

## 닭의 산란연령에 따른 자궁내막조직의 변화 및 난각 관련 유전자의 발현양상

박지애<sup>1</sup> · 조은정<sup>1</sup> · 박정연<sup>2</sup> · 손시환<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경남과학기술대학교 동물생명과학과, <sup>2</sup>진주보건대학교 임상병리과

### Histological Change of Uterus Endometrium and Expression of the Eggshell-related Genes according to Hen Age

Ji Ae Park<sup>1</sup>, Eun Jung Cho<sup>1</sup>, Jung Yeon Park<sup>2</sup> and Sea Hwan Sohn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science and Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

<sup>2</sup>Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

**ABSTRACT** The eggshell is an intricate and highly ordered structure composed of multiple layers and a calcified matrix. The eggshell is formed at the uterine segment of the chicken oviduct. In this study, histological changes in the uterine endometrium and the expression of the eggshell-related genes were investigated according to hen age. We analyzed the expression of eggshell protein-related genes, such as OCX-32, OCX-36, OC-17, OC-116, and eggshell-ion-related genes, such as CABL-1, SPP1, SCNN1G, ATP2A2, CA2, and CALM1. In chicken uterine endometrium, histological deformation, fibrosis, atrophy and elimination of micro-villi were found with increasing hen age. The concentration of blood-ion components did not significantly change with age. The amount of telomeric DNA in uterine endometrial cells decreased with increasing hen age. The expression of most of the eggshell-related genes changed significantly with increasing hen age. The expression of some ovo-proteins, which play a role in eggshell formation, increased with increasing hen age; however, there were no significant correlations among eggshell protein genes. Eggshell ion-related genes, such as ATP2A2, SCNN1G, CA2, and CALM1, were closely related to each other. The OCX-32 and OCX-36 genes were closely related to some of the eggshell ion genes. Eggshell protein-related genes, such as the OCX-32, OCX-36 genes and ion-related genes such as CALB-1, ATP2A2, SCNN1G, CA2, CALM1, affected eggshell formation, mutually or independently. This study shows that, uterine although endometrial cell damage occurs with increasing hen age, normal eggshells can be formed in old hens. This suggests that eggshell protein-and eggshell ion-related genes also control the homeostasis of eggshell formation.

(Key words: aging, eggshell-related gene, uterus endometrium, egg shell, chicken)

## 서 론

2015년 농림축산식품부의 통계자료에 따르면 국내 연간 계란생산량은 약 135억 개이며, 이는 국내 총 농업생산액의 4%, 축산물 생산액의 9.6% 정도이다. 또한 1인당 계란소비량은 약 268개에 달하고 있으며, 연간 약 5% 정도의 성장세를 보이고 있다. 이러한 계란 산업의 규모에도 불구하고, 현재 생산농가에서 생산되는 계란의 파란율은 약 7~8% 정도로 경제적으로 막대한 손실과 더불어 안전한 축산물 유통에 부정적인 영향을 끼치고 있다. 따라서 국내 산란계 농가의 최우선 현안은 파란율 감소를 위한 난각질 개선이라 할 수 있겠다.

가금에서의 난관은 계란형성 동안 호르몬적, 신경적, 생화학적 세포변화를 겪는 복합 장기로서, 난관의 구조 및 기능적 변화는 직접적으로 계란과 난각의 질에 영향을 준다. 난관은 누두부, 팽대부, 협부, 자궁부, 질부의 다섯 개의 영역으로 구분되며, 모든 난관부위는 점막성 상피세포로, 섬모가 있거나, 섬모가 없는 분비세포로 구성된다. 특히 난각을 형성하는 자궁의 조직학적 구조는 주름진 위 층층 원주상피세포로 기저세포와 배상세포로 구성된다(Mohammadpour et al., 2012). 이러한 자궁 표면의 세포구조는 난각질과 밀접한 관련을 가지며, 환우 때에 산란이 중지되면 자궁내막의 상피세포가 탈락되고, 점막 고유층의 밀도가 감소되어 점막세

\* To whom correspondence should be addressed : shsohn@gntech.ac.kr

포의 소실이 일어난다(Huntley and Holder, 1978; Ariyadi et al., 2012). 난각의 구성은 95%의 calcium carbonate와 5%의 유기물질로 된 얇은 보호막으로, 복잡하고 고도화 된 다층 석회화 구조이다(Romanoff, 1949; Tyler, 1969). 일반적으로 난각은 6개의 층으로 구성되고, 가장 안쪽에는 난황과 난백을 직접적으로 싸는 막과 외부 막층 가까이 있는 섬유질 막은 난각의 석회화에 관여한다(Tyler, 1969; Pooley, 1979). 난각의 질은 품종과 같은 유전적 요인뿐만 아니라, 영양적 요인, 환경적 요인 및 산란 연령과 같은 다양한 요인에 의해 영향을 받는다(Roland, 1979; Hill et al., 1980; Peebles and Brake, 1987; Williams, 1992; Suk and Park, 2001; Samli et al., 2005; Akyurek and Okur, 2009; Jin et al., 2011; Roberts et al., 2013; Lee et al., 2016). 난각 형성과 관련하여 각 대사과 정별 관련유전자들의 발현 양상을 살펴보면 닭에서의 난각 형성은 여러 대사 작용이 함께 작용하는데, 대표적으로  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ , Vit D, PTH와 gonadal hormone 등이 밀접하게 관여한다고 알려져 있다. 이온대사 중  $Ca^{2+}$ 이동관련 유전자로 CABL1, ATP2A3, TRPV6 등이,  $Na^+$  관련 유전자로 SCNN1A, B, G 및 SLC8A1, 3 등이 주된 유전자로 알려져 있으며, 난각의 석회화에는 Vit D 및  $Ca^{2+}$ 의 대사작용과 PTH, 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> 및 calcitonin 등이 관여한다고 보고하고 있다(Soares, 1984; Bar et al., 1999; Dacke, 2000; Ingleton, 2002; Silverman, 2003; Huang et al., 2006; Ramasamy, 2006; Talmage and Mobley, 2008; Bar, 2009). 난각의 석회화는  $Ca^{2+}$ 의 항상성과 이의 대사경로와 밀접한 관련이 있는데,  $Ca^{2+}$ 은 자궁 내 난각선(egg shell gland)에서 분비 조절되어 난각 형성에 관여하나, 보통은 장과 뼈 그리고 신장으로 이동한다(Bar, 2008). 성숙기 동안 생식호르몬의 분비와 활성화 증가는  $Ca^{2+}$ 의 농도를 증가시키고, 뼈의 수질 형성과 간에서 estrogen-dependent-plasma-Ca-binding protein 형태로 존재하면서 산란하는 동안 매우 높은 농도를 유지한다(Griffin, 1992; Walzem, 1996; Davis, 1997; Dacke, 2000; Bar, 2008). 난각은 이온뿐만 아니라, OCX-32, OCX-36, OC-17, OC-116, Osteopontin 등의 단백질로 구성되며, 이들 중 OCX-32는 uterine specific protein으로 난각의 석회화 및 외부각질화에 작용한다. OCX-36의 경우, 자궁선에서만 분비되는 단백질로 난각의 석회화에 이용되고, OC-116은 난각 복합단백질로서 120~200 kDa의 sulfate proteoglycan으로 ovoglycan이라고도 한다. 현재 이들 단백질에 대한 구조적 특징 및 SNP의 연구가 활발히 진행되고 있다(Horvat-Gordon et al., 2008; Uemoto et al., 2009; Bardet et al., 2010; Gautron et al., 2011; Cordeiro et al., 2013).

