

라이코펜 첨가 급여가 닭의 지방대사, 포도당 수송 및 친염증 유전자 발현에 미치는 영향

장인석·문양수[†]

경남과학기술대학교 동물생명과학과

Effects of Lycopene on the Expression of Lipid Metabolism, Glucose Transport and Pro-Inflammatory Related Genes in Chickens

In Surk Jang and Yang Soo Moon[†]

Dept. of Animal Science and Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

ABSTRACT The present study aimed to investigate the effects of lycopene on hepatic metabolic- and immune-related gene expression in laying hens. A total of 48 25-week-old White Leghorn hens were randomly allocated into four groups consisting of four replicates of three birds: control (basal diet), T1 (basal diet + 10 mg/kg of tomato powder-containing lycopene), T2 (basal diet + 10 mg/kg of micelles of tomato powder-containing lycopene), and T3 (basal diet + 10 mg/kg of purified lycopene). Chickens were fed ad libitum for 5 weeks, and then total RNA was extracted from the livers for quantitative RT-PCR analysis. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) expression was decreased in the liver of chickens after lycopene supplementation ($P < 0.05$). Micellar lycopene supplementation decreased the expression of PPAR γ target genes including fatty acid binding protein 4 (FABP4) and fatty acids synthase (FASN) in the T2 group ($P < 0.05$). Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) and C/EBP- α were also downregulated in hens fed with micellar lycopene ($P < 0.05$). Glucose transporter 8 (GLUT-8) was upregulated in the T2 and T3 groups ($P < 0.05$). However, the expression of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1) was not changed by lycopene supplementation. Pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) were downregulated by lycopene supplementation ($P < 0.05$). These data suggest that the type of lycopene supplementation is critical and that micelles of tomato powder-containing lycopene may play an important role in the modulation of lipid metabolism and immunity in chickens.

(Key words: lycopene, gene expressions, metabolism, inflammation, chickens)

서론

라이코펜(lycopene)은 non-provitamin A 카로테노이드(carotenoid)로서 식물과 미생물에 의해 합성이 되지만 동물은 합성할 수가 없다. 라이코펜은 베타카로틴(β -carotene), 루테인(lutein) 등과 함께 대표적인 카로테노이드 계열로 붉은 색을 가진 채소와 과일 즉, 토마토, 감, 수박, 석류, 붉은 포도 등에 풍부하게 함유되어 있다. 라이코펜은 가공된 토마토(스파게티 소스, 케첩, 토마토 paste)에 많이 함유(7~17 mg/100 g)되어 있다(Nguyen and Schwartz, 1999; Rao, 2002). 많은 카로테노이드 중에서 라이코펜은 가장 강력한 항산화제 중 하나로(Sahin et al., 2008; Englmaierova et al., 2011) 알려

져 있으며, 라이코펜의 생리적 작용은 스트레스, 급속 성장, 높은 산란율, 빠른 대사작용 등이 요구되는 가금에 큰 이점이 될 수 있다(Englmaierova et al., 2011). 라이코펜은 메추리에서 산화적 스트레스를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(Sahin et al., 2006). 스트레스 환경에 있는 메추리에서 사료 내 토마토 분말 첨가 급여는 사료섭취량, 증체량, 사료효율 등을 개선하였다고 한다(Sahin et al., 2008). 위와 같은 라이코펜의 항산화적 기능 외에 여러 질병 모델과 연관된 항염증에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Huang et al., 2008; Feng et al., 2010). 이와 관련하여 라이코펜은 식이 유도 비만 또는 스트레스에 노출된 생쥐의 지방조직에서 염증관련 유전자들(IL-6, IL1 β , MCP-1)의 발현을 억제하는

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

것으로 보고되었다(Gouranton et al., 2011). 닭에서 베타카로틴(β -carotene)이 사료의 첨가제로서 산화적 스트레스 완화(Palozza et al., 2000)와 계란 난황으로의 전이로 착색도가 크게 개선되었다는 보고도 있다(Damron et al., 1984). 라이코펜의 섭취가 사람의 복부지방, 허리둘레, 체지방 등의 감소에 영향을 미친다는 보고(Sluijs et al., 2009)가 있었으며, 이는 라이코펜이 지방조직 또는 간에서 지방대사에 관여할 수 있음을 보여준다. 최근에는 라이코펜이 생쥐와 토끼에서 지방대사 연관 유전자들의 발현 조절에 관여하는 것으로도 보고된 바 있다(Tan et al., 2014; Mao et al., 2014). 사람에서 라이코펜의 섭취는 혈중 콜레스테롤의 농도를 낮게하여 심혈관 질환의 위험성을 줄여준다는 보고도 있다(Fuhman et al., 1997; Ried and Fakler, 2011). 위와 같이 라이코펜이 항산화적 스트레스, 항염증, 난황의 착색도 개선 등에 대한 보고는 있지만, 라이코펜의 첨가급여가 닭의 지방과 포도당 대사 및 면역 관련 유전자들의 발현에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 닭에서 라이코펜의 가공 및 급이형태가 지방대사, 지방산 및 포도당 운반 그리고 염증 관련 유전자들의 발현에 어떤 영향을 미치는지 살펴보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 분석 시료

