

닭의 고밀도사양 스트레스가 품종 간 체내대사 유전자 발현에 미치는 영향

손시환 · 장인석 · 안영숙 · 문양수[†]

경남과학기술대학교 동물생명과학과

Effects of High Stocking Density on the Expression of Metabolic Related Genes in Two Strains of Chickens

Sea Hwan Sohn, In Surk Jang, Young Sook An and Yang Soo Moon[†]

Department of Animal Science and Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT Chickens are exposed to the external and internal stressors such as low and high temperature, high stocking density, feed restriction and disease. There have been a few studies on gene expressions through the investigation of chickens under direct exposure to the stress of high stocking density. The objective of the present study was to determine the expressions of genes associated with stress, endoplasmic reticulum (ER)-stress, lipid and glucose metabolism in two strains of chickens, Korean Native Chicken (KNC) and White Leghorn (WL), raised in high stocking density. A total of 164 chickens aged 40 weeks were randomly allotted to a 540 cm²/bird stocking density (control), whereas the chickens in a high density group were assigned in a 311 cm²/bird stocking density with feeding *ad libitum* for 10 weeks. Total RNA was extracted from the live for qRT-PCR. The expression levels of hsp70 and hsp90a were higher in WL subjected to stress with high stocking density compared with those genes in control ($P<0.05$), while the expressions of genes were not affected in KNC. ER stress marker gene XBP1 was also highly expressed in WL with stress ($P<0.05$), but the stress of high stocking density did not influence to ER stress marker genes in KNC. Lipid metabolism associated genes including FABP4, FATP1 and ACSL1 were highly expressed in WL compared with KNC when subjected to high stocking density stress ($P<0.05$). The expression of glucose transport gene GLUT2 and GLUT8 were increased in chickens exposed to the stress of high stocking density ($P<0.05$). The data indicate that WL is more sensitive to the stress of high stocking density compared with KNC and the stress may influence the modulation of lipid and glucose metabolism in the liver of chickens.

(Key words : stress, gene expression, liver, chicken)

서 론

스트레스는 인간이 야생동물을 가축화시키는 과정에서 환경적응의 척도로 가장 중요한 요소로 여겼으며, 같은 종간에도 스트레스에 대한 반응은 다양함을 보인다(Price, 2002). 따라서 스트레스에 대한 포용력 또는 적응력이 높은 동물은 환경의 적응에 유리하기 때문에 가축화뿐만 아니라 가축의 육종과정에서 선발의 대상이 된다. 환경적 스트레스는 동물의 행동뿐만 아니라, 동물의 생리적 변화에도 영향을 미치게 된다(Hansen, 1996). 스트레스는 동물이 환경적 변화를 접할 때 체내 항상성 유지를 회복하기 위하여 체내 반응을 자극하는 과정으로 해석된다(Mumma et al., 2006). 스트레스는

일반적으로 동물의 성장과 생산성뿐만 아니라, 동물복지 측면에서도 위해요인으로 작용한다. 따라서 최근 닭의 연구는 사료효율과 성장률을 기반으로 한 육종 및 개량에서 질병 저항성과 동물복지를 고려한 연구로 전환되고 있다. 사양관리 중에 닭이 직면하게 되는 주요 환경적 스트레스 요인에는 사육온도, 사육밀도 및 사육형태 등이 있다. 특히 제한된 공간에서 경제성만 고려한 사육밀도의 증가는 닭의 외형적 이상을 유발함과 동시에 면역성을 악화시키는 원인이 되기도 한다(McIlroy et al., 1987; Heckert et al., 2002). 닭의 고밀도 사양은 부신(adrenal gland)의 비대와 혈중 코티코스테론의 증가(Mashaly et al., 1984; Craig et al., 1986), 근단백질의 분해에 의해 생성된 유리아미노산을 이용한 포도당 신합

[†] To whom correspondence should be addressed : ysmoon@gntech.ac.kr

성(gluconeogenesis) 증가, 그리고 이로 인한 요산의 배출 증가를 유도한다(Siegel and Van Kampen, 1984; Davison et al., 1985). 탄수화물과 단백질뿐만 아니라, 스트레스는 지방의 대사에도 영향을 미치게 되는데, 포도당 신합성에 의한 에너지 정체현상이 증가함에 따라 체지방 축적은 증가한다고 한다(Siegel and Van Kampen, 1984). 열스트레스에 의한 닭의 품종별 생리적 변화에 대한 연구에서 잠재적 성장률이 높은 개방된 실용계가 적색야계와 토종계에 비하여 스트레스에 대한 반응 지표 즉, 혈장 코티코스테론과 열스트레스 단백질(heat shock protein, HSP) 등이 높게 나타난다고 보고하였다(Soleimani et al., 2011). 닭의 감염스트레스에 의한 지방대사 균형의 파괴에 대한 연구는 보고된 바 있지만(Renli et al., 2012), 밀사 스트레스가 닭의 품종별 지방대사, 포도당 등 체내대사 관련 유전자들의 발현을 분석 비교한 연구는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 한국재래계와 백색레그혼에 대하여 표준 및 고밀도 사양을 실시하고, 고밀도 사양스트레스가 닭의 품종 간 체내대사 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향을 비교분석하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 분석 시료

