

Research Article

고온 스트레스 환경에 노출된 홀스타인종 젖소의 회복기 면역 변화 특성 규명

김연태^{1,†}, 이상진^{2,†}, 김예은², 임동현¹, 김동현¹, 박성민¹, 엄준식¹, 박지후¹, 김상범¹, 이성실³, 김명후^{2*}

¹국립축산과학원 낙농과, 천안, 31000, 대한민국

²부산대학교 동물생명자원학과, 밀양, 50463, 대한민국

³경상국립대학교 응용생명과학부(BK21), 진주, 52828, 대한민국

The Study of Attributes of Immune Changes during the Convalescence Temperature Period in Holstein Dairy Cows Exposed to High-Temperature Stress

Eun Tae Kim^{1,†}, Sangjin Lee^{2,†}, Ye Eun Kim², Dong-Hyun Lim¹, Dong Hyeon Kim¹, Seong Min Park¹, Jun Sik Eom¹, Ji Hoo Park¹, Sang Bum Kim¹, Sung Sill Lee³ and Myunghoo Kim^{2*}

¹National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan 31000, Korea

²Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

³Division of Applied Life Science (BK21), Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate immune changes by comparing the proportion and function of immune cells in the blood under high-temperature period and convalescence temperature period in Holstein dairy cows. The experiment was conducted using Holstein dairy cows of five animals per group (60 ± 20 months old, 175 ± 78 non-day) from the National Institute of Animal Science at high-temperature period (THI: 76 ± 1.2) and convalescence temperature period (THI: 66 ± 1.3). Complete blood count results showed no change in the number of immune cells between groups. In the analysis using Flow Cytometry of PBMCs, no significant differences were observed among B cells, Helper T cells, cytotoxic T cells, and $\gamma\delta$ T cells between groups. However, there was an increase in Th17 cells producing IL-17a, while Th1 cells decreased during the convalescence temperature period. The results of gene expression analysis using qRT-PCR in PBMCs revealed an increase in IL-10 during the convalescence temperature period, while a decrease in HSP70 and HSP90 was observed. In conclusion, the increased expression of IL-10 and the decrease in HSP expression suggest the possibility of a weak recovery from heat stress. However, the lack of observed changes in B cells, T cells, and other immune cells indicates incomplete recovery from heat stress during the convalescence temperature period.

(Key words: Dairy cow, Flow cytometry, Heat stress, Holstein, Immunity)

I. 서론

해마다 지구 평균 기온 상승과 함께 우리나라의 고온 다습한 환경의 지속 일수가 늘어나고 있다(Joo et al., 2009). 고온 다습한 환경 노출에 의해 발생하는 고온 스트레스는 가축의 체중이나 사료 섭취량 감소, 번식률 저하와 같은 주요 생산성 지표의 하락을 유발한다(Das et al., 2016; St-Pierre et al., 2003). 특히 우리나라 낙농가에서 대다수 사육하고 있는 착유우인 홀스타인종은 고온 스트레스에 매우 취약한 품종으로 알려져 있다(Seath and

Miller, 1947; Harris et al., 1960; Collier et al., 1981).

일반적으로 고온 스트레스로 dry matter intake (DMI) 감소와 체내의 에너지 대사 변화는 유생산성 감소를 유도한다고 알려져 있다(Collier et al., 2012; Chang-Fung-Martel et al., 2021). Wheelock et al. (2010)의 연구에서는 홀스타인종에 고온 스트레스 발생 시 체내 인슐린 수준이 증가하여 지방 조직의 지질 이동이 감소하고, 말초 조직의 포도당 사용이 증가하여 유생산량이 감소했음을 보고한 바 있다.

고온 스트레스로 인한 홀스타인종 체내 대사생리 변화는 젖소

[†]These authors contributed equally to this study

*Corresponding author: Myunghoo Kim, Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea
Tel: +82-55-350-5116, E-mail: mhkim18@pusan.ac.kr

의 면역반응 및 질병발생과 연관되어 있음이 보고되고 있다 (Fabris et al., 2019; Dahl et al., 2020). Molinari et al.(2023)은 홀스타인종의 혈액에 lipopolysaccharide (LPS)를 주입 조건에서 고온 스트레스를 받은 젖소의 혈액에서 전염증성 사이토카인의 농도 증가가 더 높다는 것을 보고하였다. 또한 여름철 착유우에게 자주 발생하는 질병인 유방염은 여름철에 고온 스트레스를 받은 홀스타인종에서 더 많이 발생한다고 보고 된 바 있다(Vitali et al., 2020). 요컨대, 고온 스트레스를 받은 젖소 착유우는 비정상적으로 염증 반응이 증가하거나 면역력 저하로 인한 감염성 질환에 걸릴 위험이 높아진다는 것이 제시되고 있다. 하지만, 고온 스트레스에 의한 젖소 면역 변화와 질병 발생의 상관관계에 대한 연구는 매우 부족한 편이다.

젖소 착유우 사양관리에 있어 고온 스트레스가 발생하는 여름철 고온 환경에서의 관리뿐 아니라 가을철 고온 스트레스로부터 젖소가 회복하는 시기에도 지속적인 관리가 필요하다는 것이 제시되고 있다(Amadori and Spelta, 2021). 실제로, 고온 스트레스가 감소하는 가을철에도 젖소의 유생산량이 즉각적으로 회복되지 못하는 현상이 이탈리아와 유럽, 미국에서 보고된 바 있다 (Amadori and Spelta, 2021). 이는 고온 스트레스에 의해 발생한 유생산량 감소 현상을 빠르게 회복하기 위해서는 고온 스트레스 후 회복기 젖소 착유우의 영양사양 관리가 필요하다는 점을 의미한다. 또한 고온 스트레스에 의해 변화된 젖소 면역 및 질병 관리의 필요성도 제시되는 바이다. 하지만 기후 변화에 따른 젖소의 면역력 변화, 특히 고온 스트레스 환경 노출 후 가을철 회복기 젖소 체내 면역력 변화 양상에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 홀스타인종 젖소 착유우에서 여름철 고온 스트레스 조건과 가을철 회복기 조건에서 혈액 내 면역세포의 분포 및 기능을 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 급여방법

본 실험에 이용된 동물에 대한 실험 절차 및 동물실험은 동물보호법과 국립축산과학원(NIAS) 동물 실험윤리위원회에서 검토 승인한(승인번호 : NIAS-2019107) 동물실험 방법에 따라 진행되었다. 홀스타인종 젖소 5두(60 ± 20 개월령, 175 ± 78 비유일)를 선별하여 시험을 진행하였다. 급여하는 사료는 가축사양표준의 영양소 요구량에 따라 조사료와 농후사료를 배합하여 total mixed ration (TMR)을 제조하여 Table 1에 따라 급여하였으며, 공시동물은 자유채식이 가능하도록 하였다.