본 연구에 이용된 공시동물은 경남과학기술대학교 종합농장에서 부화하여 사육 중인 백색레그혼종 순계(White Leghorn)를 이용하였다. 시험 설계는 lycopene의 첨가원에 따라 대조군(CON, basal diet(BD)), 토마토 건조분말 급여군(T1, BD+tomato powder-containing 10 mg lycopene/kg 사료), 토마토 건조분말 유화처리군(T2, BD+micellar of tomato powder-containing 10 mg lycopene/kg 사료) 및 정제 lycopene 급여군(T3, BD+purified 10 mg lycopene/kg 사료) 등 모두 4처리구로 설정하였다. 사양시험은 25주령(48수)부터 5주 동안 실시하였으며, 시험 종료(30주령) 후 각 처리구당 무작위로 6수씩 희생하여 간 조직을 채취하고, 액체질소로 냉동 후 -80°C 의 저온냉장고에 분석 시까지 보관하였다. 간에서 RNA를 추출하여 qRT-PCR을 실시하여 처리 간 유전자 발현을 비교 분석하였다. 공시계의 사양관리는 강제 환기 및 자동 온도 조절 시스템이 완비된 무창 계사 내 2단 4열 케이지 형태로 칸 당 90 cm(W) × 90 cm(L) × 66 cm(H)의 철망 배터리형 케이지에서 사육하였고, 사료 급이는 자유채식시켰으며, 점등 관리는 16시간 고정 점등하였다. 시험에 관련된 닭의 관리 및 취

급은 본 대학 동물실험윤리 규정을 준수하였다.

2. 유전자 발현 분석

유전자 발현 분석은 이전에 발표된 방법(Sohn et al., 2015)에 준하여 실시하였다. 간단히 소개하면 다음과 같다. 유전자 발현 분석을 위하여 간 조직은 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조사의 이용안내에 따라 total RNA를 추출하였다. 분리한 RNA는 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 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 μL 를 넣어 총 20 μL 가 되도록 혼합하고, 95°C 에서 3분간 최초 변성을 시킨 다음, 95°C 15초간 변성, 60°C 에서 15초간 접합, 72°C 40초간 확장과정을 40회 반복하였다. 그리고 94°C 1분간 재 접합 과정을 거친 후 55°C 에서 1분간 재 확장 과정을 실시하였다. 마지막으로 55°C 에서 0.5°C 씩 상승시켜 형광접합물질인 SYBR Green이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다. 유전자 발현의 상대적 발현은 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 방법을 이용하여 분석하였다(Livak and Schmittgen, 2001). 본 시험에 이용된 primer 들의 정보는 Table 1에 제시하였다.

3. 통계분석

시험구의 유전자 발현에 대한 통계처리는 각 군의 결과를 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 처리별로 SAS 통계패키지(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 GLM procedure(SAS, 1996)를 이용하여 Duncan 다중검증법에 따라 95% 수준에서 각 군의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 라이코펜의 첨가급여가 닭의 지방대사 연관 유전자 발현에 미치는 영향

백색레그혼 종을 대상으로 25주령부터 5주간 대조구와 라이코펜 첨가급여구로 구분하여 사양시험을 실시하고, 이들 개체들의 간 조직으로부터 지방대사 연관 유전자들의 발현을 분석하여 Table 2에 제시하였다. 지방세포 분화와 지방 합성에 중요한 역할을 하는 PPAR γ 는 대조구에 비하여 분말첨가인 T1과 유화처리된 T2 처리구에서 모두 억제되었다($P < 0.05$). 지방산결 합단백질 FABP4도 T2에서 효과적으로 그 발현이 억제되었고, 지방합성효소 유전자 FASN의 발현도 T2에

