

Lipopolysaccharide 감염처리가 닭의 품종간 스트레스연관 유전자 발현에 미치는 영향

장인석 · 손시환 · 문양수[†]

경남과학기술대학교 동물생명과학과

Effects of Lipopolysaccharide-induced Stressor on the Expression of Stress-related Genes in Two Breeds of Chickens

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

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

ABSTRACT The objective of the present study was to determine the expression of genes associated with lipopolysaccharide (LPS)-induced stressor in two breeds of chickens: the Korean native chicken (KNC) and the White Leghorn chicken (WLH). Forty chickens per breed, aged 40 weeks, were randomly allotted to the control (CON, administered the saline vehicle) and LPS-injected stress groups. Samples were collected at 0 and 48 h post-LPS injection, and total RNA was extracted from the chicken livers for RNA microarray and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analyses. In response to LPS, 1,044 and 1,193 genes were upregulated, and 1,000 and 1,072 genes were downregulated in the KNC and WLH, respectively, using a ≥ 2 -fold cutoff change. A functional network analysis revealed that stress-related genes were downregulated in both KNC and WLH after LPS infection. The results obtained from the qRT-PCR analysis of mRNA expression of heat shock 90 (HSP90), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), activating transcription factor 4 (ATF4), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), and X-box binding protein 1 (XBP1) were confirmed by the results of the microarray analysis. There was a significant difference in the expression of stress-associated genes between the control and LPS-injected KNC and WLH groups. The qRT-PCR analysis revealed that the stress-related *HSP90 α* and *HMGCR* genes were downregulated in both LPS-injected KNC and WLH groups. However, the *HSP70* and *HSP90 β* genes were upregulated only in the LPS-injected KNC group. The results suggest that the mRNA expression of stress-related genes is differentially affected by LPS stimulation, and some of the responses varied with the chicken breed. A better understanding of the LPS-induced infective stressors in chicken using the qRT-PCR and RNA microarray analyses may contribute to improving animal welfare and husbandry practices.

(Key words: LPS infection, stress, microarray, gene expression, chicken)

서 론

닭은 사육 시 사육밀도, 사육온도, 사육시설의 형태 등을 포함한 많은 환경적 스트레스 요인에 직면하게 된다. 특히 현대 양계산업은 집약적 생산시스템에 따라 병원균의 감염, 백신접종 등을 포함한 감염 스트레스(infected stress)도 생산에 크게 영향을 미칠 수 있다. 최근 유럽의 양계산업은 하우스 시스템 즉 배터리 케이지의 금지와 환경적 병원균 조절을 위한 예방적 항생제 사용의 금지와 같은 동물복지 기반의 사육시스템으로 빠른 변화를 보이고 있다. 이러한 변화들은 닭에게 오히려 스트레스 요인의 증가로 작용하여 동물의 건

강 및 복지에 큰 영향을 미쳐 가축생산자에게는 오히려 경제적 손실을 초래할 수 있다(Barnett and Hemsworth, 2003). 동물에서 신체적 스트레스 반응에 대한 주목적은 항상성 상태 유지 혹은 회복과 함께 중요한 생리적 활동 즉 생산, 번식, 성장 등에 대한 기능적 정상상태 유지의 수단이다. 수년 동안 연구자들은 닭의 복지와 생산 능력과의 관계(기후, 환경, 영양, 물리적·사회적·질병학적 요인 등)를 연구하였다. 이러한 연구들을 종합하여 보면 위에 제시된 요인들은 가금에게 지속적인 스트레스 요인으로 작용되고, 이에 대한 생리적 결과는 혈중 코티코스테론의 농도 증가와 연결되며, 이는 결국 대사적, 물리적 또는 면역적 변화를 초래하게 된다(Shini

