

Research Article

Transcriptomic Profiling of Growth Stage-Specific Gene Expression in Hanwoo Liver

Taejoon Jeong¹, Woncheoul Park², Sunsik Jang³, Dajeong Lim^{1*}

¹Department of Animal Resources Science, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

²Animal Genomics and Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju, Republic of Korea

³Hanwoo Research Institute, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Pyeongchang, Republic of Korea

*Corresponding author: limdj@cnu.ac.kr

ABSTRACT

This study investigates gene expression changes in Hanwoo liver tissue across early growth stages to understand the molecular mechanisms underlying liver development and immune functions. Using weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), we analyzed liver samples from 10 days (n = 3), 2 months (n = 10), 6 months (n = 6), and 10 months (n = 10) Hanwoo calves to identify growth stage-specific gene modules. We identified significant gene expression patterns related to immune responses, metabolic processes, and extracellular matrix organization, particularly at critical developmental stages. The findings suggest a dynamic shift in liver functions, particularly immune modulation in early months, as highlighted by the involvement of immune-related hub gene *DOCK2* and enhanced metabolic activity as calves mature. These results contribute to understanding liver-specific development and may support strategies for improving growth and health in Hanwoo cattle.

Keywords: Hanwoo, Growth stage of liver, Transcriptome analysis, WGCNA

INTRODUCTION

한우(Hanwoo)는 한국 고유의 토종 소 품종으로, 육질과 풍미에서 우수한 평가를 받으며 한국 내에서 높은 경제적 가치를 지닌다(Hur, Park et al. 2008, Cho, Kim et al. 2010). 한우와 같은 가축의 생산성 및 건강 상태는 성장 과정 중 발생하는 다양한 생리적 변화와 긴밀히 연결되어 있다(Kim, Kim et al. 2013, Reddy, Jeong et al. 2018, Zhang, Xia et al. 2019, Woo, Lee et al. 2024).

가축의 고기 생산은 성장 단계에서 성별, 유전적 요인, 영양 상태, 환경적 요인 등의 영향을 받으며(Irshad, Kandeepan et al. 2013), 특히 생후 초기인 포유기와 이유기를 지나 성숙으로 성장하는 과정에서 이러한 요인들이 조절되는 방식에 따라 성장 결과가 크게 달라진다(Bruns, Pritchard et al. 2005, Amaral, Mariz et al. 2018). 따라서 한우의 초기 성장 단계에서의 유전자 발현 패턴을 조사하는 것은 생산성 향상을 위한 중요한 단서가 될 수 있으나, 한우에 초점을 맞춘 이러한 연구는 현재 매우 제한적인 상태이다.

동물의 간 조직은 면역체계에서 핵심적 역할을 수행하는 중요한 기관으로, 면역 반응 조절과 병원체 저항성 유지에 크게 기여한다(Gao, Jeong et al. 2007, Kubes and Jenne 2018). 간에는 다양한 면역 세포들이 존재하여 병원체를 감지하고, 면역 반응을 개시 및 조절하며, 선천 면역에서 특히 중요한 역할을 한다(Wick, Leithauser et al. 2002, Gao, Jeong et al. 2007, Kubes and Jenne 2018). 소에서의 간 면역 기능에 관한 연구들은 간이 면역 세포 활성화와 사이토카인 분비를 통해 전신적 면역 반응을 지원하는 기관으로서 역할을 수행함을 보여주고 있으며(Peng, Wisse et al. 2016, Kubes and Jenne 2018), NK 세포와 같은 선천 면역 세포들이 병원체에 대한 첫 방어선을 제공함이 밝혀졌다(Chen, Zeng et al. 2019, Singh, Golla et al. 2019, Heimes, Brodhagen et al. 2020).

한우의 권장 이유 시기는 3개월령으로(Lim, Ahn et al. 2018) 이전 시기는 어미의 젖을 먹는 포유기로서 면역 체계 발달에 중요한 시기이다. 이 시기의 면역 활성화는 성장 과정 전반에 걸쳐 장기적인 영향을 미칠 수 있다(Hulbert and Moisés 2016). 이 기간 동안 형성된 면역력은 외부 병원체에 대한 저항성을 강화하며, 이는 이후 성장과 생산성에까지 영향을 미치며(Hulbert and Moisés 2016), 다른 축종에서도 확인된 바 있다(Chavatte-Palmer, Duvaux-Ponter et al. 2001, Lessard, Beaudoin et al. 2012, Albenzio, Santillo et al. 2016, Zhang, Liu et al. 2020).

본 연구에서는 한우 간 조직을 대상으로 성장 단계에 따른 유전자 발현 변화를 체계적으로 파악하기 위해, 가중치 네트워크 기반의 군집화 분석 기법인 가중 유전자 공발현 네트워크 분석(Weighted Gene Co-expression Network Analysis, WGCNA)을 활용하였다. WGCNA는 유전자 발현 패턴의 유사성을 계산하여 유전자들을 여러 모듈로 나누어, 생리적 조건이나 시기별로 특이적인 유전자 그룹을 식별하는 데 강력한 도구로 사용된다(Langfelder and Horvath 2008).