이와 같이 닭의 난각 형성에는 여러 복합적인 요인들이

작용하는데, 대사적 측면에서 이에 관여하는 유전자와 난각 단백질 유전자 간의 상호관계를 탐색하고, 닭의 노화에 따른 이들 유전자들의 발현 정도의 변화를 구명하는 것은 난각질 개선을 위해 매우 유용한 연구라 하겠다. 따라서 본 연구에서는 닭의 산란연령 증가에 따른 자궁내막조직의 변화 양상과 난각 형성에 관여하는 주요 유전자들의 상호관계 및 발현 양상을 비교 고찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 분석 시료

본 시험에 이용된 공시동물은 경남과학기술대학교 종합농장에서 부화하여 사육 중인 단관백색레그혼종(Single Comb White Leghorn)으로, 공시계는 케이지 육추 후 16주령부터 펜(pen)형태의 평사에서 방 당 100수씩(♀ 90:♂ 10) 혼합사육하였으며, 자유 급이 및 자유 급수 하였다. 시험분석은 미성숙 시기인 10주령, 산란 피크 시기인 30주령 및 산란 후기인 60주령의 개체 각 10수씩을 대상으로 하였으며, 시료는 산란개체의 경우 하루 중 난각 형성 말기 시점에 맞춰 채혈하고 도살 후 조직을 채취하였다. 시험에 관련된 닭의 관리 및 취급은 본 기관의 동물실험윤리위원회(IACUC)의 규정을 준수하여 시행하였다.

### 2. 분석방법

#### 1) 혈중 이온분석

공시계의 혈중 이온 분석을 위하여 개체의 익 정맥에서 혈액을 채취하였고, 혈액 내  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  이온 함량을 분석하였다. 채취된 혈액은 1,500 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였고, 상층의 혈청(serum)을 수거 후 분석에 이용하였다. 분석방법은 Olympus AU2700(Olympus Medical Engineering Company, Japan)을 사용하여 디지털 광학계-후 분광 방식의 분광광도 원리를 이용하여 분석하였다.

#### 2) 조직표본 제작 및 염색

##### (1) 조직표본을 위한 paraffin block 제작

공시계의 조직표본제작은 30주령 및 60주령 개체를 대상으로 하루 중 난각 형성 완료 시점에 개체를 도살하고, 멸균된 가위로 자궁의 체부 위주로 조직을 채취하였다. 채취된 조직은 D-PBS 용액에 2회 세척 후 조직 크기의 20배 정도 양의 10% Formalin(Sigma, St. Louis, MO, USA)용액으로

고정처리 하였다. 24시간 고정시킨 조직은 자동침투기(Model Microm STP 120, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Germany)를 이용하여 조직표본을 제작하였다. 조직의 수세, 탈수, 투명작업 후 paraffin 침투가 완료된 조직은 포매 작업대(Model Histostar, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Germany)를 이용하여 포매를 시행하였다. 이 때 관찰 부위가 박질이 될 수 있도록 하향하고, 제작이 완료된 표본은 회전형 박절기(Model Jung Histocut 820, Leica, Nussloch, Germany)로 박절하였다. 박절된 조직은 45~50℃의 부유항온수조에서 조직을 편 후, 슬라이드에 부착하여 표본을 제작하였다.

## (2) 염색

제작된 표본의 핵과 세포질의 염색 과정은 먼저 xylene으로 탈 paraffin 과정 후 고농도에서 저농도의 alcohol로 함수시키고, 표본을 hematoxylin-eosin solution(Muto, Tokyo,

Japan)으로 염색하였다. 조직의 염색은 퇴행성 염색으로 과염색 후 필요에 따라 탈색하였다. 염색이 완료된 후 저농도에서 고농도의 alcohol을 거쳐 탈수를 하고, xylene으로 굴절율을 높이는 투명과정을 거쳤다. 제작이 완료된 시료는 permount로 봉입한 후 검경하였다.

