고 병원성 세균에 대한 저항성을 평가하여 과다급이에 의한 영향을 분석하고자 하였다.

Leitritz and Lewis(1980)는 무지개송어의 급이량을 7인치 길이를 기준으로 15℃에서 사육할 경우 1.7%를 제공할 것을 권장하였으며 국립수산과학원의 무지개송어 양식 매뉴얼에 따르면 50-70g 무게에 대해 15℃에서 사육할 경우 어체중의 1.6 ~ 1.8%를 급이할 것을 권고하고 있다. 본 연구에서도 양식 매뉴얼에 따라 C그룹의 급이량을 약 1.5~2.17%로 유지하였으며 OF 그룹은 권장 급이량 보다 2배 이상이 높은 약

3.09~3.95%로 설정하여 실험을 수행하였다. OF 그룹의 급이량을 산출한 결과 세 번의 실험(Trial 1, 2, 3)에서 C그룹에 비해 각각 2.06배, 2.24배, 1.82배가 더 많이 공급되었음을 확인하였다. 세계보건기구 (World Health Organization, WHO)에 따르면 성별에 관계없이 사람을 기준으로 체질량지수가 25kg/m^2 이상을 과체중, 30kg/m^2 이상을 비만으로 정의하고 있다(WHO, 2000). 본 연구에서는 무지개송어의 길이 (cm)와 무게 (g)로 체질량지수를 계산하였으며 과다 급이 시 경우 평균 0.32g/cm^2 으로 같은 기간 동안 권장 급이량을 준수한 그룹에 비해 약 1.4배 정도 차이 나는 것을 확인할 수 있었다. 급이량과 BMI결과를 종합해보았을 때, OF그룹은 정상보다 2배 이상의 과다한 급이가 이루어졌으며 이로 인해 무지개송어에 과체중 또는 비만을 유도한 것으로 보인다. 또한, C그룹과 OF그룹 간의 급이량의 차이가 클수록 HSI에서도 유의적인 차이를 보였다. 특히, C그룹과 OF그룹에서 평균 급이량의 차이가 4주까지 2% 이상이었던 Trial 2에서 2, 4 및 8주에서 HSI와 4 및 8주에서 BMI는 OF와 C그룹 간에 유의적인 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 반면 Trial 1에서는 C그룹과 OF그룹에서 8주간 평균 급이량의 차이가 1%대를 계속 유지하였고 HSI 역시 2주를 제외한 나머지에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 과급이 그룹의 무지개송어가 유의적으로 높은 HSI 값을 가지기 위해서는 대조군에 비해 최소 2% 이상의 많은 사료가 공급되어야 하는 것으로 보이며 이 조건에 의해 과체중(또는 비만)이 유도되는 것으로 생각된다. 본 연구에서 어려웠던 점은 OF 그룹의 급이율을 실험 기간 내내 일정하게 유지하는 것이 힘들었던 것이다. 특히 초반에 과도한 양의 사료를 섭취한 경우 시간이 갈수록 그 양이 줄어들었으며 이와 연계되어 HSI 값 또한 감소하는 경향을 보였다. 하지만 그럼에도 불구하고 간의 조직병리학적 분석 결과 간세포의 크기는 증가한 것을 확인할 수 있었다. 간은 영양분이