시험에 공시된 동물과 사양조건은 Sohn et al.(2014)이 제시한 내용과 같으며, 간단히 기술하면 다음과 같다. 공시동물은 경남과학기술대학교 종합농장에서 부화하여 사육 중인 백색레그혼종 순계(White Leghorn, WL) 82수 및 한국재래닭(Korean Native Chicken, KNC) 적갈색종 82수를 이용하였다. 공시계들은 두 품종 모두 40주령 때 대조구(540 cm²/수) 및 고밀도구(311 cm²/수)로 분리하고, 50주령까지 10주간 사육하였다. 공시계의 사양관리는 강제 환기 및 자동 온도 조절 시스템이 완비된 무창 계사 내 2단 4열 케이지 형태로, 칸당 90 cm(W) × 90 cm(L) × 66 cm(H)의 철망 배터리형 케이지에서 사육하였고, 사료 급이는 자유채식시켰으며, 점등 관리는 16시간 고정 점등하였다.

시험종료(50주령) 후 시험구별 무작위로 10수씩 추출하여 각 개체로부터 간 조직을 취하여 액체질소에 급속냉동을 실시하였고, total RNA를 추출하기 전까지 -80℃에 보관하였다. 시험에 관련된 닭의 관리 및 취급은 본 대학 동물실험윤리위원회(IACUC)의 규정을 준수하였으며, 사전 승인을 받았다.

2. 유전자 발현 분석

유전자 발현 분석을 위하여 간 조직은 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조사의 이용안내에 따라 total RNA를 추출하였다. 분리한 RNA는 1 µg/µL의 농도로 정량하고, Improm-II Reverse transcription system(Promega, Fitchburg, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 MyiQ(Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 다음과 같이 시행하였다. PCR 반응물은 cDNA(10 ng) 5 µL, primer(5 pmole)는 각각 0.5 µL, SYBR Green(Bio-Rad) 10 µL, ddH₂O 4 µL를 넣어 총 20 µL가 되도록 혼합하고, 95℃에서 3분간 최초 변성을 시킨 다음 95℃ 15초간 변성, 60℃에서 15초간 접합, 72℃ 40초간 확장과정을 40회 반복하였다. 그리고 94℃ 1분간 재 접합 과정을 거친 후 55℃에서 1분간 재 확장 과정을 실시하였다. 마지막으로 55℃에서 0.5℃씩 상승시켜 형광접합물질인 SYBR Green이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다. 유전자 발현의 상대적 발현은 2^{-ΔΔCt} 방법을 이용하여 분석하였다(Livak and Schmittgen, 2001). 본 시험에 이용된 primer들의 정보는 Table 1에 제시된 바와 같다.

3. 통계분석

시험구의 유전자 발현에 대한 통계 분석은 2 × 2 요인시험 설계에 따라 SAS 통계패키지(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 GLM procedure를 이용하여 품종 간, 사양밀도 간 및 품종 × 사양밀도에 대한 유의성을 검정하고, 요인별 차이를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 고밀도사양 스트레스에 따른 품종 간 스트레스 표지 유전자들의 발현비교

한국재래계와 백색레그혼 종을 대상으로 40주령부터 10주간 대조구와 밀사 스트레스구로 구분하여 사양시험을 실시하고, 이들 개체들이 받은 스트레스의 정도는 간 조직으로부터 hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase(HMGCR), heat shock protein(HSP)70, HSP90-α 및 HSP90-β 유전자의 mRNA 발현을 분석 비교하여 Table 2에 제시하였다. 한국재래계는 분석된 모든 스트레스 표지 유전자들의 발현이 밀사구와 대조구 사이에 유의적인 변화를 보이지 않았다. 그러나 백색레그혼의 경우, HSP70과 HSP90-β 유전자의 발현이 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). HSP는 포유류뿐만 아니라, 조류에서도 사료섭취제한, 사회집단으로부터의 고립, 수송

Table 1. The primer pairs used to analyze gene expression by real-time RT-PCR and size of products