## 3) Telomere 및 난각 관련 유전자 발현 분석

Telomere 및 난각 관련 유전자 발현 분석을 위하여 quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR)을 시행하였다. 이를 위해 개체별 채혈한 전혈을 이용하여 QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)로 RNA를 추출한 후, cDNA를 합성하였다. Real-time PCR을 위한 primer 제작은 primer-dimer가 형성되지 않도록 하고, reference gene(18S RNA) 및 telomere, 난각 형성 관련 유전자를 분석 대상유전자로 하였다(Table 1). Quantitative-PCR은 real-

**Table 1.** The primers of telomere and eggshell related genes for the qRT-PCR

Genes	Primer	Sequence (5'~3')	Size (bp)	Tm (°C)
18s RNA	Forward	GGCGGCTTTGGTGACTCTAG	148	60
	Reverse	ATCGAACCTTGATTCCCCGT		
Telomere	Forward	CGGTTTGTFTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT	76~	60
	Reverse	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT		
OCX-32	Forward	AGAAGAGGACCACAGATTTTACGAA	101	60
	Reverse	GATGGTCATGGGCAATATTTCC		
OCX-36	Forward	TTGCAGTGCCATCCCTGTTT	200	60
	Reverse	CGGTCTGAATGATGGCATCG		
OC-17	Forward	CGTTCTGCCGCCGTTGGG	96	60
	Reverse	CCCGCGACGCGTTGAGGA		
OC-116	Forward	CCAGCTCTGAAGAAAAATACGACC	117	60
	Reverse	TTGGCTTCTTGCTAGGAATGTCAG		
CALB1	Forward	CCCCTTGGTGGTCAGTAAAT	213	60
	Reverse	CCCCAAGTGGGTATAGTTCC		
SPP1	Forward	CCAGCTCTGAAGAAAAATACGACC	200	60
	Reverse	TTGGCTCTTGCTAGGAATGTCAG		
SCNN1G	Forward	TGGGACAAAAGGCAGAAAATC	141	60
	Reverse	GCCGAAGTTGGACAGAAGGA		
ATP2A2	Forward	GCAGATTGCATATCTTTTGTGCTG	200	60
	Reverse	CATTTCTTTCCTGCCCACTCC		
CA2	Forward	ATCGTCAACAACGGGCACTCCTTC	101	60
	Reverse	TGCACCAACCTGTAGACTCCATCC		
CALM1	Forward	AAAGAGAATGTACTGGAGAGGCAGG	146	60
	Reverse	CCATGAGTGAACGACAGATAGATGG		

time PCR machine(Model LC480, Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 cDNA 5  $\mu$ L(10 ng/ $\mu$ L), primer(5 pmol/ $\mu$ L) 각각 0.5 $\mu$ L, SYBR Green(Roche, GmbH, Mannheim, Germany) 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L를 넣어 최종 volume이 20  $\mu$ L가 되도록 하였다. 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분 처리하여 최초 변성시킨 후, 95 $^{\circ}$ C 10초 변성, 60 $^{\circ}$ C 30초 접합, 72 $^{\circ}$ C 10초간 신장 반응을 40회 반복하면서 진행하고, 실시간 형광 모니터링하였다. Tm 값의 측정은 LightCycler<sup>®</sup> 480 software v1.5(Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 분석하였고, 각 표적유전자의 상대적 정량값은 Livak and Schmittgen(2001)이 제시한  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 분석하였다. Telomere 및 난각 관련 유전자의 발현값은 30주령의 특정 값(1.0)을 기준으로 상대적인  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값을 제시하였다.

3. 통계분석

텔로미어, 난각 관련 유전자의 발현을 및 혈중 이온 농도의 통계 분석은 SAS 통계패키지(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 ANOVA-one way procedure를 이용하여 연령별 분석 값 간의 유의성을 검정하고, 각 항목별 연령 간 평균값의 비교는 Tukey 방법으로 검정하였다. 연령에 따른 난각 형성 유전자 발현값 간의 상관관계는 동일 통계패키지의 Correlation Procedure를 이용하여 상관계수를 추정하고, 이의 유의성을 검정하였다.

결 과

닭의 연령에 따른 혈중 이온농도의 변화를 관찰하고자 30주령과 60주령 개체의 혈중 이온농도를 분석하고 이의 결과를 Table 2에 제시하였다. 분석결과, 혈중 Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> 이온 함량은 산란연령에 따른 차이가 없는 것으로 나타났다.

Fig. 1은 산란연령에 따른 자궁내막조직 표본의 현미경적 관찰 결과로서, 자궁은 주름진 위 중층 원주상피세포로 섬모가 있거나 없는 형태를 가지고 내강 표면에 연속된 세로의 점

Table 2. Concentration of ion components in chicken blood according to hen age

Age	Ion			
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Ca <sup>2+</sup>
30 w	151.0±1.79	3.43±0.35	118.2±2.14	22.1±2.61
60 w	151.9±3.09	3.58±0.38	116.5±2.88	22.5±2.63

The values are mean±standard deviations.

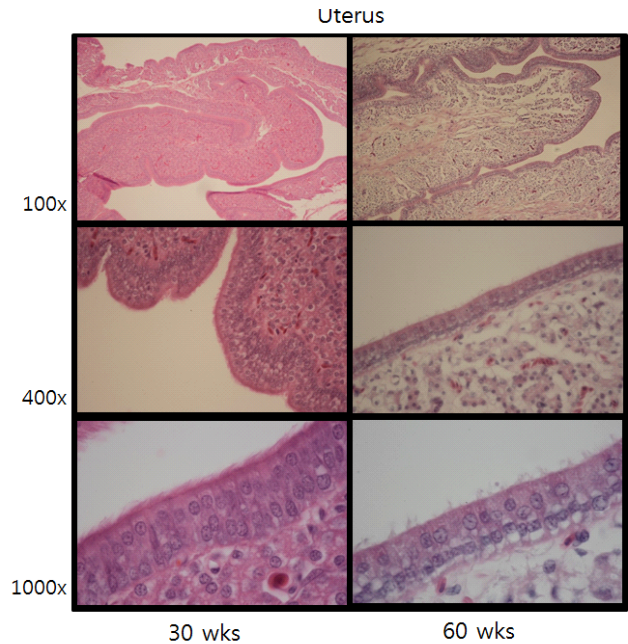


Fig. 1. Microscopical morphology of uterus endometrium tissue according to hen age

액주름을 나타낸다. 산란연령에 따른 자궁내막조직은 30주령에 비하여 60주령에 섬모상피의 탈락이 심화되고, 세포의 위축과 섬유화가 진행되는 양상을 보인다. 반면, 섬모의 길이는 30주령에 비해 60주령이 훨씬 긴 양상을 나타내고 있다 (1.1 vs. 1.7  $\mu$ m). Fig. 2는 산란연령에 따른 텔로미어의 변화