위장관을 통해 소화되어 운반된 지질의 대사가 주로 이루어지는 곳이다. 간에서 다양한 원인으로 지방의 과다한 축적이 발생하면 간세포의 거대 공포성 지방증 (macrovesicular steatosis)을 특징으로 하는 NAFLD가 발생된다고 보고되었다(Kim et al., 2005; Weiß et al., 2014). 또한, NAFLD 환자는 BMI와 전신 지방의 비율이 정상인에 비해 유의적으로 높다고 알려져 있다(Angulo et al., 1999). 이는 비만이 간 내에 지방을 침착하게 하고 결국 간질환을 유도하는 것으로 볼 수 있다. 이처럼 간의 손상은 혈청 내 GOT와 GPT의 수치를 증가시키는 특성을 가진다(Lee et al., 2007). 간이 손상되면 아미노기 전이효소인 GOT와 GPT가 혈액으로 분비되게 되어 간 손상의 지표로 사용되는 수치이다. 특히 GOT와 GPT가 간 손상 시 민감하게 작용하는 마커 중 하나로 이들 효소의 증가는 지방간, 간염 등 간의 이상을 잘 반영한다(Huang et al., 2006 ; Daniel et al., 1999). 본 연구에서도 총 세번의 실험에서 모두 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 사람과 쥐의 실험과 일치하는 결과로서, 과다 급이는 무지개송어의 비만을 유도하며 간 조직 내 효소들의 증가 및 세포의 비대가 유발되었으며 생리학적, 조직학적 관점에서 명확한 간의 손상을 확인할 수 있었다.

일반적으로 비만 환자의 지방조직은 지속적인 염증 상태를 유발할 뿐만 아니라 간에서 인슐린 저항성을 유발하여 전신적인 인슐린 저항성 및 glucose metabolism의 기능장애를 유발할 수 있다고 알려져 있다(Matson et al., 2019). 본 연구에서도 간의 전사체 분석 결과 1주와 4주 차에 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complication, Insulin signaling pathway 관련 유전자들의 상향 발현되는 패턴을 확인할 수 있었다. 이러한 유전자들은 인슐린 내성을 유도하여 당뇨병을 유발하며 특히, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complication 관련 pathway는 혈관의 석회화를

증가시켜 혈액 내의 ALP수치의 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Amber et al., 2016). 이전 연구(Khan et al., 2013 ; Ali et al., 2006)에서도 마찬가지로 비만 환자와 쥐에서 ALP의 유의적인 증가가 보고된 바 있다. 또한, ALP는 혈액뿐만 아니라 pre-adipocyte에서 지방 생산을 하는 동안 세포 내 지방 침착을 조절하는 지방조직에서도 발현을 함으로써 ALP가 비만 시 활성이 강화되고 세포 내 지방 저장의 불균형에 관여하는 인자로 예측되고 있다(Ali et al., 2013). 본 연구에서도 마찬가지로 OF 그룹의 어류에서 ALP의 수치가 유의적으로 높은 경향을 보였으며 이는 선행연구 결과와 일치한다. 즉, 과도한 급이는 어류에서도 인슐린 저항성이 유발될 수 있으며 혈청 내 ALP 수치의 증가를 유도하여 혈관성 질환 및 당뇨병을 유발하는 것으로 보여진다.

고지방 사료를 섭취한 비만 쥐의 지방조직에 대식세포가 침윤한다는 것이 이미 잘 알려져 있다(Kanda et al., 2006). 이전의 다양한 연구는 비만 지방조직에서 단핵구, 림프구, 호염구 등을 선택적으로 유도한다고 알려진 monocyte chemoattractant protein- 1(MCP-1)이 과발현되어 대식세포의 침윤을 직접적으로 유도한다는 것을 보고한 바 있다(Kanda et al., 2006; Deshmane et al., 2009; Cullberg et al., 2014). OF 그룹의 무지개송어 두신의 G/L ratio가 대조군 어류에 비해 유의적으로 낮은 것은 과체중 또는 비만인 어류의 두신에 존재하던 대식세포가 지방조직으로 침윤하였기 때문으로 추정된다. 비만에서 대식세포에 관한 연구들에 따르면 일반적으로 지방조직에 존재하는 대식세포는 classically activated M1 macrophages와 alternatively activated M2 macrophages인 2가지의 표현형으로 구성되어 있다. M1 대식세포는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산하여 인슐린 저항성을 유도하는 염증성 신호전달 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Castoldi et al., 2016). 반면 M2 대식세포는 다른