현재까지 한우의 초기 성장 단계(생후 10개월 이전)에서 유전자 발현 변화에 관한 연구는 매우 제한적이다. 본 연구에서는 한우 생후 10일, 2개월, 6개월, 10개월의 간 조직에서 RNA 시퀀싱을 수행하여 성장 단계별 유전자 발현 변화를 간 조직 발달에 따른 면역 및 성장 관련 생물학적 기전을 규명하고자 한다.

MATERIALS AND METHODS

공시재료 및 조직 추출

한우의 초기 성장 단계에 따른 간조직의 유전자 발현량을 확인하기 위해, 국립축산과학원 한우연구소에서 사육 중인 개체를 활용했다. 생후 10일령 3두, 2개월령 10두, 6개월령 6두, 10개월령 10두의 간조직이 샘플링되었다. 실험은 국립 축산과학원 동물실험 윤리위원회로부터 승인받았다(승인 번호: NIAS20201979).

RNA 추출 및 RNA-Seq 데이터 생산

거세 한우 29두에서 채취한 조직 시료는 두 가지 방법으로 Total RNA를 준비하였다. 첫 번째 방법은 Trizol 비드 RLT DNase 컬럼 프로토콜에 따라 QIAamp 96 Viral RNA Kit과 QIAzol Lysis Reagent를 사용하여 RNA를 추출하는 방법이었다. 두 번째 방법은 Trizol 비드 이소프로판올 컬럼 DNase 조직 RNA 프로토콜에 따라 QIAamp DNA Mini Kit과 QIAzol Lysis Reagent를 사용하여 RNA를 추출하는 방식이었다. RNA 농도는 NanoDrop ND-1000 분광광도계(NanoDrop Technologies, 미국)를 사용하여 확인하였다. 추출된 RNA는 TapeStation RNA Screen Tape을 통해 RNA 품질 관리(RNA QC)를 수행하였으며, 기준은 농도(총량) > 0.5 µg, RINs 값 > 6, 그리고 rRNA 비율 > 1이었다. RNA의 품질과 무결성은 bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, 미국)를 사용하여 평가하였고, RIN 값이 8.0 이상인 샘플만 cDNA 라이브러리 제작에 사용하였다. 개별 라이브러리는 Illumina TruSeq™ RNA 샘플 준비 키트(Illumina, San Diego, CA, 미국)를 사용하여 생성되었다. 모든 샘플은 Illumina NovaSeq 6000 시퀀서에서 시퀀싱을 수행하여, 샘플 당 평균 6 Gb, 100bp paired-end reads 데이터를 생성하였다.

데이터 전처리

RNA 추출 후, 확보된 29개의 시퀀싱 데이터에 대해 품질 관리(Quality Control)를 수행했다. 시퀀싱 데이터의 품질 관리는 Trimmomatic (v0.39) (Bolger, Lohse et al. 2014) paired-end mode를 사용하고, 어댑터 제거를 위해 TruSeq3-PE 어댑터 파일을 참조했으며, seedmis-match threshold 2, palindrome clip threshold 30, simple clip threshold 10으로 설정하였다. 추가 옵션으로 LEADING 3, TRAILING 3, SLIDINGWINDOW 4:15, MINLEN 36으로 설정하여 트리밍을 진행하였다. 이후, HISAT2 (Kim, Langmead et al. 2015)를 사용하여 ARS-UCD 1.3 Bos taurus 참조 유전체에 서열 정렬을 수행하였으며, SAMtools (Li, Handsaker et al. 2009)를 이용해 BAM 형식으로 변환하고 정렬하여 최종 매핑 파일을 얻었다. 매핑된 데이터는 featureCounts (Liao, Smyth et al. 2014)를 사용하여 유전자 단

위로 reads 수를 카운팅 하였다.

간 조직의 성장 단계별 특이 유전자 모듈

간 조직의 유전자 발현 패턴의 유사성을 기준으로 유전자를 모듈화하기 위해 집계된 카운트 데이터 중 각 성장 단계의 간 조직 데이터 29개(10일: 3, 2개월: 10, 6개월: 6, 10개월: 10)를 사용하였다. WGCNA 분석에서는 29개 간 조직 전체 샘플 중 약 80%인 최소 24개의 샘플에서 최소 15개의 리드 카운트가 확보되지 않은 유전자는 제외하였다. 남은 카운트 데이터는 R(Ihaka and Gentleman 1996) 패키지인 DESeq2(Love, Huber et al. 2014)의 vst (Variance Stabilizing Transformations) 함수로 분산 안정화된 발현량 데이터로 변환하였다. 이를 DESeq2의 plotPCA 함수로 성장단계 기준 PCA plot을 그려서 발현량 패턴으로 적절히 그룹화되고 있는지 사전 확인하였다. Variance Stabilizing Transformations로 변환된 발현량 데이터를 활용하여 power value를 16으로 설정하여 WGCNA 공발현 네트워크를 구축했다. 75% (merge cut height = 0.25)의 공발현 양상을 보이는 유전자들을 하나의 모듈(그룹)으로 설정했다. 각 모듈에 대해 WGCNA의 chooseTopHubInEachModule 함수로 모듈 내 연결성이 가장 높은 허브 유전자(노드)를 확인하였다. 성장 단계와 모듈간 Pearson 상관 분석을 수행하여 성장 단계 특이 유전자 모듈을 파악하였다.