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

et al., 2008). 동물의 정상적 면역 체계는 동물의 생산적 활동을 유지하면서도 건강한 상태를 유지하는 것인데, 감염과 같은 질병은 동물의 생산성을 저하시키고, 치료에 대한 비용 발생 등에 따른 경제적 손실을 초래하며, 또한 고품질의 축산물 생산을 위한 동물 복지 측면에서도 중요하게 다루어야 할 요소이다(Kogut and Klasing, 2009). 조류의 면역시스템은 약 6주령에 완성이 되는 것으로 알려져 있으며(Lillehoj and Chai, 1988), 영양 상태와 면역, 유전적 선택과 면역, 사양관리 개선, 백신처리, 식이 요인 등이 닭의 면역작용 조절에 관여하며, 이들 조절을 통한 건강증진에 관한 많은 연구가 이루어졌다(Redmond et al., 2010). 감염성 스트레스 요인으로 육계와 산란계에 LPS를 처리한 후 체온변화를 관찰한 결과, 뚜렷한 차이가 발생하였으며(Leshhinsky and Klasing, 2001), 이러한 차이는 주위온도, 투여량, 나이, 투여 부위뿐만 아니라, 유전적 계통에 영향을 미칠 수 있음을 보여준다(Cheng et al., 2004). 환경오염의 감염원으로서 박테리아 LPS가 많이 이용(Shini et al., 2008) 되는데, 계사내 공기위생적인 측면에서 공기 중의 LPS는 계사내 공기중 먼지의 양과 비례한다는 보고도 있다(Zucker and Muller, 2000). 또한 육계사의 형태가 floor litter인 경우가 netting-floored 사보다 먼지의 농도나 공기중 미생물의 수도 많았으며, 공기중 오염은 밀사 정도가 높을수록 증가하다고 한다(Madelin and Wathes, 1989). 닭의 환경스트레스에 대한 연구는 일반적으로 사육시 고온에 따른 열스트레스, 사육밀도 및 사육형태에 따른 스트레스, 수송 등에 따른 스트레스에 집중되어 있었다(Heckert et al., 2002). 닭의 감염(위생적) 스트레스에 의한 지방대사 균형의 파괴에 대한 연구(Renli et al., 2012), 계사의 사육형태에 따른 감염비교(Wang et al., 2003), 감염에 대한 육계와 산란계의 반응차이(Leshhinsky and Klasing, 2001) 등에 대한 보고는 있었지만, LPS 감염스트레스가 닭의 품종별 스트레스 관련 유전자들의 발현을 비교·분석한 연구는 거의 보고되고 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구는 한국재래계와 백색레그혼에 대하여 LPS 감염 스트레스 요인이 닭의 품종간 스트레스 및 소포체(ER) 스트레스 연관 유전자의 발현에 미치는 영향을 비교·분석하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 분석 시료

본 연구는 경남과학기술대학교 종합농장에서 사육 중인

순계 백색레그혼종(White Leghorn, WLH)과 적갈색 한국재래닭(Korean Native Chicken, KNC)을 공시동물로 이용하였다. 시험에 공시된 동물의 사양조건은 Sohn et al.(2014)이 제시한 내용과 같으며, 간단히 기술하면 다음과 같다. 공시계의 사양관리는 강제 환기 및 자동 온도 조절 시스템이 완비된 무창 계사 내 2단 4열 케이지 형태로 칸 당 90cm(W) × 90cm(L) × 66cm(H)의 철망 배터리형 케이지에서 사육하였고, 사료 급이는 자유채식시켰으며, 점등 관리는 16시간 고정 점등하였다. 공시계를 대상으로 그람음성균의 세포벽 물질인 lipopolysaccharide(LPS, Sigma L2630, 1 mg/kg BW)를 복강 투여하였으며, 대조군은 생리식염수를 복강에 투여하였다. 시험동물은 LPS투여 후 시간별(0, 48 hr)로 처리별 무작위로 5수씩 선택하여 각 개체로부터 간 조직을 취하여 액체 질소에 급속냉동을 실시하였고, total RNA를 추출하기 전까지 -80℃에 보관하였다. 시험에 관련된 닭의 관리 및 취급은 본 대학 사육관리 지침을 준수하였다.

2. Microarray 분석

감염에 의한 stress 관련 유전자들의 발현 양상을 microarray로 분석하고, 특정 유전자들은 quantitative RT-PCR로 검증하여 감염스트레스에 대한 품종별 차이가 발생하는지를 조사하였다. 닭의 간에서 0시간대와 48시간대에 각 처리로부터 total RNA를 추출한 다음, RNA microarray 분석을 실시하였다. Microarray에서 RNA 추출은 RNeasy kit(Qiagen)으로 RNA를 정제하였으며, 추출한 total RNA는 처리별로 같은 양을 취하여 pooling을 한 후, RNA microarray 분석을 실시하였다. Microarray는 Affymetrix GeneChip Chicken Genome Array이며, Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G를 이용하여 image acquisition을 실시하였고, 분석에 사용한 software는 Affymetrix Expression Console 1.1(Affymetrix, Santa Clara, USA)을 이용하였다.

3. 유전자 발현 분석

간 조직은 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, USA)로 total RNA를 추출하여 유전자 발현 분석을 실시하였다. 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)를 이용하여 시행하였으며, 구체적인 분석과정은 Sohn et al.(2014)에 기술한 내용과 같다. 유전자 발현의 상대적 발현은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 분석하였다(Livak and Schmittgen, 2001). 본 시험에

이용된 primer들의 정보는 Table 1에 제시된 바와 같다.

