

닭의 사육 환경 및 사양 조건에 따른 유용 유전자
발현 양상 구명과 산업적 실용화 연구

**Investigation and application of the genes related to
environment and feeding regimen in chickens**

진주산업대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “닭의 사육 환경 및 사양 조건에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 산업적 실용화 연구” 과제(1세부과제 “닭의 사육 환경 및 사양 조건에 따른 성장·발달 관련 유용 유전자 발현 구명과 실용화 연구”, 2세부과제 “닭의 사육 환경 및 사양 조건에 따른 면역 관련 유용 유전자 발현 구명과 실용화 연구”, 3세부과제 “닭의 사육 환경 및 사양 조건에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 구명과 실용화 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2009년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 진주산업대학교

주관연구책임자 : 손시환

세부연구책임자 : 장인석

세부연구책임자 : 문양수

연구원 : 이상호

연구원 : 박철

연구원 : 이민희

연구원 : 박경자

연구원 : Jagdish Beloor

연구원 : 고영현

연구원 : 강선영

연구원 : Vinod Subramani

연구원 : 이수희

연구원 : 최나은

요 약 문

I. 제 목

닭의 사육 환경 및 사양 조건에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 산업적 실용화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

닭의 급이 방법, 사육 밀도 및 생리활성 물질 첨가 급여에 따른 성장·발달, 면역 및 노화 관련 유용 유전자들의 발현 조절 양상 구명과 발현 유전자 표지를 이용한 육계 및 산란계의 적정 사양 조건을 제시하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 육계의 급이 방법에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴
 - 1) 7일령 브로일러를 대상으로 에너지제한 (85%, 70%) 및 섭취량 제한(85%, 70%) 급여를 1주일간 실시하고, 제한 급이 이후 시험 종료까지는 자유 급이
 - 2) 급여 처리간 생산능력 비교 분석; 체중 등
 - 3) 지방 및 근육발달 관련 유전자 클로닝; PPAR γ , FAS, MyoD 등
 - 4) 지방합성 및 근육발달 관련유전자 발현 비교 분석; MyoD, Myf5, Myogenin, PPAR- γ , FAS 등
 - 5) 혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석; AST 등
 - 6) 면역 유전자의 발현 양상 분석; iNOS, IL-4, IL-6, IFN-gamma 등
 - 7) 연령에 따른 노화 지표 변화 양상 분석; telomere 및 telomerase
 - 8) 노화 유전자 발현 양상 분석; 조직별 telomere 함량 분석
2. 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴
 - 1) 실용브로일러 수컷을 5처리 8반복, 반복당 4수씩을 4일령에 완전임의배치하고, 생리활성물질 첨가 사료로서 가시오갈피와 두충을 0%(대조구) 0.5%, 1% 수준으로 각각 첨가하여 35일령까지 자유급여 실시
 - 2) 급여 처리간 생산능력 비교 분석; 체중 등
 - 3) 육계에서 가시오갈피 및 두충 첨가가 지방 및 근육관련 유전자 발현에 미치는 영향; MyoD, Myf5, Myogenin, PPAR- γ , FAS 등
 - 4) 육계에서 가시오가피 및 두충 첨가가 항산화효소 유전자의 발현에 미치는 영향; GST, CAT, SOD 등
 - 5) 혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석; AST 등

6) 면역 유전자의 발현 양상 분석; iNOS, IL, IFN, TNF-beta 등

7) 급여 처리간 노화 유전자 발현 양상 비교 분석; telomere

3. 육계의 사육밀도에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

1) 실용브로일러 수컷을 대상으로 2일간의 적응 기간을 거친 후 4일령 병아리를 완전임의배치법에 의해 고밀도(HD;575sq.cm/bird), 표준(SD;770sq.cm/bird) 및 저밀도(LD;1150sq.cm/bird)로 나누어 처리당 8반복으로 구분하여 사육 실시

2) 사육 밀도간 생산능력 비교 분석; 체중 등

3) 육계의 사육밀도에 따른 지방 및 근육관련 유전자 발현양상 비교; MyoD, Myf5, Myogenin, PPAR- γ , FAS 등

4) 스트레스관련 유전자 발현 양상비교; HSP, HMGCR 등

5) 혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석; AST 등

6) 면역 유전자의 발현 양상 분석; iNOS, IL, IFN, TNF-beta 등

7) 사육 밀도간 노화 유전자 발현양상 비교 분석; telomere

4. 산란계에서 천연 항산화 사료첨가제 개발

1) 실용 산란계 360수를 대상으로 5처리 12반복, 반복당 6수씩을 20주령부터 30주령까지 가시오갈피와 두충을 0%(대조구) 0.5%, 1% 수준으로 각각 첨가 급여 실시.

2) 급여 처리간 난질 비교 분석

3) 산란계에서 가시오갈피 및 두충 첨가가 항산화효소 발현에 미치는 영향; GST, SOD 등

4) 혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석; AST 등

5) 급여 처리간 생리활성 및 노화 유전자의 발현 양상 비교 분석; telomere 함량 분석

IV. 연구개발결과

1. 육계의 급여 방법에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

1) 육계의 급여 방법에 따른 지방 및 근육발달 관련 유용 유전자 발현 양상 구명

육계 7일령부터 1주일간의 제한사양은 지방 합성 효소 유전자인 FAS와 malic enzyme을 비롯한 SREBP, PPAR- γ 및 C/EBP- α 등의 mRNA에도 영향을 미쳐 대조구에 비하여 낮은 발현을 나타내었으며, 근육 세포 증식에 관여하는 Myo-D와 Myf-5 유전자의 발현도 감소시켰고, 근육분화에 관여하는 Myogenin 유전자의 발현도 대조구에 비하여 낮게 발현되었다. 그러나 제한사양 후 3주간의 자유급이는 FAS와 malic enzyme의 유전자 발현에 영향을 미치지 않았으며, 에너지제한 85% 처리구를 제외하고는 Myf-5 및 Myo-D, Myogenin의 발현도 처리구간의 차이가 없었다. 이상의 시험 결과를 종합해보면 에너지제한 85% 수준이 가장 좋은 보상성장을 나타내었으며 제한사양 기간에도 근육발달 관련 유전자의 발현이 대조구와 유사하게 발현되었다. 그러나 에너지제한 70%의 경우 보상성장이 시장 출하시 까지 도달되지 못하였으며 지방합성 효소 유전자인 FAS의 발현도 낮게 나타남에 따라 에너지제한 70%수준은 피해야 될 것으로 사료된다.

2) 육계의 급이 방법에 따른 성장 및 면역 관련 유전자 발현 양상 구명

혈액의 백혈구 조성 중 호중구, 림프구, 단핵구, 호염기구 등의 상대적 %는 에너지 및 사료 섭취량의 제한급이가 어떠한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고, 면역에 있어 IFN-gamma 유전자는 사료량 제한에 따라 감소하는 경향을 나타내고 있으나 IL-4 및 IL-6 유전자는 제한 급이에 따른 일정한 경향을 나타내지 않았다. 육계성장 초기 1주일간의 양적 및 질적 제한은 오히려 IL-4 및 iNOS와 같은 사이토카인의 발현에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보이고 초기 1주일 동안 70% 제한급이 한 후 자유급이 하였을 경우에도 육계의 보상성장에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 육계성장에서 완전 자유급이 방법에 의한 과도한 영양소 급여가 항상 동물복지 및 면역작용에 긍정적인 영향을 미친다고 생각되지 않고, 사료 급이량의 약 85% 수준의 적절한 사료섭취량 및 에너지 제한 급이는 오히려 육계의 생산성에 부정적인 영향을 미치지 않고 면역력 증강을 나타낼 수 있다고 사료된다.

3) 육계의 급이 방법에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 양상 구명

실용 브로일러를 대상으로 급이 에너지 제한 및 급이량의 제한이 세포의 생리적 활성도에 미치는 영향을 살펴보고자 개체의 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 세포들의 텔로미어 함량 및 텔로머레이스 활성도를 분석하였다. 텔로머레이스 활성도의 분석 결과 14일령과 35일령 공히 급여 처리간 활성도의 차이는 보이지 않았으며 증식성 세포인 정소 세포에서만 positive activity를 나타내었다. Q-FISH 방법에 의한 처리별 각 조직 세포들의 텔로미어의 함량 분석은 14일령과 35일령 모든 조직의 세포에서 공히 일령이 증가함에 따라 현저한 텔로미어 함유율의 감소를 나타내고 있어 telomere가 age-dependent 한 노화 관련 bio-marker임을 재차 확인하였다. 급여 제한 직후 백혈구, 폐 및 정소 세포의 경우 텔로미어 함유율이 대조구에 비해 낮게 나타났으나 35일령에서는 처리간 차이가 상쇄되고 오히려 제한구의 경우 대조구에 비해 높은 함유율을 보여 세포 활성도의 높은 보상 효과를 나타내었다.

2. 생리활성물질 첨가 급여에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

1) 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 지방 및 근육발달 관련 유용 유전자 발현 양상 구명

가시오갈피 및 두충과 같은 천연 생리활성 사료첨가제를 급여하여 지방, 근육, 항산화효소 등과 관련된 유전자의 발현을 분석하여 생리활성물질이 미치는 영향을 살펴보았다. 천연물 첨가에 따른 생산 능력에는 큰 영향을 미치지 않았다. 지방합성 관련 유전자 FAS는 처리간에 차이가 없었으나 전사인자인 PPAR γ 의 유전자 발현은 두충 처리구에서 높은 발현을 보였으나 대조구와 가시오갈피와는 차이가 없었다. 근육 관련 유전자 MyoD와 Myogenin의 발현을 분석한 결과 Myogenin은 모든 처리구에서 대조구에 비해 높은 발현율을 보였으며 MyoD 또한 대조구에 비해 높은 발현율을 보였으나 가시오갈피에 비하여 두충이 이 유전자의 발현을 더 유도하는 것으로 나타났다. 항산화 효소 유전자(GST, CAT, SOD, GPX)의 발현을 측정된 결과 대체적으로 대조구와 큰 차이가 없었으나 두충의 1% 사료내 첨가는 항산화 효소 중 SOD와 GPX의 활성을 증진시켰다. 이상의 결과로부터 육계에 가시오갈피와 두충의 급여는 생산능력에 나쁜 영향을 미치지 않고 근육성장에 긍정적으로 작용하며 산화적 스트레스를 감소(SOD, GPX)시키는 것으로 사료된다.