공발현 그룹에 대한 Functional enrichment 분석

공발현 네트워크 내 16개 모듈에 대해 R 패키지인 clusterProfiler (Yu, Wang et al. 2012)를 사용하여 KEGG pathway (Kanehisa and Goto 2000) 분석 및 Gene Ontology (GO) (Ashburner, Ball et al. 2000) 하위 3개의 카테고리인 Biological Process (BP), Molecular Function (MF), Cellular Component (CC) 각각에 대한 기능 분석을 수행하여 한우의 간 조직에서 성장단계에 연관된 유의한 생물학적 기능을 추출하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

데이터 전처리 및 매핑

Table 1에서 보는 바와 같이, 평균 34,302,546 표준편차 4,936,840 reads의 Trimmomatic을 사용한 품질 관리 결과, 평균 33,476,989 reads를 사용할 수 있었다. 또한, Hisat2를 이용한 서열 정렬 결과 평균 98.03%의 Overall Alignment Rate을 보였다(Table 2).

Table 1. Summary Statistics of Quality control of sequenced reads Results for 149 Samples

Metric	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum
Input Read Pairs	34,302,546	4,936,840	24,571,802	44,648,361
Both Surviving	33,476,989	4,712,787	24,113,899	43,552,455
Forward Only Surviving	628,848	271,455	260,101	1,466,750
Reverse Only Surviving	160,279	32,325	90,097	235,493
Dropped	36,429	8,347	17,093	81,306

Table 2. Summary Statistics of Alignment Results

Metric	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum
Total Reads	33,476,989	4,712,787	24,113,899	43,552,455
Paired Reads	33,476,989	4,712,787	24,113,899	43,552,455
Concordantly 0 Times	1,943,589	716,977	731,606	4,591,173
Concordantly Exactly 1 Time	30,408,928	4,754,846	21,919,715	40,336,839
Concordantly >1 Times	1,124,471	421,672	417,964	3,034,218
Discordantly 1 Time	634,570	388,167	72,844	2,052,188
Pairs Aligned 0 Times	1,309,018	493,915	550,470	3,430,268
Mates Aligned 0 Times	1,309,018	493,915	550,470	3,430,268
Mates Aligned Exactly 1 Time	1,063,169	385,895	459,938	2,390,620
Mates Aligned >1 Times	243,910	104,171	80,564	652,306
Overall Alignment Rate	98.03	1.26	92.26	99.35

간 조직의 공발현 유전자 네트워크 구축 및 공발현 그룹과 성장단계의 상관관계 분석

구체적인 결과를 살펴보기 앞서, 본 연구의 표본 수가 크지 않은 점을 이해할 필요가 있으며, 특히, 10일령의 경우 표본 수가 3으로 매우 작으므로 관련 결과의 신뢰성에 대한 충분한 고려가 필요함을 밝히는 바이다.

전체 29개 샘플 중 최소 80%인 24개 이상의 샘플에서 리드 카운트가 15 미만인 유전자는 제외하여 36,075개의 유전자 중 15,161개의 유전자가 분석에 사용되었다. 15,161개 유전자에 대한 PCA 분석 결과 성장단계에 따른 유전자 발현 양상의 차이가 명확하게 나타났다(Figure 1). 또한, WGCNA 분석으로 성장 단계별 발현 양상 유사성에 따라 Table 3와 같이 16개의 공발현 그룹으로 분류되었다. 각 유전자 공발현 모듈(그룹)과 성장 단계(생후 10일, 2, 6, 10개월)의 상관 분석 결과, 대부분의 공발현 모듈이 본 연구 기준 전반기라고 할 수 있는 10일령, 2개월령과 후반기라고 할 수 있는 6, 10개월령에서 상반된 상관 결과를 보였다(Figure 2). 대표적으로 yellow 모듈은 10일령과 0.69의 강한 양의 상관을 보이다가 10개월령과는 -0.71의 강한 음의 상관을 보였다. 반대로 brown 모듈은 10일령에서 -0.83의 강한 음의 상관에서 10개월령과 0.64의 강한 양의 상관으로 변화함을 확인할 수 있었다.

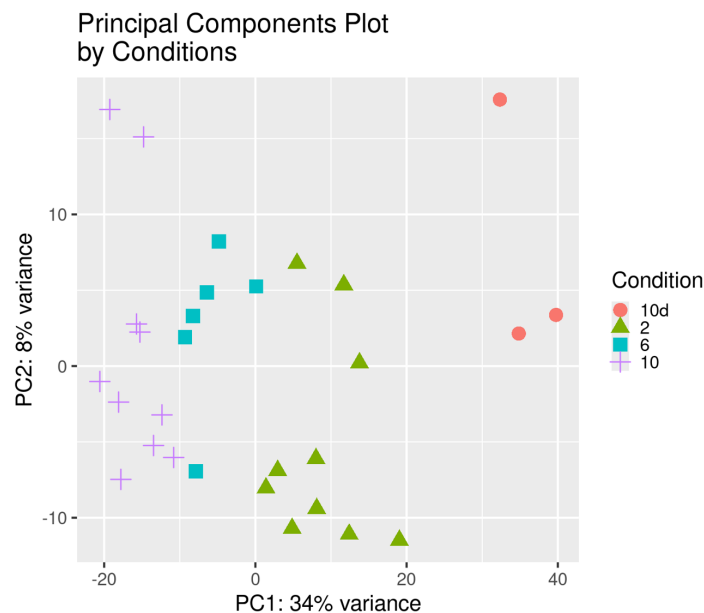


Figure 1. PCA plot of gene expression levels in Hanwoo liver tissue by age. 10d: 10 days old, 2: 2 months old, 6: 6 months old, 10: 10 months old