결과 및 고찰

4. 통계분석

닭의 품종 및 LPS 처리에 따른 유전자 발현에 대한 통계 분석은 SAS 통계패키지(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 GLM procedure를 이용하여 상호작용 효과를 분석하였으며, 처리간 비교는 LSMEANS에 의해 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다. 유전자 발현에 대한 대조군과 LPS처리군은 Student's *t*-test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 하였다.

1. 감염스트레스에 대한 RNA Microarray 총괄 분석
한국재래닭 및 백색레그혼을 공시동물로서 LPS처리 후 스트레스관련 유전자들의 발현을 microarray로 분석하여 감염 스트레스에 따른 품종별 차이가 발생하는지를 관찰하였다. 닭의 간에서 0시간 및 48시간대에 각 처리로부터 total RNA를 추출한 다음, mRNA microarray 분석을 실시하였다. 처리에 따른 유전자 발현차이(DEG, differentially expressed gene)에 대한 정보는 Table 2에 제시하였다. KNC(대조구)와

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	CAGAAGATGAAGAAGAGAAGA		
HSP90 β	Forward	GCAGGACAGTAGGTGAGT	113	60
	Reverse	GAGGCAGAGCAAGATGAAG		
HMGCR	Forward	TCAGAGCGTAAGACCTAAC	84	60
	Reverse	TGTAGTAATGGCGAACCTAA		
ATF4	Forward	AGTGGATGTTCTGGAAGGT	76	60
	Reverse	CTCTTCTCTGACTTGGTGAT		
XBP1	Forward	TCTGCTGGATGCTGGTAG	89	60
	Reverse	AGGTATGGTCAGTGCAAGA		
SREBP1	Forward	GATGGTCGCAGTGGCTGT	97	60
	Reverse	GGCTCCCCGTAGACAAAGA		
GAPDH	Forward	TAGGATACACAGAGGACCAG	133	60
	Reverse	AACTCATTGTCATACCAGGAA		
RPL27	Forward	CAGCAATGGGCAAGAAGA	81	60
	Reverse	GCATCAGGTGGTTGTAGTT		

Table 2. Total number of differentially expressed genes (DEG) in LPS infected chickens

Items	Up-regulated gene number	Down-regulated gene number	Total DEG	Total expressed genes
Control vs. LPS (KNC)	1,044	1,000	2,044	32,773
Control vs. LPS (WLH)	1,193	1,072	2,265	32,773

#A 2.0 fold difference in gene expression was set at cutoff value.

KNC에 LPS를 처리한 경우(KNC-LPS)를 비교한 결과, 대조구 대비 2배 이상 유전자의 발현이 증가한 유전자의 수는 1,044개, 발현이 감소한 유전자의 수는 1,000개였다. 감염처리에 따른 총 DEG는 2,044개로 이는 현재 알려진 닭의 총 전사체(RNA transcripts) 32,773개의 6.2%에 해당된다. WLH(대조구)를 WLH-LPS와 비교한 경우, 대조구 대비 2배 이상 유전자의 발현이 증가한 유전자의 수는 1,193개, 발현이 감소한 유전자의 수는 1,072개였다. 처리에 따른 총 DEG는 2,265개로 닭의 총 전사체의 6.9%로 LPS 처리에 따른 전사체의 발현은 WLH가 약간 높게 나타났다. LPS를 처리한 KNC를 기준으로 하고 WLH-LPS와 비교한 결과, 2배 이상 유전자의 발현이 증가한 유전자의 수는 262개였으며, 발현이 감소한 유전자의 수는 219개로, 처리에 따른 총 DEG는 481개였다. 이는 두 품종간에 LPS 처리에 따라 닭의 총 전사체 중 약 1.47%의 전사체가 증감되고 있음을 보여 주었다.

