

닭에서 사육밀도 및 Lipopolysaccharide 투여가 면역장기 무게, 혈액 생화학적 성상 및 친염증 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향

장인석[†] · 송민혜 · 김하나 · 문양수 · 손시환
경남과학기술대학교 동물생명과학과, 동물생명산업센터

Effects of Stocking Density and Lipopolysaccharide on Immune Organ Weights, Blood Biochemical Profiles and the mRNA Expression of Pro-inflammatory Cytokines in Chicks

In-Surk Jang[†], Min-Hye Song, Ha-Na Kim, Yang Soo Moon and Sea Hwan Sohn
*Dept. of Animal Science and Biotechnology, and the Regional Animal Research Center (RAIC),
Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea*

ABSTRACT This study was performed to investigate the effects of the stocking density (standard stocking density (SSD, 495 cm²/bird)) vs. high stocking density (HSD, 245cm²/bird) and challenge with lipopolysaccharide (LPS, 5mg/kg BW) on the stress-related physiological indicators in chicks. There was a significant ($p<0.05$) decrease in body weight, but not in the weight of immune organs, between the SSD and HSD groups. The LPS group resulted in a significant ($p<0.05$) increase in the weights of the thymus and bursa of fabricius compared with the SSD group. Plasma biochemical components, including aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), blood urea nitrogen, Ca, P, creatine kinase and uric acid, markedly ($p<0.05$) increased in the LPS birds, although no difference in these parameters was observed between the SSD and HSD birds. Furthermore, the birds challenged with LPS showed a significant ($p<0.05$) increase in the plasma corticosterone level, although this hormone did not differ between the SSD and HSD groups. In the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines, hepatic IL-1 β , IL-6 and iNOS in the LPS group significantly ($p<0.05$) increased compared with those in the SSD group. Thymic mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and IL-18 in the LPS group also significantly ($p<0.05$) increased compared with those in the other groups. In addition, mRNA expression of IL-1 β in the bursa of fabricius of the LPS group increased ($p<0.05$) without affecting the other cytokines. Under high stocking density, thymic IL-1 β was the only cytokine that was up-regulated compared with the SSD group. In conclusion, an acute stress induced by LPS challenge profoundly affected immune organ weight, blood biochemical profiles and pro-inflammatory cytokine expression, while chronic stress did not markedly affect biochemical and immunological parameters, suggesting that chicks under high stocking density could be adapted to prolonged stressors.

(Key words: stocking density, LPS, physiological indicators, chicks)

서 론

닭에서 사육환경 및 감염 등과 같은 다양한 외적 요인에 따른 생리학적 반응 정도를 조사하는 것은 사양, 육종, 동물 복지 등 전 분야에서 다양한 연구가 진행되고 있다. 닭의 사육 시 생리적 반응에 가장 많은 영향을 미칠 수 있는 요인으로는 사육밀도, 온도(열 및 저온), 병원균 감염, 사료제한 등이 있다. 이들 다양한 스트레스 요인들은 닭 사육 시 노출되

는 시간과 반복 빈도에 따라 급성 및 만성 스트레스로 크게 구분될 수 있다(Shini et al., 2009). 급만성 스트레스 요인들은 닭의 생리학적 지표 및 행동학적 반응에 유의한 영향을 미쳐 체내 항상성, 생산성과 동물복지에 심각한 영향을 초래하는 것으로 보고되고 있다(Hangalapura et al., 2006; Jang et al., 2014ab; Johnson et al., 1992; Xie et al., 2015).

닭의 밀사사육은 만성 스트레스의 대표적인 형태로 닭의 생리적 및 행동학적 반응에 심각한 영향을 미쳐 면역저하로

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

질병에 쉽게 노출되고, 동물복지에 중대한 영향을 초래한다(Vanhonacker and Verbeke, 2009; Puvadolpirod and Thaxton, 2000). 현재 가금생산 농가에서는 고밀도사육 시 개체 성장률은 감소하나, 단위면적당 생산성은 증가되므로 이러한 사육방식을 지속하고 있다(Feddes et al., 2002). 그러나 고밀도사육은 장기간의 사육환경에 따라서 야기되는 것으로 닭의 영양소 요구량, 대사작용, 동물행동 및 질병 저항성에 중요한 변화를 야기하여 생산성에 부정적인 영향을 초래한다(Mireles et al., 2005; Vanhonacker and Verbeke, 2009). 최근 닭에서 사육밀도, 사육온도 등과 같은 만성 스트레스 요인이 친염증 사이토카인에 영향을 미쳐 면역작용에도 부정적인 영향을 미친다는 연구가 발표되었다(Hangalapura et al., 2006; Jang et al., 2014a). 그러나 지금까지 연구에 의하면 고밀도 사육에 따른 닭의 동물복지에 관련된 다양한 지표들은 많은 요인들의 상호작용 및 복잡성으로 특히 면역관련 지표들의 일관성은 높지 않은 것으로 알려져 있다(Thaxton et al., 2006).