Table 3. Number of genes in each module with hub genes

Module	Number of Genes	Hub Gene (Ensembl ID, Gene Name)
turquoise	950	ENSBTAG00000037400, <i>TNRC18</i>
blue	875	ENSBTAG00000011096, <i>ERGIC2</i>
brown	517	ENSBTAG00000011076, <i>KCNN2</i>
yellow	302	ENSBTAG00000021466, <i>COL3A1</i>
green	245	ENSBTAG00000003229, <i>RPL23</i>
red	219	ENSBTAG00000020166, <i>ZNFY1</i>
black	76	ENSBTAG00000016562, <i>SEC63</i>
pink	62	ENSBTAG00000007930, <i>NCOA6</i>
magenta	53	ENSBTAG00000007860, <i>ASPM</i>
purple	39	ENSBTAG00000016174,
greenyellow	31	ENSBTAG00000043577, <i>MT-ND4</i>
tan	26	ENSBTAG00000066025,
salmon	24	ENSBTAG00000014612, <i>DOCK2</i>
cyan	23	ENSBTAG00000011839, <i>HMGCS1</i>
lightcyan	21	ENSBTAG00000020446, <i>THOPI</i>
midnightblue	21	ENSBTAG00000061067, <i>Metazoa_SRP</i>
grey	11,677	N/A

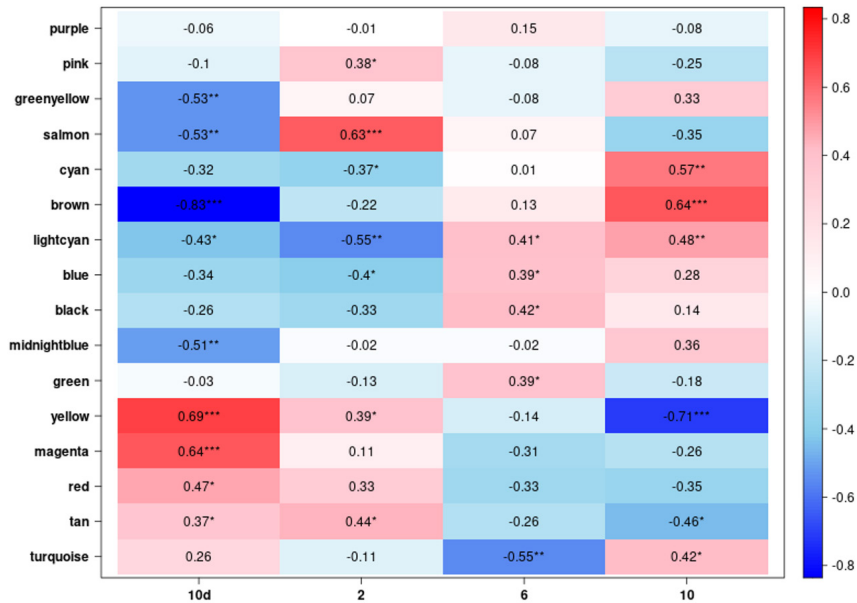


Figure 2. Correlation matrix heatmap illustrating gene expression correlations in liver tissue across growth stages (10d: 10 days old, 2: 2 months, 6: 6 months, 10: 10 months). Colors indicate the strength and direction of correlation, with red representing positive and blue negative correlations. Asterisks within cells denote significance levels: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

16개 모듈 각각에 대한 기능 분석 결과 Table 4와 같은 Term을 확인할 수 있었다. Huse, Gruppuso et al. (2015)은 사람의 태아 및 성인의 간에 대한 전사체 발현 분석 결과 성인의 간에서 분화에 관한 기능들이 있음을 밝혔다. 여기에는 Cytochrome P450 enzymes, 수송체들의 기능을 보이는 유전자 집합이 포함됐는데 이는 본 연구의 가장 마지막 성장 단계인 10개월령 특이 유전자 모듈(brown, $r = 0.64$)의 기능 분석 결과 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (KEGG: bta00980, adjusted p-value = 1.46378E-07)와 유사함을 확인할 수 있었다. 이는 Thomas, Guigneaux et al. (2002)이 나이든 쥐와 사람의 간에서 확인한 유전자 그룹의 기능 분석 결과와도 일치하는 것이었다. Cytochrome P450 enzymes는 외래 물질 유입시 대사 과정을 통해 체외 배출이 용이하도록 하는 기능을 하며, 특히 독성물질 배출에 기여하는 것으로 알려져 있다(Manikandan and Nagini 2018). Hart, Cui et al. (2009)도 쥐의 성장에 따른 간의 Cytochrome P450 관련 유전자들의 발현 패턴을 알아보는 연구에서 Cyp1a2, 2a4, 2f2, 2b10, 2c29, 2d22, 3a13, 3a25의 유전자들이 쥐가 성장(약 생후 20일 이후)함에 따라 발현량이 늘어나는 것을 확인하였다. brown 모듈은 그 외에도 Organic acid metabolic process (GO:0006082, adjusted p-value = 3.29755E-19), Oxoacid metabolic process (GO:0043436, adjusted p-value = 6.5148E-15), Carboxylic acid metabolic process (GO:0019752 adjusted p-value = 1.75359E-14) 등의 대사 관련 기능들이 주를 이루었다. Wang, Wang et al. (2022)의 연구에서 brown 모듈의 허브 유전자인 *KCNN2* (potassium calcium-activated channel subfamily N member 2)가 viral, alcoholic, 그리고 non-alcoholic hepatic fibrosis에서 모두 유의미하게 발현되는 유전자임이 밝혀졌다. 이 연구에서는 세 가지 유형의 hepatic fibrosis에서 유전자 발현 데이터를 비교 분석한 결과, *KCNN2*가 세 경우 모두에서 중요한 발현 양상을 보였으며, 단백질-단백질 상호작용 분석에서도 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 나타났다. 이를 바탕으로 *KCNN2*는 hepatic fibrosis와 관련된 후보 유전자로 제시되었다.