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

Genes	Primer sequence (5' to 3')	Size of product (bp)	Accession number (GenBank)
FASN	Forward: ttggtgtaccgcctcag Reverse: ttcccactgctgcttag	91	NM205155
FABP4	Forward: atggcaaagagactgttatcaa Reverse: tgaagacggcttctcat	118	NM204290
PPAR γ	Forward: gattagcacaacttcacacaag Reverse: tctcgttacagaactctatca	111	AB045597
C/EBP α	Forward: atggagcaagccaacttc Reverse: gcctctctgtagccgtag	110	NM001031459
SREBP1	Forward: gatggtcgcagtggtgctgt Reverse: ggctccccgtagacaaaga	97	AY029224
SREBP2	Forward: atgctggacctgaagatagat Reverse: cctggctctgaatcaatgg	115	AJ310769
GLUT2	Forward: gctgcctcttctgctaa Reverse: gtccctccaacccaac	116	NM207178
GLUT8	Forward: gaggaggaggactaagc Reverse: catcagaatcacaccaataagaag	78	AB083371
LPL	Forward: tgccaagaagcctctaaag Reverse: gaacagactccatctctct	98	NM205282
CPT1A	Forward: cagacaccagcaacac Reverse: aacaccgtaacctcatcag	96	NM001012898
TNF α	Forward: tcgggagtggtgctttaag Reverse: tgactgaataaacaggcaca	84	AY765397
IL6	Forward: cgatagcgaagcagaac Reverse: accactcatcgggatttacc	96	NM204628
RPL27	Forward: cagcaatgggcaagaaga Reverse: gcatcaggtggttagtt	81	NM205337

Table 2. Effects of lycopene-supplemented diets on the mRNA gene expressions involved in lipid metabolism in the liver of chickens[#]

Item	Treatment								p-value
	C		T1		T2		T3		
	Δ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Δ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Δ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Δ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	
FASN	-0.10±0.13 ^b	1.00	-0.02±0.49 ^b	0.95	0.79±0.07 ^a	0.54	-0.32±0.44 ^b	1.17	0.0031
PPAR γ	7.24±0.73 ^b	1.00	8.22±0.74 ^a	0.51	8.11±0.53 ^a	0.55	7.80±0.12 ^{ab}	0.68	0.0323
C/EBP α	6.11±0.34 ^b	1.00	6.35±0.23 ^{ab}	0.85	6.68±0.09 ^a	0.67	6.16±0.27 ^b	0.96	0.0003
SREBP1	7.37±0.81 ^a	1.00	7.82±0.17 ^a	0.73	7.89±0.24 ^a	0.70	7.36±0.18 ^a	1.01	0.2275
SREBP2	3.18±0.13 ^b	1.00	3.40±0.31 ^{ab}	0.86	3.58±0.25 ^a	0.76	3.33±0.20 ^{ab}	0.90	0.0359

The values (means±S.D., n=6) are Δ Ct, 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}.

^{a,b} Values with different superscripts within the same row significantly differ ($P<0.05$).

[#] Dietary treatments are as follows: Control (C): basal diet (BD), T1 (BD+tomato powder-containing lycopene 10 mg/kg diet), T2 (BD+micellar of tomato powder-containing lycopene 10 mg/kg diet) and T3 (BD+purified lycopene 10 mg/kg diet).