Genes	Primer	Sequence(5'-3')	Size (bp)	Tm(°C)
HSP70	Forward	TCCTCTGCTTTGTATTTCTCTG	145	60
	Reverse	ATGCTAATGGTATCCTGAACG		
HSP90 α	Forward	GGAGAAGTTACCAAGCGATT	133	60
	Reverse	CAGAAGATGAAGAAGAGAAGAAGA		
HSP90 β	Forward	GCAGGACAGTAGGTGAGT	113	60
	Reverse	GAGGCAGAGCAAGATGAAG		
HMGCR	Forward	TCAGAGCGTAAGACCTAAC	84	60
	Reverse	TGTAGTAATGGCGAACCTAA		
GRP78	Forward	AAGAAGAAGCAGCAGAGAAG	87	60
	Reverse	CAAGTGTTCTGAGTCCAAT		
ATF6	Forward	CAGCCACCACACATAACAA	106	60
	Reverse	ATCATCACCTCGTAGTCTT		
XBP1	Forward	TCTGCTGGATGCTGGTAG	89	60
	Reverse	AGGTATGGTCAGTGCAAGA		
SREBP2	Forward	ATGCGGACCTGAAGATAGAT	115	60
	Reverse	CCTGGCTCTGAATCAATGG		
C/EBP β	Forward	ATGACCGAACTTACCGTAGG	81	60
	Reverse	CTGCTGGGATGCTGCTAA		
FASN	Forward	TTCGTGTTACCGCCTCAG	91	60
	Reverse	TCCCCACTGCCTGCTTAG		
FABP4	Forward	ATGGCAAAGAGACTGTTATCAA	118	60
	Reverse	TGAAGACGGTTCCTCAT		
FATP1	Forward	GGGTTTGTGGTCTCCAT	102	60
	Reverse	AGGCGTCGTTAAGGTAAGA		
ACSL1	Forward	CTAAGATTTGTGTGATTGTAATGC	93	60
	Reverse	GCTCTAACAGTTGACTTGGA		
GLUT2	Forward	GCTGCCTCTTCTGCTAA	116	60
	Reverse	GTCCCTTCCAACCCAAAC		
GLUT8	Forward	GAGGAGGAGGGACTAAGC	78	60
	Reverse	CATCAGAATCACACCAATAAGAAG		
GAPDH	Forward	TAGGATACACAGAGGACCAG	133	60
	Reverse	AACTCATTGTCATAACCAGGAA		
RPL27	Forward	CAGCAATGGGCAAGAAGA	81	60
	Reverse	GCATCAGGTGGTTGTAGTT		

Table 2. Comparison of stress response for the stocking density between Korean Native Chickens and White Leghorns as analyzed with the expressions of stress-marker genes in the liver

	Korean Native Chicken				White Leghorn			
	Control		High density		Control		High density	
	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
HMGCR	2.10±0.36	1	1.97±0.25	1.09	3.01±0.56	1	2.29±0.66	1.65
HSP90- α	11.01±0.35	1	9.70±0.61	2.49	13.14±0.10 ^a	1	12.00±0.29 ^b	2.20
HSP90- β	-2.74±0.25	1	-3.27±0.58	1.45	-1.55±0.17	1	-1.60±0.15	1.04
HSP70	4.54±0.28	1	3.51±0.43	2.04	5.93±0.33 ^a	1	4.47±0.37 ^b	2.77

^{a,b} Values (means \pm S.D.) with different superscripts within the same row in each breed significantly differ ($P < 0.05$).