본 연구에서 한우 생후 초기 단계인 10일령 간 조직 특이 유전자 모듈(yellow, $r = 0.69$)의 기능 분석 결과 extracellular matrix organization (GO:0030198, adjusted p-value = 3.4721E-05), external encapsulating structure organization (GO:0045229, adjusted p-value = 3.4721E-05), extracellular structure organization (GO:0043062, adjusted p-value = 3.4721E-05), external encapsulating structure (GO:0030312, adjusted p-value = 1.9041E-11), extracellular matrix (GO:0031012, adjusted p-value = 1.9041E-11) 등의 ECM (Extracellular Matrix) 관련 기능이 주로 나타났다. Amenta and Harrison (1997)은 Hepatic Ontogenesis 과정에서 ECM이 구조적, 기능적으로 매우 중요한 역할을 한다고 하였다. 이 모듈의 허브 유전자인 *COL3A1*에 대해 Kuivaniemi and Tromp (2019)은 ECM의 주요 단백질로서, 혈액 응고 과정에서 혈소판과의 상호작용과 상처 치유에서 중요한 신호 전달 역할을 한다고 하였다. Liu, Tearle et al. (2021)가 2가지 소 아종(*Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*) 및 이 둘의 교배 아종의 임신 중기 태아 다섯개 조직(뇌, 간, 폐, 근육, 태반)에 대한 차등 발현 유전자 분석 결과 *COL3A1*이 모든 조직에서 높은 수준으로 발현되는 것을 발견했다.

2개월령 특이 유전자 모듈(salmon, $r = 0.63$)은 Positive regulation of immune system process (GO:0002684, adjusted p-value = 0.001445519), Immunoglobulin mediated immune response (GO:0016064, adjusted p-value = 0.001445519), B cell mediated immunity (GO:0019724, adjusted p-value = 0.001445519), Positive regulation of T cell activation (GO:0050870, adjusted p-value = 0.001445519), MHC protein complex (GO:0042611, adjusted p-value = 0.003732449) 등의 면역 관련 기능이 주를 이루었다. 한우는 일반적으로 3개월령에 이유를 시작하는 것으로 알려져 있다(Lim, Ahn et al. 2018). 이유 직전인 2개월령 간조직에서 면역 관련 유전자군이 특이적으로 발현된 것은 이 시기 면역 체계 형성에 간이 중요한 역할을 할 것임을 시사한다. Bailey, Haverson et al. (2005)은 어린 동물에게 있어 이유기는 면역 체계 형성에 중요한 시기임을 밝히고 있다. *DOCK2* 유전자는 인간에서 면역 세포의 이동과 활성화에 중요한 역할을 하는 구아닌 교환 인자로서, 다양한 면역 세포에서 Rac 단백질을 활성화하여 세포 이동을 촉진하고 면역 반응을 조절하는 기능이 있다(Chen, Meng et al. 2018). *Dock2*^{-/-} 쥐 실험에서 간 조직의 Natural Killer T cell 수가 유의미하게 감소되었다(Kunisaki, Tanaka et al. 2006). 소에서는 *DOCK2* 유전자가 성장 초기 간에서 면역 반응과 연관된 유전자로 밝혀지지 않았으나, 한우의 성장 초기 간 조직의 면역 반응에 연관된 유전자로 제안하고자 한다. 이에 대한 구체적인 역할과 기능을 규명하기 위한 추가 연구가 필요할 것이다.