Table 1. Ingredients and chemical composition of total mixed ration (% , DM)

Item	Content
Ingredients	
Corn gluten meal	8.40
Corn flakes	2.21
Beet pulp	4.20
Soybean meal	6.24
Molasses	1.04
Wheat bran	3.15
Limestone	0.10
Orchard grass straw	21.01
Annual ryegrass straw	27.29
Brewer's grain residue	21.01
Rice wine residue	5.25
Sodium bicarbonate	0.01
Salt	0.09
Chemical composition	
Dry matter	55.32
Crude protein	13.51
Crude fiber	22.12
Crude fat	3.16
Ash	9.22
Calcium	1.54
Phosphorus	0.58
Neutral detergent fiber	49.12
Acid detergent fiber	25.80

2. 실험설계

고온 스트레스를 받은 시기를 정하기 위해 temperature humidity index (THI)를 이용하였다. THI 측정을 위해 우사에 설치한 온습도계 (testo 174H, Testo Korea Ltd., Republic of Korea)를 이용하였다. 젖소가 고온 스트레스 영향을 받는 수준은 다음과 같은 THI 산출식 (NRC, 1971; Bohmanova et al., 2007)을 이용하였다.

$$THI=(1.8 \times \text{온도} + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times \text{상대습도}) \times (1.8 \times \text{온도} - 26)]$$

고온기는 THI > 72가 넘는 8월 THI : 76±1.2)에 회복기는 9월 말(THI : 66±1.3)에 샘플링을 진행하였다.

3. 혈액 수집 및 면역세포 분리

혈액은 각 환경조건(고온기; THI : 76, 회복기; THI : 66)에서 경정맥에서 채취하였으며, 채취 후 진공 밀봉 튜브(BD Vacutainer,

Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA)인 K2 EDTA tube로 옮겨졌다. EDTA tube에 보관되어 있던 혈액을 즉시 실험실로 운반하였다. 이후 EDTA에 담겨있던 혈액을 15 mL tube에 옮기고 phosphate buffer saline (PBS)와 1:1 비율로 희석하였다. 희석된 혈액의 절반에 해당하는 용량의 lymphoprep (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada)를 새로운 15 mL tube에 넣고, lymphoprep이 담겨져 있는 tube에 희석된 혈액을 천천히 흘러보내어 층이 깨지지 않게 유지하였다(희석된 혈액 : 위층, lymphoprep : 아래층). 다음으로 800 g의 속도로 25분 동안 브레이크 없이 상온에서 원심분리를 진행한 후, 가운데 층의 peripheral blood mononuclear cells (PBMC)를 모아 PBS로 세척하여 순수한 PBMC를 얻었다. 일부 PBMC는 Trizol에 현탁하여 qRT-PCR를 위해 RNA 추출할 때까지 -80℃에서 보관되었다.

4. 일반혈액검사

EDTA tube로 옮겨진 혈액은 즉시 실험실로 운반되어 일반혈액검사를 진행하였다. 일반혈액검사(CBC, complete blood count)는 Vetscan® HM5 hematological analyzer (ABAXIS, CA, USA)기기를 이용하여 측정되었다. 측정 변수로 white blood cell (WBC), lymphocyte (LYM), neutrophil (NEU), monocyte (MON), eosinophil (EOS), basophil (BAS)의 비율과 수를 확인하였다.

5. 홀스타인종 PBMC의 유세포 분석

고온기 및 회복기 조건에서 분리된 PBMC를 분석하기 위해 유세포 분석법을 실시하였다. 유세포 분석기를 사용하기 전 염색을 진행하였으며 세포 표면 염색은 4℃에서 20분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정되었고, 세포 내 염색은 4℃에서 perm buffer로 고정되었다. 샘플은 anti-CD21:PE (Bio-Rad, MCA1424PE), anti-CD4:Alexa Flour 647 (Bio-Rad, MCA1653A647), anti-MHCII:FITC (Bio-Rad, MCA5656F), anti-WC1:FITC (Bio-Rad, MCA838F), anti-CD8:PE, anti-IFN γ :FITC, anti-IL-17a-Biotin

를 사용하여 염색되었다. 염색된 PBMC는 분석 전까지 상온 4℃에서 보관되었다. 이후 면역세포 분석을 위해 유세포 분석기 (FACS Canto II; BD Bioscience, Heidelberg, Germany)를 이용하였다. 면역세포 모집단 정량화를 위해 FlowJo 소프트웨어 v10.7.1 (Tree Star Inc., OR, USA)을 사용하였다.

6. RNA 추출 및 qRT-PCR

RNA는 Trizol에 현탁되어 얼려진 PBMC 샘플을 사용하여 추출하였다. Trizol에 있는 샘플을 상온에서 5분 동안 배양 후 200 μ L의 클로로포름을 넣었다. 이후 샘플을 강하게 흔들어서 섞은 후 3분간 상온에서 배양했다. 시료를 4℃에서 20분간 10,000 g의 속도로 원심분리하고, 맑은 상층액을 이소프로필 알코올 500 μ L가 있는 1.5 mL tube에 옮긴 후 혼합하였다. 이후 상온에서 10분간 배양하고 4℃에서 10분간 10,000 g의 속도로 원심분리한 후 상층액을 제거하고 생성된 RNA 펠렛을 75% 에탄올로 세척 한 후 DEPC water (Invitrogen, CA, USA)를 추가하여 보관하였다. cDNA는 AccuPower RT PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 합성하였다. qRT-PCR은 QuantStudio1 Real-Time PCR 시스템(Applied Biosystems, CA, USA)과 SologTM h-Taq DNA Polymerase (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였다. 반응 조건은 10분간 50℃, 5분간 95℃, 15초간 95℃, 30초간 60℃ (40 cycle)로 하여 진행 후 분석하였다. 증폭에 사용된 프라이머는 Table 2에 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. 회복기 홀스타인종 젖소의 생산성 변화

고온 다습한 환경으로부터 유래한 고온 스트레스는 젖소의 여러 가지 생체적 변화를 유발한다. 대표적으로 사료 섭취율과 함께 호흡률, 음수량, 직장 온도, 반추위 내 pH 등은 고온 스트레스의

Table 2. Primer used for qRT-PCR gene expression analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
HSP70	AACATGAAGAGCGCCGTGGAGG	GTTACACACCTGCTCCAGCTCC
HSP90	GGAGGATCACTTGGCTGTCA	GGGATTAGCTCCTCGCAGTT
IL-1b	TGACCTGAGGAGCATCCTTT	AGAGGAGGTGGAGAGCCTTC
IL-2	ACCTCAAGCTCTCCAGGATG	CTCTGGGGTTCAGGTTTTTTG
IL-10	TGTTGACCCAGTCTCTGCTG	AGCTTCTCCCCAGTGAGTT
IL-17a	TGAGTCTGGTGGCTCTTGTTG	GGTGGAGCGCTTGTGATAAT
TNF- α	CGGTGGTGGGACTCGTATG	CTGGTTGTCTCCAGCTTCA
IFN γ	GATTCAAATTCGGTGGATG	AAATATTGCAGGCAGGAGGA