지방조직, 즉 지방이 적은 지방조직에 주로 존재하며 anti-inflammatory cytokine을 생산, 분비하는 것으로 알려져 있다(Castoldi et al., 2016). 본 연구에서 간을 타겟으로 한 전사체 분석 결과 PPAR signaling pathway의 유의적인 상향발현이 관찰되었으며 이와 연관되어 Adipocytokine signaling pathway의 상향발현이 확인되었다. Adipocytokine signaling pathway에서 TNF- α , IL-1 β 의 상향발현을 관찰할 수 있었다. Nod-like receptor protein 또한 지방조직에서 염증과 인슐린 저항성의 발달에 중요한 역할을 한다. Nod-like receptor protein 3 inflammasome(NLRP3)의 발현은 비만인 쥐에서 상향 발현되어 분비된 IL-1 β 는 IL-1R에 결합하고 NF- κ B 및 MAPK 경로를 활성화시켜, 지방세포에서 IRS-1의 활성화를 통해 인슐린 신호를 손상시켜 인슐린 저항성을 유발한다(Vandanmagsar et al., 2011). 본 연구에서도 Nod-like receptor signaling pathway의 유의적인 상향발현을 확인할 수 있었다. 따라서, trial 3의 결과를 종합하여 보았을 때, 조혈조직 내 백혈구가 간과 지방조직에서 과다한 지방의 축적으로 인해 침윤반응이 일어나 마크로파지의 수가 감소한 것으로 보인다. 이를 통해 과다한 급이는 어류에서 염증반응을 유발하며 백혈구 감소와 같은 면역 손상을 유발한 것으로 추론된다.

본 연구에서 급이 후 *A. salmonicida*로 인위 공격하였을 때, OF그룹에서 폐사율이 더 증가하는 경향을 보였다. *A. salmonicida*는 연어과 어류에 감수성을 가지는 대표적인 기회성 병원체로서 치어부터 모든 연령의 어류에 감염되며 크기에 상관없이 폐사를 유발하는 것으로 알려져 있다(Glover et al., 2006). *A. salmonicida*는 조건혐기성의 그람음성균이며 furunculosis의 원인균으로 수질악화 및 저산소, 밀식과 같은 스트레스 노출 시 감염이 더욱 증가하는 것으로 알려져 있다(Barton and Iwama, 1991; Bernoth, 1997). Shieh (1987)에 따르면 무지개송어가 *A. salmonicida*

에 의해 감염되면 숙주 간 조직의 변화와 세포의 손상을 유도하며 혈청 내 GOT, GPT, aldolase, creatine phosphokinase 효소의 증가를 유발하였다. LPS 및 박테리아 DNA와 같은 endogenous bacterial products 존재의 증가는 숙주에서 TLR4 및 TLR9 신호전달 경로를 활성화시킨다(Henao-Mejia et al. 2013). 동시에, TLR2 활성화는 간 지질 축적에 의해 유발될 수 있다(Miura et al. 2013). MyD88 경로를 통한 TLR2, TLR4 및 TLR9 신호는 NF- κ B를 활성화시키고, 그 결과 pro-inflammatory cytokine 및 만성 염증을 유발한다(Miura et al. 2013, Roh & Seki 2013). 비만환자의 지방조직은 TNF- α 및 IL-6와 같은 proinflammatory cytokine의 발현을 증가시킨다 (Fantuzzi 2005; Wang et al., 2018). 이처럼 비만은 감염 시에 나타나는 염증반응과 유사한 반응을 유도할 수 있으며 이는 감염원 없이 진행되어 만성 염증으로 이어진다. Forn-Cuni et al., 2015에 따르면 비만으로 인해 손상받은 간은 LPS 자극처럼 급성 자극에 반응하지 못하고 면역반응이 제대로 이루어지지 않는다고 알려져 있다. 이는 obese zebrafish의 간에서 LPS 자극 시 면역계(e.g., RIG-I-like receptor signaling pathway), 세포주기, 세포사멸(apoptosis)과 관련된 유전자의 발현의 조절이 되지 않았기 때문으로 보고되었다. 실제로 비만은 세균이나 바이러스에 대한 감염의 위험을 증가시키며 특히 후천적인 적응 면역을 약화시키고 세포 면역 변화를 통해 백신의 효과도 감소시키는 것으로 보고되어 있다(Dhurandhar et al., 2015). 선행연구에 따르면 신종플루에 걸렸을 때, 비만그룹이 그렇지 않은 그룹보다 사망률이 2.74배 더 증가하였다(Mertz et al., 2014). 또한, 비만인 사람에게서 A형 독감에 대한 항바이러스 치료 효과가 낮게 나타났고, 백신 효과도 감소하였다(Honce et al., 2019). 이런 효과의 감소는 비만으로 인한 지속적인 만성 염증이 원인으로 지목되고 있다(Torres et al., 2018). 유행성 질병뿐만 아니라 감염성 질환(e.g. 호흡기, 피부감염)에서도