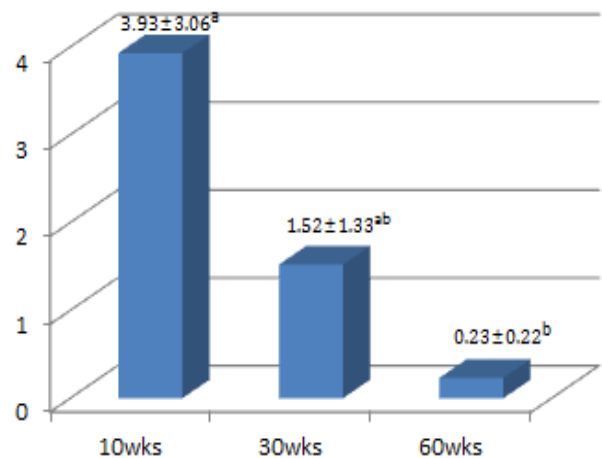
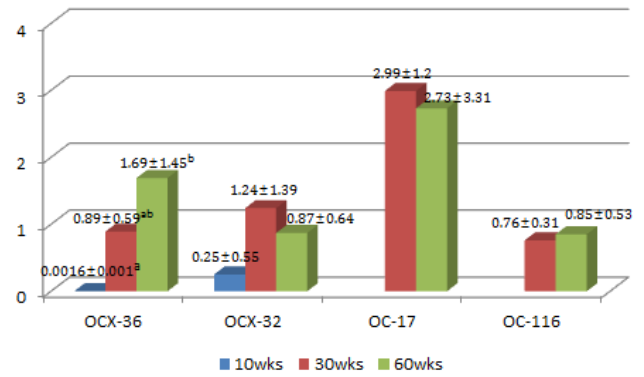


Fig. 2. The relative amount of telomeric DNA in chicken uterus cells according to hen age. The values are  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  which indicates the fold change in gene expression relative to the control. <sup>a,b</sup> Values with different superscripts significantly differ ( $P<0.05$ ).

양상으로 연령이 증가함에 따라 자궁내막세포의 텔로미어 함유율은 감소하는 것으로 나타났다. Fig. 3은 산란연령에 따른 난각 단백질 관련 유전자들의 발현양상을 제시한 것으로, OC-17 및 OC-116 유전자는 산란 이전 시기에 발현이 전혀 보이지 않았고, OCX-36 유전자는 연령이 증가함에 따라 발현량의 유의적 증가를 나타내었다. Fig. 4는 산란연령에 따른 난각 이온 관련 유전자들의 발현양상으로 난각 단백질 관련 유전자들의 발현양상과 마찬가지로 SPP1 유전자의 경우 10주령에서 유전자의 발현이 전혀 보이지 않았으며, 산란연령이 증가함에 따라 ATP2A2, SCNN1G 및 CA2 유전자 발현량은 유의적 증가를 보였다.

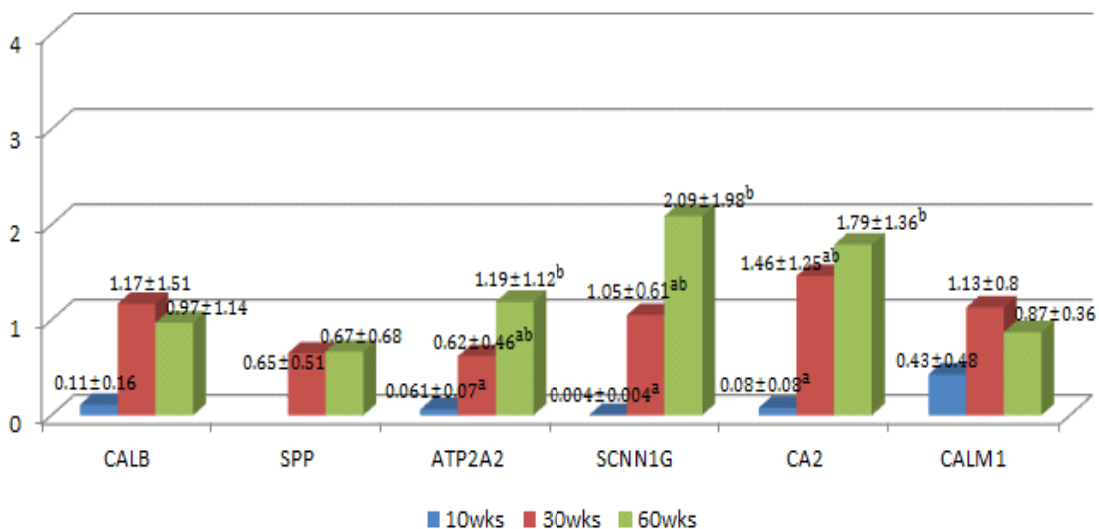
닭의 산란 연령에 따른 난각 형성 관련 유전자들 간의 연관성을 살펴보고자 이들 간의 상관계수를 추정하였다. Table 3은 난각 단백질 유전자 발현량 간 상관관계를 분석한 결과로서, OCX-32, OCX-36 및 OC-17간에는 정의 상관을, OC-116과는 낮은 부의 상관을 보이나, 모든 계수가 유의하지 않았다. Table 4는 난각 관련 이온유전자들 발현량 간 상관분석 결과로, ATP2A2, SCNN1G, CA2, CALM1 유전자들 상호 간 고도의 정의 상관관계를 확인하였다. Table 5는 난각 단백질과 난각 형성 이온유전자 발현을 간의 상관분석결과로, 난각 단백질 관련유전자인 OCX-36은 CALB-1, ATP2A2, SCNN1G, CA2, CALM1과 높은 정의 상관을, OCX-32의 경우는 ATP2A2, SCNN1G, CA2, CALM1와 고도의 정의 상관을 나타내었다.



**Fig. 3.** The relative expression values of eggshell protein genes in chicken uterus cells according to hen age. The values are  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  which indicates the fold change in gene expression relative to the control. <sup>a,b</sup> Values with different superscripts significantly differ ( $P < 0.05$ ).