등을 포함한 다양한 스트레스 종류에 대한 반응의 결과로 합성되는 단백질이다(AI-Aqil and Zulkifli, 2009; Soleimani et al., 2011, 2012). 따라서 닭의 고밀도 사양에 대한 스트레스의 반응에 대한 지표로 HSP의 발현 정도를 분석하여 스트레스의 정도를 판단하기도 한다(Gornati et al., 2004; Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012). 본 실험에서는 한국재래계 또한 고밀도 사양에 대한 스트레스로 HMGCR을 제외한 HSP 유전자들의 발현이 높아진 경향을 나타냈지만, 통계적 유의성을 보이지 못하였다. 밀사의 형태가 아닌 열 스트레스에 대한 HSP 유전자의 발현을 적색야계, 토종계 및 실용육계에서 관찰한 결과를 보면, 적색야계는 열 스트레스를 받기 전 즉 기초수준(basal level)의 HSP 유전자의 발현 정도가 토종계와 실용육계에 비하여 높은 수준을 유지하였으며, 또한 열 처리에 대하여 적색야계는 HSP의 발현에 큰 변화를 보이지 않았다고 한다. 그러나 실용육계의 경우, 열 스트레스 처리 전에는 낮은 HSP의 발현을 보였으나, 열처리 후 스트레스에 민감하게 반응하여 높은 HSP의 발현을 나타냈다고 한다(Soleimani et al., 2011). 이는 야생 혹은 개량이 적게 된 닭이 개량이 많이 진행된 닭(실용육계)에 비하여 열에 대한 스트레스 저항성이 높음을 의미하고, 포식자들로부터 도망을 하거나, 먹이사냥을 위해 일정수준 스트레스 상태를 유지하고 있는 것으로 유추하였다. 본 연구에서도 한국재래계가 백색레그혼에 비하여 표준밀도 사양에서는 HSP 유전자들의 발현이 높은 현상을 나타내었다. 야계와 토종닭 그리고 실용육계에 대한 열 스트레스에 대한 많은 연구들에서도 야계 및 토종닭의 높은 열 적응력을 보고하였다(Deeb and Cahaner, 1999; Zulkifli et al., 1999; Sandercock et al., 2006; Cahaner et al., 2008). 본 연구에서의 결과를 종합하여 보면 고밀도사양 체계는 닭에게 스트레스 요인이 될 수 있으며, 닭의 품종이나 개량의 정도에 따라 스트레스 반응에 대한 유전적 차

이가 있음을 시사한다.

2. 고밀도사양 스트레스에 따른 ER-Stress 연관 유전자들의 발현비교

고밀도 사양체계는 닭에게 스트레스를 유발할 수 있음은 앞에서 보여 주었다. 이러한 환경적 스트레스가 닭의 간조직 세포의 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 내에서 일어나는 단백질의 형성 관련 ER 스트레스 유전자들에 어떤 영향을 미치는지 조사하여 Table 3에 제시하였다. 분석된 activating transcription factor(ATF)6, glucose-regulated protein(GRP)78, sterol regulatory element-binding transcription factor(SREBP)2 등의 발현은 품종 간 차이를 볼 수 없었지만, X-box binding protein(XBP) 1의 경우 한국재래계가 백색레그혼에 비하여 낮은 발현을 보였다($P < 0.05$). 밀사에 의한 ER 스트레스의 연관 유전자들의 발현에 큰 차이가 없었으나, 고밀도 사양에 의해 SREBP2은 높은 발현을 보였다($P < 0.05$). GRP78과 SREBP2의 경우, 밀사에 의한 영향을 크게($P < 0.01$) 받으며, 또한 품종과 밀사와 서로 상호관계가 존재함을 알 수 있었다($P < 0.01$). GRP78(Bip)은 ER에 형성된 unfolded protein의 증가 시 유도되고, ATF도 또한 세포스트레스 증가 시 ER chaperone들의 전사를 촉진하는 ER stress 지표유전자로 잘 알려져 있다(Sharma et al., 2008). ER 스트레스는 단백질 형성이 이루어지는 소포체 내에서 일어나는 불완전 단백질 형성 즉 unfolded protein response(UPR) 현상으로 포유동물에서 비만, 당뇨, 인슐린 저항성 및 염증반응 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(Cnop et al., 2012). 본 연구에서는 이들 유전자들 중 XBP1만 백색레그혼 고밀도 사양체계에서 유전자의 발현이 2배 증가함을 볼 수 있었고, 품종과 관계없이 대조구와 밀사구를 비교하였을 경우에는 SREBP2를 제외하고, ER-stress 유전자들의 발현 증가를 관찰할 수 없었다. 일반적으로 포유동물

Table 3. Analysis of variances for the factors affecting to the expression of ER stress-related genes in the liver in Korean Native Chickens (KNC) and White Leghorns (WL) with different stocking density

Breed	Stocking density	ATF6	XBP1	GRP78	SREBP2
Breed means	KNC	7.97±0.40 [†] (0.93) [‡]	5.74±0.27 ^a (0.49)	9.00±0.26 (0.84)	5.38±0.31 (1.10)
	WL	7.87±0.26 (1)	4.71±0.23 ^b (1)	8.75±0.17 (1)	5.52±0.26 (1)
Stocking density	Control	7.76±0.29 (1)	5.35±0.26 (1)	8.58±0.19 ^b (1)	5.90±0.16 ^a (1)
	High	8.08±0.37 (0.80)	5.10±0.24 (1.19)	9.17±0.24 ^a (0.66)	5.00±0.42 ^b (1.87)
Breed (B)		N.S	**	N.S	N.S
Stocking (S)		N.S	N.S	**	**
B×S		*	**	**	**

^{a,b} Values (means±S.D.) with different superscripts within the same column significantly differ ($P<0.05$).