닭에서 질병 발생에 따른 심각한 영향을 초래하는 감염 스트레스는 급성스트레스의 대표적인 요인으로 초기 감염에 따라 체 조직에서 면역작용에 관련된 지표에 유의한 영향을 미친다(Baert et al., 2005). 닭에서 급성감염에 따른 반응은 다양한 지표를 분석하여 그 스트레스 정도를 조사할 수 있는데, 지금까지 연구에 따르면, 혈액 생화학적 성상의 변화, 백혈구 수, 스트레스 호르몬, 항체, 사이토카인 등과 같은 것들이 급성 스트레스 단계에서 발현 지표들로 알려져 있다(Koj 1996; Kaiser et al., 2009; Leshchinsky and Klasing, 2003; Mireles et al., 2005; Pesti and Howarth, 1983). 특히 친염증 및 항염증 사이토카인의 발현 정도가 급성감염지표로서 최근 많은 연구가 진행되고 있다(Shini et al., 2010). 이러한 급성 및 만성 스트레스 모두 닭의 면역작용에 심각한 영향을 초래하여 질병 감수성이 증가되어 사육농가에서는 생산성의 저하로 이어질 수 있다(Mireles et al., 2005). 따라서 닭에서 국내의 사육환경 및 질병 요인에 따라 체 조직에서 나타나는 각종 스트레스 지표의 반응을 조사하여 닭의 합리적 사육방법을 제시하는 자료를 확보하는 것은 동물복지에 근거한 사육방법의 도입에서 중요한 연구 분야이다.

본 연구는 닭에서 고밀도사육(만성) 및 LPS(급성)에 의한 인위적 스트레스 유발 시 면역장기 무게, 혈액 생화학적 지표 및 친염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokines) 발현과 같은 스트레스 표지를 조사하여 동물복지에 근거한 닭의 사육방법을 설정하는데 필요한 기초 자료를 획득하고자 실시되었다.

재료 및 방법

1. 시험동물 및 시험설계

시험동물은 육계 수컷 1일령 Ross(308)종 198수로서 계열화 회사에서 공급받아 2일간의 적응 기간을 거쳐 3일령에 시험에 공시하였다. 시험설계로서 표준밀도사육군 대조군(SSD군, 495 cm²/수, n=10, 90수) 및 고밀도사육군(HSD군, 245 cm²/수, n=6, 108수)으로 설정하고, 35일령까지 사양시험을 하였다. 사양시험 종료 후 표준밀도사육군(대조군)에서 평균체중에 가까운 16 수를 선발하여 8 수는 lipopolysaccharide(LPS, Sima L2630, 5 mg/kg BW)을 익대정맥에 주입하고, 3시간 후에 희생하였다. 대조군(SSD군)과 HSD군 각각 8수는 생리식염수를 익대정맥에 투여하였다. 따라서 본 시험의 처리군은 대조군(SSD), 고밀도사육군(HSD) 및 LPS 투여군(LPS) 등 모두 3처리군에서 각종 생리적 지표를 분석하였다.

2. 사양관리

본 시험 사료는 옥수수 및 대두박 위주의 상업용 사료로서 대사에너지, 조단백질 등 기타 영양소 수준은 한국사양표준에 따라 제조한 육계전기(3~21일령) 및 후기(22~35일령) 사료를 사용하였다. 전기사료는 조단백질 22%, 조지방 4.0%, 조섬유 8.0%, 조회분 8.0%, lysine 1.38%, Ca 0.8%, P 1.0% 및 대사에너지 3.10 Mcal/kg 수준으로 배합되었으며, 후기사료는 조단백질 18.5%, 조지방 4.0%, 조섬유 8.0%, 조회분 8.0%, lysine 1.08%, Ca 0.9%, P 0.75% 및 대사에너지 3.2 Mcal/kg 수준으로 배합하였다. 사료는 자유급이하고, 음수는 자동급수기로서 공급하였으며 기타 사양관리 기준은 경남과학기술대학교 종합농장의 사육기준에 따랐다. 케이지(90 cm × 90 cm × 66 cm)에는 사료조와 자동 음수장치기 부착된 철망 형태를 사용하였다. 점등은 전 사양기간 동안 24시간 중일 전등을 실시하였고, 계사온도는 일령별로 32℃에서 24℃까지 사육실 온도관리 프로그램에 따라 환기량을 조절하였다.

3. 조직 샘플

표준밀도(SSD군), 고밀도(HSD군) 및 LPS군에서 각 처리군별 8수를 희생하여 혈액, 간, 흉선, 비장, F-낭을 채취하고, 장기무게는 체중 100 g당 상대적 무게로 나타내었다. 혈액은 sodium heparin이 처리된 vacutainer(BD vacutainer, USA)에서 혈장을 분리하였으며, 면역 장기는 -70℃ 냉동고에 분석 시 까지 보관하였다.

4. 분석항목 및 분석방법

1) 혈중 생화학 성분 및 Corticosterone 분석

각 처리군별(n=8) 혈장에서 aspartate transaminase, alanine transaminase, blood urea nitrogen, alkaline phosphatase, glucose, total protein, albumin, calcium, phosphorus, triglyceride, creatine kinase, creatine, uric acid, cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol 및 low-density lipoprotein cholesterol은 자동혈액분석기(Hitachi 747, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)로 분석하였다. 혈중 corticosterone 수준은 corticosterone EIA kit(No ADI-901-097, Enzo Life Science, USA)를 사용하여 제시된 분석방법에 따라 ELISA(Vmax, Molecular Device Co. USA)로서 405 nm에서 분석하였다.