발생 여부를 판단하는 대표적인 지표로 사용되고 있다(Polsky and von Keyserlingk, 2017). 호흡은 체내 조직의 이산화탄소 제거, 산소 흡입과 같은 기체 교환의 목적 외에도 호흡기 내부 수분을 증발시켜 체온을 떨어뜨리는 역할을 한다. 고온 스트레스가 발생했을 때 젖소는 체온을 떨어뜨리고자 땀을 더욱 흘리거나 호흡수를 증가시키는데, 고온 다습한 환경에서는 체내 수분이 공기 중으로 원활하게 증발하지 않는다. 동시에 호흡수 증가로 인한 체내 수분 손실 증가에 따라 음수율도 증가한다(Atrian and Shahryar, 2012). 또한, 직장 온도는 체내 열 균형 정도를 반영하며, 고온 스트레스 발생 시 호흡률, 음수율과 함께 증가하는 대표적인 지표로 알려져 있다(Park et al., 2019). Johnson et al. (1963)의 연구에 따르면 직장 온도가 1°C 변화했을 때마다 사료 섭취율과 생산성이 감소했음을 밝힌 바 있다. 이와 반대로 반추위 pH는 감소하게 되는데, 이는 반추위액 내 총 volatile fatty acid (VFA)의 농도와 조성이 변화했기 때문이다(Yadav et al., 2013). 고온 스트레스가 발생하는 환경조건을 나타내기 위해 THI를 이용한다(Thom, 1959; Kibler, 1964; Yousef, 1985; Mader et al., 2006).

$$THI=(1.8\times\text{온도}+32)-[(0.55-0.0055\times\text{상대습도})\times(1.8\times\text{온도}-26)]$$

일반적으로 THI 지수가 72 이상일 때부터 고온 환경이라고 정의하는데, 본 연구에서 또한 이를 참고하여 고온 스트레스가 발생한다고 알려진 THI 72 이상을 고온기로 가정하며 회복기 기준 고온기와 회복기에서 동일한 젖소에서 각각 혈액을 샘플링하여 실험을 진행하였다. 이는 고온기 고온 스트레스는 받게 된 젖소가 가을철 고온 스트레스가 종료된 환경조건에서 면역적으로 어떠한 변화가 관찰되는지 관찰하기 위함이다.

2. 고온 스트레스 노출 후 회복기 홀스타인종 젖소의 혈액 내 면역세포 농도의 변화

고온 스트레스로 인한 사료 섭취율 감소는 이전부터 젖소의 유생산량 감소에 가장 큰 원인으로 작용한다고 알려져 있다(Rhoads et al., 2009). 최근 연구에 따르면 고온 스트레스에 의한 사료 섭취 감소가 젖소 체내 대사의 변화를 유도하고 이에 대한 결과로 유생산량 감소가 나타났다고 보고된 바 있다(Wheelock et al., 2010). 사료 섭취는 대표적으로 젖소의 포도당 항상성에 영향을 미치는데, 고온 스트레스를 받은 홀스타인종 젖소의 혈중 포도당, 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤, 단백질, 알부민 등의 농도가

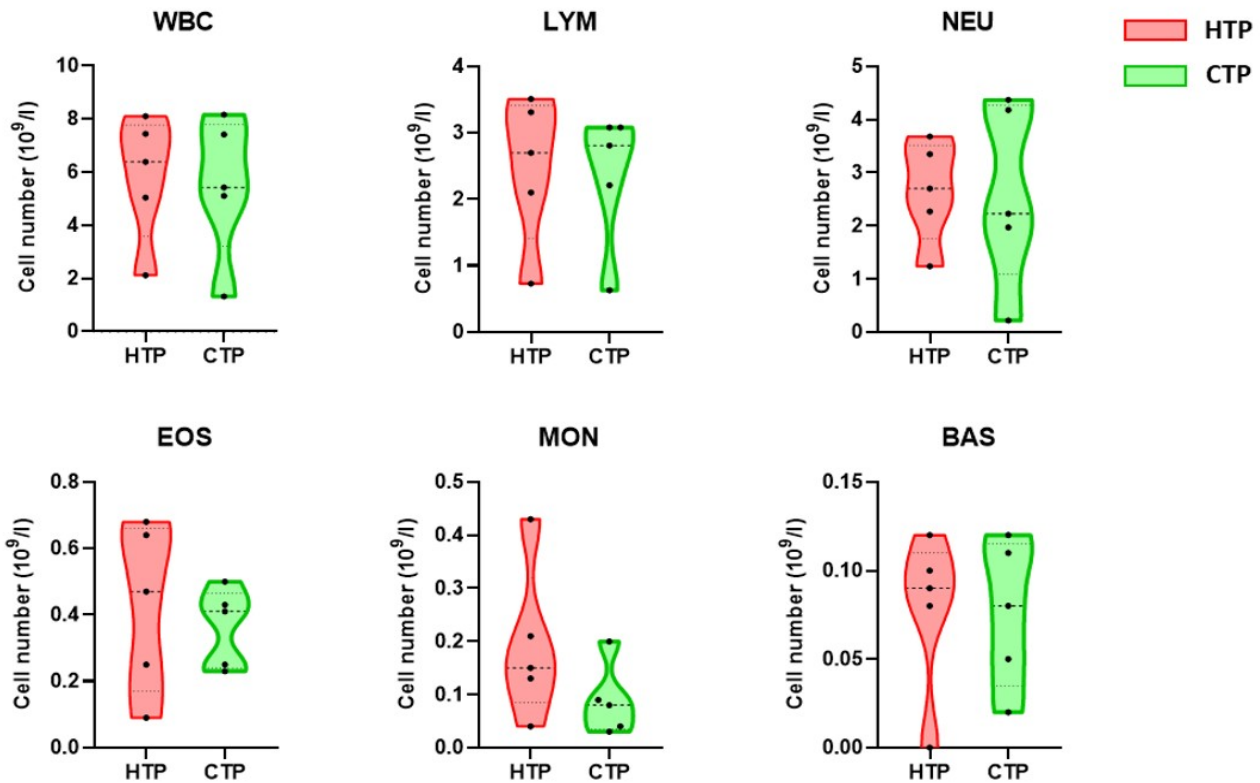


Fig. 1. The distribution of immune cells in the blood of Holstein dairy cows using CBC analysis. The number of immune cells in the blood of Holstein cows during high temperature period (HTP) and convalescence temperature period (CTP) n = 5 animals/group. Values were statistically analyzed by Welch's t test. WBC, white blood cell; LYM, lymphocyte; NEU, neutrophil; EOS, eosinophil; MON, monocyte; BAS, basophil.