서 가장 낮았다($P < 0.05$). 지방대사조절 연관 전사인자인 SREBP1의 발현은 라이코펜에 의한 영향을 받지 않았지만, 콜레스테롤합성 조절 전사인자인 SREBP2의 발현은 역시 T2에서 효과적으로 억제되었으며, 분말 혹은 정제된 라이코펜은 대조구와 차이가 없었다. PPAR γ 는 지방합성(lipogenesis)과 간 내 중성지방의 축적에 기여를 한다. 포유류에서는 베타카로틴 혹은 라이코펜의 섭취가 핵내 수용체 RXR, RAR 혹은 PPAR 등의 ligand들을 활성화시키고, 이들에 의해 조절을 받아 생리적 변화를 유도한다고 한다(Zaripheh et al., 2006). 본 연구에서도 닭에 대한 라이코펜의 첨가급여는 대조구에 비하여 약 30~50% 정도 PPAR γ 의 발현이 억제되었다. 본 연구에서는 혈중 지방산 혹은 중성지방 함량을 분석하지 않아 결과를 예단하기 어렵지만, 위와 같은 PPAR γ 의 발현억제는 지방분해(lipolysis)와 지방의 유동성(fat mobilization)의 증가에 기인하며, 라이코펜의 첨가 급여 시 지방의 섭취량도 감소시키고, 이는 혈중 중성지방의 감소와 연계된다는 보고(Lobo et al., 2010)를 감안하면, PPAR γ 의 발현 감소는 그 의미가 매우 크다고 사료된다. 본 연구에서는 지방합성효소의 유전자 FASN의 발현이 T2에서 효과적으로 감소된 것으로 보아 Lobo 등(2010)의 결과와 유사하지만, 유휴 처리 되지 않은 라이코펜의 경우는 효과적으로 FASN의 감소를 유도하지 못하였다. 지방대사와 카로테노이드 대사의 연계성이 최근에 밝혀졌는데, PPAR γ 는 하부 유전자들, 특히 지방대사 연관 유전자들의 발현을 조절하게 되고, PPAR γ 의 response element가 carotenoid-15, 15'-monooxygenase(CMO-1) 유전자의 promoter 영역에 존재함으로써 서로의 대사경로가 겹치는 것으로 알려졌다(Boulanger et al., 2003). 최근 보고에 의하면 CMO-1은 생쥐에서 지방산의 흡수, 운반 및 대사에도 영향을 미치는 것으로 알려졌다(Ford et al., 2013). 라이코펜은 산화적 스트레스에 효과적인 것으로 잘 알려져 있지만, 사람의 심혈관 질환의 감소에도 영향이 있다고 하는데, 이는 라이코펜에 의한 산화적 스트레스 완화와 더불어 low-density-lipoprotein (LDL) cholesterol의 감소에 있다고 한다(Ried and Fakler, 2011). 닭을 이용한 본 실험에서 유휴처리된 라이코펜 첨가구는 SREBP2의 유전자 발현이 효과적으로 억제됨을 볼 수 있었으나, 분말 혹은 정제된 첨가구는 그 효과가 적거나 없었다. 분말의 처리형태 즉 흡수가 용이한 유휴된 라이코펜이 효과적으로 콜레스테롤 합성 조절인자인 SREBP2를 억제함을 보여 주었다. SREBP2는 LDL receptor의 합성을 촉진 시키는 기능을 하지만, 라이코펜에 의한 SREBP2의 감소는 LDL receptor의 유전자 발현 억제로 연결되어 최종적으로 LDL-cholesterol의 감소로 이어질 것으로 사료

된다. SREBP1은 포유류에서 지방합성에 관여하는 것으로 알려져 있지만, 닭을 이용한 라이코펜 실험에서는 처리구 간에 유의적 차이를 발견할 수 없었으며, C/EBP α 의 경우 유휴처리된 라이코펜구에서 발현이 억제되었지만, 나머지 처리구에서는 대조구와 큰 차이를 보이지 않아 라이코펜에 의한 C/EBP α 의 조절은 제한적인 것으로 보인다. SREBP1과 PPAR γ 는 간에서 지방합성(lipogenesis)의 주요 인자이지만 SREBP1은 PPAR γ 의 보조자의 역할이 더 큰 것으로 알려져 있다(Brown and Goldstein, 1997). 닭에서 라이코펜에 의한 지방대사의 주요 조절인자는 PRAR γ 와 SREBP2인 것으로 사료된다.

2. 라이코펜의 첨가급여가 지방의 분해와 운반에 미치는 영향

닭에서 체내 축적된 중성지방의 lipoprotein lipase(LPL)에 의한 분해(lipolysis), 분해된 지방산의 β -oxidation을 위한 carnitine palmitoyltransferase I(CPT1)에 의한 미토콘드리아로의 운반, 그리고 fatty acid binding protein(FABP)에 의한 세포 또는 조직간 지방산 운반 등에 첨가 급여된 라이코펜이 어떤 영향을 주는지 확인하기 위하여 위의 유전자들의 발현을 분석하였다(Table 3). Lipoprotein lipase는 라이코펜 분말 처리(T1)에서 낮게 발현되었고, 나머지 라이코펜 처리구는 유의성을 보이지 않았다. CPT1의 경우, 라이코펜의 첨가 유무와 관계없이 처리 간에 차이를 볼 수 없었다. FABP은 유휴처리 및 정제처리 라이코펜구에서 뚜렷한 발현의 차이를 보였다($P < 0.05$). 토마토를 섭취한 생쥐에서 PPAR γ 의 발현이 억제되고(Tan et al., 2014), β -카로틴을 급여한 경우에도 PPAR γ 의 발현이 억제(Lobo et al., 2010)되어 지방의 분해(lipolysis)와 지방의 유동성(mobilization)을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 닭을 이용한 본 실험에서 포유동물과 같이 라이코펜에 의한 지방분해 증가는 관찰되지 않았으며, 오히려 biomarker 유전자인 LPL이 토마토처리구(T1)에서 억제된 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 포유류와 조류의 지방대사에 차이가 있음을 시사한다. 닭의 경우, 대사활동이 매우 빠르기 때문에 에너지 소비량도 높을 것으로 사료되는데, 이를 위하여 지방산의 미토콘드리아 내부로의 활발한 운송이 중요할 것이다. 포유동물의 간에서 지방의 축적은 간에서 지방산 합성의 증가 또는 β -oxidation의 감소에 기인한다(Desvergne and Wahli, 1999). CPT-1은 지방산의 미토콘드리아 내부로 이동하기 위한 통로로서 간의 미토콘드리아 β -oxidation의 주요 조절자(master regulator)이다(Desvergne and Wahli, 1999). 닭을 이용한 라이코펜 첨가시험에서 간의 CPT1의 유전자 발현은 처리 구에 차이를 보이지 않는 것으로 보아, 닭에서 라이코펜