비만환자의 유병률이 그렇지 않은 사람보다 높았으며 특히 호흡기 질환에서 1.5~2.02배까지 감염률을 증가시키는 것으로 보고되었다(Harpsøe et al., 2016; Maccioni et al., 2018). 본 연구에서도 *A. salmonicida*에 의한 감염은 과도한 급이로 인해 타격을 받은 간에 2차 피해가 발생하여 GOT, GPT 등의 수치가 급격히 증가한 것으로 보인다. 또한, 과다급이가 이루어진 무지개송어에서 유의적으로 높은 폐사율을 보이는 경향이 나타났으며 이는 주된 보체 생산 조직인 간이 손상되고 두신과 같은 조혈조직 내의 백혈구가 지방조직으로 이동하는 변화로 인해 정상적인 면역반응이 일어나지 못한 결과에 의한 것으로 판단된다.

따라서 본 연구의 결과를 종합하여 보았을 때, 무지개송어를 대상으로 과다 급이 후 BMI와 HSI의 증가와 혈청에서 GOT, GPT, 간에서 세포 크기의 증가를 통해 간의 손상을 확인할 수 있었다. 또한, 간의 전사체 분석에서 PPAR signaling pathway 및 Nod-like receptor signaling pathway의 유의적인 증가와 Insulin signaling 경로의 상향발현을 통해 과도한 영양분의 공급이 간에서 지방 관련 합성과 대사경로를 과도하게 활성화시켜 필요 이상의 지질을 생산하고 어체에 부정적인 영향을 미친다는 것을 추론할 수 있었다. 향후 연구에서는 어류에서 급이와 크기, 다양한 인자의 발현 상관관계를 파악하여 비만의 기준점을 마련하고 비만이 전신적으로 미치는 영향에 대한 보다 면밀한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

5. 결론

결론적으로 사료의 과다한 급이가 지속되면 어류에 있어서 비만을 유도하고 이는 생리·면역학적으로 불균형을 유발하여 어류 건강에 있어 악영향을 미치게 된다. 특히 과다한 급이로 유도된 과체중 또는 비만인 무지개송어는 간의 손상이 발생하고 여러 가지 비만 시에 일어나는 부작용 등으로 인해 감염 또는 스트레스 자극에 보다 취약한 상태가 되는 것으로 나타났다. 이는 어류가 비만 또는 과체중 상태가 되면 감염에 대한 감수성이 증가하여 전반적인 어류의 건강도가 저하되는 중요한 결과를 보여주고 있다.