감소하였음이 보고된 바 있다(Joo et al., 2021). Eom et al. (2022)에 따르면 고온 스트레스 하에 홀스타인종 수소의 혈액 내에서 glucose 신생합성과 관련된 주요 전구체인 alanine이 증가했음을 밝혔다. 위 연구에서는 반추동물의 사료 섭취량 감소에 따라 부족해진 포도당을 보충하기 위해 alanine을 이용하여 포도당 신생합성을 증가시킨 것이라고 제안한 바 있다. 더불어 고온 환경에서 체온을 조절하기 위한 에너지 요구량이 증가하면서 우유 생산과 같은 다량의 에너지를 필요로 하는 기능이 저하되었음이 사전에 증명된 바 있다(Abeni et al., 2007; Park et al., 2013). 포도당은 유선에서 유당 및 우유 지질의 글리세롤을 합성하기 위한 재료로 사용되며 동시에 지질 합성을 위한 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 제공에 중요한 역할을 한다(Bines and Hart, 1982; Zhao, 2014). 포도당이 유생산이 아닌 체온 항상성 유지에 사용되면서 여름철에 발생하는 젖소의 유생산량 저하 등 경제성 하락의 주요 원인으로 작용하게 된다(Abbas et al., 2020).

포도당 대사와 면역력 유지의 상관관계는 많은 선행 연구들을 통해 입증 되어왔다. 면역세포의 활성화는 포도당 이용의 증가와 관련이 있으며, 포도당 항상성 유지에 실패 시 면역세포의 기능이 저하되고 이에 따라 염증이 발생할 수 있음이 제안된 바 있다(Calder et al., 2007). 특히 비유기에는 건유기보다 우유 생산에 더 많은 에너지를 사용하며, 염증 증가로 인한 불필요한 면역반응의 활성화는 비유 작용에 사용되어야 할 에너지의 양이 부족해지는 현상의 원인이 된다(Park et al., 2013; Kvidera et al., 2017).

TH1가 높은 고온기와 이후 TH1가 낮아지는 회복기에 홀스타인종 젖소의 면역 변화 특성을 알아보기 위해 젖소 혈액을 수집 후 일반혈액검사를 실시하였다(Fig. 1). 젖소의 백혈구(WBC) 수 준은 $1.5 \times 10^9 - 8 \times 10^9$ 을 나타냈다. 이는 다른 연구에서 보고된 수치와 유사하였다(Alvarez et al., 2013). 림프구(LYM)과 호중구(NEU)는 혈액 내 면역세포(WBC)의 95% 이상을 차지하고 있으며 림프구의 경우 감염 발생 시 가장 활발히 증식하는 면역세포이다. 병원체의 침입과 항원 제시 세포의 자극으로 인해 림프구가 활성화되면 여러 종류의 면역세포로 분화하게 되는데, 이를 통해 사이토카인 혹은 케모카인 분비, 손상된 조직 및 세포의 파괴 등 선천성 면역반응이 나타나게 된다(Schäffer and Barbul, 1998; Pearce et al., 2013). 호중구의 경우 혈액을 통해 체내를 순환하는 면역세포 중 가장 많은 비율을 차지하고 있으며, 식세포 작용 등을 통해 침입한 병원체에 가장 먼저 대항하는 세포로 알려져 있다. 또한 다양한 종류의 전염증성 사이토카인을 분비하여 T cell 및 획득성 면역의 활성화를 유도한다(Wright et al., 2010; Amulic et al., 2012). 젖소의 경우 비유 개시로 인해 극심한 대사 변화를 겪게 되는데, 이 과정에서 염증의 증가와 함께 유방염을 발생한 젖소에서 호중구의 증가가 관찰되곤 한다. 호산구와 호염

기구는 알리지성 염증 반응과 연관되어 있는 백혈구로서 기생충이나 알러지 유발 물질에 1차적으로 대응하는 면역세포로 알려져 있다. 이와 함께 사이토카인이나 케모카인, 히스타민을 분비함으로써 T cell에서 2형 T cell로의 분화를 촉진한다고 알려져 있다(Fulkerson and Rothenberg, 2013; Nadif et al., 2013). 단핵구는 골수에서 유래하여 혈액을 순환하다 병원체 침입 시 식세포 작용을 하는 세포군으로써, 수지상세포나 대식세포로 분화한다는 특징을 가진다. 이들은 림프구에 항원을 제시함으로써 후천성 면역의 개시자 역할을 하며, 전염증과 항염증의 기능 둘 다 가지고 있어 광범위한 면역 기능을 수행한다(Jakubzick et al., 2017). 본 연구에서는 일반혈액 검사를 통해 혈액 내 주요 면역세포는 고온기와 회복기에 비교 관찰하였다. 하지만, 백혈구와 마찬가지로 림프구와 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구에서 유의미한 차이는 관찰되지 않았다.

비록 착유우는 아니지만 고온 스트레스를 받은 홀스타인종 비육우의 혈액 내 polymorphonuclear cell을 유세포 분석 기법으로 살펴본 결과 호중구의 주요 마커인 CH138A를 발현하는 호중구의 수가 감소하는 경향을 보였음을 밝혔다. 더불어 호중구의 단백질 myeloperoxidase (MPO)의 농도가 고온 스트레스 발생 조건에서 유의적으로 감소한 것으로 나타났다(Park et al., 2021). MPO는 호중구의 산화적 기능을 수행하는 기초적인 효소로서, 호중구가 병원체를 제거하고 염증이 발생한 조직의 손상을 촉진하는 가장 중요한 요소라고 할 수 있다(Kettle and Winterbourn, 1997). 요컨대 고온 스트레스 발생 시 혈액 내 호중구의 수 감소 및 MPO 농도의 감소가 일어나 전반적인 면역력의 저하 현상이 일어남을 알 수 있다.

3. 고온기와 회복기의 PBMC 내 면역세포 변화

동물의 면역학적 특성을 이해하기 위한 방법으로 유세포 분석은 면역학 분야에서 매우 유용한 방법이다. 그러나 경제 동물을 대상으로 면역학적 반응을 평가하기 위한 위해 유세포 분석을 진행한 연구는 매우 적다. 본 연구에서는 유세포 분석을 이용하여 고온 스트레스에 노출 시 회복기에 홀스타인종 젖소의 혈액 내 주요 면역세포의 분포를 분석하였다. 먼저, 적응면역을 담당하는 주요 면역세포인 T cell과 B cell의 분포를 확인하였다. T cell은 세포의 기능에 따라 보조 T 세포(helper T cell), 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell), 감마델타 T 세포($\gamma\delta$ T cell)로 나뉘게 된다. Helper T cell은 적응면역에 가장 중요한 면역세포이며 여러가지 하위집합을 가지고 있다. 특히 B cell을 활성화시켜 항체를 분비하게 만들거나 다른 면역세포를 활성화시켜 병원체에 대해 보호하는데 도움을 주고 cytotoxic T cell을 활성화하여 표적세포를 제거한다. Cytotoxic T cell은 주로 바이러스 또는 병원체에 감염

된 세포를 직접적으로 세포와 접촉하여 제거하는 역할을 한다. $\gamma\delta$ T cell은 초기 면역반응을 담당하며 선천 면역세포와 유사한 기능을 수행한다.