Table 3. Effects of lycopene-supplemented diets on the mRNA gene expressions involved in fatty acid transport in the liver of chickens[#]

Item	Treatment								p-value
	C		T1		T2		T3		
	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	
LPL	8.17±0.34 ^b	1.00	9.00±0.18 ^a	0.56	8.68±0.47 ^{ab}	0.70	8.77±0.51 ^{ab}	0.66	0.0503
CPT1A	4.24±0.12 ^a	1.00	4.47±0.15 ^a	0.85	4.58±0.28 ^a	0.79	4.50±0.38 ^a	0.84	0.3112
FABP4	7.53±0.42 ^c	1.00	7.85±0.40 ^c	0.80	9.52±0.08 ^a	0.25	8.79±0.15 ^b	0.42	<0.0001

The values (means±S.D., n=6) 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}.

^{a~c} Values with different superscripts within the same row significantly differ (P<0.05).

[#] Dietary treatments are as follows: Control (C): basal diet (BD), T1 (BD+tomato powder-containing lycopene 10 mg/kg diet), T2 (BD+micellar of tomato powder-containing lycopene 10 mg/kg diet) and T3 (BD+purified lycopene 10 mg/kg diet).

은 미토콘드리아 β-oxidation의 조절과는 무관한 것으로 사료된다. 그러나 PPARγ의 target gene 중의 하나인 FABP는 라이코펜 첨가급여에 의한 PPARγ의 발현 억제와 더불어 동반 억제됨을 확인하였다(P<0.05). Zaripheh 등(2006)에 의하면 쥐에서 라이코펜의 첨가급여는 신장과 부신에서 CMO-1과 PPARγ의 억제와 더불어 FABP를 효과적으로 감소시켰다고 한다. 이는 라이코펜이 지방대사와 조절에 깊이 관여하고 있는 것으로 보이지만, FABP의 낮은 발현과 오히려 억제된 LPL 발현 등을 감안하면 조류에서는 포유동물과 다른 지방대사 조절 작용이 있을 것으로 사료된다.

3. 라이코펜의 첨가급여가 닭의 포도당 대사 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향

라이코펜의 급여형태가 백색레그혼종의 간 조직에서 포도당 대사 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향을 분석하여 Table 4에 제시하였다. GLUT2와 GLUT8 모두 정제된 라이

코펜 첨가구에서 대조구에 비해 발현이 증가하였으며, GLUT8의 경우 유허처리 라이코펜에서도 증가함을 볼 수 있었다(P<0.01). 포도당 신합성과 glycogen의 분해는 조류의 간에서 담당하며, 체내 포도당 항상성에 중대한 기여를 한다(Warriss et al., 1988; Tinker et al., 1986). 비타민과 포도당대사에 관한 연구는 1970년대 보고된바 있으며, 닭에서 비타민 A가 결핍되면 간에서 glycogen이 증가하여 비타민이 포도당대사 조절에 관여할 수 있음을 보여주었다(Nockels et al., 1973). 포도당 운송체인 GLUT는 세포의 포도당 흡수 및 포도당 항상성 유지에 중요한 기능을 하며, 닭에서 GLUT2는 간과 신장에서 주로 발현되고, GLUT8은 대부분의 세포조직에서 발현된다(Kono et al., 2005). 최근 보고에 의하면 육계에서 열스트레스는 소장에서 영양소의 흡수와 운송이 저하되었는데, 포도당 운송에 관련된 GLUT2의 유전자 발현이 크게 감소하였다고 한다(Sun et al., 2015). 조류는 포유동물에 비해 높은 혈중 포도당 농도(Braun and Sweazea, 2008), 세포 내 매

Table 4. Effects of lycopene-supplemented diets on the mRNA gene expressions involved in glucose transporter in the liver of chickens[#]

Item	Treatment								p-value
	C		T1		T2		T3		
	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	
GLUT2	3.81±0.05 ^a	1.00	3.68±0.16 ^a	1.09	4.30±0.26 ^a	0.91	3.32±0.18 ^b	1.40	<0.0001
GLUT8	6.92±0.40 ^b	1.00	7.25±0.14 ^a	0.84	6.19±0.12 ^c	1.65	6.00±0.13 ^c	1.89	<0.0001

The values (means±S.D., n=6) 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}.