2) 면역 장기에서 친염증 Cytokine mRNA 분석

(1) 조직에서 RNA 분리

각 처리군별(n=8)로 공시동물의 조직으로부터 RNAsol™ kit(Tel-Test, Inc, Friendwood, TX, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 조직을 RNazol 용액에서 균질화한 후 chloroform을 혼합한 후 원심분리하고, 2-propanol을 혼합하여 RNA를 침전시켜 분리하였으며, 분리된 RNA는 Reverse transcription system(Promega Corp. WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

(2) Semi-Quantitative PCR을 이용한 mRNA 발현 친염증 사이토카인으로 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-18

및 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 등의 mRNA 발현 분석을 위한 primer는 Table 1과 같다. 추출한 RNA를 이용하여 분광광도계에서 OD 값을 측정하여 RNA를 10 μ g으로 정량한 후 oligo dT(Invitrogen Inc. CA, USA), 1 μ L와 dH₂O를 넣어 최종 부피가 12 μ L가 되도록 하여 RT를 제조하였다. RT-product 2.5 μ L, MgCl₂(Promega Corp. WI, USA) 2.0 μ L, 2.5 mM dNTP 2.5 μ L, 10 \times PCR buffer(TaKaRa Inc. Shiga, Japan) 2.5 μ L, 10 pmol primer 2.5 μ L, Taq polymerase(TaKaRa Inc. Shiga, Japan) 0.2 μ L, DEPC H₂O 10.3 μ L를 넣어 최종부피를 25 μ L로 맞춘다. PCR 조건은 혈액에서 94 $^{\circ}$ C에서 3분, [94 $^{\circ}$ C에서 30초, 62~50 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초] \times 32~35 cycle, 72 $^{\circ}$ C에서 10분, 4 $^{\circ}$ C에서 ∞ 로 실시하였으며, 조직에서는 94 $^{\circ}$ C에서 3분, [94 $^{\circ}$ C에서 30초, 59 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초] \times 40 cycle, 72 $^{\circ}$ C에서 10분, 4 $^{\circ}$ C에서 ∞ 로 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 Bio-Imaging System(Mahale HaHamisha, Israel)을 이용하여 density를 측정하여 β -actin량에 대한 상대적 density를 계산하여 mRNA양을 확인하였다.

5. 통계 분석

사육밀도 및 LPS 투여에 따른 장기무게 등과 혈액 생화학 성분, 스트레스호르몬 및 사이토카인 발현은 Proc-GLM (SAS, 1996)에 의해 분산분석을 실시하였으며, 처리 간 비교는 Duncan 다중검정 방법에 의해 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결 과

Table 1. The primer sequences used for the experiment

Genes	Direction	Sequence(5' to 3')	Size (bp)	Accession No.
IL-1 β	Forward	GCT CTA CAT GTC GTG TGT GA	167	AJ245728
	Reverse	TGT CGA TGT CCC GCA TGA		
IL-6	Forward	GCT CGG AAC AAC CTC AAC CT	247	EU170468
	Reverse	CTG GGA TGA CCA CTT CAT CG		
IL-18	Forward	GGA ATG CGA TGC CTT TTG TA	219	NM204609
	Reverse	TCT ACC TGG ACG CTG AAT GC		
iNOS	Forward	GCA TCC AAA ATA TGA GTG GT	274	U34045
	Reverse	AAG CAC AGC CAC ATT TAT CT		
β -actin	Forward	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA	540	NM001101
	Reverse	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GA		

1. 사육밀도 및 LPS 투여에 따른 체중 및 면역 장기무게
 사육밀도(SSD군 495 cm²/수 vs. HSD군 245 cm²/수) 및 LPS(5 mg/kg BW) 투여에 따른 닭의 체중 및 면역장기 무게를 조사한 결과는 Table 2에 제시한 바와 같다. 대조군(SSD)과 고밀도사육군(HSD) 간의 비교 시 체중은 유의하게($p<0.05$) 감소되는 것으로 나타나, 고밀도 사육 시 닭에서 심각한 스트레스가 유발되었음을 알 수 있었다. 그러나 간, 비장 및 흉선 등 면역장기의 무게는 사육밀도에 따른 차이가 없는 것으로 나타났다. LPS 투여 후 조사한 결과, 체중은 변화가 없었으나, 장기무게는 대조군에 비해 흉선과 F-낭의 무게가 유의하게($p<0.05$) 증가되었으며, 간과 비장무게도 증가되는 경향을 보였다. 이상의 결과, 고밀도 사육과 LPS 투여에 따른 스트레스 요인은 체중 및 면역장기 무게에 미치는 영향이 각각 다르게 나타났다.

2. 사육밀도 및 LPS에 따른 혈액생화학 성상 및 Corticosterone

고밀도사육 및 LPS 투여에 따른 혈액 생화학적 성상을 보면(Table 3), 간 독성 지표인 AST, ALT 및 BUN 수준은 SSD군과 HSD군 간에서는 차이가 없었지만, LPS군에서 이들 지표가 현저히($p<0.05$) 증가되었다. Glucose 농도는 SSD군과

Table 2. Effects of stocking density and lipopolysaccharide challenge on body and immune-related organ weights in broiler chicks

Item	Treatment		
	SSD	HSD	LPS*
Final BW (35 d) (g)	1,711.5±55.4 ^a	1,496.1±28.2 ^b	1,687.8±47.1 ^a
Liver (g/100 g BW)	2.51±0.43 ^{ab}	2.09±0.22 ^b	2.88±0.51 ^a
Spleen (g/100 g BW)	0.14±0.07 ^{ab}	0.11±0.02 ^b	0.19±0.08 ^a
Thymus (g/100 g BW)	0.13±0.03 ^b	0.15±0.05 ^b	0.26±0.09 ^a
Bursa of fabricius (g/100 g BW)	0.07±0.04 ^b	0.09±0.05 ^{ab}	0.15±0.04 ^a

* Eight birds from the SSD group were selected for the injection of LPS and eight birds per each group were sacrificed to obtain immune organs.