### 고 찰

닭의 30주령과 60주령의 혈중 이온농도 분석 결과, 산란 연령에 따라  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  이온 농도의 차이는 없는 것으로 나타났다. 이는 사료 급이 형태가 동일할 경우, 연령 증가에 따른 혈중 이온 간의 변화가 없음을 의미한다. 산란주령에 따른 자궁내막조직 표본의 현미경적 관찰 결과, 30주령에 비하여 60주령에 섬모상피세포의 탈락이 증가하고, 자궁내막세포의 위축과 섬유화 진행양상이 심화됨을 보였다



**Fig. 4.** The relative expression values of eggshell related ion genes in chicken uterus cells according to hen age. The values are  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  which indicates the fold change in gene expression relative to the control. <sup>a,b</sup> Values with different superscripts significantly differ ( $P < 0.05$ ).

**Table 3.** The correlation coefficients among eggshell protein genes

		OCX-32	OC-17	OC-116
OCX-36	<i>r</i>	0.29888	0.27399	-0.09769
	<i>p</i>	0.166	0.3432	0.7092
OCX-32	<i>r</i>		0.56296	0.13195
	<i>p</i>		0.0567	0.6674
OC-17	<i>r</i>			-0.01555
	<i>p</i>			0.9579

*r*: correlation coefficient. *p*: *p*-value.

(Fig. 1). 더불어 섬모 길이를 측정된 결과, 30주령에 비하여 60주령에 섬모의 길이가 유의적으로 증가하였는데, 이는 30주령의 경우 세포의 활동이 활발하여 재생이 잘 이루어져 섬모의 탈락율도 적고, 섬모의 길이가 짧은 반면, 60주령의 경우 자궁조직의 노화와 손상으로 인해 섬모의 탈락이 많을 뿐만 아니라, 상대적으로 길이가 증가함을 알 수 있다. 닭의 계란형성 기간 동안 난관은 호르몬적, 신경적, 생화학적 세포변화를 겪는 복합 장기로서 난관 구조의 변화는 계란과 난각질에 직접적 영향을 준다(Mohammadpour et al., 2012). 자궁내막조직의 섬유화는 지속적인 산란으로 인한 자궁내막의 손상을 의미하며, 이로 인해 조직의 탄력성의 저하 및 기능저하를 초래할 수 있다. 자궁 내막조직의 위축은 점액질 분비에 관여하는 배상세포의 기능을 저해할 뿐만 아니라, 세

포의 apoptosis를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Song et al., 2009). 자궁의 체액을 통해 난각을 형성하는 각종 이온물질이 이동하여 난각의 무기질화에 관여하므로 이러한 체액의 분비 부족은 물질 이동 대사의 저해로 난각 형성에 영향을 미칠 수 있다.

산란연령에 따른 텔로미어 및 난각 관련 유전자들의 발현양상을 분석한 결과, 자궁내막세포의 텔로미어의 감축양상은 기존 혈액세포에서 텔로미어 변화 양상과 동일하게 닭의 연령이 증가함에 따라 텔로미어 함량의 감소를 나타내었다(Cho et al., 2005; Sohn and Subramani, 2014). 난각 관련 유전자들의 발현양상을 분석한 결과, 난각 단백질 유전자인 OC-17과 OC-116 및 난각 이온유전자인 SPP1은 산란 이전 시기에 발현이 없는 것으로 나타났다. Ovocleidin-17(OC-17)은 C-type의 lectin-like protein으로서 난각 무기질화에 있어 calcium carbonate의 침착을 조절하여 난각 강도에 영향을 미치고, 특히 산란 개시시기에 활발하게 작용하는 것으로 알려져 있다(Reyes-Grajeda et al., 2004). Ovocleidin-116(OC-116)은 일명 dermatan sulfate proteoglycan으로 조류 성장판 연골 세포에서 발현되는 것으로 알려져 있으며(Horvat-Gordon et al., 2008), 자궁에서 난각의 무기질화에 관여하며, 난각을 형성하는 산란 전 기간에 발현한다고 한다(Hincke et al., 1999). SPP1(osteopontin)은 산성 단백질로 조류 및 포유류에서 칼슘 대사에 관여한다. 닭에서의 osteopontin은 뼈와 난각의 기저층과 유두침층에 존재하는 단백질로서, 자궁 내 알이 있으면 단백질의 활성도를 자극하여 자궁 내벽의 기계적 팽창

**Table 4.** The correlation coefficients among eggshell ion related genes

		SPP-1	ATP2A2	SCNN1G	CA2	CALM1
CALB-1	<i>r</i>	0.44363	0.36885	0.39635	0.28457	0.18184
	<i>p</i>	0.0976	0.0912	0.0612	0.2112	0.418
SPP-1	<i>r</i>		0.31034	0.292	0.3694	0.28403
	<i>p</i>		0.2603	0.2725	0.1754	0.3049
ATP2A2	<i>r</i>			0.90819	0.85622	0.70677
	<i>p</i>			<0.0001	<0.0001	<0.0001
SCNN1G	<i>r</i>				0.82915	0.70178
	<i>p</i>				<0.0001	0.0001
CA2	<i>r</i>					0.74067
	<i>p</i>					<0.0001

*r*: correlation coefficient. *p*: *p*-value.

**Table 5.** The correlation coefficients between eggshell protein genes and ion related genes

		CALB-1	SPP-1	ATP2A2	SCNN1G	CA2	CALM1
OCX-36	<i>r</i>	0.66821	0.44312	0.77159	0.76126	0.59548	0.44808
	<i>p</i>	0.0004	0.0856	<0.0001	<0.0001	0.0017	0.0217
OCX-32	<i>r</i>	0.03841	-0.04394	0.82308	0.57831	0.96743	0.71107
	<i>p</i>	0.8759	0.8867	<0.0001	0.006	<0.0001	0.0001
OC-17	<i>r</i>	-0.1778	0.43421	0.32794	0.40676	0.5309	0.2738
	<i>p</i>	0.954	0.1208	0.2524	0.1489	0.0508	0.3435
OC-116	<i>r</i>	0.07577	0.33617	-0.02445	-0.2653	0.08198	-0.12854
	<i>p</i>	0.7803	0.203	0.9284	0.2873	0.7628	0.6352

*r*: correlation coefficient. *p*: *p*-value.