본 연구에서는 혈액 내 주요 면역세포 분포를 확인하기 위하여 B cell의 경우 CD21과 MHCII의 발현을, helper T cell은 CD4, cytotoxic T cell은 CD8, $\gamma\delta$ T cell은 WC1을 발현하는 세포를 확인하여 각 세포의 비율을 분석하였다. 본 연구에서 고온기와 회복기 간 B cell, helper T cell, cytotoxic T cell, $\gamma\delta$ T cell 분포에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2a). B cell은 항체를 생성할 뿐 아니라 항원제시세포로서 체내 감염 확산 방지에 중요한 역할을 하며, 다른 연구에서는 고온 스트레스에 노출된 동물이 B cell의 분화 및 증식에 문제를 일으킨다고 보고된 바 있다 (Hirakawa et al., 2020). 또 다른 연구에서는 홀스타인종 비육우에서 적온기 환경과 고온기 환경에서 면역세포를 비교한 결과 B cell에서 유의적인 감소가 나타났음을 보여주었다(Park et al., 2021). 그러므로 비록 본 연구에서 홀스타인종 젖소의 적온기 정

상범위의 B cell의 수준이 비교되지 못했으나, 회복기에 B cell이 고온기와 유사하게 유지되었다는 것은 고온 스트레스에 의해 저하된 B cell이 회복기에도 회복되지 못했을 가능성이 있음을 시사한다.

추가적으로 T cell의 면역학적 기능을 담당하는 사이토카인의 발현을 확인하기 위하여 IL-17a와 IFN γ 의 발현을 확인하였다. CD4+ cell에서 IL-17a을 발현하는 세포를 Th17 cell, IFN γ 를 발현하는 세포를 Th1 cell, CD8+ cell에서 IFN γ 를 발현하는 cytotoxic T cell을 확인하였다. 연구 결과, Th17 cell은 고온기에 비하여 회복기에 유의적으로 증가하였으며, 반대로 Th1 cell은 고온기에 비해 회복기에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 2b). Th17 cell은 여러 가지 감염 및 세포의 세균 감염에 대해 방어 체계를 제공한다. Th17 cell은 염증성 면역을 매개한다고 잘 알려져 있지만 반대로 IL-1 β 의 생산과 독립적으로 생산될 경우 항염증 사이토카인인 IL-10의 매개 기능을 수행할 수 있기 때문에 면역 반응에서 이중적인 역할을 수행한다고 할 수 있다(Noster et al.,

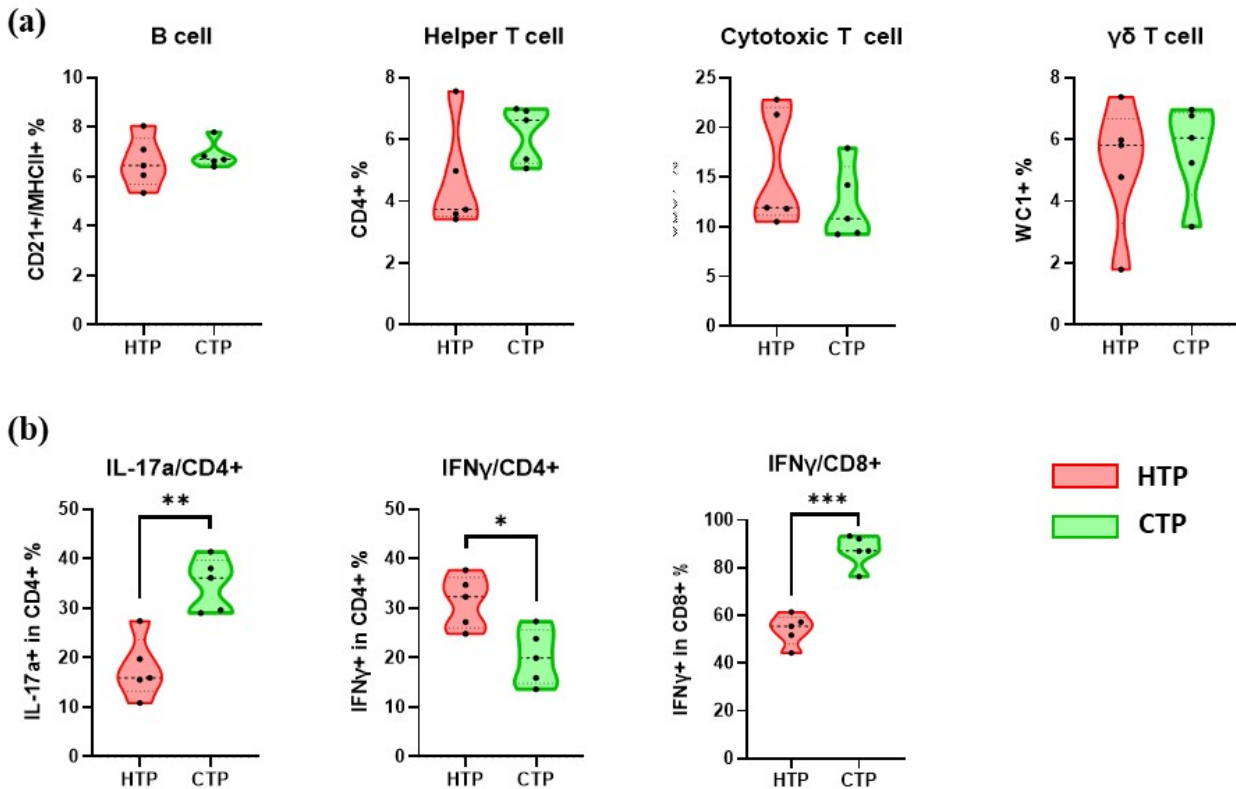


Fig. 2. Proportion of lymphocyte type in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from Holstein dairy cow during high temperature period (HTP) and convalescence temperature period (CTP). Lymphocytes of PBMC were analyzed using flow cytometry. Graph indicates percentage of (a) B cell (MHCII+, CD21+), Helper T cell (CD4+), Cytotoxic T cell (CD8+), $\gamma\delta$ T cell (WC1+) in PBMC of Holstein dairy cows. The percentages of (b) IFN γ and IL-17a production from CD4+ T cell and IFN γ production from CD8+ T cell are shown. n = 5 animals/group. Values were statistically analyzed by Welch's t test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

2015). 그러므로 고온기에 Th17 cell의 감소는 젖소의 전반적인 면역반응을 떨어뜨리는 원인 중 하나가 될 수 있으며, 이는 고온 스트레스 종료 후 즉, 회복기에 어느 정도 수준으로 회복되는 것으로 보인다. Th1 cell은 세포 내 병원체에 대한 숙주 방어에 중요한 역할을 하는 세포이나 한편으로 염증성 반응에 중요한 역할을 하여 다양한 염증성 질환 발생에서 중요한 역할을 하는 세포이다. 본 연구의 결과에서 고온기에 비하여 회복기에 Th1 cell이 유의적으로 감소하는 결과를 보여주었지만, 다른 논문들에서는 고온 스트레스에 노출된 젖소에서 Th1 cell이 감소한다고 보고된 바 있다(Welsh et al., 2005; Lacetera et al., 2006).