2) 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 성장 및 면역 관련 유전자 발현 양상 구명

혈액 생화학성분으로서 albumin, AST, ALT, total protein 등은 대조구 및 처리구간 비슷한 수치를 보였으나 triglycerides, cholesterol 및 glucose는 대조구에 비해 처리구가 유의적으로 높게 나타나 에너지 대사에 관련된 혈중 성분이 증가된 것으로 보인다. 한편 천연물 급여에 따른 간 기능 수치 등에서는 모든 구에서 유사한 결과를 나타내고 있어 0.5% 수준의 가시오갈피 및 두충 급여는 육계의 생리적 대사작용에 부정적인 영향이 없는 것으로 나타났다. 혈중 면역 사이토카인의 발현은 천연물 첨가에 따라 유의적 차이가 없었으나 흉선(thymus)에서는 iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-10 및 IL-4가 천연물 첨가 급여구에서 유의적으로 증가되는 것으로 나타났다. 간 조직에서는 TNF- α , iNOS, IL-6, IL-10 등과 같은 친염증 사이토카인의 발현이 두충 급여구에서 유의적으로 감소하여 면역작용에 긍정적인 효과를 보였다. 이러한 결과로 보아 천연생리활성 물질인 가시오갈피 및 두충급여는 가금에서 면역작용에 중요한 역할을 수행하는 흉선 및 간 조직에서 일부 사이토카인의 발현에 영향을 미쳐 긍정적인 효과가 기대되며 증체 및 경제성 등을 고려할 경우 가시오갈피 및 두충 0.5% 급여가 가장 바람직한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다.

3) 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 양상 구명

생리활성물질 첨가 급여가 육계의 생리적 활성도에 미치는 영향을 살펴보고자 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 세포들에 대한 텔로미어 함량을 분석하였다. 35일령 시험 종료시 혈액을 제외한 처리구 별 개체의 간, 폐, 심장, 정소 세포들의 텔로미어 함유율은 생리활성 물질 급여에 따른 차이가 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 면역 관련 혈중 백혈구 세포내 텔로미어 함유율은 가시오갈피 및 두충의 첨가 급여가 급여치 않은 개체들에 비해 현저히 높은 텔로미어 함유율을 보이고, 특히 가시오갈피 첨가가 두충에 비해 더욱 효과적임을 나타낸다. 이상의 결과로서 본 시험에 이용된 첨가 물질들이 개체의 항산화와 관련하여 매우 긍정적 효과를 보임에 따라 육계의 생리활성에 유의한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

4) 산란계에서 천연 항산화 사료첨가제 개발

실용 산란계를 대상으로 항산화 사료첨가제로서 가시오갈피 및 두충을 20주령부터 30주령까지 첨가 급여하고 30주령말 개체의 생산 능력 및 생리적 지표를 분석 하였다. 가시오갈피 및 두충 급여가 산란계의 소장 및 간장 조직에서 SOD 특이적 활성도는 큰 변화가 없는 것으로 나타났으나, GST 효소 활성도가 증가됨으로 체내 항산화 방어기능에 비교적 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 한편 생리활성물질의 첨가 급여가 계란의 난질에 미치는 영향을 살펴본 바 난중, 난백고, 호우유니트 등이 급여 처리구가 무처리구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다. 또한 백혈구 내 텔로미어의 함유율에서 모든 급여 처리구가 무첨가구에 비해 현저히 높은 결과를 보이는데 이는 생리활성 물질의 급여가 개체의 생리 활성도 및 기능을 향상 시킨다는 것을 뒷받침하는 증거라 사료된다. 이상의 결과로 부터 산란계에 있어 소량의 가시오갈피와 두충의 첨가는 체내에 미치는 독성이 없이 개체의 기능성 증가와 더불어 난 형성에 매우 긍정적 영향을 미침으로 향후 기능성 사료 첨가제로 개발 가능성이 매우 높은 천연 소재 물질로 사료된다.

3. 육계의 사육밀도에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

1) 육계의 사육밀도에 따른 지방 및 근육발달 관련 유용 유전자 발현 양상 구명

사육밀도에 따른 육계의 지방 및 근육발달 유용 유전자 및 스트레스 관련 유용유전자의 발현양상을 분석하였다. FAS(fatty acid synthase)와 PPAR γ 의 mRNA 발현은 사육밀도에 영향 받지 않는 것으로 나타났으며, 스트레스관련 유전자인 HSP 70과 HMGCR의 발현은 고밀도 처리구에서 저밀도와 표준 밀도에 비해 약 2배 높은 발현양상을 보였다. 그러나 HSP 25와 HSP 90에서는 처리간 차이를 나타내지 않았다. 또한 세포의 사멸과의 연관성을 분석하기 위해 Bcl-x와 Bcl-2를 분석한 결과 처리에 따른 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과로부터 HSP70과 HMGCR를 혈액에서 분석하여 스트레스 관련 biomarker로서 활용할 수 있음을 시사한다.

2) 육계의 사육밀도에 따른 성장 및 면역 관련 유전자 발현 양상 구명

사육밀도에 따른 육계의 생산 능력에서 체중 및 사료요구율은 처리구 간 유의적 차이가 없었고 다만 사료 섭취량에서 저밀도구가 증가되는 것으로 나타났다. 사육밀도에 따른 각종 장기 무게의 변화를 조사한 바 간, 비장 및 흉선의 무게는 모든 구에서 유사한 결과를 나타내어 사육밀도가 면역에 관련된 장기들의 무게에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 대부분의 생화학 성분도 사육밀도에 영향이 없는 것으로 나타났다. 사육밀도에 따른 혈액, F-낭, 비장 및 간 조직에서 iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6 및 TNF- α 등의 사이토카인 유전자의 발현량을 분석한 바 처리구간 유의적 차이가 없었으나 IL-10 유전자는 고밀도사육군(HSD)에서 현저하게 감소되었다. 그러나 흉선에서 사이토카인 유전자의 발현 양상을 조사한 바 TNF- α , iNOS, IL-6, IFN- γ , IL-1 β 와 같은 친염증 유전자의 발현이 고밀도군에서 유의적으로 증가되고, 항염증 유전자인 IL-4는 저밀도군에서 유의적으로 감소되었다. 이는 가금의 면역작용에 중요한 역할을 수행하는 흉선에서 친염증 사이토카인 발현을 증가시키므로 고밀도에 따른 면역력 저하가 발생할 수 있음을 시사한다.

3) 육계의 사육밀도에 따른 노화 관련 유전자 발현 양상 구명

육계의 사육 밀도가 생리적 활성도에 미치는 영향을 살펴보고자 35일령 개체들의 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 세포들에 대한 텔로미어 함량을 분석 한 바 Q-FISH 결과 혈액을 제외한 사육 밀도 별 각 조직들의 텔로미어 함유율의 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 스트레스 및 면역과 직접적 관련이 있는 백혈구 세포내 텔로미어 함유율은 저밀도구와 고밀도구간에 유의적이 차이를 보이며, 저밀도구의 개체들이 월등히 높은 텔로미어 함유율을 나타내었다. 이는 사육 환경 조건 중 사육 밀도가 개체의 스트레스 요인 중 하나임을 입증하는 것으로 노화 및 생리 표지인 텔로미어 함유율이 스트레스 표지로서의 가능성을 시사한다 하겠다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

가. 기술적 측면

- 1) 육계에서 제한 사양 및 사육밀도와 관련 동물의 반응을 조절하는 유전자 발현 분석을 통한 분자생물학적 기초자료 제시

- 2) 육계의 환경스트레스와 유전자 발현양상의 상호관계를 규명하여 관련 유전자를 bio-marker 로 제시
- 3) 사료 급이 방식과 사육밀도와 관련하여 스트레스 예측 유전자 발굴
- 4) 육계의 면역 및 생리활성 정도와 관련한 천연 항산화 소재 발굴
- 5) 산란계의 생산성 및 생리활성 정도와 관련한 천연 항산화 소재 발굴

나. 경제, 산업적 측면

- 1) 환경스트레스에 의한 동물 반응을 조절하는 유전자들을 분석함으로써 육계의 제한사양의 적정범위 등 생산성 및 복지를 고려한 사육 환경 제안
- 2) 천연항산화제의 사료첨가와 항산화효소의 활성화 유도에 의한 육계의 생산성 증대
- 3) 천연 사료 첨가제 발굴로서 산란계의 난질 개선
- 4) 적정 사육밀도의 분자생물학적 지표 개발로 복지개념의 사육환경 개선
- 5) 친 환경 및 면역 증강 육계 생산 지표의 제시로서 건강 계육 생산 및 소비자 기대 부응

다. 학술적 측면

- 1) 논문게재 5편 (SCI 1편, 학진등재 4편)
- 2) 학술발표 19편 (국제 3편, 국내 16편)
- 3) 산업재산권 4건 (특허 2건, 상표 출원 2건)

2. 성과 활용 계획

가. 학술적 측면

- 1) 제한사양과 보상성장에 따른 근육발달과 지방합성관련 유전자, 성장과 면역 관련 유전자 및 노화 관련 유전자들의 발현 양상 분석은 가금에서의 생리 반응을 조절하는 유전자들의 작용 기전을 밝히는데 기초 자료를 제공 할 것이다.
- 2) 육계에서 천연항산화제 처리에 대한 생리적 효과를 분자생물학적으로 분석하여 그 기작에 대한 기초 자료를 제공할 것이다.
- 3) 육계의 사육밀도와 연관된 스트레스관련 인자인 HSP와 HMGCGR 유전자 및 telomere 유전자의 관련 여부에 대한 분자생물학적 작용기작을 밝히는데 활용할 것이다.
- 4) 천연식물성 사료첨가제는 체내 항상성 유지 및 생리활성 증진에 효과가 입증됨에 따라 이에 대한 기전 연구 및 대사성 질환 예방을 위한 사양방법 연구에 적극 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 산업적 측면

- 1) 닭의 생리적 활성도 및 생산성을 고려한 제한 사양 및 사육 밀도에 대한 근거 제시로 농가 활용 가능성 제시
- 2) 육계에서 두충 및 가시오갈피의 첨가가 산화적 스트레스 관련 효소(SOD, superoxide dismutase; GPX, glutathione peroxidase)의 활성과 연관이 있는 것으로 나타남에 따라 천연항산화제로의 개발 가능성 제시
- 3) 산란계에서 두충 및 가시오갈피의 첨가가 생리활성 뿐만 아니라 난질 향상에 효과를 보임으로 산업적 이용 가능성 제시

- 4) 육계의 사육 밀도가 스트레스 관련 HSP계 유전자(HSP70, HMGCR) 및 telomere 유전자 발현에 영향을 미침에 따라 이들 유전자들을 가금의 사육밀도 관련 스트레스 측정 지표로 개발 활용 기대
- 5) 기존 사육방식인 에너지 과잉 급이 및 밀사 등의 체계가 과학적으로 바람직하지 않음을 입증함에 따라 동물복지를 고려한 사육체계의 전환 제시
- 6) 천연식물성 사료첨가제가 육계 산업현장에서 문제시되는 급성 폐사병 및 복수증을 예방할 수 있는 신 소재로서의 활용 가능성 제시

SUMMARY

I. Title

Investigation and application of the genes related to environment and feeding regimen in chickens

II. Research Objective

The experiments were performed to investigate the effect of feed restriction, antioxidants and stocking density on growth performance, immune related genes, myogenic genes, adipogenic genes and telomere length in broilers and/ laying hens.