2. 감염스트레스에 따른 품종 간 스트레스 표지 유전자들의 microarray 분석

감염스트레스에 대한 RNA microarray 분석에서 품종별 스트레스연관 유전자들의 증감에 대한 발현 차이를 조사하였다(Table 3). LPS 처리 48시간 후 KNC와 WLH 모두 HSP25 유전자가 증가하였다. 이 유전자는 스트레스 환경에서 세포의 생존을 유지하기 위한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, actin filament의 파손을 억제하고, 세포의 막을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 세포의 사멸(apoptosis)을 유도하는 유전자 중 하나인 PDCD4의 유전자 발현도 증가하는 것으로 보아, LPS 감염 후 세포에서는 감염된 세포를 정상적으로 유지하려는 기작과 문제가 된 세포를 제거하려는 기작이 동시에 작동되고 있음을 추정할 수 있었다. TLR3 (toll-like receptor 3)는 두 품종 모두에서 LPS에 의하여 발현이 증가하였는데, 이는 외부병원성에 대한 인지능력과 내부 면역을 활성화 시키는 주요한 기능을 하며(Roach et al., 2005), dsRNA가 ligand로 작동할 때 유도되는 것으로 알려져 있다(Keestra et al., 2013). Miyake et al.(2008)에 의하면 TLR은 LPS 등의 세포표면인자와 분자를 인식하여 세포내 친염증 사이토카인들(IL-1, IL-6, TNF- α , IL-18 등)의 발현을 촉진하는 신호전달 경로에 관여하는 중요한 유전자로 보고하였다. 닭에서도 LPS 감염원에 대해 즉각적인 염증 반응을 보여 효과적인 면역작용에 필요한 IL-1 β 와 IFN γ 발현 등과 같은 cytokines를 생성하여 질병방어 작용에 기여한다(Leshchinsky and Klasing, 2003). KNC와 WLH 모두 LPS 감염에 대응하기 위하여 TLR3가 감염 후 48시간 후에도 높게 발현되고

있음을 확인할 수 있었다. LPS감염은 TLR4에 의하여 인지되고 세포내 신호전달 체계에 따라 cytokine이나 chemokine 유전자들의 발현을 유도하게 된다(Kogut et al., 2005). Ozoe et al.(2009)에 따르면 백색레그혼 산란계를 이용하여 LPS(1 mg/kg BW)를 정맥에 투여하고 간에서 시간대별 TLR4의 발현을 qRT-PCR로 분석한 결과 12시간대에 발현이 가장 많이 증가하였고 이후 감소하였다고 하였다. LPS에 의한 친염증 cytokine IL-1 β 의 발현은 위와 같은 조건에서 6시간대에 가장 많이 증가하였다가 24시까지 계속 감소하는 추세를 보여 주었다. 즉, 닭에서 LPS에 의한 감염은 acute response의 형태로 TLR4의 signaling pathway에 의한 반응을 볼 수 있는데, 본 연구의 microarray 에서는 LPS투여 48시간 후 TLR3에 대한 유전자 발현은 모두 높게 발현되었지만 예상과 달리 TLR4에 대한 발현은 2-fold 뿐만 아니라 1.5-fold 수준의 cutoff 수준에서도 확인이 되지 않았다. Microarray에서 차이를 볼수 없어 TLR4의 qRT-PCR을 실시하였지만, LPS 투여 48시간 후 TLR4의 발현은 처리간에 유의적 차이를 발견할 수 없었다. HSPA2는 HSP70 family로서 KNC-LPS(2.02-fold)와 WLH-LPS(1.71-fold)에서 그 발현량이 증가하였는데, 이는 바이러스의 감염에 의해 증가되는 단백질(Wainberg et al., 1997)로 특히 급성감염(acute infection)에 의한 특이적 반응을 보이는 단백질 중 하나이다. RIPK2(receptor-interacting serine-threonine kinase 2)는 면역반응에 관여하면서 강력한 NF- κ B의 활성화 인자이고, 외부자극에 대한 반응의 하나로 세포의 사멸을 유도하는 인자이다(McCarthy et al., 1998). 이 단백질 또한 LPS에 의해 두 품종 모두에서 높게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. LPS 도입 48시간 후 감소된 스트레스 연관 유전자에는 HSP90와 HMGCR이 관찰되었다. HSP90 β 는 소포체(ER)에 존재하고, 단백질의 folding에 관여하는 chaperone protein의 하나이며, 면역 반응과 스트레스와 연관하여 immune chaperone에 주요한 기능을 한다(Schild and Rammensee, 2000). HSP90 β 의 발현 감소는 두 품종 모두에서 LPS감염원에 대한 방어기작이 정상적으로 일어나지 않을 수 있음을 시사한다. HMGCR은 KNC-LPS(2.19-fold)와 WLH-LPS(1.57-fold)에서 모두 그 발현량이 감소하였다. 일반적인 스트레스 하에서는 HMGCR이 증가하게 되며, 이는 스트레스 호르몬인 cortisol의 생성을 증가시키는 주요 효소로 작용하기 때문이다(Beloor et al., 2010). Cortisol은 T-cell의 증식을 억제하여 면역기작을 저하시키는 작용을 할 수 있는데, 감염성 스트레스에 HMGCR을 억제시켜 스트레스호르몬의 분비를 억제함으로써 면역기능을 유지하려는 생리적 작용이라 사료되지만, 환경스트레스와 감염스트레스에서 차별적 표지유전