[†] Δ Ct value, [‡] $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ value, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

에서 식이성 포화지방산이나 콜레스테롤 등에 의해 유도되는 ER stress(Borradaile et al., 2006)가 닭과 같은 조류에서는 고밀도 사양스트레스에서는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 다만 본 연구에서는 분석된 모든 지표 유전자들에서 밀사와 품종 간에 유의적 상관관계는 존재함을 보여 주었다.

3. 고밀도사양 스트레스에 따른 지방대사 연관 유전자들의 발현비교

밀사스트레스가 한국재래계와 백색레그혼종의 간 조직에서 지방대사 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향을 분석하여 Table 4에 제시하였다. 분석된 유전자들 중 fatty acid-binding protein 4(FABP4), fatty acid transport protein 1(FATP1), Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1(ACSL1)의 경우, 백색레그혼에 비하여 한국재래계에서 낮은 유전자 발현을 보였으며($P<0.05$), fatty acid synthase(FASN)은 한국재래계가 오히려 높은 발현을 나타내었다($P<0.05$). C/EBP α 의

Table 4. Analysis of variances for the factors affecting to the expression of lipid metabolism related genes in the liver in Korean Native Chickens (KNC) and White Leghorns (WL) with different stocking density

Breed	Stocking density	C/EBP α	FASN	FABP4	FATP1	ACSL1
Breed means	KNC	6.77±0.47 ^{a†} (1.42) [‡]	4.73±0.16 ^b (1.41)	10.45±0.50 ^a (0.58)	8.73±0.33 ^a (0.40)	4.79±0.27 ^a (0.28)
	WL	7.28±0.31 ^a (1)	5.23±0.26 ^a (1)	9.66±0.27 ^b (1)	7.41±0.13 ^b (1)	2.96±0.20 ^b (1)
Stocking density	Control	7.32±0.30 ^a (1)	5.34±0.30 ^a (1)	10.66±0.44 ^a (1)	8.24±0.24 ^a (1)	4.14±0.25 ^a (1)
	High	6.73±0.48 ^b (1.51)	4.62±0.12 ^b (1.65)	9.46±0.33 ^b (2.30)	7.91±0.22 ^a (1.26)	3.60±0.22 ^b (1.45)
Breed (B)		N.S	**	*	**	**
Stocking (S)		*	**	**	N.S	*
B×S		**	*	**	**	**

^{a,b} Values (means±S.D.) with different superscripts within the same column significantly differ ($P<0.05$).

[†] Δ Ct value, [‡] $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ value, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

경우는 한국재래계에서 높은 발현 경향을 보였지만, 유의적 차이는 없었다. 지방공급은 동물의 성장과 생산에 중요한 에너지 공급원이다. 뉴캐슬 감염에 의한 초기스트레스의 경우 지방합성을 저해하였으며, FASN, acetyl-CoA carboxylase (ACC), PPAR γ , FATP1 등의 mRNA의 유전자 발현은 감소하였고, FABP의 발현은 증가하였다고 한다(Renli et al., 2012). ACSL1은 유리장쇄지방산을 fatty acyl-CoA ester로 전환시키는 기능으로 지방생합성을 위한 주된 역할과, beta-oxidation을 이용한 지방산의 산화를 유도하여 지방산을 분해하는 양면적 성격을 지니는 효소이다. 따라서 ACSL1 mRNA는 지방합성과 지방산화를 유도하는 조건에서 모두 증가하게 된다. 환경스트레스에 의한 외적 인자는 앞에서 언급한 바와 같이 세포내 스트레스 지표 유전자들의 발현에 영향을 주게 되고, 이는 지방대사 관련 유전자들(FABP, FATP, ASCL1)의 발현에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그러나 지방합성 효소인 FASN의 발현은 한국재래계에서 오히려 높게 나타난 것은 백색레그혼의 경우 산란기로 개량된 대표 품종인 반면, 한국재래계는 계란과 고기를 같이 생산하는 겸용종임을 감안해야 할 것으로 사료된다. 사람과 쥐에서는 FATP1에 대한 연구가 비교적 많이 되었지만, 가금에서는 FATP1에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 박테리아나 바이러스 등 질병 감염은 동물의 정상적 생리 체계를 방해하고, 대사균형을 파괴한다(Butler, 1975; Sijtsma et al., 1989). 정상적 지방대사는 체내 에너지 균형에 매우 중요하다. 이러한 균형이 무너지게 되면 건강한 성장과 생산성에도 위협이 된다. 조류에서 지