* Standard stocking density (SSD), high stocking density (HSD) and LPS (5 mg/kg BW).

^{ab} Values (Mean±S.D., n=8) with different superscripts differ significantly ($p<0.05$) among treatments.

HSD군은 차이가 없었지만 LPS군에서 HSD군보다 현저히($p<0.05$) 감소되었다. 혈중 Ca, P, CK, uric acid 함량 모두 LPS군에서 다른 처리군에 비해 유의하게($p<0.05$) 높았다. Total cholesterol 농도는 HSD군에서 SSD군보다 높게 나타났으며, SSD군과 LPS군 간에는 차이가 없었다. 한편, Total protein, albumin, creatinine, triglyceride, LDL-cholesterol 등은 비슷한 수준을 보였다. 한편, 고밀도사육 및 LPS 투여에 따른 혈중 corticosterone 수준(Fig. 1)은 SSD군에서 가장 낮게 나타났으나, HSD군 간에는 차이가 없었다. LPS군은 SSD 및 HSD군에 비해 유의적($p<0.05$)으로 호르몬 농도가 증가되었다.

3. 사육밀도 및 LPS 투여에 따른 친염증 Cytokine 발현

고밀도사육 및 LPS 투여에 따른 친염증 cytokine mRNA의 상대적 발현량을 조사한 결과(Table 4), 간 조직에서 IL-1 β , IL-6 및 iNOS mRNA 발현은 LPS군에서 SSD 및 HSD군에 비해 유의적으로($p<0.05$) 증가하였다. 그러나 HSD군은 SSD군과 비교 시 간 조직의 친염증 사이토카인 mRNA 발현에는 차이가 없었다. 흉선조직에서 IL-1 β , IL-6, IL-18 mRNA 유전자 대부분은 LPS군에서 SSD군 또는 HSD군에 비해 유의하게($p<0.05$) 증가되었다. 고밀도사육군에서 흉선의 IL-1 β 는 대조군에 비해 현저히($p<0.05$) 증가되었다. F-낭에서 사이토카인 발현을 살펴보면, IL-1 β 는 LPS군에서 현저히($p<0.05$) 증가되었으나, 다른 사이토카인들의 발현은 차이가 없었다. 한편, IL-6 mRNA 발현은 HSD군에서 SSD와 LPS군들에 비해 오히려 감소되었다.

고찰

본 연구는 만성스트레스 요인으로 고밀도사육과 및 급성 스트레스 요인으로 LPS 투여에 따른 닭의 체중, 면역장기 무게, 혈액 생화학적 성상 및 면역관련 친염증 사이토카인의 발현을 조사하여 스트레스 bio-marker로서 활용가능성을 위해 이들 지표들의 변화 양상을 조사하였다. 먼저 사육밀도(표준사육밀도군 495 cm²/수 vs. 고밀도사육군 245 cm²/수)에 따른 조사결과, 고밀도사육군에서 체중이 현저히 감소되었다. 또한 증체량 및 사료섭취량 모두 현저히 감소되고, 폐사율 역시 약 4배 이상 증가되는 것으로 나타났다(자료 미제시). 이러한 결과로 보아 고밀도사육에 따라 닭의 생산성에 심각한 스트레스가 유발되었음을 알 수 있었다. 사육밀도와 생산성에 관련된 결과는 선행연구들과 거의 일치되는 것으로 다른 연구들에서도 사육밀도와 닭의 생산성과는 반비례의 관계가 있는 것으로 보고하였다(Beloor et al., 2010; Feddes et al.,

Table 3. Effects of stocking density and lipopolysaccharide challenge on plasma biochemical profiles in broiler chicks

Item**	Treatment*		
	SSD	HSD	LPS
AST (U/L)	210.80±33.50 ^b	238.50±34.40 ^b	1,248.80±495.50 ^a
ALT (U/L)	1.88±0.64 ^b	2.38±1.19 ^b	7.00±3.16 ^a
BUN (mg/dL)	0.36±0.15 ^b	0.34±0.12 ^b	1.52±1.04 ^a
ALP (U/L)	6,963.30±3,004.90	8,278.80±3,392.60	5,828.80±1,639.80
GLU (mg/dL)	220.90±31.40 ^{ab}	244.80±44.30 ^a	172.20±55.50 ^b
TP (mg/dL)	3.35±0.80	2.99±0.53	2.94±0.76
ALB (mg/dL)	0.86±0.09	0.94±0.13	1.08±0.28
Ca (mg/dL)	10.53±0.64 ^b	10.49±0.66 ^b	12.44±1.52 ^a
P (mg/dL)	6.85±0.73 ^b	6.89±0.87 ^b	15.85±11.07 ^a
TG (g/dL)	43.88±14.64	37.88±18.13	55.40±17.62
CK (mg/dL)	4,600.00±3,222.70 ^b	5,446.90±1,937.20 ^b	13,221.60±2,009.00 ^a
CRE (mg/dL)	0.29±0.04	0.30±0.00	0.34±0.15
UA (mg/dL)	4.53±1.27 ^b	6.33±1.93 ^b	16.46±5.63 ^a
CHO (mg/dL)	96.50±14.06 ^b	129.12±11.52 ^a	91.00±10.44 ^b
HDL (mg/dL)	64.38±14.44 ^{ab}	76.38±11.11 ^a	47.40±9.96 ^b
LDL (mg/dL)	29.00±7.60	27.00±9.83	30.20±7.98

* Standard stocking density (SSD), high stocking density (HSD) and LPS (5 mg/kg BW).