Table 3. Information on the expression of stress related-genes with up- and down-regulated genes in the liver using RNA microarray in Korean native chicken and White Leghorn challenged to LPS

Accession no.	Breed	Genesymbol	Gene function	Log2 ratio	Fold change
Stress related genes					
NM_001008458	KNC	BRE	Brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)	1.73	3.31
NM_001031144	KNC	CCDC98	Coiled-coil domain containing 98	1.30	2.46
XM_417715	KNC	EYA3	Eyes absent homolog 3 (Drosophila)	1.11	2.16
NM_001030962	KNC	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	1.30	2.45
NM_204304	KNC	PDCD4	Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	1.38	2.60
NM_001030943	KNC	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	3.16	8.96
NM_001011691	KNC	TLR3	Toll-like receptor 3	1.81	3.51
NM_001010842	KNC	HSP25	Heat shock protein 25	1.52	2.86
NM_001006685	KNC	HSPA2	Heat shock 70kDa protein 2	1.01	2.02
NM_204289	KNC	HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	-1.66	3.16
NM_204485	KNC	HMGCR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	-1.13	2.19
NM_001008458	WLH	BRE	Brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)	1.78	3.44
NM_001030962	WLH	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	1.65	3.14
NM_204304	WLH	PDCD4	Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	1.27	2.36
NM_001030943	WLH	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	3.79	13.83
NM_001011691	WLH	TLR3	Toll-like receptor 3	1.86	3.62
NM_001010842	WLH	HSP25	Heat shock protein 25	5.11	34.62
NM_001031430	WLH	SYK	Spleen tyrosine kinase	-1.02	2.02
NM_204289	WLH	HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	-1.19	2.29

*A 2.0-fold difference in gene expression was set as a cutoff value.

자들의 발현양상에 대하여 보다 더 심도있는 연구가 필요할 것으로 보인다.

3. Microarray와 qRT-PCR 비교분석

Microarray에서 확보된 결과를 검증하기 위하여 선택된 유전자들의 microarray 데이터와 qRT-PCR 결과를 비교하여 Table 4와 Table 5에 제시하였다. 분석된 대부분의 유전자들은 발현의 정도의 차이는 있었지만 microarray의 결과와 qRT-PCR의 결과와 유사한 경향을 보였다. 다만 한국재래계의 SREBP1의 경우는 microarray와 qRT-PCR의 분석과 상반된

결과를 보였다. 한국재래계에서 HSP90 β 의 경우, LPS 처리에 따른 fold change가 1.57이지만, 대조구와 실질적 발현의 차이가 나지 않았다($P>0.05$). WLH에서 HSP90 α (0.79 vs. 1.22)의 경우도 Table 5에서 보는 바와 같이 대조구와 유전적 발현의 차이는 없었으며($P>0.05$), 따라서 microarray의 0.79 fold change와 유전적 발현의 차이를 크게 발견할 수 없었다. 다만 WLH에서 HSP90 β (0.85 vs. 2.93)의 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 나타나($P<0.05$), LPS 처리에 의해 HSP90 β 의 발현이 증가하여 영향을 받는 것으로 검증되었지만, microarray에서는 0.85-fold change로서 대조구와 차이가 없거나

Table 4. Comparison of microarray and real-time RT-PCR analyses of some selected genes (KNC-C vs KNC-LPS)

Item	Microarray Fold change*	Real-time RT-PCR [#]				P-value ^{##}	
		Control		48 hr			
		ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
Stress related genes	HSP90 α	0.88	7.35 \pm 0.15	1	10.13 \pm 0.17	0.15	<.0001
	HSP90 β	0.51	-0.27 \pm 0.52	1	-0.92 \pm 0.19	1.57	0.1145
	HMGCR	0.46	5.69 \pm 0.34	1	6.64 \pm 0.26	0.52	0.0181
ER Stress related genes	ATF4	0.89	5.51 \pm 0.35	1	7.22 \pm 0.43	0.31	0.0060
	XBP1	1.19	6.40 \pm 0.28	1	5.98 \pm 0.36	1.34	0.1881
	SREBP1	0.93	8.98 \pm 0.26	1	8.34 \pm 0.11	1.57	0.0169

[#]The values (means, n=5) are ΔCt , which is represented as the Ct of each target gene corrected by Ct of the control gene (RPL27). The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

^{##}Student's *t*-test between ΔCt values (control vs. 48 hr) of real-time RT-PCR.