국문요약

과급이에 의해 비만이 유도된 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의
면역생리학적 반응 연구

박지연

부경대학교 수산생명의학과

양식장에서의 경제적 이득 창출의 목적으로 공공연하게 이뤄지는 과다한 급이는 에너지 불균형으로 인한 비만을 유발할 수 있다. 본 연구에서는 과급이에 의해 유도된 과체중이 어류의 건강도 및 질병 노출 시 감수성 변화에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다. 세번의 독립적인 실험에서 총 3개의 그룹(정상, 중간 및/또는 과다급이)을 두어 4 또는 8주간 실험을 수행하였다. 1, 2, 4 및/또는 8주의 급이 후 각 그룹별로 5마리 또는 7마리를 이용하여 hepatosomatic index (HSI), body mass index (BMI)를 측정하고 다양한 혈청 인자를 분석하였으며 과급이에 의한 스트레스를 고수온 또는 병원성 세균의 공격을 통해 평가하고자 하였다. 세 번의 실험에서 공통적으로 4주 또는 8주간의 과다급이 시 HSI와 BMI가 유의적으로 증가하였으며 GOT 및 GPT와 같은 혈청학적 수치에서도 유의적인 증가를 관찰할 수 있었다. 또한, 첫번째 실험에서, 8주간의 과다 급이 후 고수온 자극과 *Flavobacterium psychrophilum* 균주 FPRT1을 2.66×10^6 CFU/fish 농도로 접종하였을 때 C그룹에 비해 OF그룹에서 높은 폐사율과 감염율을 보였다. 두 번째 실험에서 급이 4주 후 *Aeromonas salmonicida* 18KR23 균주를 4.06×10^6 CFU/fish 농도로 접종하였을 때 C그룹에서는 60%의 폐사를 보인 반면 과다 급이 구간에서는 전량 폐사하였다. 8주 후 모든 급이 구간을 3개의 그룹으로 나눠 18KR23 균주를 3개의 농도($\sim 10^6$, 10^5 , 10^4 CFU/fish)로 공격한 결과, 모두 과다 급이에서 가장 높은 폐사율을 보였다. 세번째 실험에서, 백혈구의 분포를

확인하였을 때 과다급이 구간에서 유의적으로 감소된 Granulocyte-macrophage/lymphocyte ratio를 확인할 수 있었다. 또한, 이전과 마찬가지로 *A. salmonicida* 감염 시, 유의적으로 높은 폐사율을 나타내었다. 지금까지 확인된 비만이 어류의 건강도에 부정적인 영향을 전사체 수준에서 확인하고자 본 연구에서는 4주 동안 어류의 간에서 RNA-seq을 수행하였다. 이에 대한 결과, Citrate cycle (TCA cycle), Electron transfer activity, Oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H와 같이 에너지 합성과 관련된 유전자와 Glycolysis / Gluconeogenesis, Fatty acid metabolism 관련된 지방산 합성과 대사, PPAR signaling, NOD-like receptor signaling pathway 유전자가 OF그룹간에서 상향 발현된 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 사료의 과잉공급은 어류에 비만을 유도할 수 있으며 생리·면역학적 불균형을 일으켜 연속되는 다른 스트레스 인자에 보다 더 취약할 수 있음을 보여주는 중요한 결과라고 판단된다.



참고문헌

- Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006; 355:763–778.
- Ali AT, Ferris WF, Penny CB, Van der Merwe M-T, Jacobson BF, Paiker JE, et al. Lipid accumulation and alkaline phosphatase activity in human preadipocytes isolated from different body fat depots. *J Endocrinol Metabol Diabetes SA* 2013; 18: 58-64.
- Ali AT, Paiker JE, Crowther NJ. The relationship between anthropometry and serum concentrations of alkaline phosphatase isoenzymes, liver enzymes, albumin, and bilirubin. *Am J Clin Pathol.*2006; 126:437-42.
- Andrews, Simon. "FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data." (2010).
- Angulo, P., Keach, J. C., Batts, K. P., & Lindor, K. D. (1999). Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 30(6), 1356-1362.
- Barton, B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish diseases*, 1, 3-26.
- Bernoth, E. M., Ellis, A. E., Midtlyng, P. J., Olivier, G., & Smith, P. (Eds.). (1997). *Furunculosis: multidisciplinary fish disease research*. Elsevier.
- Castoldi, A., Naffah de Souza, C., Câmara, N. O. S., & Moraes-Vieira, P. M. (2016). The macrophage switch in obesity development. *Frontiers in immunology*, 6, 637.
- Carvalho, M. J., Martínez-Murcia, A., Esteves, A. C., Correia, A., & Saavedra, M. J. (2012). Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *International journal of food microbiology*, 159(3), 230-239.