방의 생합성은 주로 간에서 일어나지만(O'Hea and Leveille, 1968), 쥐와 같은 포유류는 간과 지방조직에서 모두 이루어진다(Bedu et al., 2002). 스트레스와 연관된 닭의 내인성 체지방의 대사연관 유전자 발현의 변화는 간 조직에서 정상적 지방대사에 매우 중요함을 시사한다. 따라서 조류에서 스트레스와 지방대사 연관 유전자들의 발현 및 조절에 대한 체계적인 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

4. 고밀도사양 스트레스에 따른 포도당대사 연관 유전자들의 발현비교

밀사 스트레스가 한국재래계와 백색레그혼종의 간 조직에서 포도당 대사 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향을 분석하여 Table 5에 제시하였다. 조류의 간세포에서 포도당의 흡수에 관여하는 GLUT2는 고밀도 스트레스에 의한 두 계통간의 발현 차이를 보이지 않았다. 그러나 밀사 여부에 따른 GLUT2의 발현은 대조구에 비하여 고밀도 사양에 의해 약 1.85배 크게 증가하였다($P<0.05$). 즉, 이 유전자의 발현은 품종 간에는 영향을 받지 않지만, 밀사에 의한 영향을 받고 있음을 보여 주었다. GLUT8의 경우, 한국재래계에서 약 3.8배 높은 발현을 보였지만($P<0.05$), GLUT2와는 달리 밀사에 의한 영향은 받지 않았다. 따라서 GLUT8의 경우, 품종에 의한 차이($P<0.01$)와 품종과 밀사에 의한 상호관계는 존재하였지만($P<0.01$), 밀사에 의한 유의성은 없었다. GAPDH의 경우도 GLUT2와 유사한 발현 경향을 보였다. 조류는 포유동물에 비하여 단위 체중 당 높은 혈중 포도당 농도를 가지

Table 5. Analysis of variances for the factors affecting to the expression of glucose metabolism related genes in the liver in Korean Native Chickens (KNC) and White Leghorns (WL) with different stocking density

Breed	Stocking density	GLUT2	GLUT8	GAPDH
Breed means	KNC	6.20±0.20 [†] (0.91) [‡]	4.53±0.39 ^b (3.76)	5.84±0.33 (0.95)
	WL	6.07±0.41 (1)	6.44±0.28 ^a (1)	5.77±0.17 (1)
Stocking density	Control	6.58±0.37 ^a (1)	5.57±0.28 (1)	6.42±0.21 ^a (1)
	High	5.69±0.23 ^b (1.85)	5.40±0.39 (1.13)	5.20±0.29 ^b (2.33)
Breed (B)		N.S	**	N.S
Stocking (S)		**	N.S	**
B×S		**	**	*

^{a,b} Values (means±S.D.) with different superscripts within the same column significantly differ ($P<0.05$).

[†] Δ Ct value, [‡] $2^{-\Delta\Delta$ Ct value, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

고 있다(Braun and Sweazea, 2008). 또한 조류의 경우, 포도당의 세포내 저장형태인 glycogen이 매우 적은 편이다. 반면, 혈중 인슐린 수준은 더 낮아 쥐와 비교하여 약 1/10 수준에 불과하며, 인슐린에 의한 혈중 포도당의 농도 조절이 미약한 것으로 알려져 있다(Dupont et al, 2004). 백색레그혼에 비하여 한국재래계에서 GLUT8의 높은 발현과 고밀도 사양에서 GLUT2의 발현 증가는 간세포에서 포도당 흡수의 증가 및 글라이코젠 합성과 연관이 있을 것으로 사료되어, 이에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 보인다. 조류의 소화 장치에서 포도당의 흡수는 sodium-glucose co-transporters(SGLTs; apical side of cells)와 glucose transport proteins(GLUTs; basolateral side of cells)에 의해 이루어진다. 조류에서 간은 포도당 신합성과 글라이코젠의 분해 등을 이용하여 포도당의 체내 일정한 수준을 유지(포도당 항상성)하는데 중대한 기여를 한다(Warriss et al., 1988; Tinker et al., 1986). 조류의 간에서 포도당의 흡수는 GLUT1과 2에서 그리고 대부분의 조직에서는 GLUT8과 다른 GLUT isoform들에 의해 이루어진다(Carver et al., 2001, Kono et al., 2005). GLUT 1과 2는 육계의 간에서 발현되는 것으로 알려졌으며, GLUT3과 GLUT8은 낮은 수준이지만 육계의 간에서 발현이 되는 것으로 보고되었다(Kono et al., 2005). 조류의 간은 순환하는 포도당의 수준을 조절하는데 큰 기여를 하는데 사료섭취가 줄게 되면 즉 6~24시간 절식하게 되면 간의 glycogen함량을 낮추어 포도당 항상성 유지에 기여하게 된다(Heald, 1963; Warriss et al., 1988; Edwards et al., 1999). 따라서 타 동물에 비하여 조류의 높은 대사율(metabolic rate)의 유지는 간의 glycogenolysis와 gluconeogenesis로부터 유래된 포도당의 공급이 매우 중요함을 보여준다(Tinker et al., 1986). 그러나 환경적 스트레스와 포도당 대사 관련 유전자들의 발현에 대한 연구는 초보적인 수준이며, 이에 대한 체계적인 연구가 필요하다고 사료된다.