III. Content of Experiments

1. Effect of feed and energy restriction.

1) Broiler chickens were subjected to feed restriction (FR) and energy restriction(ER) (75% and 85%). Both FR and ER treatments were given to 7days old chicks upto d14 and there after until d35 free feeding was allowed.

2) Analysis of growth performance in broilers of different treatments.

3) Cloning of adipogenic (PPAR gamma and FAS) and myogenic (myoD, myf5 and myogenin) genes.

4) Analysis of myogenic and adipogenic gene expression levels in different treatments.

5) Analysis of biochemical characteristics of blood plasma and liver; AST et al.

6) Analysis of immune related (iNOS, IL-4, IL-6 and IFN gamma) gene expression levels.

7) Analysis of telomere length in different tissues.

2. Effect of natural antioxidants (*Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae*)

1) Birds were subjected to 5 dietary treatments; Control (CON), Siberian ginseng 0.5% (T1), 1% (T2), Eucommiaceae 0.5% (T3), 1% (T4). Each treatment was replicated 8 times with 4 birds per replication. Feed trial was conducted from d4 to d35 of age.

2) Analysis of growth performance in broilers of different treatments.

3) Analysis of myogenic and adipogenic gene expression levels in different treatments.

4) Analysis of biochemical characteristics of blood plasma and liver.

5) Analysis of immune related (iNOS, IL-4, IL-6 and IFN gamma, TNF-beta) gene expression levels.

6) Analysis of antioxidant (GST, CAT and SOD) gene expression levels.

7) Analysis of telomere length in different tissues.

3. Effect of stocking density

- 1) Seven days old Ross broiler chicks were housed at High (575sq.cm/bird), Standard (770sq.cm/bird) and Low (1150sq.cm/bird) densities with 8 replicates. The experiment was carried out from d7 to d35 of the age.
- 2) Analysis of growth performance in broilers of different treatments.
- 3) Analysis of myogenic and adipogenic gene expression levels in different treatments.
- 4) Stress related HSP (HSP70, 90, 25) and HMGCR gene expression levels were analyzed.
- 5) Analysis of biochemical characteristics of blood plasma and liver.
- 6) Analysis of immune related (iNOS, IL-4, IL-6 and IFN gamma, TNF-beta) gene expression levels.
- 7) Analysis of telomere length in different tissues.

4. Effect of antioxidants on laying hens

- 1) Total of 360 laying birds of age 20 weeks were subjected to 5 treatments, Control (CON), Siberian ginseng 0.5% (T1), 1% (T2), Eucommiaceae 0.5% (T3), 1% (T4). Each treatment was replicated 12 times with 6 birds/cage.
- 2) The egg quality was analyzed.
- 3) Analysis of myogenic and adipogenic gene expression levels in different treatments.
- 4) Analysis of biochemical characteristics of blood plasma and liver.
- 5) Analysis of antioxidant (GST, CAT and SOD) gene expression levels.
- 6) Analysis of telomere length in different tissues.

IV. Results

1. Effect of feed and energy restriction.

- 1) Effect of Feed restriction and Energy restriction on adipogenic and myogenic gene expression levels.

The expression of adipogenic genes like malic enzyme, FAS, SREBP1c, PPAR gamma, and C/EBP alpha were down regulated by restricted feed regimen. Muscle related genes like MyoD, Myf5, and Myogenin were also down regulated at the end of d14, but the analysis at the end of the experiment at d35 the expression levels of malic enzyme and FAS did not show any difference when compared to the control group. Except ER85 (Energy restriction 85%), the expression levels of MyoD and Myf5 in all treatment group was decreased by restriction regimen compared to control group. The expression levels of Myogenin were down regulated by restriction regimen in all treatment groups. Myf5 gene from ER85 was highly expressed at d35 of age, but it was not different among other treatments. The RNA expression levels of MyoD and Myogenin were not different among treatment groups after realimentation at d35 of age in broilers. These results suggest that ER85 group shows the best growth performance by realimentation and the genes of muscle are also expressed as much as that of control group even during the restriction period. However, the ER70 group could not catch up the body weight with the control group and the FAS expression is

still low at the end of d35 of age. ER70 is severe to normal growth of broilers and its better to avoid the restriction regimen in broiler chickens.

2) Effect of Feed restriction and Energy restriction on immune related gene expression levels.

There was no statistical difference in weight gain, feed intake and feed conversion ration between the CON and quantitative or qualitative FR groups during the entire period. In cytokines, there was no significant difference in the expression of lymphocytic IL-4 and IFN-gamma at 14d of age between the FR and the CON groups, whereas lymphocytic IL-6 and iNOS expression were significantly lower in FI85 and FI70 groups. In conclusion, 85% of quantitative or qualitative FR would have beneficial effect on the expression of some cytokine without change in growth performance of birds.

3) Feed restriction and telomere

In here, we studied the effect of feed restriction on telomere amount and telomerase activity. Telomere amount is an age dependent biomarker as it is known to reduce with age. We investigated blood, liver, lung, heart, testes tissues in this study which involved three sampling at the end of 7 days, 14 days and 35 days respectively. In results, we found out that telomere amount decreased with age and hence proves its role as a age dependent biomarker. At the of 14 days, we found that the amount of telomere was decreased compared to controls however, at the end of the study after 35 days we found that telomere quantity was more than that of the control. The explanation for this change is probably because of the compensation effect on the study birds due to feed restriction. The difference in telomere amount was significant in case of blood lymphocytes, lung and testes tissues. The telomerase activity however, remained unchanged at end of 14 and 35 days. It showed positive activity only in case of testes tissue which is the gonadal tissue and hence needs telomerase activity for the normal telomere maintenance needed for the gametes.

2. Effect of natural antioxidants (*Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae*)

1) Effect of dietary supplementation of siberian ginseng and *Eucommiaceae* on the expression of lipogenic, myogenic, and antioxidant enzyme genes in broiler chickens.

Birds subjected to 1% *A. senticosus* had higher feed conversion ration than the other treated birds where as no significant difference were found in body weight, weight gain and feed intake. The expression levels of FAS were not different among the treated groups while the transcription factors PPAR gamma was highly expressed in *Eucommiaceae* but not in control and *A. senticosus*. The gene expression of Myogenin was high in both the treatments compared to control. MyoD also showed high expression in treated groups furthermore, *Eucommiaceae* could stimulate the expression of MyoD more than *A. senticosus*. The antioxidant gene expression (SOD, CAT GPX) generally were not much different among the treatments, however GPX and SOD were stimulated in broilers consumed 1% *Eucommiaceae* diet. The result of this experiment showed that the dietary supplementation of *A. senticosus* and *Eucommiaceae* in broiler may improve the antioxidant defence system through SOD and GPX without affecting the growth performance.

2) Effect of dietary supplementation of natural bioactive substances on growth performance, expression of genes associated with immune system in broiler chickens.

The blood biochemical profiles like albumin, AST, ALT and total protein were not different among treated groups, however the triglycerides (TG), cholesterol and glucose in treated groups significantly ($P<0.05$) increased compared to that of control group. The expression levels of cytokines (IFN gamma, IL-1beta, IL-10 and IL-4) of blood were not different among the treated groups, however the expression levels in thymus were significantly ($P<0.05$) higher in treated group compared to the control. The expression levels of TNF alpha, iNOS, IL-6 and IL-10 in liver were significantly lower in eucomiaceae supplemented birds.

3) Antioxidant and telomere

In this study we sought out to investigate the effects of antioxidant feed on broiler chicken telomere length in blood lymphocyte, liver, lung, heart and testes tissues. Since, telomere amount is an indication of the biological well being of a cell of an organism. The birds were fed with two diets consisting of *Euchomia* and *Acanthopanax senticosum*. In results, we found out that antioxidant fed chicken showed higher telomere amounts than the control ones especially in blood and specifically *Acanthopanax senticosum* feed effect was much more effective than the *Euchomia* fed birds. The telomere amount also reflects the immune state of the birds since it is involved in the well being of lymphocytes which are key players in immune function. Other tissues such as liver, lung, heart and testes showed little effect with respect to change in telomere amounts when compared to blood lymphocytes.

4) Effect of antioxidants in laying hens

All the birds were subjected to 5 different treatments from the age 20 weeks to 30 weeks. Growth performance and physiological markers were analyzed. The expression levels of SOD showed no difference in intestine and liver tissues, but GST had an increased expression levels. Thus these antioxidants have immuno protective effect. Apart from this the quality of the egg in the treatment group was better than the control. As these natural antioxidants do have side effect so can be used as a feed supplement.

3. Effect of stocking density

1) Effect of stocking density on adipogenic, myogenic and stress gene expression levels.