- Cullberg, K. B., Larsen, J. Ø., Pedersen, S. B., & Richelsen, B. (2014). Effects of LPS and dietary free fatty acids on MCP-1 in 3T3-L1 adipocytes and macrophages in vitro. *Nutrition & diabetes*, 4(3), e113.
- Daniel, S., Ben-Menachem, T., Vasudevan, G., Ma, C. K., & Blumenkehl, M. (1999). Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *The American journal of gastroenterology*, 94(10), 3010-3014.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(6), 313-326.
- Dhurandhar NV, Bailey D, Thomas D. Interaction of obesity and infections. *Obes Rev* 2015;16(12):1017-29.
- Engelgau MM, et al. The evolving diabetes burden in the United States. *Ann Intern Med*.2004;140(11):945–950
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(5), 911-919.
- Forn-Cuni, G., Varela, M., Fernandez-Rodriguez, C. M., Figueras Huerta, A., & Novoa, B. (2015). Liver immune responses to inflammatory stimuli in a dietinduced obesity model of zebrafish.
- Glover, K. A., Bergh, Ø., Rudra, H., & Skaala, Ø. (2006). Juvenile growth and susceptibility to *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of farmed, hybrid and wild parentage. *Aquaculture*, 254(1-4), 72-81.
- Harpsøe MC, Nielsen NM, Friis-Møller N, Andersson M, Wohlfahrt J, Linneberg A, et al. Body mass index and risk of infections among women in the Danish national birth cohort. *Am J Epidemiol* 2016;183(11):1008-17.
- Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaiss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jurczak MJ et al. 2013 Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482 179–185.

- Honce R, Schultz-Cherry S. Impact of obesity on influenza A virus pathogenesis, immune response, and evolution. *Front Immunol* 2019;10:1071.
- Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech* 2009;2:231–7.
- Huang, X. J., Choi, Y. K., Im, H. S., Yarimaga, O., Yoon, E., & Kim, H. S. (2006). Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*, 6(7), 756-782.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K. I., Kitazawa, R., ... & Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation*, 116(6), 1494-1505.
- Kay, A. M., Simpson, C. L., & Stewart, J. A. (2016). The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification. *Journal of diabetes research*, 2016.
- Khan, A. R., Awan, F. R., Najam, S., Islam, M., Siddique, T., & Zain, M. (2015). Elevated serum level of human alkaline phosphatase in obesity. *Age (years)*, 48(8.8), 45-2.
- Kim, J. W., Lee, H. N., Jee, B. Y., Woo, S. H., Kim, Y. J., & Lee, M. K. (2012). Monitoring of the mortalities in the aquaculture farms of South Korea. *Journal of fish pathology*, 25(3), 271-277.
- Kim, S. S., Song, J. W., Lim, S. J., Jeong, J. B., Jeon, Y. J., Yeo, I. K., & Lee, K. J. (2010). Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder on immune responses, blood components, and disease resistance against principal fish disease of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. *Journal of Animal Science and Technology*, 52(4), 337-346.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73.