Table 4. Functional analysis results for each of the 16 modules. Up to 5 terms were selected based on the lowest p-adjusted values (≤ 0.05). (continued)

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	p.adjust	Module
GO:0010494	cytoplasmic stress granule	3/52	20/14787	0.004124	black
GO:0036464	cytoplasmic ribonucleoprotein granule	4/52	87/14787	0.009663	black
GO:0035770	ribonucleoprotein granule	4/52	93/14787	0.009663	black
GO:0006888	endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport	28/619	89/15517	5.91E-15	blue
GO:0048193	Golgi vesicle transport	36/619	172/15517	1.14E-13	blue
GO:0031984	organelle subcompartment	57/627	400/14787	1.79E-13	blue
GO:0005794	Golgi apparatus	56/627	457/14787	1.12E-10	blue
GO:0098827	endoplasmic reticulum subcompartment	43/627	295/14787	1.24E-10	blue
GO:0006082	organic acid metabolic process	50/350	422/15517	3.3E-19	brown
GO:0043436	oxoacid metabolic process	43/350	399/15517	6.51E-15	brown
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	42/350	395/15517	1.75E-14	brown
GO:0004497	monooxygenase activity	22/393	118/15934	4.87E-11	brown
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	25/393	171/15934	1.61E-10	brown
bta00100	Steroid biosynthesis	8/18	20/9770	9.3E-17	cyan
GO:0008610	lipid biosynthetic process	11/16	281/15517	2.14E-14	cyan
GO:0006720	isoprenoid metabolic process	7/16	37/15517	1.27E-13	cyan
GO:0008299	isoprenoid biosynthetic process	6/16	18/15517	2.23E-13	cyan
GO:0016126	sterol biosynthetic process	6/16	19/15517	2.23E-13	cyan
GO:0003735	structural constituent of ribosome	70/190	239/15934	1.79E-78	green
bta03010	Ribosome	70/176	202/9770	8.24E-73	green
GO:0005840	ribosome	71/232	253/14787	1.24E-68	green
GO:0006412	translation	74/195	417/15517	2.64E-63	green
GO:0043043	peptide biosynthetic process	74/195	423/15517	4.03E-63	green
bta00190	Oxidative phosphorylation	12/20	165/9770	1.33E-15	greenyellow
bta05415	Diabetic cardiomyopathy	12/20	234/9770	4.72E-14	greenyellow
bta05016	Huntington disease	13/20	340/9770	6E-14	greenyellow
bta04714	Thermogenesis	12/20	261/9770	7.75E-14	greenyellow
bta05208	Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	12/20	263/9770	7.75E-14	greenyellow
bta04216	Ferroptosis	2/11	49/9770	0.03713	lightcyan
bta01212	Fatty acid metabolism	2/11	59/9770	0.03713	lightcyan
GO:0022402	cell cycle process	27/44	442/15517	1.05E-28	magenta
GO:0000278	mitotic cell cycle	24/44	309/15517	1.06E-27	magenta
GO:1903047	mitotic cell cycle process	22/44	230/15517	3.06E-27	magenta
GO:0007059	chromosome segregation	17/44	149/15517	7.57E-22	magenta
GO:0098813	nuclear chromosome segregation	15/44	107/15517	1.49E-20	magenta
bta03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	1/1	100/9770	0.010235	midnightblue
GO:0051254	positive regulation of RNA metabolic process	13/48	339/15517	4.8E-09	pink
GO:0045935	positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	13/48	369/15517	6.91E-09	pink
GO:0045893	positive regulation of DNA-templated transcription	11/48	280/15517	4.09E-08	pink
GO:1902680	positive regulation of RNA biosynthetic process	11/48	280/15517	4.09E-08	pink
GO:0010557	positive regulation of macromolecule biosynthetic process	12/48	422/15517	1.71E-07	pink
GO:0033044	regulation of chromosome organization	4/27	40/15517	0.000183	purple
GO:0005654	nucleoplasm	7/29	393/14787	0.000527	purple
GO:0000723	telomere maintenance	3/27	37/15517	0.003641	purple
GO:0032200	telomere organization	3/27	38/15517	0.003641	purple
GO:0006278	RNA-templated DNA biosynthetic process	2/27	10/15517	0.007467	purple

Table 4. Functional analysis results for each of the 16 modules. Up to 5 terms were selected based on the lowest p-adjusted values (≤ 0.05).

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	p.adjust	Module
GO:0009615	response to virus	20/151	50/15517	4.5E-25	red
GO:0051607	defense response to virus	18/151	47/15517	3E-22	red
GO:0140546	defense response to symbiont	29/151	269/15517	7.33E-20	red
GO:0043207	response to external biotic stimulus	32/151	361/15517	1.02E-19	red
GO:0051707	response to other organism	32/151	361/15517	1.02E-19	red
bta05416	Viral myocarditis	4/14	83/9770	0.000519	salmon
bta04015	Rap1 signaling pathway	5/14	216/9770	0.000519	salmon
bta04670	Leukocyte transendothelial migration	4/14	118/9770	0.000744	salmon
GO:0007264	small GTPase-mediated signal transduction	5/21	231/15517	0.001446	salmon
GO:0002684	positive regulation of immune system process	5/21	291/15517	0.001446	salmon
GO:0004896	cytokine receptor activity	3/16	83/15934	0.002689	tan
bta04630	JAK-STAT signaling pathway	4/10	218/9770	0.002871	tan
GO:0140375	immune receptor activity	3/16	109/15934	0.003023	tan
bta04380	Osteoclast differentiation	3/10	152/9770	0.012881	tan
bta05160	Hepatitis C	3/10	182/9770	0.014551	tan
GO:0030674	protein-macromolecule adaptor activity	51/754	360/15934	9.54E-10	turquoise
GO:0060090	molecular adaptor activity	52/754	405/15934	1.26E-08	turquoise
GO:0003712	transcription coregulator activity	36/754	245/15934	2.23E-07	turquoise
GO:0051254	positive regulation of RNA metabolic process	41/710	339/15517	1.01E-05	turquoise
GO:0045893	positive regulation of DNA-templated transcription	36/710	280/15517	1.01E-05	turquoise
GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	14/238	34/15934	6.39E-15	yellow
bta04820	Cytoskeleton in muscle cells	25/155	232/9770	5.1E-12	yellow
GO:0030312	external encapsulating structure	20/195	178/14787	1.9E-11	yellow
GO:0031012	extracellular matrix	20/195	178/14787	1.9E-11	yellow
bta04512	ECM-receptor interaction	16/155	89/9770	5.75E-11	yellow