We investigated the effect of stocking density on adipogenic (PPARgamma, Fattyacidsynthase), myogenic (Myogenin, Myo-D, Myf5), stress related heat shock protein genes (HSP25, HSP70 and HSP90), 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) and apoptosis related (Bcl-X and Bcl-2) genes in broiler chickens. Except the feed intake ($P<0.05$), the other growth performances like feed conversion ratio, body weight gain, feed efficiency ratio showed no difference among the treated groups. HSP90, HSP25, PPAR gamma, FAS, Myogenin, Myo-D, Myf5, Bcl-x, and Bcl-2 did not show any significant changes in the expression among the treated groups. While HSP70 and HMGCR gene expression levels showed the increasing trend with the increase in stocking density. Though the expression levels were not significantly different among the low and standard group but were found to be significantly ($p<0.05$) high in high density stocked group. This clearly indicates that birds stocked at high density were experiencing stress when analyzed at transcription level.

2) Effect of stocking density on growth performance, expression of genes associated with immune system in broiler chickens.

Stocking density showed no significant effect on body weight and feed conversion ratio among the different treatments. However, feed intake was significantly ($P < 0.05$) high in the low density treatment. The weights of liver, spleen and thymus were not different among the treatments. The expression levels of cytokines, iNOS, IFN gamma, IL-1, IL-4, IL-6 and TNF alpha were not different among the treatment, but the expression levels of IL-10 was significantly ($P < 0.05$) enhanced in high density treatment when blood, bursa, spleen and liver were analyzed. However the cytokines, iNOS, IFN gamma, IL-1, IL-4, IL-6 and TNF alpha were significantly enhanced in thymus for high density treatment. The expression of IL-4 decreased in low density treatment. In conclusion, high density has very little effect on the immune function.

3) Stocking density and telomere

In this study, we investigated the effect of stocking density on telomere amount in blood, liver, lung, heart and testes tissues. We hypothesized that increased stocking density in broiler chickens causes increase in stress in the birds and hence would affect the amount of telomere amount in these birds. Using the interphase Q-FISH technique we analyzed the telomeric amount and In results, we found out that with increase in stocking density the amount of telomere decreases in blood lymphocytes however, we did not find much change in the other tissues

V. Achievements and Further Plans

1. Research achievements

1) Technical aspect

- ① Provides a basic data regarding the gene expression levels of various genes in feed restricted broilers and broiler chickens stocked at different densities.
- ② Search the relationship between stress and gene expression and put out related bio-marker in broilers.
- ③ Finding prediction stress gene related dietary feeding and foster density method
- ④ Development of natural antioxidant materials related to immune and bioactive characteristics
- ⑤ Development of natural antioxidant materials related to production yield and bioactive level in broiler.

2) Economic and industrial aspect

- ① With the analysis of regulated gene expression about environmental stress, appropriate restricted feeding boundary containing production yield and welfare of fostering animals
- ② Increasing the production yield of broilers induced by activating antioxidant enzyme and feeding antioxidant materials
- ③ Improvement of egg quality caused by feeding developed antioxidant materials
- ④ Concepts of welfare in animal, helping for reformation of feeding environment in broiler caused by development of bio-marker adjusted by stock density
- ⑤ Help for animal product firm and consumer by the environment-friendly and immune-buster

outcome

3) Academic aspect

- ① Published papers: 5 papers (SCI 1)
- ② Proceeding results: 19 (international 3, domestics 16)
- ③ Industrial property 4 (Patent 2, trademark application 2)

2. Further plans

1) Academic aspect

- ① Analysis of gene expression on (a) muscle development by the method of restrict feeding and compensation feeding, (b) fat synthesis, (c) growth, (d) immune and (e) aging will provide basic theory related gene mechanism, involving bio-active response, in chicken
- ② Provide basic data of the mechanism about effect of antioxidant materials on physiological aspect in chicken.
- ③ Study of the relationship between restrict density and stress related gene HSP, HMGCR, telomere will helpful for knowing the biochemical mechanism in broiler.
- ④ According to the result of confirmation that natural plant additives are affect on maintaining [homeostasis](#) and improving physical aspect in body, this study seem to help develop feeding technique and protect mechanical disease in animal

2) Economic and industrial aspect

- ① Improve the broiler raising system based on restriction feeding and stocking density
- ② Development of natural antioxidants as dietary supplementation to chicken; Siberian ginseng and Eucommiaceae in layer and broiler.
- ③ Siberian ginseng and Eucommiaceae have physiological active components which help in improving the egg quality and thus this can be used in poultry industry for improving the egg quality
- ④ As stocking density has effect on gene expression levels of HSP70 and HMGCR and telomere length these parameters can be used as a biomarker to analyze the stocking density stress.
- ⑤ Generally high stocking density and high energy feeding is followed in the poultry industry so this might be a point of concern for chicken welfare.
- ⑥ Natural antioxidants prevent broiler disease, so the feed containing natural antioxidants may be very helpful.

CONTENTS

CH 1. Introduction	19
1. Aims	19
2. Significances	19
3. Contents and scope	20
CH 2. Status of research and development	23
CH 3. Results	25
1. Effect of feed and energy restriction on gene expression	25
2. Effect of natural antioxidants on gene expression	52
3. Effect of stocking density on gene expression	76
CH 4. Achievements and contribution	95
1. Achievements	95
2. Research contribution	98
CH 5. Research products and further plans	99
1. Research products	99
2. Further plans	103
CH 6. New technical and scientific information	105
CH 7. References	107

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	19
1.	연구개발의 목적	19
2.	연구개발의 필요성	19
3.	연구개발의 내용 및 범위	20
제 2 장	국내외 기술개발 현황	23
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	25
1.	육계의 급이 방법에 따른 유용유전자 발현양상 구명과 실용표지유전자 발굴	25
2.	생리활성 물질 첨가 급여에 따른 유용유전자 발현양상 구명과 실용 표지유전자 발굴	52
3.	육계의 사육 밀도에 따른 유용유전자 발현양상 구명과 실용 표지유전자 발굴	76
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	95
1.	목표달성도	95
2.	관련분야 기여도	98
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	99
1.	연구개발 성과	99
2.	성과활용 계획	103
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	105
제 7 장	참고문헌	107

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적

닭의 급이 방법, 사육 밀도 및 생리활성 물질 첨가 급여에 따른 성장·발달, 면역 및 노화 관련 유용 유전자들의 발현 조절 양상 구명과 발현 유전자 표지를 이용한 육계 및 산란계의 적정 사양 조건을 제시하고 자 한다.

2절 연구개발 필요성

최근 농업부분에서 축산업이 차지하는 조수입이 농업 생산성의 33% 차지하고 있으며, 앞으로 경제수준이 향상됨에 따라 축산업의 비중은 날로 증가하는 것이 지금의 현실이다. 오늘날 식문화의 서구화 인하여 가금 산업은 우수한 동물성 단백질을 급여할 수 있는 장점과 더불어 급속한 외식산업의 발달로 양적으로 매우 팽창되어 있다. 이러한 사회적 관점과 더불어 실제 육류 단백질 공급원으로 근육내 지방의 축적이 상대적으로 적은 가금의 소비는 앞으로도 지속적으로 증가 될 전망이다. 그러나 소비자들이 과도한 지방 섭취와 심장 및 뇌혈관계 질환 등의 빈발로 저지방의 닭고기를 선호하는 경향에 따라 선진국에서는 가금생산물에서 친환경적이고 건강지향적인 (식품안전성, 무항생제, 저지방, 동물복지) 사육방법에 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 최근 유럽연합(EU) 등과 같은 나라들과 FTA 체결 등과 같은 국제 무역환경이 급변하여 우리나라 가금 산업의 가치관에 상당한 변화를 요구하고 있는 것이 지금의 실정이다. 지금까지 사육방법으로 밀사, 고에너지 사료, 성장조절 및 사료효율 증대를 위해 동물 자체의 건강 및 복지 등에 대해 일방적으로 간과되고 있다. 육계(broiler)는 빠른 성장에 기초한 유전적 개량에 의해 괄목할 만한 육계능력의 개량이 이루어져 왔다. 이러한 결과는 육계의 성장은 매우 빨라졌으나 과도한 체지방 축적, 면역 및 체내 항산화성 부족에 따른 질병 및 대사성 질환이 다 발하는 현상으로 이어져 질병발생 및 항생제 다량 사용 등과 같은 경쟁력을 악화시키는 주요한 원인으로 지적되고 있다. 가금에서 생산성 향상을 목적으로 사양관리에 의한 방법 즉, 급이 제한방법, 사육 환경의 조절 및 다양한 사료 첨가제와 항생제의 급여 등 여러 방법이 개발 시도되고 있는 실정이나 이의 효과에 대한 영양학적, 생리학적 및 대사학적 기전이 명확히 밝혀지지 않고 있으며 더욱이 유전자에 의한 발현 조절 양상에 대해서는 거의 알려진 바가 없으므로 현장에서 실용화와는 상당한 거리가 있다. 특히 육계 및 양계산업에서 열이나 사육밀도 등과 같은 환경 스트레스 및 친환경 사양방법은 동물의 생산성과 밀접한 관계가 있어 동물복지에 근거한 사육방법의 도입은 현장에서는 아직 부정적이다. 한편으로 사람을 비롯한 닭 유전체의 기본적인 유전 정보는 이미 완료가 된 상태로서 앞으로 이들 유전체의 기능과 발현양상에 대한 연구가 향후 과제로 남아있으며, 이제는 밝혀진 유용유전자를 대상으로 산업적 선택과 적용 유무의 검증이 시도되어야 할 때이다. 특히 환경의 변화와 유전자 발현간의 연구는 사육이란 관점에서 시급히 이루어져야 하는 과제로 생각된다. 닭에 있어서 생산성에 관여하는 형질들은 거의 양적유전의 지배를 받는 유전자들로서 이들 형질의 발현은 환경에 의한 영향이 절대적이라

알려져 있다. 그럼으로 이들 유전자 발현의 극대화를 이루기 위해서는 환경과의 상호작용이 구명되어야하고, 각종 사육 환경 및 사양 조건에 따른 유용 유전자들의 발현과 조절 양상에 대한 연구가 현안이 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 육계 및 산란계의 사료급이 방법, 사육밀도 및 사료첨가제 등에 따른 성장, 체지방, 면역, 항상성 증가 및 노화 등에 관련된 유전자들의 발현 양상을 구명하여 현장에서 적용 가능한 bio-marker를 발굴하고 이를 과학적 근거로 활용하여 최적 가금 사양 방법을 제시 적용하고자 한다.