을 유발한다(Pines et al., 1994; Lavelin et al., 2002; Hincke et al., 2008; Jeong et al., 2012). 따라서 10주령의 경우, 미성숙 시기로 산란을 하지 않기 때문에 OC-17, OC-116 및 SPP1 유전자의 발현이 보이지 않는 것을 알 수 있다. 난각 단백질 관련 OCX-36 유전자와 난각 이온관련 ATP2A2, SCNN1G, CA2 유전자는 연령이 증가함에 따라 유전자의 발현량이 유의적으로 증가하였다. OCX-36은 큐티클 층 형성에 관여하는 단백질로 외부의 미생물로부터 계란을 보호해주는 역할을 하고, 세균의 염증 반응 동안 lipopolysaccharide(LPS)와 lipoteichoic acid(LTA)와 결합하여 내독소와 비내독소를 중화시키는 역할을 한다(Cordeiro et al., 2013). OCX-36 및 OCX-36 유도 펩타이드는 선천적 면역 반응 조절기능을 가지며, OCX-36 유도 펩타이드는 패혈증의 잠재적 치료제로도 활용된다(Kovacs-Nolan et al., 2014). 포유류에서 소포체는 세포 내  $Ca^{2+}$  농도의 항상성을 유지하는데 직접적 기여를 하는 소기관으로, ATP2A2는 자궁세포의 소포체에서  $Ca^{2+}$  이온의 이동에 관여한다(Briesemeister et al., 2010). 소포체의  $Ca^{2+}$  ATPase(ATP2A1, 2, 3)는 세포질 내 일정수준의 Ca농도를 유지하도록  $Ca^{2+}$  흡수를 촉진하는 역할을 하는 것으로 ATP2A2의 경우 다른 장기에 비해 자궁에서 과다 발현되고 있다. SCNN1G는  $Na^{+}$  channel로서  $Ca^{2+}$  교환에 관여한다.  $Na^{+}$  채널의 세 하위 단위(SCNN1A, 1B, 1G)는 난관 및 기타 장기에 비해 자궁에서 과다 발현되고 있고, 특히 자궁선 세포막에서  $Na^{+}$  농도 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(Jonchère et al., 2012). Carbonic anhydrases II(CA2)는 자궁세포에서  $HCO_3^{-}$ 를 형성하는 역할을 한다. 난각 결정체를 이루는  $HCO_3^{-}$  전구체는 자궁선 세포를 관통하는 혈액  $CO_2$ 에서 유래하며,

carbonic anhydrases(CAs)는 자궁체액으로 분비되는  $HCO_3^{-}$ 에 대하여  $CO_2$ 의 촉매작용을 한다. 즉, CA2의 주요 역할은 난각의 무기질화로서 자궁선 세포에서 CA2에 의해 생성된  $HCO_3^{-}$ 는 난각 형성을 위해 자궁체액으로 분비된다(Flemström and Allen, 2005; Jonchère et al., 2012).

난각 단백질 관련 유전자 발현량 간 상관분석 결과, OCX-32, OCX-36, OC-17 및 OC-116 간에 유의한 상관관계가 나타나지 않았다. OCX-32는 자궁 특이적 단백질로 난각의 무기질화 및 외부 각질화에 작용하여 외부 이물질의 침입을 막아주는 역할을 하며, 난각 형성 전 기간에 작용한다(Gautron et al., 2001). OC-17의 경우는 언급한 바와 같이, 난각 형성 시기에 calcium carbonate의 농도를 조절하여 난각강도에 영향하고 산란 초기에 활발하게 작용한다(Reyes- Grajeda et al., 2004). 따라서 OCX-32와 OC-17 및 OCX-36 유전자 모두 산란 전 기간에 걸쳐 난각 강도에 영향을 미치는 유전자로 사료되고, 난각 형성에 각기 독립적으로 작용하는 것으로 보인다. 난각 관련 이온유전자들 간 상관관계에서 ATP2A2, SCNN1G, CA2, CALM1 유전자 상호간 높은 정의 상관을 확인하였다. ATP2A2는 자궁세포 내 소포체에서  $Ca^{2+}$  이온의 이동, 농도 유지 및 항상성에 기여하고, SCNN1G는  $Na^{+}$  channel로서  $Ca^{2+}$ 와의 교환 및 자궁 내  $Na^{+}$ 대사에 관여하며, CA2는 자궁세포에서  $HCO_3^{-}$ 를 형성하여 난각의 무기질화에 관여한다. 한편, calmodulin(CALM)은  $Ca^{2+}$ 의 주요 수용체 단백질로서  $Ca^{2+}$  전달과정을 제어하고, 시상하부-뇌하수체-생식선축에서 성선자극호르몬 방출호르몬을 조절한다(Sun et al., 2001; Roberson et al., 2005). 이와 같이 혈액에서 자궁체액으로의 칼슘과 중탄산염의 이동은 세포의 항

상성을 유지하기 위한 이온 전달과정으로, 세포 내 생리적 이온 농도를 유지하기 위해  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  및  $\text{Cl}^-$ 의 교환이 필수적이다. 따라서 자궁선 세포에서 체액으로 분비되는  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ 의 조절에 관여하는 ATP2A2, SCNN1G, CA2, CALM1 유전자들은 난각 형성 대사 과정 중 상호 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다. 본 연구에서 추정된 난각 형성 관련 상기 이온 유전자들 발현량 간의 높은 정의 상관관계는 이러한 이론을 뒷받침하는 결과라 하겠다(Table 4). 또한 난각 단백질 관련 유전자 발현량과 난각 형성 이온 관련 유전자 발현량들 간의 상관분석결과 OXC-36는 ATP2A2, CALB-1, SCNN1G, CA2, CALM1와 높은 정의 상관관계를, OXC-32의 경우 ATP2A2, SCNN1G, CA2, CALM1와 높은 정의 상관관계가 있음을 확인하였다. 이들 간 높은 정의 상관관계는 난각 단백질 관련 유전자와 이온 관련 유전자들이 난각 형성 전 기간 동안 상호 밀접하게 관련되어 작용함을 시사한다.