CONCLUSION

본 연구는 한우 초기 성장 단계에서 간 조직의 유전자 발현 변화를 분석하여, 성장 단계에 따라 면역 방어와 대사 적응에 중요한 역할을 하는 특이적 유전자 모듈을 밝혀냈다. 연구 결과에 따르면, 초기 성장 단계에서는 면역 관련 기능이 활발하며, 성장이 진행됨에 따라 대사 기능이 점차 강화되는 전환 과정을 확인할 수 있었다. 특히, 생후 2개월 시기에 면역 조절과 관련된 모듈, 생후 10일 시기에 세포외기질 형성과 관련된 모듈이 나타나며, 이는 성장 초기 동안 전신 건강을 지원하는 간의 적응적 역할을 시사한다. 본 연구 결과는 한우의 성장과 생산성 최적화를 위한 분자적 마커 발굴과 이를 통한 맞춤형 사육 및 관리 전략 개발에 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

CONFLICT OF INTERESTS

No potential conflict of interest relevant to this article is reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

이 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었습니다.

REFERENCES

- Albenzio, M., A. Santillo, M. Caroprese, M. G. Ciliberti, R. Marino and A. Sevi 2016. Effect of stage of lactation on the immune competence of goat mammary gland. *Journal of dairy science* 99(5): 3889-3895.
- Amaral, P., L. Mariz, D. Zanetti, L. Prados, M. Marcondes, S. Santos, E. Detmann, A. Faciola and S. Valadares Filho 2018. Effect of dietary protein content on performance, feed efficiency and carcass traits of feedlot Nellore and Angus \times Nellore cross cattle at different growth stages. *The Journal of Agricultural Science* 156(1): 110-117.
- Amenta, P. S. and D. Harrison 1997. Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: A review. *Microscopy Research and Technique* 39(4): 372-386.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight and J. T. Eppig 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* 25(1): 25-29.
- Bailey, M., K. Haverson, C. Inman, C. Harris, P. Jones, G. Corfield, B. Miller and C. Stokes 2005. The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proceedings of the Nutrition Society* 64(4): 451-457.
- Bolger, A. M., M. Lohse and B. Usadel 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120.
- Bruns, K. W., R. H. Pritchard and D. L. Boggs 2005. The effect of stage of growth and implant exposure on performance and carcass composition in steers. *Journal of Animal Science* 83(1): 108-116.
- Chavatte-Palmer, P., C. Duvaux-Ponter and F. Clément 2001. Passive transfer of immunity in horses. *Pferdeheilkunde* 17(6): 669-672.
- Chen, Y., F. Meng, B. Wang, L. He, Y. Liu and Z. Liu 2018. Dock2 in the development of inflammation and cancer. *European journal of immunology* 48(6): 915-922.
- Chen, Y., B. Zeng, P. Shi, H. Xiao and S. Chen 2019. Comparative analysis of the Liver and Spleen transcriptomes between Holstein and Yunnan humped cattle. *Animals* 9(8): 527.
- Cho, S., J. Kim, B. Park, P. Seong, G. Kang, J. Kim, S. Jung, S. Im and D. Kim 2010. Assessment of meat quality properties and development of a palatability prediction model for Korean Hanwoo steer beef. *Meat science* 86(1): 236-242.
- Gao, B., W.-I. Jeong and Z. Tian 2007. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47(2): 729-736.
- Hart, S. N., Y. Cui, C. D. Klaassen and X.-B. Zhong 2009. Three Patterns of Cytochrome P450 Gene Expression during Liver Maturation in Mice. *Drug Metabolism and Disposition* 37(1): 116-121.
- Heimes, A., J. Brodhagen, R. Weikard, D. Becker, M. Meyerholz, W. Petzl, H. Zerbe, H.-J. Schuberth, M. Hoedemaker and M. Schmicke 2020. Cows selected for divergent mastitis susceptibility display a differential liver transcriptome profile after experimental *Staphylococcus aureus* mammary gland inoculation. *Journal of dairy science* 103(7): 6364-6373.
- Hulbert, L. E. and S. J. Moisé 2016. Stress, immunity, and the management of calves. *Journal of dairy science* 99(4): 3199-3216.
- Hur, S. J., G. B. Park and S. T. Joo 2008. A comparison of the meat qualities from the Hanwoo (Korean native cattle) and Holstein steer. *Food and Bioprocess Technology* 1: 196-200.
- Huse, S. M., P. A. Gruppuso, K. Boekelheide and J. A. Sanders 2015. Patterns of gene expression and DNA methylation in human fetal and adult liver. *BMC Genomics* 16(1).
- Ihaka, R. and R. Gentleman 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics* 5(3): 299-314.
- Irshad, A., G. Kandeepan, S. Kumar, K. Ashish, M. Vishnuraj and V. Shukla 2013. Factors influencing carcass composition of livestock: A review. *J. Anim. Prod. Adv* 3(1): 1.
- Kanehisa, M. and S. Goto 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28(1): 27-30.
- Kim, D., K. Kim, I. Nam, S. Lee, C. Choi, W. Kim, E. Kwon, K. Lee, M. Lee and Y. Oh 2013. Effect of indigenous herbs on growth, blood metabolites and carcass characteristics in the late fattening period of Hanwoo steers. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 26(11): 1562.
- Kim, D., B. Langmead and S. L. Salzberg 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods* 12(4): 357-360.
- Kubes, P. and C. Jenne 2018. Immune responses in the liver. *Annual review of immunology* 36(1): 247-277.
- Kuivaniemi, H. and G. Tromp 2019. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene* 707: 151-171.
- Kunisaki, Y., Y. Tanaka, T. Sanui, A. Inayoshi, M. Noda, T. Nakayama, M. Harada, M. Taniguchi, T. Sasazuki and Y. Fukui 2006. DOCK2 Is Required in T Cell Precursors for Development of V α 14 NK T Cells. *The Journal of Immunology* 176(8): 4640-4645.