3절 연구개발의 내용 및 범위

1. 육계의 급이 방법에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

(1) 시험 설계

7일령 브로일러를 대상으로 에너지제한 (85%, 70%) 및 섭취량 제한(85%, 70%) 급여를 1주일간 실시하고, 제한 급이 이후 시험 종료까지는 자유 급이 함.

(2) 제한 급여 처리별 생산능력 비교 분석

체중, 증체량, 사료섭취량 및 사료효율 분석

(3) 지방 및 근육발달 관련 유전자 클로닝

지방세포 발달 관련 transcription factor PPAR γ , C/EBP α , SREBP와 지방합성효소 관련 FAS(fatty acid synthase) 유전자 및 근육세포발달 조절인자로 MyoD, Myf5와 근육세포의 분화에 관여하는 Myogenin 유전자의 cloning

(4) 지방합성 및 근육발달 관련유전자 발현 비교 분석

제한 급여 처리별 지방합성 관련 유전자 FAS, SREBP, malic enzyme, PPAR- γ , C/EBP- α 및 근육관련 유전자 Myo-D, Myf-5, Myogenin의 발현 양상 비교 분석

(5) 혈청 및 간 조직 내에 생화학적 성분분석

제한 급여 처리별 혈청내 AST, ALT, glucose, total protein, albumin, cholesterol, triglyceride 분석 및 백혈구 differential count 비교 분석

(6) 면역 유전자의 발현 양상 분석

제한 급여 처리별 iNOS, IL-4, IL-6, IFN-gamma의 발현 양상 분석

(7) 연령에 따른 노화 지표 변화 양상 분석

Q-FISH에 의한 연령별 개체의 텔로미어 함량분석 및 telomerase activity 분석

(8) 노화 유전자 발현 양상 분석

제한 급여 처리별 개체 조직간 telomere 함량 비교 분석

2. 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

(1) 시험 설계

실용브로일러(Ross 종) 수컷을 5처리 8반복, 반복당 4수씩을 4일령에 완전임의배치하고, 생

리활성물질 첨가 사료로서 가시오갈피와 두충을 0%(대조구) 0.5%, 1% 수준으로 각각 첨가하여 35일령까지 자유급여 실시

(2) 급여 처리간 생산능력 비교 분석

체중, 증체량, 사료섭취량 및 사료효율 분석

(3) 육계에서 가시오갈피 및 두충 첨가가 지방 및 근육관련 유전자 발현에 미치는 영향

생리활성물질 첨가 급여구간 MyoD, Myogenin, PPAR- γ 및 FAS 유전자의 발현 양상 비교 분석

(4) 육계에서 가시오가피 및 두충 첨가가 항산화효소 유전자의 발현에 미치는 영향

생리활성물질 첨가 급여구간 GST, CAT, GPX 및 SOD 발현량 비교 분석

(5) 혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석

생리활성물질 첨가 급여구별 혈장 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 비교 분석

(6) 면역 유전자의 발현 양상 분석

생리활성물질 첨가 급여구별 iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 및 TNF- α 의 발현 양상 비교 분석

(7) 급여 처리간 노화 관련 유전자 발현 양상 비교 분석

생리활성물질 첨가 급여구별 개체 조직간 telomere 함량 비교 분석

3. 육계의 사육밀도에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

(1) 시험 설계

실용브로일러 수컷을 대상으로 2일간의 적응 기간을 거친 후 4일령 병아리를 완전임의배치법에 의해 고밀도(HD;575sq.cm/bird), 표준(SD;770sq.cm/bird) 및 저밀도(LD;1150sq.cm/bird)로 나누어 처리당 8반복으로 시험

(2) 사육 밀도간 생산능력 비교 분석

사육 밀도에 따른 체중, 증체량, 사료섭취량 및 사료효율 비교 분석

(3) 육계의 사육밀도에 따른 지방 및 근육관련 유전자 발현양상 비교

사육 밀도에 따른 처리별 MyoD, Myogenin, Myf5, PPAR- γ 및 FAS 유전자의 발현 양상 비교 분석

(4) 스트레스관련 유전자 발현 양상비교

사육 밀도에 따른 처리별 heat shock protein(HSP) 및 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) 유전자들의 발현 양상 비교 분석

(5) 혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석

사육 밀도에 따른 처리별 혈장 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 비교 분석

(6) 면역 유전자의 발현 양상 분석

사육 밀도에 따른 처리별 iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 및 TNF- α 의 발현 양상 비교 분석

(7) 사육 밀도간 노화 관련 유전자 발현 양상 비교 분석

사육 밀도에 따른 처리별 개체 조직간 telomere 함량 비교 분석

4. 산란계에서 천연 항산화 사료첨가제 개발

(1) 시험 설계

실용 산란계(하이라인 브라운) 360수를 대상으로 5처리 12반복, 반복당 6수씩을 20주령부터 30주령까지 가시오갈피와 두충을 0%(대조구) 0.5%, 1% 수준으로 각각 첨가 급여 실시.

(2) 급여 처리간 난질 비교 분석

급여 처리간 산란한 계란의 난중, 난백고, 호우유니트, 난각색, 난황색, 난각두께, 난각무게 및 난각밀도 분석

(3) 산란계에서 가시오갈피 및 두충 첨가가 항산화효소 발현에 미치는 영향

급여 처리간 GST, SOD, GSHPx 및 MDA 발현 양상 비교 분석

(4) 혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석

급여 처리간 혈장 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 비교 분석

(5) 급여 처리간 생리활성 및 노화 유전자의 발현 양상 비교 분석

급여 처리에 따른 처리별 개체 조직간 telomere 함량 비교 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 세계적 수준

개념정립 단계	✓	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

2. 국내수준

개념정립 단계	✓	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

3. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
캘리포니아주립대	<ul style="list-style-type: none"> 마우스의 노화 과정에서 환경 변화에 따른 유전자 발현 양상을 보고; 제한 급이가 생리활성 유전자들의 발현을 극대화 시킴 (Lee 등, 1999) 	- 환경에 따른 유전발현 양상 최초 제시
진주산업대	<ul style="list-style-type: none"> 체지방 조절 유전자인 leptin, PPARγ, Acetyl CoA carboxylase 발현 및 췌장 INS-1 cell 세포사 (apoptosis) 연구에서 사육환경에 따른 유전자 변화 관찰 (Jang 등, 2003) 	- 연구 수준
UC-Berkly	<ul style="list-style-type: none"> 지방세포분화 관련 유전자 탐색 및 기능연구 (Moon 등, 2002) 지방합성효소 유전자 프로모터 조절에 관한 연구 (Moon 등, 2000; 2002) 	- 연구 수준
진주산업대	<ul style="list-style-type: none"> 연령 및 사료첨가제에 따른 체 조직내 항산화 효소 및 체 지방 유전자(leptin) 발현 조사를 통한 체내 항산화 유지 및 체지방 감소 관찰 (Jang 등, 2004) 	- 연구 수준
경희대 버지니아 주립대	<ul style="list-style-type: none"> 사료섭취량 제한을 통한 뇌하수체 및 대뇌피질의 NADPH 및 nitric oxide synthase 유전자 발현 관찰, leptin 투여에 따른 식이조절 연구 수행 	- 연구 수준
Texas주립대	<ul style="list-style-type: none"> cell apoptosis와 telomere 양적 분석간 관계 구명 (Sohn 등, 2002) 	- 연구 수준
진주산업대	<ul style="list-style-type: none"> 닭의 발생 단계별 세포내 telomere의 양적 분포양상과 telomerase 활성도를 분석하여 노화에 따른 telomere의 유의적 감소를 제시 (조 등, 2005) 	- telomere가 노화표지임을 제시
중앙대, 경상대, 건국대, 축협중앙회, 진주산업대, 서울대	<ul style="list-style-type: none"> 육계에 각종 항생제 대체 사료첨가제 급여로 항생제 대체 효과 입증 차잎, 홍삼부산물, 한약재, 은행잎, 지방산, 유기산제제, 목초산의 사료적 가치 평가; 유효성분이 계란으로 전이 포도씨앗 분말 급여시 혈중 전체 항산화력 증가 랫트를 이용한 연구에서 가시오갈피추출물에서 간내 항산화 효소(SOD, glutathione peroxidase, catalase) 증가 및 간 손상지표 효소인 GPT 활성도 감소 	<ul style="list-style-type: none"> 과학적 근거 미약 현장 적용을 위한 구체적 접근 요구 생균제, 항산화제, 한약제 등 각종 사료첨가제 판매(브랜드란 출시)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 육계의 급이 방법에 따른 유용유전자 발현양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

1. 육계의 급이 방법에 따른 지방 및 근육발달 관련 유용유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

가. 지방 및 근육발달 관련 유전자 클로닝

(1) 지방관련유전자 cloning

지방세포의 발달과 분화에 크게 영향을 주는 것으로 알려진 transcription factor PPAR γ , C/EBP α , SREBP와 지방세포에서 지방합성의 표지인자로서 많이 활용하는 지방합성효소 FAS(fatty acid synthase) 유전자를 확보하기 위하여 Genbank에 등록되어 있는 정보를 활용하여 이들 유전자들을 cloning하였다. 이들 유전자들은 RT-PCR 또는 Real-Time PCR등에 이용할 목적으로 full sequence보다 작은 cDNA 부분을 증폭하여 이용하였다. 이들 cDNA들은 pCR2.1 벡터에 삽입하여 추후 관련 연구에 이용할 수 있도록 하였다. 이들 cDNA를 증폭하기 위하여 이용된 primer들은 아래 Table 1과 같다. 이들 유전자들을 확보하기 위한 PCR 방법들은 일반적 PCR을 위한 반응조성과 PCR 조건들을 수행하여 진행하였다.