4. 혈액 내 면역세포의 유전자 발현 비교

홀스타인종 젖소가 고온 스트레스에 대해 어떠한 반응을 보이는지 PBMC에서 qRT-PCR을 통해 유전자 발현을 확인하였다. 열 충격 단백질(HSP)은 고온 스트레스 내성에 대해 중요한 바이오마커로 알려져 있다. 홀스타인종 젖소는 고온 스트레스 환경에서 HSP70, HSP90의 발현이 회복기보다 유의적으로 높게 ($p < 0.05$) 나타났다. 이는 고온 스트레스에 의해 면역세포가 다양

한 영향을 받게됨을 시사하며, 이는 고온기가 종료되는 회복기 시기에 일정 수준으로 회복되는 것으로 보인다. 다음으로 면역세포 내에서 고온 스트레스에 의해 다양한 사이토카인의 발현이 어떻게 변화하였는지 확인하기 위해 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-2, IL-17a, IFN γ , TNF- α 과 대표적 항염증성 사이토카인인 IL-10을 확인하였다(Fig. 3).

TNF- α 는 염증 발생 시 대식세포, 단핵구에 의해 주로 생성되는 염증성 사이토카인으로 세포 내 신호를 담당하여 세포 자멸 또는 괴사를 유발하며 지질 대사 조절 및 기능에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 TNF- α 는 고온기보다 회복기에 낮아지는 경향을 보였지만, 유의적인 차이는 발생하지 않았다. IFN γ 는 바이러스를 억제하는 중요한 사이토카인으로 많은 역할을 수행하지만, 주로 대식세포의 활성화를 유발하여 식세포작용을 증가시키며 박테리아 및 곰팡이의 세포 내 자살을 유도한다. 특히 염증이 발생하였을 때, IFN γ 의 높은 농도는 부정적인 반응을 유발하여 과도한 염증 반응을 나타낼 수 있다. IL-1 β 는 다양한 기능을 수행하며 염증성 사이토카인 중 하나이다. IL-1 β 는 염증 반응의 주요 매개인자이며, CD8+ T cell에 반응하여 분화

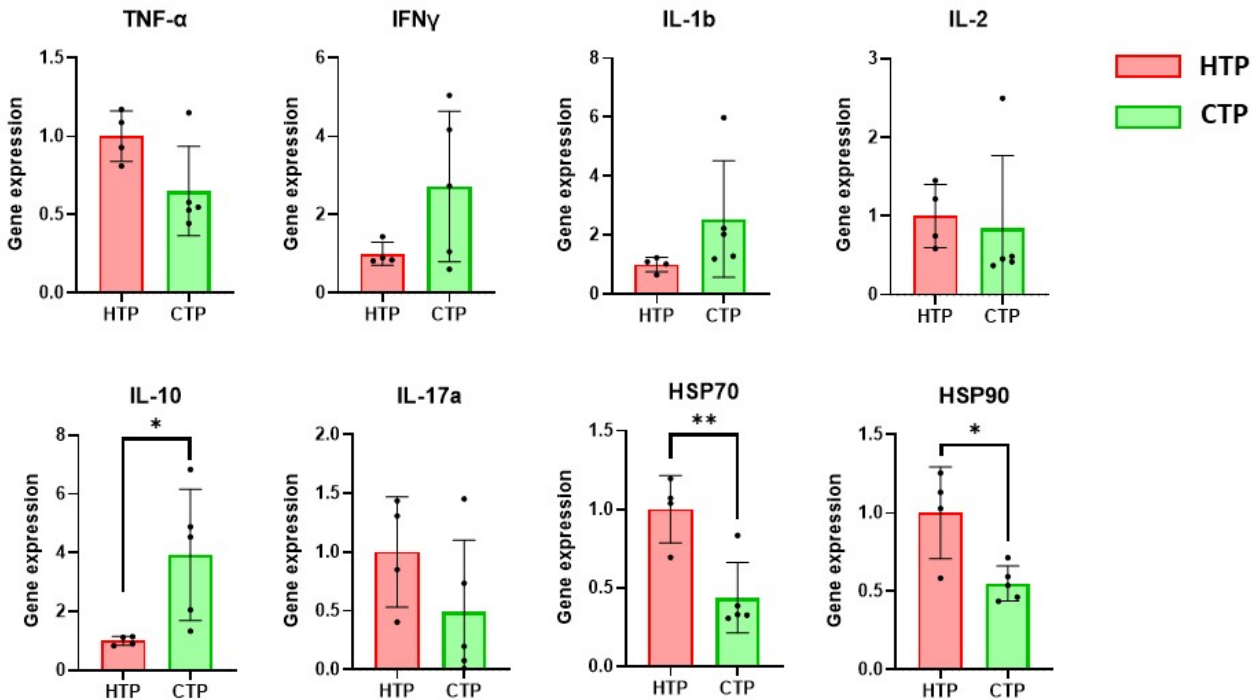


Fig. 3. Changes in the mRNA expression of PBMCs of Holstein dairy cows during high temperature period (HTP) and convalescence temperature period (CTP). Gene expression of cytokines (TNF- α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-10, and IL-17a) and Heat shock protein (HSP70 and HSP90) in PBMCs was normalized using the method by quantitative Real-Time PCR. Data are represented as means \pm standard deviation (SD); n = 4, HTP; n = 5, CTP. Values were statistically analyzed by Welch's t test. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

를 촉진시키지만 만성 질환과 급성 조직 손상이 발생할 시 과한 발현은 손상을 악화시킨다. IL-2는 CD4+, CD8+ T cell에 의해 분비되는 염증성 사이토카인으로 면역조절에 기여하며, 면역세포의 성장과 발달을 촉진한다. 하지만 본 연구의 결과에서는 IFN γ , IL-1 β , IL-2의 발현이 고온기와 회복기 사이에서 유의미한 차이가 발생하지 않았다. IL-17a는 주로 Th17에서 생산되는 사이토카인이며, 호중구 및 대식세포를 활성화시켜 박테리아와 곰팡이에 대한 숙주 방어에 중요한 역할을 하는 염증성 사이토카인이다. 앞서 유세포 분석에서 나타난 회복기의 IL-17a+ CD4+ T 세포의 증가와는 다르게 PBMC내 IL-17a의 발현은 유의적으로 차이가 발생하지 않았다.

IL-10은 항염증성 사이토카인으로 면역조절에 중요한 역할을 하며, IL-12와 같은 염증성 사이토카인을 생산을 방지하여 숙주의 손상을 방지하고 정상적인 조직 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다. 또한 IL-10은 자가면역반응과 알레르기에서 유도되는 비정상적 면역반응을 억제할 수 있다. 연구 결과에서 나타난 회복기에서의 IL-10 발현의 증가는 고온기에 증가하였던 염증성 반응을 억제하며 소의 항염증 반응을 증가시켜 고온 스트레스로부터 면역을 개선되고 있음을 나타내는 대표적인 결과라고 할 수 있다.