^{a~c} Values with different superscripts within the same row significantly differ (P<0.05).

[#] Dietary treatments are as follows: Control (C): basal diet (BD), T1 (BD+tomato powder-containing lycopene 10 mg/kg diet), T2 (BD+micellar of tomato powder-containing lycopene 10 mg/kg diet) and T3 (BD+purified lycopene 10 mg/kg diet).

우 낮은 glycogen 수준 및 혈중 인슐린의 낮은 수준에 의한 혈중 포도당 농도 조절 미약(Dupont et al, 2004) 등과 같이 포유동물과 차별화된 조류 특유의 포도당 대사를 갖고 있다. 조류의 간은 질식하게 되면 간의 glycogen 함량을 낮추어, 혈중 포도당의 수준을 조절하여 포도당 항상성 유지에 기여하게 된다(Tinker et al., 1986). 포유동물에 비하여 조류의 높은 대사율(metabolic rate)의 유지는 간의 glycogen 분해와 포도당 신합성으로 유래된 포도당의 공급이 매우 중요함을 보여준다(Tinker et al., 1986). 건강한 닭에서 라이코펜의 첨가 급여에 의한 GLUT의 발현 증가는 간조직에서 포도당 흡수의 증가와 에너지원 혹은 glycogen으로의 전변 등과 같이 포도당 대사에 관여하는 것으로 예상되지만, 카로테노이드에 의한 포도당대사 조절에 대해서는 체계적 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

4. 라이코펜첨가 급여가 염증 연관 유전자 발현에 미치는 영향

본 연구는 라이코펜의 첨가 급여가 대표적 염증인자 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 interleukin(IL)-6의 발현에 라이코펜의 급여형태별 반응을 보기 위하여 이들 유전자들 간에 분석하였다. IL-6의 경우, 급여형태와 관계없이 모든 라이코펜 첨가구에서 이 유전자의 발현이 감소하였으며($P<0.05$), TNF α 의 경우 토마토(T1)와 유화처리 라이코펜(T2)에서 낮은 유전자 발현을 보였다($P<0.05$)(Table 5). 사람에서 카로테노이드의 흡수는 지방과 함께 섭취할 경우, 장에서 흡수가 증가한다고 한다(Chung et al., 2004). 사람을 포함한 포유동물에서 라이코펜의 경우, 항산화 효과, DNA의 산화적 손상 완화 등과 더불어 면역반응효과도 관여하는 것으로 알려져 있다(Wertz et al., 2004). 이러한 카로테노이드의 잠재적 효능의 예를 보면, α -토코페롤을 닭에게 첨가 급여한 결과, 열스

트레스 환경에서 계란의 품질향상(Kirunda et al., 2001)뿐만 아니라, 조류 면역반응에도 긍정적인 결과를 보였다고 한다(Leshchinsky and Klasing, 2001). 섭취된 카로테노이드는 계란에 전이, 축적됨에 따라 이를 섭취하는 사람의 건강증진뿐만 아니라, 산란계의 건강을 유지하는데도 기여한다고 한다(Grobas et al., 2002). 그러나 비타민 E의 급여량에 따라서는 질병저항 또는 면역반응 등에 효과가 적거나 없는 보고도 있다(Sell et al., 1997). 이는 공시동물의 유전적 배경, 스트레스의 정도, 공급되는 비타민 E의 수준 등의 복합적 산물의 결과로 효과에 대한 번이가 발생하는 것으로 보인다. 라이코펜을 섭취한 생쥐는 피하지방 및 내장지방의 감소와 더불어 proinflammatory cytokine의 대표적 단백질인 IL-6와 TNF- α 의 발현을 감소시킨다고 하였다(Gouranton et al., 2011). 본 연구의 결과에서도 위에서 언급한 닭에서의 α -토코페롤의 효과 및 생쥐에서의 라이코펜의 효과와 유사한 결과를 보여주었으며, 라이코펜은 환경스트레스 또는 질병 저항성을 높이기 위한 효과적 사료첨가제가 될 수 있음을 보여주었다.