** AST (aspartate transaminase), ALT (alanine transaminase), BUN (blood urea nitrogen), ALP (alkaline phosphatase), GLU (glucose), TP (total protein), ALB (albumin), Ca (calcium), P (phosphorus), CHO (cholesterol), TG (triglyceride), CK (creatin kinase), CRE (creatin), UA (uric acid), HDL (high-density lipoprotein cholesterol) and LDL (low-density lipoprotein cholesterol)

^{a,b} Values (Mean±S.D., n=8) with different superscripts differ significantly ($p<0.05$) among treatments.

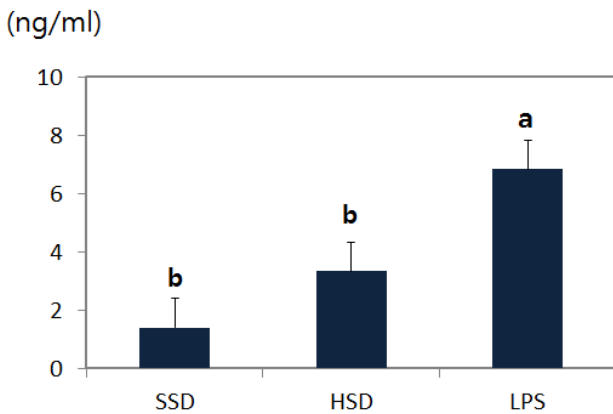


Fig. 1. Effects of stocking density and LPS challenge on plasma corticosterone (ng/mL) in broiler chicks. Standard stocking density (SSD), high stocking density (HSD) and LPS (5 mg/kg BW).

^{a,b} Values (Mean±S.D., n=8) with different superscripts differ significantly ($p<0.05$) among treatments.

2002; Simitzis et al., 2012; Zuowei et al., 2011). 본 연구팀에서 Ross와 Cobb 품종을 이용하여 사육밀도(표준밀도구 0.046 m²/수 vs. 고밀도구 0.023 m²/수)에 따른 생산성을 조사한 결과, 두 품종 모두 고밀도 사육에서 체중과 사료섭취량이 현저하게 감소되어 이번 연구결과와 일치한다(Jang et al., 2014b).

고밀도사육에 따른 간, 비장 및 흉선 등과 같은 면역장기의 무게는 차이가 없었으나, LPS 투여 후 이들 무게는 대조군에 비해 흉선과 F-낭이 급격히 증가되고, 간과 비장 무게도 증가되는 경향을 보였다. 닭에서 각종 스트레스가 림프기관의 무게에 영향을 미치는 것으로(Xie et al., 2000) 보고되고 있으나, 사육밀도가 면역장기의 무게에 직접적으로 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 본 시험결과와 유사하게 Jang et al.(2014b)도 육계에서 사육밀도는 간과 비장의 무게는 영향을 미치지 않는 것으로 보고하였다. 또한 Buijs et al. (2009)도 여러 사육밀도(6, 15, 23, 33, 35, 41, 47, and 56 kg/

Table 4. Semi-quantification of mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines of the liver, spleen, thymus and bursa of Fabricius in broiler chicks housed in standard stocking density (SSD), high stocking density(HSD) and challenged with lipopolysaccharide(LPS)

Item	Treatment*			
	SSD	HSD	LPS	
Liver	IL-1 β	2.41 \pm 1.02 ^b	3.02 \pm 0.69 ^b	4.69 \pm 1.52 ^a
	IL-6	0.66 \pm 0.50 ^b	0.44 \pm 0.26 ^b	2.86 \pm 1.42 ^a
	IL-18	2.86 \pm 0.91	2.98 \pm 1.11	4.58 \pm 1.10
	iNOS	0.49 \pm 0.05 ^b	0.51 \pm 0.08 ^b	0.61 \pm 0.10 ^a
Thymus	IL-1 β	0.87 \pm 1.34 ^b	4.18 \pm 0.86 ^a	5.44 \pm 3.53 ^a
	IL-6	0.55 \pm 0.22 ^b	0.40 \pm 0.42 ^b	2.58 \pm 1.14 ^a
	IL-18	0.83 \pm 0.16 ^b	0.69 \pm 0.24 ^b	1.42 \pm 0.43 ^a
	iNOS	1.01 \pm 0.18	0.84 \pm 0.17	1.20 \pm 0.32
Bursa of fabricius	IL-1 β	1.46 \pm 0.81 ^b	1.89 \pm 1.11 ^b	6.29 \pm 1.97 ^a
	IL-6	0.97 \pm 0.22 ^a	0.23 \pm 0.12 ^b	1.34 \pm 0.58 ^a
	IL-18	0.06 \pm 0.06	0.27 \pm 0.34	0.08 \pm 0.12
	iNOS	0.66 \pm 0.08	0.61 \pm 0.12	0.68 \pm 0.11

Levels of all mRNAs were expressed as the ratio of signal intensity for genes relative to that for β -actin.

* Standard stocking density (SSD), high stocking density (HSD) and LPS (5 mg/kg BW).

^{a,b} Values (Mean \pm S.D., n=8) with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$) among treatments.