본 연구 결과에서 IL-10과 같은 항염증성 사이토카인의 증가를 통해 일부 면역반응은 회복됨을 보여주었지만, 고온 스트레스를 받은 후 변화할 것이라고 예상되는 다른 면역세포(B cell, helper T cell, cytotoxic T cell)에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 이는 고온 스트레스 후 회복기에 홀스타인종 젖소가 면역적으로 완벽하게 회복되지 못했을 가능성을 제시한다. 본 연구에서는 정상 수준의 젖소 면역세포 분포에 대한 결과가 부재하여 적온기, 고온기, 회복기의 연결성 있는 비교분석이 부족하다는 한계가 있다. 또한 적온기, 고온기, 회복기에 나타나는 젖소의 생리 대사와 유생산량, 고온 스트레스 바이오마커 등에 대한 분석이 함께 이루어진다면 좀 더 명확한 회복기 대사 및 면역반응에 대한 결과를 도출할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 요약

본 연구는 고온 스트레스에 노출된 홀스타인종 젖소와 이후 회복 기간을 가진 홀스타인종 젖소의 혈액을 분석하여 면역세포의 분포와 기능을 확인하여 고온 스트레스에 대한 시간에 따른 면역 변화를 규명하고자 하였다. 실험은 HTP(THI: 76 ± 1.2)와 CTP(THI: 66 ± 1.3)의 국립축산과학원 낙농과에서 사육중인 홀스타인종 젖소를 그룹당 5마리를 사용하여 수행되었다. EDTA tube를 사용하여 혈액을 샘플링하여 CBC 분석과 PBMC를 분리되었

다. 분리된 PBMC는 유세포 분석을 실시하였다. CBC 결과는 그룹 간 면역세포 수에 변화가 없었다. PBMC의 Flow Cytometry를 사용한 분석에서는 그룹 간 B cell, Helper T cell, cytotoxic T cell, $\gamma\delta$ T cell 간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 IL-17a를 생산하는 Th17 cell의 증가가 있었던 반면, CTP 중 Th1 cell은 감소하였다. CTP에서 IL-10의 발현 증가와 HSP70과 HSP90의 발현 감소가 관찰되었다. 결론적으로, IL-10의 발현 증가와 HSP 발현의 감소는 고온 스트레스로부터 약한 회복의 가능성을 시사한다. 그러나 B cell, T cell 및 기타 면역세포의 관찰된 변화가 없다는 것은 CTP 중 고온 스트레스로부터 불완전하게 회복되었음을 나타낸다. 본 연구에서는 적온기 정상수준의 젖소 면역세포 분포에 대한 결과가 부재하여 적온기, 고온기, 회복기의 연결성 있는 비교분석이 부족하다는 한계가 있으며 젖소의 생리 대사와 유생산량, 고온 스트레스 바이오마커 등에 대한 분석이 함께 이루어진다면 좀 더 명확한 회복기 대사 및 면역반응에 대한 결과 도출이 가능할 것으로 생각된다.

V. REFERENCES

- Abbas, Z., Sammad, A., Hu, L., Fang, H., Xu, Q. and Wang, Y. 2020. Glucose metabolism and dynamics of facilitative glucose transporters (GLUTs) under the influence of heat stress in dairy cattle. *Metabolites*. 10(8):312. doi:10.3390/metabo10080312
- Abeni, F., Calamari, L. and Stefanini, L. 2007. Metabolic conditions of lactating Friesian cows during the hot season in the Po valley. 1. Blood indicators of heat stress. *International Journal of Biometeorology*. 52:87-96. doi:10.1007/s00484-007-0098-3
- Alvarez, I., Gutiérrez, G., Gammella, M., Martínez, C., Politzki, R., González, C., Caviglia, L., Carignano, H., Fondevila, N., Poli, M. and Trono, K. 2013. Evaluation of total white blood cell count as a marker for proviral load of bovine leukemia virus in dairy cattle from herds with a high seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus. *American Journal of Veterinary Research*. 74(5):744-749. doi:10.2460/ajvr.74.5.744
- Amadori, M. and Spelta, C. 2021. The autumn low milk yield syndrome in high genetic merit dairy cattle: The possible role of a dysregulated innate immune response. *Animals*. 11(2):388. doi:10.3390/ani11020388
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D. and Zychlinsky, A. 2012. Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*. 30:459-489. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074942
- Atrian, P. and Shahryar, H.A. 2012. Heat stress in dairy cows (a review).

Holstein Immune Alterations Induced by Heat Stress

- Research in Zoology. 2(4):31-37. doi:10.5923/j.zoology.20120204.03
- Bines, J. and Hart, I. 1982. Metabolic limits to milk production, especially roles of growth hormone and insulin. *Journal of Dairy Science*. 65(8):1375-1389. doi:10.3168/jds.S0022-0302(82)82358-8
- Calder, P.C., Dimitriadis, G. and Newsholme, P. 2007. Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 10(4):531-540. doi:10.1097/MCO.0b013e3281e72ad4
- Chang-Fung-Martel, J., Harrison, M., Brown, J., Rawnsley, R., Smith, A. and Meinke, H. 2021. Negative relationship between dry matter intake and the temperature-humidity index with increasing heat stress in cattle: A global meta-analysis. *International Journal of Biometeorology*. 65(12):2099-2109. doi:10.1007/s00484-021-02167-0
- Collier, R., Eley, R., Sharma, A., Pereira, R. and Buffington, D. 1981. Shade management in subtropical environment for milk yield and composition in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*. 64(5):844-849. doi:10.3168/jds.S0022-0302(81)82656-2
- Collier, R.J., Hall, L.W., Rungruang, S. and Zimbleman, R.B. 2012. Quantifying heat stress and its impact on metabolism and performance. *Proceedings of 23rd Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*. pp. 74-84.
- Dahl, G.E., Tao, S. and Laporta, J. 2020. Heat stress impacts immune status in cows across the life cycle. *Frontiers in Veterinary Science*. 7:116. doi:10.3389/fvets.2020.00116
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J. and Kumar, R. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*. 9(3): 260. doi:10.14202/vetworld.2016.260-268
- Eom, J.S., Lee, S.J., Lee, S.S., Seo, S., Park, S.M. and Lee, S.S. 2022. Metabolic profiling of rumen fluid and serum in Holstein steers exposure by heat-stressed using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*. 23(1):489-500. doi:10.5762/KAIS.2022.23.1.489
- Fabris, T.F., Laporta, J., Skibieli, A.L., Corra, F.N., Senn, B.D., Wohlgemuth, S.E. and Dahl, G.E. 2019. Effect of heat stress during early, late, and entire dry period on dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 102(6):5647-5656. doi:10.3168/jds.2018-15721
- Fulkerson, P.C. and Rothenberg, M.E. 2013. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12(2):117-129. doi:10.7554/dic.212587
- Harris, D., Shrode, R., Rupel, I. and Leighton, R. 1960. A study of solar radiation as related to physiological and production responses of lactating Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*. 43(9):1255-1262. doi:10.3168/jds.S0022-0302(60)90312-X
- Hirakawa, R., Nurjanah, S., Furukawa, K., Murai, A., Kikusato, M., Nochi, T. and Toyomizu, M. 2020. Heat stress causes immune abnormalities via massive damage to effect proliferation and differentiation of lymphocytes in broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*. 7:46. doi:10.3389/fvets.2020.00046
- Jakubzick, C.V., Randolph, G.J. and Henson, P.M. 2017. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*. 17(6):349-362. doi:10.1038/nri.2017.28
- Johnson, H., Ragsdale, A., Berry, I., Shanklin, M. and Mclarney, S. 1963. Environmental physiology and shelter engineering with special reference to domestic animals. 66. Temperature-humidity effects including influence of acclimation in feed and water consumption of Holstein cattle. *Research Bulletin. Missouri Agricultural Experiment Station* (846).
- Joo, S.S., Lee, S.J., Park, D.S., Kim, D.H., Gu, B.H., Park, Y.J., Rim, C.Y., Kim, M. and Kim, E.T. 2021. Changes in blood metabolites and immune cells in Holstein and Jersey dairy cows by heat stress. *Animals*. 11(4):974. doi:10.3390/ani11040974
- Joo, Y.S., Jung, H.J. and Kim, B.J. 2009. Cluster analysis with Korean weather data: Application of model-based Bayesian clustering method. *Journal of the Korean Data and Information Science Society*. 20(1):57-64.
- Kettle, A.J. and Winterbourn, C.C. 1997. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Report*. 3(1):3-15. doi:10.1080/13510002.1997.11747085
- Kibler, H.H. 1964. Environmental physiology and shelter engineering with special reference to domestic animals. LXVII. thermal effects of various temperature-humidity combinations on Holstein cattle as measured by eight physiological responses. *Agricultural Experiment Station. University of Missouri*. No. 0862.
- Kvidera, S., Horst, E., Abuajamieh, M., Mayorga, E., Fernandez, M.S. and Baumgard, L. 2017. Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 100(3):2360-2374. doi:10.3168/jds.2016-12001
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Scalia, D., Basiricò, L., Morera, P. and Nardone, A. 2006. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from Brown Swiss and Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 89(12):4606-4612. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72510-3
- Mader, T.L., Davis, M. and Brown-Brandl, T. 2006. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 84(3):712-719. doi:10.2527/2006.843712x
- Molinari, P.C., Davidson, B.D., Laporta, J., Dahl, G.E., Sheldon, I.M. and Bromfield, J.J. 2023. Parturition heat stress in dairy cows increases postpartum inflammatory responses in blood of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 106(2):1464-1474. doi:10.