적 요

라이코펜은 항산화제로서 많이 알려져 있지만, 최근에는 포유동물에서 염증 관련 면역과 지방대사 조절자로서 관심의 대상이 되기 시작하였다. 본 연구는 산란계에서 라이코펜의 가공 및 급여형태가 지방대사, 지방산 및 포도당 운반, 면역 관련 유전자들의 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 실시하였다. 백색레그혼(25주령) 48수를 lycopene의 첨가원에 따라 대조군(CON, basal diet(BD)), 토마토 건조분말 급여군(T1, BD+tomato powder-containing 10 mg lycopene/kg 사료), 토마토 건조분말 유화처리군(T2, BD+micellar of tomato powder-containing 10 mg lycopene/kg 사료) 및 정제 lycopene 급여군

Table 5. Effects of lycopene-supplemented diets on the mRNA gene expressions involved in inflammation in the liver of chickens[#]

Item	Treatment								p-value
	C		T1		T2		T3		
	Δ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Δ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Δ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Δ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	
TNF α	6.74 \pm 0.18 ^c	1.00	7.86 \pm 0.11 ^a	0.46	7.43 \pm 0.22 ^b	0.62	6.88 \pm 0.47 ^c	0.91	0.0004
IL6	16.27 \pm 0.51 ^b	1.00	17.15 \pm 0.17 ^a	0.55	17.15 \pm 0.15 ^a	0.54	17.54 \pm 0.32 ^a	0.42	0.0009

The values (means \pm S.D., n=6) are Δ Ct, 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}.

^{a-c} Values with different superscripts within the same row significantly differ ($P<0.05$).

[#] Dietary treatments are as follows: Control (C): basal diet (BD), T1 (BD+tomato powder-containing lycopene 10 mg/kg diet), T2 (BD+micellar of tomato powder-containing lycopene 10 mg/kg diet) and T3 (BD+purified lycopene 10 mg/kg diet).

(T3, BD+purified 10 mg lycopene/kg 사료) 등 모두 4처리구로 설정하여 5주간 사양시험을 실시하였다. 시험 종료 후 각 개체의 간으로부터 total RNA를 추출하고 real-time PCR을 이용하여 유전자들의 발현을 분석하였다. 라이코펜을 급여 받은 닭은 급여형태와 관계없이 모두 PPAR γ 의 발현을 억제하였다($P<0.05$). 지방합성효소 유전자 FASN의 발현은 T2에서 효과적으로 감소하였으나($P<0.05$), T1, T3에서는 영향이 없었다. SREBP2와 C/EBP α 또한 T2에서 효과적으로 유전자 발현이 억제됨을 보였다. 세포 내 포도당 흡수기능을 하는 GLUT8은 T2와 T3에서 유전자 발현이 증가하였다($P<0.05$). 지방산 산화를 위한 지방산 운반체인 CPT-1 유전자는 라이코펜에 의한 영향을 받지 않았다. 면역 관련 염증인자인 TNF α 와 IL6는 라이코펜에 의하여 효과적으로 그 발현이 억제되었다($P<0.05$). 본 연구결과는 라이코펜의 급여 형태가 지방대사 관련 유전자 발현에 영향을 미치며, 그 중 유화처리된 라이코펜이 지방대사, 포도당 및 면역반응에 더 효과적인 급이 수단이 될 수 있음을 보여주었다.

(색인어 : 라이코펜, 유전자 발현, 지방대사, 염증, 닭)