*Fold changes (KNC-LPS/KNC-C).

Table 5. Comparison of microarray and real-time RT-PCR analyses of some selected genes (WLH-C vs WLH-LPS)

Item	Microarray Fold change*	Real-time RT-PCR [#]				P-value ^{##}	
		Control		48 hr			
		ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
Stress related genes	HSP90 α	0.79	8.43 \pm 0.55	1	8.15 \pm 0.13	1.22	0.4318
	HSP90 β	0.85	-0.30 \pm 0.26	1	-1.85 \pm 0.51	2.93	0.0093
	HMGCR	0.63	4.93 \pm 0.73	1	6.47 \pm 0.68	0.34	0.0550
ER Stress related genes	ATF4	0.85	5.82 \pm 0.55	1	6.64 \pm 0.33	0.57	0.0904
	XBP1	0.71	4.3 \pm 0.23	1	6.89 \pm 0.27	0.17	0.0002
	SREBP1	0.63	8.17 \pm 0.12	1	11.20 \pm 0.17	0.12	<.0001

[#]The values (means, n=5) are ΔCt , which is represented as the Ct of each target gene corrected by Ct of the control gene (RPL27). The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

^{##}Student's *t*-test between ΔCt values (control vs. 48 hr) of real-time RT-PCR.

*Fold changes (KNC-LPS/KNC-C)

미미한 감소 양상을 보였다. 한국재래계에서 HSP 90 α 와 HMGCR의 유전자 발현은 LPS 감염 스트레스에 억제되는 것을 보여주었다. 이러한 결과는 RAW264.7 세포주에서 LPS 감염에 의한 HMGCR의 유전자 발현의 감소(Kobori et al., 2007)와 닭의 macrophage 세포주(MQ-NCSU)에 LPS를 노출시키면 스트레스 단백질이 발현될 수 있지만, 열 스트레스는 LPS 처리 세포에서 이들 유전자들의 발현을 억제시킨다는 보고(Miller and Qureshi, 1992)와 유사하였다. 그러나 육계를 밀사한 후(밀사스트레스) 분석한 HMGCR과 HSP90

은 적정 사육환경조건의 닭에 비하여 이들 유전자들의 발현이 크게 증가한 결과(An et al., 2012)를 보면 스트레스에 대한 표지유전자들의 발현 양상은 스트레스요인에 따라 차이가 있을 수 있음을 보여주었다. 세포수준의 스트레스(ER 스트레스)에서 ATF4, XBP1, SREBP1은 화이트레그혼에서 microarray와 qRT-PCR에서와 같이 이들 유전자들의 발현이 억제되는 것을 보여주었다. 그러나 한국재래계에서는 ATF4만 microarray와 qRT-PCR에서 모두 낮은 발현을 보였으며, LPS에 의해 영향을 받지 않거나(XBP1) 오히려 증가(SREBP)하

는 양상을 보였다. ER 스트레스의 결과를 보면 화이트레그혼은 LPS에 의해 소포체 내에서 일어나는 unfolded protein response(UPR)을 크게 형성하지 않는 것으로 보이며, 한국재래계는 세포내 스트레스에 대한 반응으로 UPR 형성으로 정상적 단백질 형성에 영향을 미칠 수 있음을 보여주었다.

4. 한국재래계와 화이트레그혼에서 감염에 따른 스트레스 연관 유전자들의 qRT-PCR을 이용한 발현 비교 · 분석
한국재래계와 화이트레그혼에 LPS 처리 48시간 후 간 조직을 취하여 total RNA를 추출하여 qRT-PCR을 실시하였으며, 스트레스 연관 유전자들의 분석 결과는 Table 6에 제시된 바와 같다. LPS 처리 후 유전자들의 발현은 HSP70이 KNC-LPS에서, HSP90β가 WLH-LPS에서 높게 발현되었다($P<0.05$). HSP70의 경우, 품종과 LPS 요인에 다른 상호작용 효과가 관찰되었으나($P<0.05$), HMGCR은 두 품종간에 LPS에 의한 상호작용이 없는 것으로 보아, HMGCR 발현에 의한 감염 차이점을 찾을 수 없었다. 한국재래계에서 HSP70은 LPS 처리 후에 대조구에 비하여 약 2.5배 이상 높은 발현을 보였으나, 백색 레그혼에서는 낮은 발현 양상을 나타내었다. HSP90α는 한국재래계에서 LPS에 의해 낮은 발현 양상을 보였으나, 화이트레그혼은 대조구와 차이를 보이지 않았다. HSP90β는 두 품종 모두 LPS 감염에 의해 높은 발현 양상을 보여 LPS에 민감하게 반응하는 마커 유전자의 가능성을 보여주었다. 한국재래계에서 감염에 의한 HSP70의 높은 발현은, 밀사 혹은 절식과 같은 환경적 스트레스(Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012)와 같은 경향을 보여 주었지만, 본 시험의 HSP90

α는 그 발현이 매우 낮은 양상을 보여, 스트레스 지표 유전자들의 종류뿐만 아니라, 스트레스 종류(예: 환경스트레스, 감염 스트레스)에 따라 유전자들의 발현 반응에 차이가 있음을 보여주었다.