Holstein Immune Alterations Induced by Heat Stress

3168/jds.2022-22405

- Nadif, R., Zerimech, F., Bouzigon, E. and Matran, R. 2013. The role of eosinophils and basophils in allergic diseases considering genetic findings. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 13(5):507-513. doi:10.1097/ACI.0b013e328364e9c0
- Noster, R., De Koning, H., Sallusto, F. and Zielinski, C. 2015. Two types of human Th17 cells with pro-and anti-inflammatory properties and distinct roles in autoinflammation. *Pediatric Rheumatology*. 13(Suppl 1):O49. doi:10.1186/1546-0096-13-S1-O49
- NRC. 1971. A guide to environmental research on animals. Washington, DC. USA: National Academy of Science.
- Park, D.S., Gu, B.H., Park, Y.J., Joo, S.S., Lee, S.S., Kim, S.H., Kim, E.T., Kim, D.H., Lee, S.S., Lee, S.J., Kim, B.W. and Kim, M. 2021. Dynamic changes in blood immune cell composition and function in Holstein and Jersey steers in response to heat stress. *Cell Stress and Chaperones*. 26(4):705-720. doi:10.1007/s12192-021-01216-2
- Park, J.H., Choi, H.C., Lee, H.J., Kim, E.T., Son, J.K. and Kim, D.H. 2019. A study on the effect of temperature-humidity index on the respiration rate, rectal temperature and rumination time of lactating Holstein cow in summer season. *Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society*. 20(11):136-143. doi:10.5762/KAIS.2019.20.11.136
- Park, S.B., Lim, D.H., Park, S.M., Kim, T.I., Choi, S.H., Kwon, E.G., Seo, J., Seo, S. and Ki, K.S. 2013. Effects of different energy and rumen undegradable protein levels on dairy cow's production performance at mid-lactation period. *CNU Journal of Agricultural Science*. 40(4):333-338. doi:10.7744/cnujas.2013.40.4.333
- Pearce, E.L., Poffenberger, M.C., Chang, C.H. and Jones, R.G. 2013. Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 342(6155):1242454. doi:10.1126/science.1242454
- Polisky, L. and Von Keyserlingk, M.A. 2017. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science*. 100(11):8645-8657. doi:10.3168/jds.2017-12651
- Rhoads, M., Rhoads, R., VanBaale, M., Collier, R., Sanders, S., Weber, W., Crooker, B. and Baumgard, L. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *Journal of Dairy Science*. 92(5):1986-1997. doi:10.3168/jds.2008-1641
- Schäffer, M. and Barbul, A. 1998. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *British Journal of Surgery*. 85(4):444-460. doi:10.1046/j.1365-2168.1998.00734.x
- Seath, D. and Miller, G. 1947. Heat tolerance comparisons between Jersey and Holstein cows. *Journal of Animal Science*. 6(1):24-34. doi:10.2527/jas1947.6124
- St-Pierre, N.R., Cobanov, B. and Schnitkey, G. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science*. 86(E. Suppl.):E52-E77. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5
- Thom, E.C. 1959. The discomfort index. *Weatherwise*. 12(2):57-61. doi:10.1080/00431672.1959.9926960
- Vitali, A., Felici, A., Lees, A., Giacinti, G., Maresca, C., Bernabucci, U., Gaughan, J., Nardone, A. and Lacetera, N. 2020. Heat load increases the risk of clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 103(9):8378-8387. doi:10.3168/jds.2019-17748
- Welsh, M.D., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R.M., McNair, J., Skuce, R.A., Bryson, D. and Pollock, J.M. 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*. 114(1):101-111. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.02003.x
- Wheelock, J., Rhoads, R., VanBaale, M., Sanders, S. and Baumgard, L. 2010. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 93(2):644-655. doi:10.3168/jds.2009-2295
- Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C. and Edwards, S.W. 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 49(9):1618-1631. doi:10.1093/rheumatology/keq045
- Yadav, B., Singh, G., Verma, A., Dutta, N. and Sejian, V. 2013. Impact of heat stress on rumen functions. *Veterinary World*. 6(12):992. doi:10.14202/vetworld.2013.992-996
- Yousef, M.K. 1985. Stress physiology in livestock. Volume I. Basic principles. CRC Press.
- Zhao, F.Q. 2014. Biology of glucose transport in the mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 19:3-17. doi:10.1007/s10911-013-9310-8

(Received : November 15, 2023 | Revised : November 30, 2023 | Accepted : December 01, 2023)