Table 1. PCR primers for fat related genes

		primer sequence	size
PPAR γ	forward	5'-CAATGGTTGACACAGAAATGC-3'	182bp
	reverse	5'-GCTTGTGTTGATCAGCTCTTCC-3'	
C/EBP α	forward	5'-GATTTTCGATTTCCACGGCATG-3'	181bp
	reverse	5'-GCTCCIGCTTGATGACCAGCG-3'	
SREBP	forward	5'-TGCAGAAGAGCAAGTCCCTCA-3'	220bp
	reverse	5'-CTTCACCTTGCCATGGTGCA-3'	
FAS	forward	5'-CACCCCAAACAAGCTCATACA-3'	196bp
	reverse	5'-GCCAGTCATACTGTATCCCAA-3'	

(2) 근육관련 유전자 cloning

근육세포발달 조절인자에는 myoblast의 증식에 관여하는 MyoD와 Myf5가 있으며 이후 근육세포의 분화에 관여하는 Myogenin이 있다. 본 과제에서도 이들 유전자를 활용하기 위하여 이들 유전자를 닭의 근육세포로부터 RNA를 추출하여 pCR2.1 벡터에 클로닝 하였다. 이들 유전자들을 확보하기 위한 primer들의 조성과 그 산물의 크기를 Table 2에 표기하였다. 이들은 지방세포발달 유전자들과 같이 RT-PCR과 Real-Time PCR을 위한 primer들로 이용하였다.

Table 2. PCR primers for muscle related gene

		primer sequences	size
actin	forward	5'-CAAAGCGCTCGATTCATCGC-3'	517bp
	reverse	5'-CAGCACTTTGCAGATGCGGT-3'	
MyoD	forward	5'-ACTCCGACGTTCCCAGTCGCC-3'	193bp
	reverse	5'-GGTGCTCCTCGGGCTTCAGCA-3'	
Myogenin	forward	5'-ATGGAGCTCTTTGAGACCAAC-3'	170bp
	reverse	5'-GTCAGATCCTTCTCCTCCAAA-3'	
Myf5	forward	5'-ATGGAGGTGATGGACAGCTGC-3'	171bp
	reverse	5'-GGACTCCTTCTCCTTGTGCAG-3'	

나. 지방합성 및 근육발달 관련유전자 발현 비교 분석

(1) 지방합성유전자의 발현 양상 분석

(가) 제한사양이 지방합성 유전자 FAS와 SREBP의 발현에 미치는 영향

지방합성효소(FAS)유전자의 발현은 이 유전자의 promotor 전사조절 부위에 SREBP 전사인자가 작용하여 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 FAS mRNA 발현율은 SREBP의 발현정도에 따라서 영향을 받을 것으로 예상되기 때문에 FAS와 SREBP의 발현양상을 같이 분석하였다. 7일간의 제한사양 직 후 FAS와 SREBP의 발현양상은 대조구에서 가장 높은 발현율을 나타냈고, 급이제한 85%, 에너지제한 85%, 급이제한 70%, 에너지제한 70%수준으로 높게 발현되었다(Fig. 1).

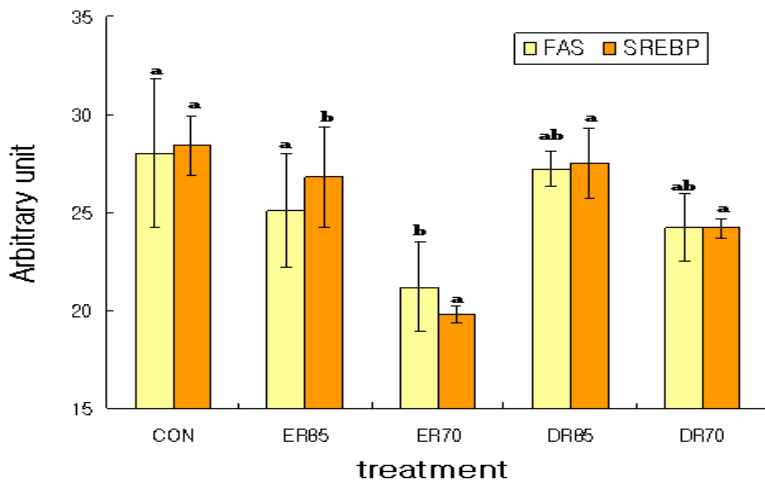


Fig. 1. RNA expression patterns of lipogenic genes in the liver after diet or energy restrictions for 7 days

(Note) Values (mean±SE, n=5) with different letters are significantly (P<0.05) different among treatment groups. * Treatment; CON represents control. ER85 represents energy restriction 85% level compared with control diet. ER70 represents energy restriction 70% level compared with control diet. DR85 represents diet restriction 85% level compared with control diet. DR70 represents diet restriction 70% level compared with control diet.

육계에 있어 사료 제한처리는 2주령에서 3주령에 걸쳐 가장 많이 적용되는데 이 시기에 지방조직 성장의 주요 요인인 지방세포의 과성장을 억제 할 수 있기 때문이라고 Pfaff 등(1977)은 보고하였다. 본 실험에서는 1주령과 2주령사이에 제한급이를 실시하였다.

Rosebrough 등(1986)와 McMurtry 등(1988)이 성장 초기의 사료제한이 육계의 체지방 축적에 미치는 영향에 대한 결과에서 보여 주는 것과 같이 저영양 시기에는 간에서의 지방생성에 관련된 효소의 활동이 위축된다는 보고와 본 실험결과 또한 유사한 경향을 보였다. 그리고 제한사양시기가 유사한 Rosebrough 등(1986)의 보고서에서도 FAS 유전자 발현이 본 연구결과와 유사한 지방합성의 감소를 보고한 바 있으며, 이러한 결과는 체중과 중성지방의 결과에서도 에너지제한 70%에서 그 발현율이 가장 낮게 나타난 결과를 뒷받침하는 것으로 사료된다.

(나) 보상성장에 의한 지방합성 유전자 FAS와 SREBP의 발현에 미치는 영향

7일 동안의 제한사양 실시 후 14일령부터 3주간의 보상성장 한 지방합성 유전자 FAS와 SREBP의 발현양상은 에너지제한 85%, 대조구, 급이제한 85%, 급이제한 70%, 에너지제한 70% 수준으로 높게 발현되었다(Fig. 2). 보상성장 후 에너지제한 70%의 발현율은 제한사양 후의 결과와 마찬가지로 낮았다(Fig. 2). 이 결과는 앞서 설명한 체중과 혈중 중성지방의 결과에서도 에너지제한 70% 처리구에서 가장 낮게 나타난 결과를 뒷받침 하는 것으로 사료된다.

Rosebrough 등(1986)와 McMurtry 등(1988)은 저영양 시기에는 간에서의 지방생성에 관련된 효소의 활동이 위축되고 급이를 재개하면 이러한 효소들이 극적으로 활발히 활동한다고 보고하였다. 그러나 급이를 재개한 후 2주일이 지나면 FAS와 malic enzyme 효소들의 활동이 자유급이 한 처리구에 비하여 수준이 낮아진다고 보고하였다. 이렇듯 지방합성효소의 활동이 왕성하다 다시 줄어드는 이유는 명확하지 않아서 더 심도 깊은 실험이 필요 할 것으로 사료된다.

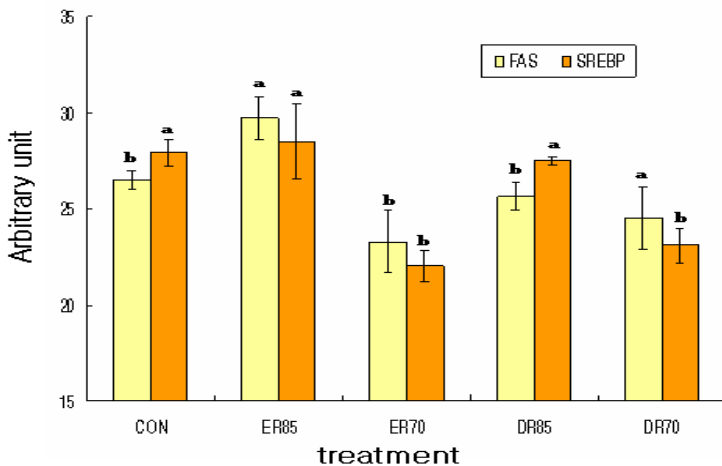


Fig. 2. RNA expression patterns of lipogenic genes, FAS and SREBP, in the liver after realimentation for 3 weeks.

(Note) Values (mean±SE, n=5) with different letters are significantly(P<0.05) different among treatment groups. *Treatment; CON represents control. ER85 represents energy restriction 85% level compared with control diet. ER70 represents energy restriction 70% level compared with control diet. DR85 represents diet restriction 85% level compared with control diet. DR70 represents diet restriction 70% level compared with control diet.

(다) 제한사양이 지방합성 유전자 malic enzyme, PPAR- γ , C/EBP- α 의 발현에 미치는 영향

지방합성효소(malic enzyme, ME)유전자의 발현에 가장 영향을 미치는 요소는 PPAR- γ 와 C/EBP- α 전사인자로서 ME의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 ME발현은 PPAR- γ 와 C/EBP- α 의 발현정도에 따라서 영향을 받을 것으로 예상되기 때문에 ME, PPAR- γ 와 C/EBP- α 의 발현양상을 같이 분석하였다.

7일간의 제한사양 직 후 세 유전자의 변화는 대조구에 비해 모든 처리구의 발현율이 전반적으로 낮았다. 급이제한 85%, 에너지제한 85%, 급이제한 70%, 에너지제한 70% 순으로 발현율이 높았다. 이러한 결과는 체중과 중성지방의 결과에서도 급이제한 70%에서 가장 낮게 나타난 결과를 뒷받침하는 것으로 사료된다(Fig. 3).