이상에서 닭의 연령이 증가함에 따라 노화로 인한 자궁내막조직의 손상이 촉진되고, 이로 인하여 난각질의 저하를 초래하게 된다. 그러나 산란후기에도 기능적으로 정상적인 난각을 형성할 수 있는 이유는 일부 난각 단백질 및 이온 관련 유전자의 발현이 증가되어 난각 형성의 항상성 유지를 조절하기 때문인 것으로 사료된다.

## 적 요

계란의 난각은 닭의 자궁에서 형성되는 복잡하고 고도화된 다층 석회화 구조이다. 본 연구는 닭의 산란연령에 따른 자궁내막조직의 변화 양상과 난각 형성에 관여하는 주요 유전자들의 발현 양상을 고찰하였다. 난각 형성과 관련하여 난각 단백질과 관련한 OXC-32, OXC-36, OC-17, OC-116 유전자와 난각 이온과 관련한 CALB1, SPP1, SCNN1G, ATP2A2, CA2, CALM1 유전자를 분석대상으로 하였다. 자궁내막조직의 현미경적 관찰 결과, 연령이 증가함에 따라, 자궁 섬모 상피세포의 탈락 및 세포의 위축과 섬유화 진행양상이 심화되었다. 그러나 연령 증가에 따른 혈중 이온성분의 농도차이는 없었다. 자궁내막 상피세포의 텔로미어 함량 분석 결과, 산란연령이 증가함에 따라 텔로미어 함유율이 감소됨을 확인하였다. 대부분의 난각 형성 관련 유전자의 발현량은 산란연령에 따라 유의한 변화를 나타내었다. 일부 난각 단백질 관련 유전자의 발현량은 산란연령이 증가함에 따라 증가 양상을 보였으나, 이들 유전자들 간의 상호 관련성은 유의

한 관계를 보이지 않았다. 난각 형성 이온 관련 유전자인 ATP2A2, SCNN1G, CA2, CALM1 유전자 간에는 상호 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. 또한 난각 단백질 관련 OXC-32 및 OXC-36 유전자는 대부분의 이온 관련 유전자들과 높은 정의 상관관계를 보였다. 따라서 OXC-32, OXC-36, CALB-1, ATP2A2, SCNN1G, CA2 및 CALM1 유전자들이 난각 형성에 상호 협력하거나 또는 독립적으로 작용한다. 결론적으로 산란연령이 증가함에 따라 자궁내막세포의 손상이 일어나지만, 그럼에도 불구하고 정상적인 난각을 형성할 수 있는 이유는 난각 단백질 및 난각 형성 이온 관련 일부 유전자들이 발현을 조절하여 난각 형성의 항상성 유지하기 때문인 것으로 사료된다.

(색인어 : 노화, 난각 형성 유전자, 자궁내막조직, 난각, 닭)

## 사 사

이 논문은 2014년도 경남과학기술대학교 박사 대학원생 지원 사업에 의하여 연구되었음.

## REFERENCES

- Akyurek H, Okur AA 2009 Effect of storage time, temperature and hen age on egg quality in free-range layer hens. *J Anim Vet Adv* 8:1953-1958.
- Ariyadi B, Isobe N, Yoshimura Y 2012 Differences in the mucosal surface barrier formed by mucin in the lower oviductal segments between laying and molting hens. *Poult Sci* 91:1173-1178.
- Bar A 2008 Calcium homeostasis, vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds. *Comp Biochem Physiol A* 151:477-490.
- Bar A 2009 Calcium transport in strongly calcifying laying birds: Mechanisms and regulation. *Comp Biochem Physiol Part A* 152:447-469.
- Bar A, Vax E, Striem S 1999 Relationships among age, eggshell thickness and vitamin D metabolism and its expression in the laying hen. *Comp Biochem Physiol* 123:147-154.
- Bardet C, Vincent C, Lajarille MC, Jaffredo T, Sire JY 2010 OC-116, the chicken ortholog of mammalian mepe found in eggshell, is also expressed in bone cells. *J Exp Zool* 314B:653-662.