- Leitritz, E., & Lewis, R. C. (1980). Trout and salmon culture: hatchery methods (Vol. 164). UCANR Publications.
- Lomonaco, R., Ortiz-Lopez, C., Orsak, B., Webb, A., Hardies, J., Darland, C., ... & Cusi, K. (2012). Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 55(5), 1389-1397.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550.
- Lovell, R. T. (2003). Diet and fish husbandry. In *Fish nutrition* (pp. 703-754). Academic Press.
- Maccioni L, Weber S, Elgizouli M, Stoeckler AS, Geist I, Peter HH, et al. Obesity and risk of respiratory tract infections: results of an infection-diary based cohort study. *BMC Public Health* 2018;18(1):271.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.
- Matson, R. I., Perry, R., Hunt, L. P., Chong, A. H., Beynon, R., Hamilton-Shield, J., & Birch, L. (2019). Change in obesity-related metabolic abnormalities associated with BMI improvement through life-style intervention: a meta-regression. *Pediatric Diabetes*. 21-4031.
- Mertz D, Kim TH, Johnstone J, Lam PP, Science M, Kuster SP, et al. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2013;347:f5061.
- Morris, M. J., Beilharz, J. E., Maniam, J., Reichelt, A. C., & Westbrook, R. F. (2015). Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 58, 36-45.
- Miura K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H & Seki E 2013 Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology* 57 577–589.

- Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007; 132:2087–2102.
- Park S, Yu J and Han J. 2012. Studies on the overinflation of the Cardiac Stomach in Sterlet Sturgeon *Acipenser ruthenus*, fingerlings. *J Fish Pathol* 25, 59-65. 10.7847/ jfp.2012.25.1.059.
- Roh YS & Seki E 2013 Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28 38–42.
- Shieh, H. S. (1978). Changes of blood enzymes in brook trout induced by infection with *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Biology*, 12(1), 13–18. doi:10.1111/j.1095-8649.1978.tb04145.x
- Shieh, H. S. (1976). Effect of *Aeromonas salmonicida* (Furunculosis) Infection on the Incorporation of [1-14C] Acetate into Lipids of Trout Liver. *Infection and immunity*, 14(3), 836-838.
- Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E: Animal models of obesity. *Obes Rev* 2007, 8(Suppl 1):55-61.
- Tsevis, N., Klaoudatos, S., & Conides, A. (1992). Food conversion budget in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, fingerlings under two different feeding frequency patterns. *Aquaculture*, 101(3-4), 293-304.
- Torres L, Martins VD, Faria AMC, Maioli TU. The intriguing relationship between obesity and infection. *J Infectiology* 2018;1(1):6-10.
- T. Oka, Y. Nishimura, L. Zang, M. Hirano, Y. Shimada, Z. Wang, N. Umemoto, J. Kuroyanagi, N. Nishimura, T. Tanaka, Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity, *BMC Physiol.* 10 (2010) 21.
- Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* (2011) 17:179–88. doi:10.1038/nm.2279
- Wang, X. Z., Jiang, W. D., Feng, L., Wu, P., Liu, Y., Zeng, Y. Y., ... & Zhou, X. Q. (2018). Low or excess levels of dietary cholesterol

- impaired immunity and aggravated inflammation response in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & shellfish immunology*, 78, 202-221.
- Weiß, J., Rau, M., & Geier, A. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, 111(26), 447.
- World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic (No. 894). World Health Organization
- 국립수산물과학원. (2017). 무지개송어 양식 표준 매뉴얼
- 김경오, 박상훈, 박철휘, 한태호, 유교상, 김종혁, ... & 조현득. (2005). 비알콜성 지방간에서 간조직 손상과 혈중 렙틴의 연관성. *Clinical and Molecular Hepatology* (대한간학회지), 11(1), 51-58.
- 백진이, & 박경일. (2016). 무지개송어 양식업의 경제성 분석. *수산해양교육연구*, 28(5), 1280-1289.
- 이선혜, 김미현, 박미나, 이연숙. (2007). 고지방식을 섭취하는 흰 쥐에서 제니스테인 보충이 지방간 및 지질대사에 미치는 영향. *한국영양학회지*, 40(8), 693-700.
- 한국해양수산개발원. 2020해양수산 전망대회 발표자료집