적 요

본 연구는 밀사에 의한 환경스트레스가 닭의 품종에 따라 스트레스 및 대사 연관 유전자들의 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 실시하였다. 공시계는 한국재래닭과 백색레그혼으로 두 품종 모두 40주령 때 대조구(540 cm²/수) 및 고밀도구(311 cm²/수)로 분리하고, 50주령까지 10주간 사육하였다. 사양시험 종료 후, 각 개체의 간으로부터 total RNA를 추출하고, 스트레스, 소포체(ER) 스트레스 및 대사 연관

유전자들의 발현을 real-time PCR을 이용하여 분석하였다. 한국재래계는 분석된 모든 스트레스 표지 유전자들의 발현이 밀사구와 대조구 사이에 유의적인 변화를 보이지 않았다. 그러나 백색레그혼의 경우, HSP70과 HSP90α 유전자들의 발현이 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 분석된 ATF6, GRP78, SREBP2 등의 발현은 품종 간 차이를 볼 수 없었지만, XBP1의 경우 백색레그혼이 한국재래계에 비하여 높은 발현을 보였다($P<0.05$). 분석된 유전자들 중 FABP4, FATP1, ACSL1 등의 경우, 한국재래계에 비하여 백색레그혼에서 높은 유전자 발현을 보였다($P<0.05$). GLUT의 발현은 품종 간에는 영향을 받지 않지만, 밀사에 의한 영향을 받고 있음을 보여주었다. 고밀도사양 체계는 닭의 품종과 관계없이 스트레스 요인이 될 수 있으며, 닭의 품종이나 개량의 정도에 따라 스트레스 반응에 대한 유전적 차이가 있음을 시사하고, 또한 밀사와 같은 환경적 스트레스는 간의 지방 및 포도당 대사에 영향을 미칠 수 있음을 보여주었다.

(색인어 : 스트레스, 유전자 발현, 간, 닭)

사 사

본 논문은 GSP 사업 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Al-Aqil A, Zulkifli I 2009 Changes in heat shock protein 70 expression and blood characteristics in transported broiler chickens as affected by housing and early age feed restriction. *Poult Sci* 88(7):1358-1364.
- Bedu E, Chainier F, Sibille B, Meister R, Dallevet G, Garin D, Duchamp C 2002 Increased lipogenesis in isolated hepatocytes from cold-acclimated ducklings. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(5):R1245-1253.
- Beloor J, Kang HK, Kim YJ, Subramani VK, Jang IS, Sohn SH, Moon YS 2010 The effect of stocking density on stress related genes and telomeric broiler chickens. *Asian-Aust J Anim Sci* 23:437-443.
- Borradaile NM, Han X, Harp JD, Gale SE, Ory DS, Schaffer JE 2006 Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res* 47(12):2726-2737.
- Braun EJ, Sweazea KL 2008 Glucose regulation in birds.

- Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 151(1):1-9.
- Butler EJ 1975 Lipid metabolism in the fowl under normal and abnormal circumstances. Proc Nutr Soc 34(1):29-34.
- Cahaner A, Ajuh JA, Siegmund-Schultze M, Azoulay Y, Druyan S, Zárata AV 2008 Effects of the genetically reduced feather coverage in naked neck and featherless broilers on their performance under hot conditions. Poult Sci 87(12): 2517-2527.
- Carver FM1, Shibley IA Jr, Pennington JS, Pennington SN 2001 Differential expression of glucose transporters during chick embryogenesis. Cell Mol Life Sci 58(4):645-652.
- Cnop M, Foufelle F, Velloso LA 2012 Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. Trends Mol Med 18(1): 59-68.
- Craig JV, Craig JA, Vargas Vargas J 1986 Corticosteroids and other indicators of hens' well-being in four laying-house environments. Poult Sci 65(5):856-863.
- Davison TF, Freeman BM, Rea J 1985 Effects of continuous treatment with synthetic ACTH1-24 or corticosterone on immature *Gallus domesticus*. Gen Comp Endocrinol 59(3): 416-423.
- Deeb N, Cahaner A 1999 The effects of naked neck genotypes, ambient temperature, and feeding status and their interactions on body temperature and performance of broilers. Poult Sci 78(10):1341-1346.
- Dupont J, Dagou C, Derouet M, Simon J, Taouis M 2004 Early steps of insulin receptor signaling in chicken and rat: apparent refractoriness in chicken muscle. Domest Anim Endocrinol 26(2):127-142.
- Gornati R, Papis E, Simona R, Genciana T, Marco S, Giovanni B 2004 Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Gene 341:111-118.
- Hansen SW 1996 Selection for behavioural traits in farm mink. Applied Animal Behaviour Sci 49:137-148.
- Heald PJ 1963 The metabolism of carbohydrate by liver of the domestic fowl. Biochem J 86:103-110.
- Heckert RA, Estevez I, Russek-Cohen E, Pettit-Riley R 2002 Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. Poult Sci 81(4):451-457.
- Kono T, Nishida M, Nishiki Y, Seki Y, Sato K, Akiba Y 2005 Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. Br Poult Sci 46(4):510-515.
- Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method. Methods 25(4):402-408.
- Mashaly MM, Webb ML, Youtz SL, Roush WB, Graves HB 1984 Changes in serum corticosterone concentration of laying hens as a response to increased population density. Poult Sci 63(11):2271-2274.
- McIlroy SG, Goodall EA, McMurray CH 1987 A contact dermatitis of broilers-epidemiological findings. Avian Pathol 16(1):93-105.
- Mumma JO, Thaxton JP, Vizzier-Thaxton Y, Dodson WL 2006 Physiological stress in laying hens. Poult Sci 85(4):761-769.
- O'Hea EK, Leveille GA 1968 Lipogenesis in isolated adipose tissue of the domestic chick (*Gallus domesticus*). Comp Biochem Physiol 26(1):111-120
- Price EO 2002 Animal Domestication and Behavior. Wallingford: CABI Publishing. 297 p.
- Puvadolpirod S, Thaxton JP 2000 Model of physiological stress in chickens 4. Digestion and metabolism. Poult Sci 79: 383-390.
- Renli Q, Chao S, Jun Y, Chan S, Yunfei X 2012 Changes in fat metabolism of black-bone chickens during early stages of infection with Newcastle disease virus. Animal 6(8): 1246-1252.
- Sandercock DA, Hunter RR, Mitchell MA, Hocking PM 2006 Thermoregulatory capacity and muscle membrane integrity are compromised in broilers compared with layers at the same age or body weight. Br Poult Sci 47:322-329.
- Sharma NK, Das SK, Mondal AK, Hackney OG, Chu WS, Kern PA, Rasouli N, Spencer HJ, Yao-Borengasser A, El-bein SC 2008 Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. J Clin Endocrinol Metab 93(11):4532-4541.
- Siegel HS, Van Kampen M 1984 Energy relationships in growing chickens given daily injections of corticosterone. Br Poult Sci 25(4):477-485.
- Sijtsma SR, West CE, Rombout JH, Van der Zijpp AJ 1989 Effect of Newcastle disease virus infection on vitamin A metabolism in chickens. J Nutr 119(6):940-947.

- Sohn SH, Subramani VK, Moon YS, Jang IS 2012 Telomeric DNA quantity, DNA damage, and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens. *Poult Sci* 91(4):829-836.
- Sohn SH, Cho EJ, Park DB, Jang IS, Moon YS 2014 Comparison of stress response between Korean Native Chickens and single comb White Leghorns subjected to a high stocking density. *Korean J Poult Sci* 41(2):115-125.
- Soleimani AF, Zulkifli I, Omar AR, Raha AR 2011 Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. *Poult Sci* 90(7):1435-1440.
- Soleimani AF, Zulkifli I, Omar AR, Raha AR 2012 The relationship between adrenocortical function and Hsp70 expression in socially isolated Japanese quail. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 161(2):140-144.
- Tinker DA, Brosnan JT, Herzberg GR 1986 Interorgan metabolism of amino acids, glucose, lactate, glycerol and uric acid in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biochem J* 15; 240(3):829-836.
- Warriss PD, Kestin SC, Brown SN, Bevis EA 1988 Depletion of glycogen reserves in fasting broiler chickens. *Br Poult Sci* 29(1):149-154.
- Zulkifli I, Dass RT, Norma MT 1999 Acute heat stress effects on physiology and fear-related behaviour in red jungle fowl and domestic fowl. *Can J Anim Sci* 79:165-170.
-
- Received Feb. 4, 2015, Revised Feb. 24, 2015, Accepted Mar. 9, 2015