적 요

본 연구는 한국재래계(KNC)와 백색레그혼(WLH)에서 lipopolysaccharide(LPS) 감염 스트레스가 닭의 품종간 스트레스 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향을 비교 · 분석하고자 실시되었다. 공시계를 대상으로 생리식염수(대조구)와 LPS(처리구)를 복강에 투여한 후, 시간(0, 48 hr) 및 처리별 각 개체로부터 간 조직을 취하고, microarray 및 quantitative RT-PCR(qRT-PCR) 분석을 하였다. 처리에 따른 유전자 발현차이를 보면, KNC(대조구)와 KNC에 LPS를 처리한 경우(KNC-LPS)를 비교한 결과, 대조구 대비 2배 이상 유전자의 발현이 증가한 유전자의 수는 1,044개, 발현이 감소한 유전자의 수는 1,000개였다. WLH(대조구)를 WLH-LPS와 비교한 경우, 유전자의 발현이 증가한 유전자의 수는 1,193개, 발현이 감소한 유전자의 수는 1,072개였다. LPS 처리에 따른 스트레스 연관 유전자들의 microarray 발현에서 스트레스 연관 유전자들의 발현은 두 품종 모두에서 감소하였으며, 품종 간 차이는 없는 것으로 나타났다. Microarray의 결과를 바탕으로 HSP90, HMGCR, ATF4, SREBP1, XBP1 등의 유전자 발현을 qRT-PCR을 이용하여 검증한 결과, 대조구와 LPS 감염구 간에 유의적 차이를 나타내었다($P<0.05$). 세포

Table 6. Effects of strain and LPS challenges on mRNA expression of stress-related genes in the liver using qRT-PCR in Korean native chicken and White Leghorn

Item	Treatment#								Pooled SE	Significance (<i>P</i> -value)		
	KNC				WLH					Strain (S)	LPS (L)	Interaction (S*L)
	Non-LPS		LPS		Non-LPS		LPS					
	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}				
HSP70	7.72±0.22	1	6.39±0.39	2.51	6.77±0.82	1	9.51±0.31	0.15	0.20	0.01	0.04	0.0001
HSP90α	7.35±0.15	1	10.13±0.17	0.15	8.43±0.55	1	8.15±0.13	1.22	0.14	0.0001	0.0004	0.002
HSP90β	-0.27±0.52	1	-0.92±0.19	1.57	-0.30±0.26	1	-1.85±0.51	2.93	0.16	0.07	0.001	0.09
HMGCR	5.69±0.34	1	6.64±0.26	0.52	4.93±0.73	1	6.47±0.68	0.34	0.22	0.17	0.004	0.38

#The values (means, n=5) are ΔCt, which is represented as the Ct of each target gene corrected by Ct of the control gene (RPL27). The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the 2^{-ΔΔCt}. The level of probability for statistical difference was considered at $P<0.05$.

수준의 스트레스(ER 스트레스)에서 ATF4, XBP1, SREBP1은 화이트레그혼에서 microarray와 qRT-PCR에서와 같이 이들 유전자들의 발현이 억제되는 것을 보여주었다. 그러나 한국재래계에서는 ATF4를 제외한 유전자들은 LPS에 의해 영향을 받지 않거나(XBP1), 오히려 증가(SREBP)하는 양상을 보였다. ER-stress 연관 유전자들의 발현 양상으로 볼 때, KNC이 WLH에 비하여 LPS 감염에 더 민감하게 반응하는 것으로 보인다. HMGCR은 두 품종간에 LPS에 의한 상호작용이 없는 것으로 보아, HMGCR 발현에 의한 감염 차이점을 찾을 수 없었다. 한국재래계에서 HSP70은 LPS 처리 후에 대조구에 비하여 약 2.5배 이상 높은 발현을 보였으나, 백색 레그혼에서는 낮은 발현 양상을 나타내었다. 스트레스 지표 유전자들의 종류뿐만 아니라, 스트레스 종류(예: 환경 스트레스, 감염스트레스)에 따라 유전자들의 발현 반응에 차이가 있음을 보여주었다. LPS 감염스트레스에 따른 스트레스연관 유전자 발현연구는 닭의 품종별 질병 저항성 및 동물복지 관련 지표의 탐색에 기여할 것으로 사료된다.