BW/m²)에서 시험한 결과, F-낭 등과 같은 장기 무게는 사육 밀도에 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 그러나 Simitzis et al.(2012)은 저밀도사육 시 간의 무게가 증가되는 것으로 보고하여, 본 시험결과와 다소 상이한 결과를 보였다. 한편, LPS 투여에 따른 면역장기의 무게 변화는 본 결과와 유사하게 Mireles et al.(2005)도 육계에게 LPS(1 mg/kg BW) 투여는 간의 무게를 증가시킨다고 보고한바, 이는 LPS에 따른 스트레스 반응으로 면역기관에서 급성 면역반응 단백질(acute phase protein) 생성을 촉진하기 때문이라 보고했다(Xie et al., 2000).

고밀도사육 및 LPS 투여에 따른 혈액 생화학적 성분의 변화에서 AST, ALT 및 BUN 수준은 고밀도사육에 따른 차이는 없었지만, LPS 투여 시 이들 지표가 현저히 증가되었다. 다른 혈액 생화학 성분 역시 고밀도사육에 따른 차이는 없었지만, LPS 투여 시 Ca, P, uric acid, creatine kinase(CK) 수준 모두 현저히 증가되었다. 혈중 corticosterone 농도 역시 대

조군에서 가장 낮았고, LPS군에서 현저히 증가되었다. 혈액 AST, ALT 등은 간에서 탄수화물 및 단백질 대사에 관여하는 효소로서 간 독성지표(Giannini et al., 1999)이며, CK는 근육 손상지표(Hagiwara et al., 1989)로 잘 알려져 있다. LPS 투여와 같이 체 조직에서 산화 스트레스가 증가할 경우, 본 실험의 결과처럼 혈장 AST, ALT 또는 CK 수준이 증가되는 것으로 보고되었다(Jing et al., 2014; Li et al., 2012). 혈장 uric acid과 creatinine 수준은 체 조직의 산화 스트레스 지표로 사용되는 바(Hartman et al., 2006; Perrone et al., 1992), 본 시험에서 LPS 투여 후 산화 스트레스가 증가되어 조직기능의 손상이 발생하는 것으로 생각된다. 또한 LPS 투여 시 닭에서 뼈 조직의 골밀도 저하로 혈중 Ca과 P의 수준이 감소되는 것으로 알려져 있다(Mireles et al., 2005). 본 시험결과와 유사하게 LPS 투여와 같은 급성 스트레스에서 혈중 corticosterone 수준이 증가되는 것은 잘 알려져 있다(Baert et al., 2005; Shini et al., 2008). 한편, 고밀도사육과 같은 만성스트레스는 닭에서 생산성 저하와 이상행동 등의 스트레스를 유발하지만, 혈액 corticosterone을 포함한 생화학 성분은 장기간의 적응성 반응결과로서 특이적 변화가 적은 것으로 보고되고 있다(Ho-usehmand et al., 2012).

닭에서 면역작용은 사육밀도(Beloor et al., 2010; Buijs et al, 2009), 질병(Baert et al., 2005; Shini et al., 2008), 환경온도(Hangalapura et al., 2006; Xie et al., 2015) 등에 따라 많은 영향을 받는다. 닭에서 사육밀도에 따른 면역항체 변화(Pohle and Cheng, 2009)와 LPS 투여에 따른 사이토카인의 특이적 반응 등이 적응성 면역반응에 중요한 영향을 미친다(Shini et al., 2008). 적응성 면역작용에서 IL-1 β , IL-6, IL-18 등과 같은 친염증 사이토카인은 면역 조직에 널리 발현되어 염증발현에 중요한 매개 역할을 한다(Kaiser et al., 2009). 면역염증 반응에 따라 iNOS는 L-arginine으로부터 nitric oxide(NO) 발생시켜 면역반응을 유기하며(Moncada and Higgs, 1995), IL-1 β , IL-6, TNF- α 등과 같은 친염증 사이토카인은 NO 발생과 밀접한 연관이 있다(Becherel et al., 1997). 본 시험결과 친염증 cytokine mRNA 발현을 조사한 결과, 간, 흉선 및 F-낭 등의 IL-1 β , IL-6, IL-18 또는 iNOS mRNA 발현은 LPS 투여에 따라 현저히 증가되었으나, 고밀도사육에서는 대부분의 면역장기에서 차이가 없었다. 이러한 결과로 보아 고밀도사육에 따른 만성스트레스는 친염증 사이토카인 발현에 미치는 영향은 적었으나, LPS 투여(감염성 급성스트레스)는 대부분의 면역기관에서 이들 사이토카인의 발현을 급격하게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 본 결과와 유사하게 육계를 다양한 사육밀도(20, 25, 20, 35, 40, 45 및 55 kg BW/m²)에서 사

육한 결과, iNOS에서 생성되는 NO 발생은 차이가 없었다고 하였다(Thaxton et al. 2006). Jang et al.(2014b)도 닭에서 사육밀도에 따른 간 조직의 IL-1 β , IL-6, IL-18 및 IFN- γ mRNA 발현은 본 연구와 유사하게 차이가 없음을 보고하였다. 따라서 닭에서 고밀도사육은 친염증 사이토카인의 발현에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 보이며, 이러한 것은 만성스트레스하에서 적응성 반응이 이루어졌기 때문으로 해석된다.