제한사양시기가 유사한 Rosebrough 등(1986)의 보고서에서도 ME의 발현율이 지방 합성 효소의 감소를 보고한 바 있다. 본 실험 결과 또한 제한 급이시 지방합성효소인 ME의 발현양상이 기존의 보고들과 일치함을 보여준다. 육계에 있어 사료 제한처리는 2주령에서 3주령에 걸쳐 가장 많이 적용되는데 이 시기에 지방조직 성장의 주요 요인인 지방세포의 과 성장을 억제할 수 있기 때문이라고 Pfaff 등(1977)은 보고하였다. 그리고 육계의 체지방함량을 낮추기 위해서는 초기에 영양을 제한하는 조치는 그 성공의 수준이 아주 다양한데 초기 급이 제한에 따른 체지방과 복부지방 감소효과는 많은 연구자들에 의해 입증되었다. 반면 그 만큼 많은 수의 연구자들이 실제적인 효과를 거두지 못한다고 보고되고 있다(Pfaff 등, 1977). 그 이유는 앞서 설명한 것과 같이 닭의 성장 초기 저영양 공급 프로그램에 대한 닭의 반응이 일정치 않은 것은 Yu와 Robinson(1992)의 연구에서 지적한 듯이 각 각의 연구에 사용된 닭의 영양수준이나 재급이한 기간 그리고, 닭의 계종 등의 차이 때문으로 생각된다.

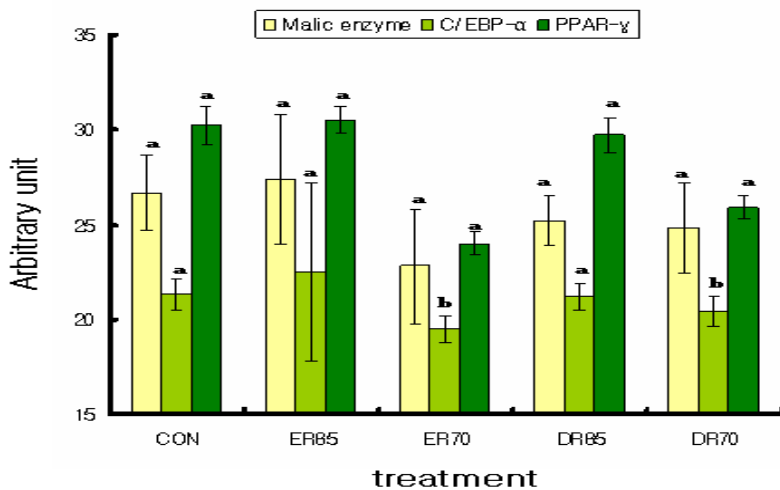


Fig. 3. RNA expression patterns of lipogenic genes, malic enzyme, PPAR- γ , and C/EBP- α in the liver after diet or energy restriction for 7 days.

(Note) Values (mean \pm SE, n=5) with different letters are significantly(P<0.05) different among treatment groups. * Treatment; CON represents control. ER85 represents energy restriction 85% level compared with control diet. ER70 represents energy restriction 70% level compared with control diet. DR85 represents diet restriction 85% level compared with control diet. DR70 represents diet restriction 70% level compared with control diet.

(라) 보상성장에 의한 지방합성유전자 malic enzyme, PPAR- γ , C/EBP- α 의 발현에 미치는 영향
 1주일간의 제한급이 종료 후 3주간의 자유급이로 인한 지방합성유전자의 보상성장의 발현 양상은 대조구와 거의 유사한 양상으로 발현되었다. Malic enzyme(ME)은 급이제한 70%를 제외한 나머지 처리구에서 대조구와 비슷한 발현양상을 나타내었다. C/EBP- α 는 전처리 구간별로 대조구와 비슷한 양상으로 발현되었고, 급이제한 70%처리구만 조금 낮은 발현율을 보였다. PPAR- γ 는 대조구와 에너지제한 85%, 급이제한 85%는 비슷한 발현양상을 보였으며 급이제한 70%와 에너지제한 70%수준 순으로 발현율이 높았다(Fig. 4).

많은 연구자들은 보상성장을 보조하는 에너지와 영양소는 급이재개 후 작은 체구로 인해 유지요구량이 줄어들어 보충되는 것이라고 보고했다. 급이 제한에 이어 재급이한 육계는 무제한 급이구와 비교하여 체중에 비해 사료섭취량이 높다고 Zubair와 Leeson(1994)은 보고하였다. 이러한 가설은 급이 재개 시기에 보상성장을 위한 에너지는 체중에 비해 높은 사료섭취량에서 온다는 개념을 뒷받침한다. 다른 적응의 예로는 소화기관의 상대적인 확장, 특히 선위, 근위, 쓸개, 간 등이 비대하여 사료섭취량을 늘리고 보상성장을 돕는다는 사항들이다(Zubair와 Leeson, 1994). 보상성장에 영향을 미치는 다른 요소들로는 영양수준, 재 급이 기간, 닭의 계종 등을 들 수 있으며 사료의 조작으로 지방세포의 과성장을 줄여 체지방을 감소시킬 수 있다. 하지만 지방세포 크기의 변화는 대단히 일시적으로 몇 일간의 재급이로 정상 지방세포 크기로 돌아온다. 이 때문에 제한급이에 이어 재급이한 육계의 체지방을 낮추기는 아주 힘들다. 사료 효율과 체지방 감소에 있어서 더욱 일정한 결과를 얻기 위해서는 일령에 따른 에너지 대사와 지방세포의 변화간의 관계가 좀 더 깊이 조사되어야 할 것으로 사료되며 이러한 과정이 일령, 저영양 수준, 시기, 기간과 같은 요소들과도 어떠한 영향을 받는지도 깊게 이해하고 연구하는 것이 필요 할 것으로 사료된다.

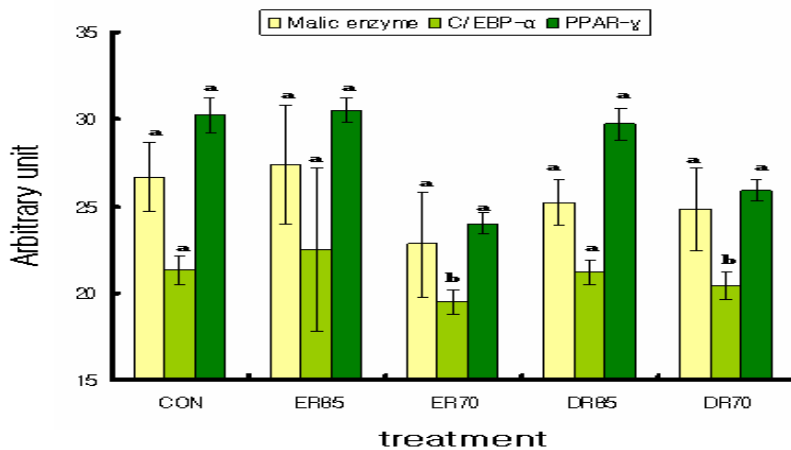


Fig. 4. RNA expression patterns of lipogenic genes, malic enzyme, PPAR- γ , and C/EBP- α in the liver after realimentation for 3 weeks.

(Note) Values (mean \pm SE, n=5) with different letters are significantly (P<0.05) different among treatment groups. *Treatment; CON represents control. ER85 represents energy restriction 85% level compared with control diet. ER70 represents energy restriction 70% level compared with control diet. DR85 represents diet restriction 85% level compared with control diet. DR70 represents diet restriction 70% level compared with control diet.

(2) 근육관련유전자의 발현양상

(가) 제한사양이 근육관련 유전자 Myo-D, Myf-5, Myogenin의 발현 양상 분석

육계의 조기제한 급이가 근육관련 유전자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 에너지 및 급이량을 8일령부터 1주일간 제한사양을 실시하였다. 1주일간의 제한사양 이 후 근육관련 유전자의 발현 양상은 대조구에 비해 모든 처리구에서 발현율이 낮게 나타났다(Fig. 5).

육계의 근육형성은 일차적인 근섬유 형성이 이루어지는 배아기에 시작되고, 이러한 근육형성 과정에서는 Myo-D와 Myf-5유전자들의 상호 작용이 분화 관련 유전자의 발현을 조절함으로써 근섬유의 분화를 유도한다고 Kablar(2002)등은 보고하였다. 본 실험에서도 Myo-D와 Myf-5의 발현양상은 제한사양 후와 보상성장 후 큰 변화가 없었다. 이것은 초기 근육 분화를 유도하는 인자로서 육계의 초기 성장 시기인 14일령 이전 시점에서 두 유전자가 왕성히 발현 되어 작용한 것으로 사료되며 이 결과는 Kablar(2002)등의 연구 결과와도 유사하였다.

육계의 근육형성이 일차적 근섬유 형성이 이루어지는 배아기에 시작되면 부화 후 1주령 에는 장기형성이 이루어지고 3주령까지 골격이 형성되며 3주령 이후부터 7주령까지 근육형성을 이룬다. 근육형성이 이뤄지는 시기에 Myo-D 와 Myf-5유전자는 근육세포의 증식에 관여하는 인자로 작용하며 세포분열에도 영향을 미친다.

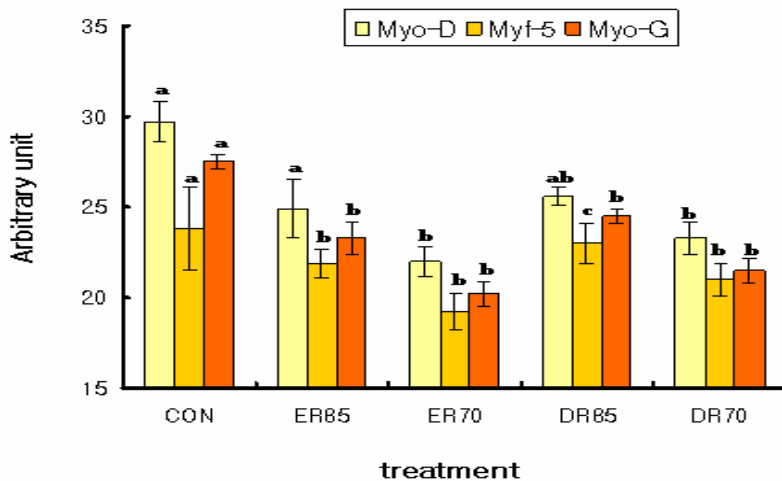


Fig. 5. RNA expression patterns of myogenic transcription factors after diet restriction for 7 days.

(Note) Values (mean±SE, n=5) with different letters are significantly(P<0.05) different among treatment groups. *Treatment; CON represents control. ER85 represents energy restriction 85% level compared with control diet. ER70 represents energy restriction 70% level compared with control diet. DR85 represents diet restriction 85% level compared with control diet. DR70 represents diet restriction 70% level compared with control diet.