- Briesemeister S, Rahnenfuhrer J, Kohlbacher O 2010 Going from where to why-interpretable prediction of protein sub-cellular localization. *Bioinform* 26(9):1232-1238.
- Cho EJ, Choi CH, Sohn SH 2005 The amount of telomeres and telomerase activity on chicken embryonic cells during developmental stages. *Kor J Anim Sci* 47(2):187-194.
- Cordeiro CMM, Esmaili H, Ansah G, Hincke MT 2013 Ovocalyxin-36 is a pattern recognition protein in chicken eggshell membranes. *Plos One* 8(12):e84112.
- Dacke CG 2000 The parathyroids, calcitonin, and vitamin D. In: Whittow GC (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology*. Academic Press. New York. pp 473-488.
- Davis RA 1997 Evolution of processes and regulators of lipoprotein synthesis: from birds to mammals. *J Nutr* 127: 795S-800S.
- Flemström G, Allen A 2005 Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(1):1-19.
- Gautron J, Hincke MT, Mann K, Panhe'leux M, Bain M, McKee MD, Solomon SE, Nys Y 2001 Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein. *J Biol Chem* 276:3 9243-39252.
- Gautron J, Rehault-Godbert S, Pascal G, Nys Y, Hincke MT 2011 Ovocalyxin-36 and other LBP/BPI/PLUNC-like proteins as molecular actors of the mechanisms of the avian egg natural defences. *Biochem Soc Trans* 39(4):971-976.
- Griffin HD 1992 Manipulation of egg yolk cholesterol. a physiologist's view. *World's Poult Sci J* 48:101-112.
- Hill AT, Eissinger RC, Hamilton DM, Patko J 1980 Sample sizes required for predicting albumen quality in stored eggs from eight commercial stocks. *Can J Anim Sci* 60:979-989.
- Hincke MT, Chien Y-C, Gerstenfeld LC, McKee MD 2008 Colloidal-gold immunocytochemical localization of osteopontin in avian eggshell gland and eggshell. *J Histochem Cytochem* 56(5):467-476.
- Hincke MT, Gautron J, Tsang CP, McKee MD, Nys Y 1999 Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116. *J Biol Chem* 274(46):32915-32923.
- Horvat-Gordon M, Yu F, Burns D, Leach Jr RM 2008 Ovocleidin (OC 116) is present in avian skeletal tissues. *Poult Sci* 87:1618-1623.
- Huang CL, Sun L, Moonga BS, Zaidi M 2006 Molecular physiology and pharmacology of calcitonin. *Cell Mol Biol* 52:33-43.
- Huntley DM, Holder DP 1978 Ultrastructure of shell gland tissue from hens producing good and poor eggshells. *Poult Sci* 57:1365-1368.
- Ingleton PM 2002 Parathyroid hormone-related protein in lower vertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 132B:87-95.
- Jeong W, Lim W, Kim J, Ahn SE, Lee HC, Jeong JW, Han JY, Song G, Bazer FW 2012 Cell-specific and temporal aspects of gene expression in the chicken oviduct at different stages of the laying cycle. *Biol Reprod* 86(6):172, 1-8.
- Jin YH, Lee KT, Lee WI, Han YK 2011 Effects of storage temperature and time on the quality of eggs from laying hens at peak production. *Asian-Aust J Anim Sci* 24:279-284.
- Jonchère V, Brionne A, Gautron J, Nys Y 2012 Identification of uterine ion transporters for mineralisation precursors of the avian eggshell. *BMC Physiology* 12:10.
- Kovacs-Nolan J, Cordeiro C, Young D, Mine Y, Hincke M 2014 Ovocalyxin-36 is an effector protein modulating the production of proinflammatory mediators. *Vet Immun Immunopath* 160:1-11.
- Lavelin I, Meiri N, Einat M, Genina O, Pines M 2002 Mechanical strain regulation of the chicken glypican-4 gene expression in the avian eggshell gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(4):R853-861.
- Lee MH, Cho EJ, Choi ES, Sohn SH 2016 The effect of storage period and temperature on egg quality in commercial eggs. *Kor J Poult Sci* 43(1):31-38.
- Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> method. *Methods* 25(4):402-408.
- Mohammadpour AA, Zamanimoghadam A, Heidari M 2012 Comparative histomorphometrical study of genital tract in adult laying hen and duck. *Vet Res Forum* 3(1):27-30.
- Peebles ED, Brake J 1987 Eggshell quality and hatchability in broiler breeder eggs. *Poult Sci* 66:596-604.
- Pines M, Knopov V, Bar A 1994 Involvement of osteopontin in egg shell formation in the laying chicken. *Matrix Biol* 14:765-771.
- Pooley AS 1979 Ultrastructural relationships of mineral and organic matter in avian eggshells. In *Scanning Electron*

- Microscopy/1979/II. SEM Inc. AMF O'Hare, IL.
- Ramasamy I 2006 Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clin Chem Lab Med* 44:237-273.
- Reyes-Grajeda JP, Moreno A, Romero A 2004 Crystal structure of ovocleidin-17, a major protein of the calcified *Gallus gallus* eggshell. *JBC* 279(39):40876-40881.
- Roberson MS, Bliss SP, Xie J, Navratil AM, Farmerie TA, Wolfe MW, Clay CM 2005 Gonadotropin-releasing hormone induction of extracellular-signal regulated kinase is blocked by inhibition of calmodulin. *Mol Endocrinol* 19:2412-2423.
- Roberts JR, Chousalkar K, Samiullah S 2013 Egg quality and age of laying hens: implications for product safety. *Anim Prod Sci* 53:1291-1297.
- Roland DA Sr 1979 Factors influencing shell quality of aging hens. *Poult Sci* 58:774-777.
- Romanoff AL 1949 *The Avian Egg*. John Wiley & Sons. Inc. New York, NY. pp. 353.
- Samli HE, Agma A, Senkoylu N 2005 Effects of storage time and temperature on egg quality in old laying hens. *J Appl Poult Res* 14:548-553.
- Silverman SL 2003 Calcitonin. *Endocrinol Metab Clin N Am* 32:273-284.
- Soares JH Jr 1984 Calcium metabolism and its control- a review. *Poult Sci* 63:2075-2083.
- Sohn SH, Subramani VK 2014 Dynamics of telomere length in the chicken. *World's Poult Sci J* 70:721-735.
- Song J, Wolf SE, Wu XW, Finnerty CC, Gauglitz GG, Herndon DN, Jeschke MG 2009 Starvation induced proximal gut mucosal atrophy diminished with aging. *J Parenter Enteral Nutr* 33(4):411-416.
- Suk YO, Park C 2001 Effect of breed and age of hens on the yolk to albumen ratio in two different genetic stocks. *Poult Sci* 80(7):855-858.
- Sun YM, Dunn IC, Baines E, Talbot RT, Illing N, Millar RP, Sharp PJ 2001 Distribution and regulation by oestrogen of fully processed and variant transcripts of gonadotropin releasing hormone I and gonadotropin releasing hormone receptor mRNAs in the male chicken. *J Neuroendocrinol* 13:37-49.
- Talmage RV, Mobley HT 2008 Calcium homeostasis: reassessment of the actions of parathyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol* 156:1-8.
- Tyler 1969 A study of the eggshells of the Gaviiformes, Procellariiformes, Podicipitiformes and Pelecaniformes. *J Zool London* 158:395-412.
- Uemoto Y, Suzuki C, Sato S, Sato S, Ohtake T, Sasaki O, Takahashi H, Kobayashi E 2009 Polymorphism of the ovocalyxin-32 gene and its association with egg production traits in the chicken. *Poult Sci* 88:2512-2517.
- Walzem RL 1996 Lipoproteins and the laying hen: form follows function. *Poult Avian Biol Rev* 7:31-64.
- Williams KC 1992 Some factors affecting albumen quality with particular reference to Haugh unit score. *World's Poult Sci J* 48:5-16.

---

Received Dec. 29, 2016, Revised Mar. 6, 2017, Accepted Mar. 7, 2017