한편, LPS 투여에 따른 친염증 사이토카인의 발현은 본 결과와 유사하게 Leshchinsky and Klasing(2003)도 닭에서 LPS 접종 시 IL-1 β 와 IFN γ 발현이 촉진된다고 보고하였다. IL-1 β , IL-6 등 친염증 사이토카인은 급성스트레스에 따라 발현이 급격히 증가되는 것으로, 세포성 면역에서 친염증 사이토카인은 염증반응을 유기하여 항체 생산을 촉진한다(Nii et al., 2011). LPS에 따른 친염증 사이토카인은 iNOS 생성을 촉진하여 NO 발생을 촉진시킨다(Hussain and Qureshi, 1997). 또, 다른 연구에서 급성 스트레스 요인으로 corticosterone을 닭에게 투여 시 IL-1 β , IL-6, IL-18 등 친염증 사이토카인의 발현이 급격히 증가되는 것으로 보고하였다(Shini et al., 2010).

이상의 결과, 고밀도사육 및 LPS 투여에 따른 각각의 스트레스 요인은 면역장기 무게, 혈액 생화학 성분 및 친염증 사이토카인의 발현에 미치는 영향이 뚜렷이 다르게 나타났다. 고밀도사육에 따른 만성스트레스는 생산성에 직접적인 부정적 영향을 미치지 않으나, 면역장기무게, 혈액 생화학 성분, corticosterone 농도, 사이토카인 등은 다양한 요인들의 상호작용과 환경적응성에 따라 이들 지표들의 일관성은 낮았다. 그러나 LPS 투여에 따른 급성 감염스트레스는 혈액생화학적 성분과 면역기관의 친염증 사이토카인 발현이 급격히 증가시켜 급성스트레스 biomarker로 유용하게 활용될 수 있는 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 닭에서 사육밀도[(대조군(SSD) 495 cm²/수 vs. 고밀도사육군(HSD) 245 cm²/수] 및 LPS 투여(5 mg/kg BW)가 다른 각종 생리적 스트레스 지표에 미치는 영향을 조사하기 위해 실시되었다. 대조군, HSD군 및 LPS군(5 mg/kg BW)에서 체중 및 장기 무게를 조사한 결과, SSD군과 HSD군간 비교 시 체중은 고밀도사육 시 현저히($p<0.05$) 감소하였으나, 간, 비장 및 흉선 무게는 차이가 없었다. LPS 투여군에서는 대조군에 비해 흉선과 F-낭 무게가 유의적($p<0.05$)으로 증가하였다. 혈액 생화학적 성분에서 AST, ALT 및 BUN 수준은 SSD군과 HSD군 간에는 차이가 없었지만, LPS군에서 증가

되었다($p<0.05$). 혈중 Ca, P, CK, uric acid 수준 모두 LPS군에서 유의하게($p<0.05$) 높았다. 혈중 corticosterone 수준은 LPS군에서 SSD군과 HSD군에 비해 유의적($p<0.05$)으로 증가되었으나, SSD와 HSD군 간에는 차이가 없었다. 친염증 사이토카인 mRNA 발현을 조사한 결과, 간 조직의 IL-1 β , IL-6 및 iNOS mRNA 발현은 LPS군에서 SSD군에 비해 증가되었으나($p<0.05$), SSD군과 HSD군 간에는 차이가 없었다. 흉선 IL-1 β , IL-6, IL-18 mRNA 유전자 역시 LPS군에서 다른 군들에 비해 유의하게($p<0.05$) 증가되었다. HSD군에서 흉선의 IL-1 β 는 SSD군에 비해 현저히($p<0.05$) 증가되었다. F-낭의 IL-1 β 발현은 LPS군에서 SSD군에 비해 증가되었으나($p<0.05$), 다른 사이토카인은 차이가 없었다. 이상의 결과, 고밀도사육에 따른 만성스트레스 요인은 닭의 환경적응성에 따라 생산성을 제외한 다른 지표들의 변화는 적었으나, LPS 투여는 혈액 생화학성분 및 친염증 사이토카인 mRNA 발현을 현저하게 변화시켰다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(PJ011639062016)의 지원 및 경남과학기술대학교 동물생명산업센터(RAIC)의 장비활용사업으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Baert K, Duchateau L, De Boever S, Cherlet M, De Backer P 2005 Antipyretic effect of oral sodium salicylate after an intravenous *E. coli* LPS injection in broiler chickens. Br Poult Sci 46:137-143.
- Becherel PA, Chosidow O, Le Goff L, Frances C, Debre P, Mossalayi MD, Arock M 1997 Inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression by human keratinocytes during acute urticaria. Mol Med 3:686-694.
- 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.
- Buijs S, Keeling L, Rettenbacher S, Van Poucke E, Tuytens FA 2009 Stocking density effects on broiler welfare: Identifying sensitive ranges for different indicators. Poul Sci 88:1536-1543.
- Feddes JJ, Emmanuel EJ, Zuidhofs MJ 2002 Broiler perfor-