사 사

본 논문은 2014년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Boulanger A1, McLemore P, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Yu SS, Gentleman S, Redmond TM, Boulanger 2003 Identification of beta-carotene 15, 15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *FASEB J.* 17(10):1304-1306.
- Braun EJ, Sweazea KL 2008 Glucose regulation in birds. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 151(1):1-9.
- Brown MS, Goldstein JL 1997 The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 89(3):331-340.
- Chung HY, Rasmussen HM, Johnson EJ 2004 Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J Nutr.* 134(8):1887-1893.
- Damron BL, Goodson SR, Harms RH, Janky DM, Wilson HR 1984 Beta-carotene supplementation of laying hen diets. *Br Poult Sci.* 25(3):349-352.
- Desvergne B, Wahli W 1999 Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 20(5):649-688.
- 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.
- Englmaierova M, Bubancova I, Vit T, Skrivan M 2011 The effect of lycopene and vitamin E on growth performances, quality and oxidative stability of chicken leg meat. *Czech J Anim Sci.* 56: 536-543.
- Feng D, Ling WH, Duan RD 2010 Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF-kappaB in macrophages. *Inflamm Res.* 59(2):115-121.
- Ford NA, Elsen AC, Erdman JW Jr 2013 Genetic ablation of carotene oxygenases and consumption of lycopene or tomato powder diets modulate carotenoid and lipid metabolism in mice. *Nutr Res.* 33(9):733-742.
- Fuhrman B, Elis A, Aviram M 1997 Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 233(3):658-662.
- Gouranton E, Thabuis C, Riollot C, Malezet-Desmoulins C, Yazidi C, Amiot MJ, Borel P, Landrier JF 2011 Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue. *J Nutr Biochem.* 22(7):642-648.
- Grobias S, Méndez J, Lopez BC, De BC, Mateos GG 2002 Effect of vitamin E and A supplementation on egg yolk alpha-tocopherol concentration. *Poult Sci.* 81(3):376-381.
- Huang CS, Liao JW, Hu ML 2008 Lycopene inhibits experimental metastasis of human hepatoma SK-Hep-1 cells in athymic nude mice. *J Nutr.* 138(3):538-543.
- Karin Ried, Peter Fakler 2011 Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials. *Maturitas.* 68(4):299-310.
- Kirunda DF, Scheideler SE, McKee SR 2001 The efficacy of vitamin E (DL-alpha-tocopheryl acetate) supplementation in hen diets to alleviate egg quality deterioration associated with high temperature exposure. *Poult Sci.* 80(9):1378-1383.
- 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.
- Leshchinsky TV, Klasing KC 2001 Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. *Poult Sci.* 80(11):1590-1599.
- 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.
- Lobo GP, Amengual J, Li HN, Golczak M, Bonet ML, Palczewski K, von Lintig J 2010 Beta, beta-carotene decreases peroxisome proliferator receptor gamma activity and reduces lipid storage capacity of adipocytes in a beta, beta-carotene oxygenase 1-dependent manner. *J Biol Chem.* 285(36):27891-27899.
- Mao M, Lei H, Liu Q, He R, Zuo Z, Zhang N, Zhou C 2014 Lycopene inhibits neointimal hyperplasia through regulating lipid metabolism and suppressing oxidative stress. *Mol Med Rep.* 10(1):262-268.
- Nguyen, ML, Schwartz SJ 1999 Lycopene; Chemical and biological properties. *Foodtechnology.* 53:38-45.
- Nockels CF, Lopez GA, Phillips RW 1973 Influence of vitamins A and C on corticosterone and carbohydrate metabolism in chickens. *Poult Sci.* 52(4):1261-1269.
- Palozza P, Calviello G, Emilia De Leo M, Serini S, Bartoli GM 2000 Canthaxanthin supplementation alters antioxidant enzymes and iron concentration in liver of Balb/c mice. *J Nutr.* 130(5):1303-1308.
- Rao AV 2002 Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Exp Biol Med.* 227(10):908-913.
- Ried K, Fakler P 2011 Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials. *Maturitas.* 68(4):299-310.
- Sahin N, Sahin K, Onderci M, Karatep M, Smith MO, Kucuk O 2006 Effects of dietary lycopene and vitamin E on egg production, antioxidant status and cholesterol levels in Japanese quail. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 19:224-230.
- Sahin N, Orhan C, Tuzcu M, Sahin K, Kucuk O 2008 The effects of tomato powder supplementation on performance and lipid peroxidation in quail. *Poult Sci.* 87:276-283.
- SAS 1996 User's Guide: Statistics Version 6.12 Ed. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Sell JL, Trampel DW, Griffith RW 1997 Adverse effects of *Escherichia coli* infection of turkeys were not alleviated by supplemental dietary vitamin E. *Poult Sci.* 76(12):1682-1687.
- Sluijs I, Beulens JW, Grobbee DE, van der Schouw YT 2009 Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men. *J Nutr.* 139(5):987-992.
- Sohn SH, Jang IS, An YS, Moon YS 2015 Effects of high stocking density on the expression of metabolic related genes in two strains of chickens. *Kor J Poult Sci.* 42(1):51-59.
- Sun X, Zhang H, Sheikahmadi A, Wang Y, Jiao H, Lin H, Song Z 2015 Effects of heat stress on the gene expression of nutrient transporters in the jejunum of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Int J Biometeorol.* 59(2):127-135.
- Tan HL, Moran NE, Cichon MJ, Riedl KM, Schwartz SJ, Erdman JW Jr, Pearl DK, Thomas-Ahner JM, Clinton SK 2014 β -Carotene-9',10'-oxygenase status modulates the impact of dietary tomato and lycopene on hepatic nuclear receptor-, stress-, and metabolism-related gene expression in mice. *J Nutr.* 144(4):431-439.
- 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.* 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.
- Wertz K, Siler U, Goralczyk R 2004 Lycopene: Modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys.* 430(1):127-134.
- Zaripheh S, Nara TY, Nakamura MT, Erdman JW Jr 2006 Dietary lycopene downregulates carotenoid 15,15'-monooxygenase and PPAR-gamma in selected rat tissues. *J Nutr.* 136(4):932-938.

Received Aug. 20, 2015, Revised Sep. 9, 2015, Accepted Sep. 14, 2015