(색인어 : LPS감염, 스트레스, microarray, 유전자 발현, 닭)

사 사

이 논문은 2016년도 경남과학기술대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- An YS, Park JG, Jang IS, Sohn SH, Moon YS 2012 Effects of high stocking density on the expressions of stress and lipid metabolism associated genes in the liver of chicken. *Journal of Life Science* 22(12):1672-1679.
- Barnett JL, Hemsworth PH 2003 Science and its application in assessing the welfare of laying hens in the egg industry. *Aust Vet J* 81(10):615-624.
- 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.
- Cheng HW, Freire R, Pajor EA 2004 Endotoxin stress responses in chickens from different genetic lines. 1. Sickness, behavioral, and physical responses. *Poult Sci* 83(5):707-715.
- 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.
- Keestra AM, de Zoete MR, Bouwman LI, Vaezirad MM, van Putten JP 2013 Unique features of chicken Toll-like receptors. *Dev Comp Immunol* 41(3):316-323.
- Kobori M, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, Shinmoto H 2007 Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Pharmacol* 150(2):209-219.
- Kogut MH, Iqbal M, He H, Philbin V, Kaiser P, Smith A 2005 Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Dev Comp Immunol* 29:791-807.
- Kogut MH, Klasing K 2009 An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. *J Appl Poult Res* 18:103-110.
- Leshchinsky TV, Klasing KC 2003 Profile of chicken cytokines induced by lipopolysaccharide is modulated by dietary α -tocopheryl acetate. *Poult Sci* 82:1266-1273.
- Leshchinsky TV, Klasing KC 2001 Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Dev Comp Immunol* 25(7):629-638.
- Lillehoj HS, Chai JY 1988 Comparative natural killer cell activities of thymic, bursal, splenic and intestinal intraepithelial lymphocytes of chickens. *Dev Comp Immunol* 12(3):629-643.
- 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.
- Madelin TM, Wathes CM 1989 Air hygiene in a broiler house: comparison of deep litter with raised netting floors. *Br Poult Sci* 30(1):23-37.
- McCarthy JV, Ni J, Dixit VM 1998 RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 273(27):16968-16975.
- Miller L, Qureshi MA 1992 Comparison of heat-shock-induced and lipopolysaccharide-induced protein changes and tumoricidal activity in a chicken mononuclear cell line. *Poult Sci* 71(6):979-987.
- Miyake A, Murata Y, Okazawa H, Ikeda H, Niwayama Y, Ohnishi H, Hirata Y, Matozaki T 2008 Negative regula-

- tion by SHPS-1 of Toll-like receptor-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. *Genes Cells* 13(2):209-219.
- Ozoe A, Isobe N, Yoshimura Y 2009 Expression of Toll-like receptors (TLRs) and TLR4 response to lipopolysaccharide in hen oviduct. *Vet Immunol Immunopathol* 127:259-268.
- Redmond SB, Tell RM, Coble D, Mueller C, Palic D, Andreasen CB, Lamont SJ. 2010 Differential splenic cytokine responses to dietary immune modulation by diverse chicken lines. *Poult Sci* 89(8):1635-1641.
- 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.
- Roach J, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell M, Smith K, Hood L, Aderem A 2005 The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *PNAS* 102(27):9577-9582.
- Schild H, Rammensee HG 2000 gp96-the immune system's Swiss army knife. *Nat Immunol* 1(2):100-101. Review.
- Shini S, Kaiser P, Shini A, Bryden WL 2008 Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149(2):324-333.
- 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.
- 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.
- Wainberg Z, Oliveira M, Lerner S, Tao Y, Brenner BG 1997 Modulation of stress protein (hsp27 and hsp70) expression in CD4+ lymphocytic cells following acute infection with human immunodeficiency virus type-1. *Virology* 233(2):364-373.
- Wang W, Wideman RF Jr, Chapman ME, Bersi TK, Erf GF 2003 Effect of intravenous endotoxin on blood cell profiles of broilers housed in cages and floor litter environments. *Poult Sci* 82(12):1886-1897.
- Zucker BA, Müller W. 2000 Investigations on airborne microorganisms in animal stables. 3: Relationship between inhalable endotoxin, inhalable dust and airborne bacteria in a hen house]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 113(7-8):279-283. German.

Received Nov. 29, 2016, Revised Feb. 9, 2017, Accepted Feb. 13, 2017