- mance, body weight variance, feed and water intake, and carcass quality at different stocking densities. *Poult Sci* 81:774-779.
- Giannini E, Botta F, Fasoli A, Ceppa P, Risso D, Lantieri PB, Celle G, Testa R 1999 Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio. *Dig Dis Sci* 44:1249-1253.
- Hagiwara Y, Shimo-Oka T, Okamura K, Ozawa E 1989 Basis for the assay of myogenic cell growth *in vitro* using creatine kinase activity as an index, with special reference to measurement of power ratio of transferrins in growth promotion. *Jpn J Pharmacol* 49:53-58.
- Hangalapura BN, Kaiser MG, Poel JJ, Parmentier HK, Lamont SJ 2006 Cold stress equally enhances *in vivo* proinflammatory cytokine gene expression in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Dev Comp Immunol* 30:503-511.
- Hartman S, Taleb SA, Geng T, Gyenai K, Guan X, Smith E 2006 Comparison of plasma uric acid levels in five varieties of the domestic turkey, *Meleagris gallopavo*. *Poult Sci* 85:1791-1794.
- Houshmand M, Azhar K, Zulkifli I, Bejo MH, Kamyab A 2012 Effects of prebiotic, protein level, and stocking density on performance, immunity, and stress indicators of broilers. *Poult Sci* 91:393-401.
- Hussain I, Qureshi MA 1997 Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. *Poult Sci* 76:1524-1530.
- Jang IS, Ko YH, Moon YS, Sohn SH 2014a Effects of vitamin C or E on the pro-inflammatory cytokines, HSP 70 and antioxidant status in broiler chicks under summer conditions. *Asian-Aust J Anim Sci* 27:749-756.
- Jang IS, Yun SH, Ko YH, Kim SY, Song MH, Kim JS, Sohn SH, Moon YS 2014b The effect of stocking density and strain on the performance and physiological adaptive responses in broiler chickens. *Kor J Poult Sci* 41:205-215.
- Jing M, Munyaka PM, Tactacan GB, Rodriguez-Lecompte JC, O K, House JD 2014 Performance, serum biochemical responses, and gene expression of intestinal folate transporters of young and older laying hens in response to dietary folic acid supplementation and challenge with *E. coli* lipopolysaccharide. *Poult Sci* 93:122-131.
- Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW 1992 Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 16:115-130. Review.
- Kaiser P, Wu Z, Rothwell L, Fife M, Gibson M, Poh TY, Shini A, Bryden AW, Shini A 2009 Prospects for understanding immune-endocrine interactions in the chicken. *Gen Comp Endocrinol* 163:83-91.
- Koj A 1996 Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1317:84-94. Review
- Leshchinsky TV, Klasing KC 2003 Profile of chicken cytokines induced by lipopolysaccharide is modulated by dietary *α*-tocopheryl acetate. *Poult Sci* 82:1266-1273.
- Li Q, Liu Y, Che Z, Zhu H, Meng G, Hou Y, Ding B, Yin Y, Chen F 2012 Dietary L-arginine supplementation alleviates liver injury caused by *E. coli* LPS in weaned pigs. *Innate Immun* 18:804-814.
- Mireles AJ, Kim SM, Klasing KC 2005 An acute inflammatory response alters bone homeostasis, body composition, and the humoral immune response of broiler chickens. *Poult Sci* 84:553-560.
- Moncada S, Higgs EA 1995 Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 9(13):1319-1330. Review.
- Nii T, Sonoda Y, Isobe N, Yoshimura Y 2011 Effects of LPS on the expression of proinflammatory cytokines and chemokines and the subsequent recruitment of immunocompetent cells in the oviduct of laying and molting hens. *Poult Sci* 90:2332-2341.
- Perrone RD, Madias NE, Levey AS 1992 Serum creatinine as an index of renal function: New insights into old concepts. *Clin Chem* 38:1933-1953. Review.
- Pesti GM, Howarth B 1983 Effects of population density on the growth, organ weights, and plasma corticosterone of young broiler chicks. *Poult Sci* 62:1080-1083.
- Pohle K, Cheng HW 2009 Comparative effects of furnished and battery cages on egg production and physiological parameters in White Leghorn hens. *Poult Sci* 88:2042-2051.
- Puvadolpirod S, Thaxton JP 2000 Model of physiological stress in chickens 4. Digestion and metabolism. *Poult Sci* 79:383-390.
- Shini S, Huff GR, Shini A, Kaiser P 2010 Understanding

- stress-induced immunosuppression: Exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. *Poult Sci* 89:841-851.
- Shini S, Kaiser P, Shini A, Bryden WL 2008 Biological response of chickens induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149:324-333.
- Shini S, Shini A, Huff GR 2009 Effects of chronic and repeated corticosterone administration in rearing chickens on physiology, the onset of lay and egg production of hens. *Physio Behavior* 98:73-77.
- Simitzis PE, Kalogeraki E, Goliomytis M, Charismiadou MA, Triantaphyllopoulos K, Ayoutanti A, Niforou K, Hager-Theodorides AL, Deligeorgis SG 2012 Impact of stocking density on broiler growth performance, meat characteristics, behavioural components and indicators of physiological and oxidative stress. *Br Poult Sci* 53:721-730.
- Thaxton JP, Dozier WA 3rd, Branton SL, Morgan GW, Miles DW, Roush WB, Lott BD, Vizzier-Thaxton Y 2006 Stocking density and physiological adaptive response of broilers. *Poult Sci* 85:819-824.
- Vanhonacker F, Verbeke W 2009 Buying higher welfare poultry products? Profiling Flemish consumers who do and do not. *Poult Sci* 88:2702-2711.
- Xie H, Rath NC, Huff GR, Huff WE, Balog JM 2000 Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poult Sci* 79:33-40.
- Xie J, Tang L, Lu L, Zhang L, Lin X, Liu HC, Odle J, Luo X 2015 Effects of acute and chronic heat stress on plasma metabolites, hormones and oxidant status in restrictedly fed broiler breeders. *Poult Sci* 94:1635-1644.
- Zuowei S, Yan L, Yuan L, Jiao H, Song Z, Guo Y, Lin H 2011 Stocking density affects the growth performance of broilers in a sex-dependent fashion. *Poult Sci* 90:1406-1415.

Received Aug. 8, 2016, Revised Sep. 3, 2016, Accepted Sep. 7, 2016