- Langfelder, P. and S. Horvath 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9(1): 559.
- Lessard, M., F. Beaudoin, M. Menard, M. Lachance, J. Laforest and C. Farmer 2012. Impact of a long photoperiod during lactation on immune status of piglets. *Journal of Animal Science* 90(10): 3468-3476.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin and G. P. D. P. Subgroup 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16): 2078-2079.
- Liao, Y., G. K. Smyth and W. Shi 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30(7): 923-930.
- Lim, H., J. S. Ahn, M. J. Kim, G. H. Son, J. K. Park, J. Y. Shim, I. Y. Kim, J. H. Kim, S. M. Cho and E. G. Kwon 2018. Effects of weaning and castration ages on growth performance, blood metabolites, and carcass characteristics in Hanwoo steers. *Journal of Animal Science and Technology* 60: 1-11.
- Liu, R., R. Tearle, W. Y. Low, T. Chen, D. Thomsen, T. P. L. Smith, S. Hiendleder and J. L. Williams 2021. Distinctive gene expression patterns and imprinting signatures revealed in reciprocal crosses between cattle sub-species. *BMC Genomics* 22(1).
- Love, M. I., W. Huber and S. Anders 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15: 1-21.
- Manikandan, P. and S. Nagini 2018. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Current drug targets* 19(1): 38-54.
- Peng, H., E. Wisse and Z. Tian 2016. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cellular & molecular immunology* 13(3): 328-336.
- Reddy, K. E., J. Y. Jeong, S. Y. Ji, Y.-C. Baek, S. Lee, M. Kim, Y. K. Oh and H.-J. Lee 2018. Effects of High Levels of Nutrients on Growth Performance and Carcass Characteristics of Hanwoo Cattle. *Journal of The Korean Society of Grassland and Forage Science* 38(3): 180-189.
- Singh, S., N. Golla, D. Sharma, D. Singh and S. K. Onteru 2019. Buffalo liver transcriptome analysis suggests immune tolerance as its key adaptive mechanism during early postpartum negative energy balance. *Functional & integrative genomics* 19: 759-773.
- Thomas, R. P., M. Guigneaux, T. Wood and B. M. Evers 2002. Age-Associated Changes in Gene Expression Patterns in the Liver. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 6(3): 445-454.
- Wang, X., Y. Wang, X. Li, S. Qin, J. Xu and J. Xie 2022. Exploration of new therapeutic targets for viral hepatic fibrosis, alcoholic hepatic fibrosis, and non-alcoholic hepatic fibrosis. *Annals of Translational Medicine* 10(16).
- Wick, M. J., F. Leithauser and J. Reimann 2002. The hepatic immune system. *Critical Reviews™ in Immunology* 22(1).
- Woo, J. S., N. K. Lee, H. G. Lee and K. K. Park 2024. Effects of heat stress on performance, physiological parameters, and blood profiles of early-fattening Hanwoo steers in climate chambers. *Animal Bioscience* 37(1): 142.
- Yu, G., L.-G. Wang, Y. Han and Q.-Y. He 2012. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics: a journal of integrative biology* 16(5): 284-287.
- Zhang, W., S. Xia, J. Zhu, L. Miao, M. Ren, Y. Lin, X. Ge and S. Sun 2019. Growth performance, physiological response and histology changes of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* exposed to chronic ammonia. *Aquaculture* 506: 424-436.
- Zhang, X., X. Liu, F. Li and X. Yue 2020. The differential composition of whey proteomes in Hu sheep colostrum and milk during different lactation periods. *Animals* 10(10): 1784.

AUTHORS INFORMATION

Taejoon Jeong: <https://orcid.org/0000-0002-7427-7681>