(나) 보상성장에 의한 근육관련 유전자 Myo-D, Myf-5, Myogenin의 발현 양상 분석

1주일간의 제한급이 종료 후 3주간의 자유급이가 근육관련 유전자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 근육관련 유전자에 발현양상을 조사하였다. 보상성장 후 근육관련 유전자는 대조구와 모든 처리구에서 발현율이 비슷한 양상으로 나타났다(Fig. 6). 이러한 결과는 7일간의 제한사양 후 3주간의 자유급이로 인한 보상성장의 효과로 생각된다.

이러한 결과는 앞서 제한사양 후 근육관련 유전자들의 발현양상과 같이 어린시기의 7일간의 에너지를 제한하여 사양한 후 3주간의 자유급이가 근육생성과 발달에 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료된다.

Myogenin은 근육의 분화를 유도하는 인자로 Myo-D와 Myf-5가 초기 근육 분화를 유도하는 인자로서 육계의 초기 성장 시기인 14일령 이전 시점에서 두 유전자가 왕성히 작용하고 난 후 Myogenin이 후기에 작용한 것으로 사료된다. 육계의 제한사양과 근육관련 유전자의 연구 보고 사례가 거의 없는 실정이라 본 실험내용과 비교할 자료가 없었으므로 앞으로 더 많은 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

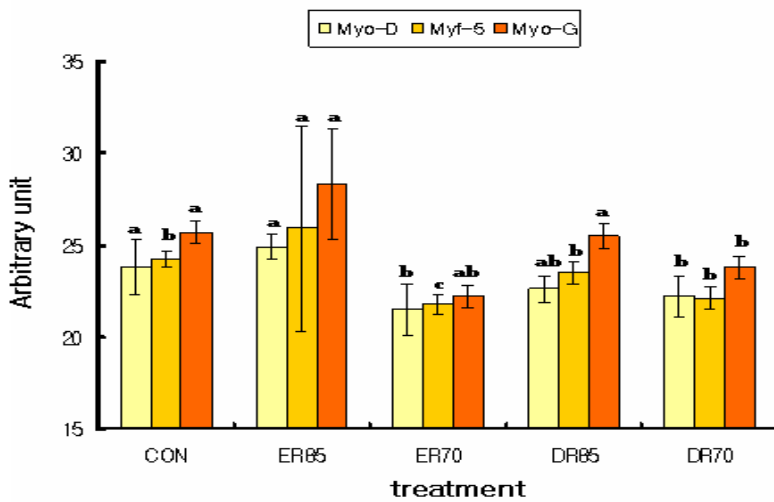


Fig. 6. RNA expression patterns of myogenic transcription factors realimentation for 3 weeks.

(Note) Values (mean±SE, n=5) with different letters are significantly (P<0.05) different among treatment groups. *Treatment; CON represents control. ER85 represents energy restriction 85% level compared with control diet. ER70 represents energy restriction 70% level compared with control diet. DR85 represents diet restriction 85% level compared with control diet. DR70 represents diet restriction 70% level compared with control diet.

2. 닭의 사료급여량 및 에너지 제한에 따른 성장 및 면역관련유전자 발현에 관한 연구

가. 재료 및 방법

(1) 육계 사양시험

(가) 공시동물 및 사양관리

본 시험에 공시된 시험동물은 육계 수컷 Ross종 200수로서 (주)올품(구 하림)에서 구입하였

다. 구입 후 스트레스로 인한 부작용을 줄이기 위하여 2일간 적응기간을 거친 3일령 (34.19±0.10 g) 병아리를 완전임의배치법에 의해 5개 처리구에 케이지 당 4수씩 배치하였다. 본 시험설계에 따른 사양프로그램에 따라 사료를 급여하고 7일령, 14일령 및 35일령에 체중과 사료 섭취량을 조사하였다. 이어서 각 처리구당 평균체중에 가까운 5수씩 선발하여 매번 35수를 7일령, 14일령 및 35일령에서 희생하여 샘플을 채취하였다. 본 사양관리는 온도 및 명암조절(조명: 07:00~19:00)을 갖춘 사육시설에서 본 대학의 육계 사육 관리 지침에 따라 일령별로 사육을 실시하였다.

(나) 시험설계 및 시험사료

본 연구의 시험 설계는 대조구를 포함하여 모두 5개 군으로 설정하였다. 사료 및 에너지 섭취량은 다음과 같은 방법으로 급여량을 조절하여 시험구를 설정하였다. 먼저 육계에서 에너지 섭취량 제한하기 위하여 대조구 (CON)에 비해 사료 배합비를 조절하여 에너지를 85%(EN85) 및 70%(EN70) 수준으로 희석하였다. 다음으로 사료 섭취량을 제한하는 방법으로 사료 섭취량을 자유 섭취량의 85%(FI85) 및 75%(FI70)로 설정하여 사료급여량을 양적으로 제한하였다. 육계 Ross종의 자유 섭취량은 Ross 사로부터 제공된 일령별에 따른 사료섭취량 자료를 근거로 설정하였다. 제한 급이는 7일령에서 14일령까지 성장이 가장 활발한 1주일간 실시하였고 제한 급이를 실시하기전과 미친후 14일령에서 35일령까지는 모든 구에서 동일한 사료를 자유 급이 하였다. 제한급이 기간 동안 대조구(Con), 에너지 85% 제한 급이구 (EN85) 및 70% 제한 급이구(EN70)에서는 시험사료는 동물이 충분히 먹을 수 있는 양을 급여하여 자유 채식시켰으며, 사료섭취량 85% 제한 급이구(FI85) 및 70% 제한급이구(FI70)는 시험설계에 따라 매일 자유섭취량의 85% 및 70%를 정해진 시간에 제한급이 하였다. 시험사료의 조성 및 화학적 성분은 Table 3에 나타난바와 같다.

Table 3. Feed formula of experimental diet

Items	Treatment		
	CON	EN85	EN70
Ingredients			
Yellow corn	55.78	49.00	36.54
Tallow	3.50	-	-
Wheat bran		21.00	46.50
Corn gluten meal	5.00	2.00	-
Soybean meal	30.40	22.00	11.50
Process salt	0.32	0.37	0.33
limestone	0.80	1.20	1.30
DCP	1.70	1.20	0.90
Vitamin premix. etc.	2.50	3.23	2.93
	100.00	100.00	100.00
CP, %	21.13	18.02	14.80
ME, kcal/kg	3,120	2,655	2,190
Ca, %	0.85	0.85	0.85
P, %	0.65	0.65	0.65

(다) 시험 샘플채취

육계는 제한 사양이 시작되는 7일령, 제한 사양이 끝난 14일령 및 사양시험이 종료되는 35일령에 체중 측정과 사료섭취량을 조사하고 각 구당 5두씩 평균 체중에 가까운 개체를 선발하여 경정맥을 절단하여 혈액을 채취하였다. 이어서 복강을 절개하여 간, 흉선, F-낭 및 복강지방을 멸균된 가위를 이용하여 채취하여 밀봉한 후 액체질소에 급속 동결하여 분석 전까지 -70℃에 보관하였다.

(2) 분석항목

(가) 체중 및 사료섭취량 측정

체중측정은 시험 개시(1일령), 제한사양실시 전(7일령), 후(14일령), 21일령 및 시험종료일인 35일령에 정해진 시간에 일정하게 체중 및 사료섭취량을 측정하여 본 사양시험동안 사료섭취량 및 사료요구율을 구하였다.

(나) 혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석

혈청내 AST, ALT, glucose, total protein, albumin, cholesterol, triglyceride 분석은 자동 혈액분석기를 사용하여 분석하였다. 백혈구 differential count는 자동 혈액분석기를 사용하여 분석하였다

(다) 면역 유전자 mRNA 발현

① 혈액에서 백혈구 및 RNA분리

각 처리군당 5수씩 혈액을 채취한 후 3ml 넣고 채취한 신선한 혈액과 0.9% NaCl을 혼합하고 Lymphocyte Separation Medium (LSM) 시약을 조심스럽게 분주하여 400xg에서 20분 동안 원심 분리하였다. 이어서 혈장층을 제거한 후, 백혈구층과 LSM층 50%을 흡입하여 동량의 0.9% NaCl를 다시 넣은 뒤 200xg에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 버리고 생리식염수를 다시 넣어 원심 분리하여 세척하여 pellet(백혈구)를 분리하여 취하였다.

백혈구 Total RNA는 GIAmp mini kit를 사용하여 분리하였다. 간단하게 소개하면, EL buffer 에 백혈구를 혼합하고 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 상청액을 제거하였다. 다시 RLT buffer를 넣은 뒤 백혈구 세포를 파괴하기 위해 잘 혼합하고 위의 분해산물을 QIAshredder spin column에 넣은 뒤 14,000rpm에서 2분 동안 균질화하였다. 균질액에 70% Alcohol을 넣고 잘 혼합하여 다시 QIAamp spin column에 넣은 뒤 8,000xg에서 1분 동안 원심분리후 RW1 buffer로 세척하고 8,000xg에서 1분 동안 재 세척하였다. 이어서 RPE buffer을 수 차례 원심분리하여 RNase free water을 membrane에 정확히 분주한 후 다시 10,000rpm 1분 동안 용출하여 RNA을 추출하였다.

② 흉선에서 RNA 분리

각 처리군 별로 5수씩 선택한 공시동물의 흉선 및 F-낭의 조직으로부터 RNAsol™ kit(TEL-TEST, INC)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 조직을 RNazol reagent용액에서 homogenization한 후 chloroform을 혼합한 후 원심분리하고 aqueous phase에 2-propanol을 혼합하여 RNA를 침전시켜 분리하고 분리된 RNA를 이용하여 즉시 cDNA를 합성하여 냉장 보관하였다.

Table 4. The sequences of primer

Item	Direction	Sequence(5' to 3')	Size(bp)
IFN-gamma	Forward	TTCCTTCATTTTCCTCTTGA	294
	Reverse	ACTGGAAAACACAAGGTCAC	
iNOS	Forward	GCATCCAAAATATGAGTGGT	274
	Reverse	AAGCACAGCCACATTTATCT	
IL-6	Forward	GCTCGCCGGCTTCGA	188
	Reverse	GGTAGGTCIGAAAGGCGAACAG	
IL-4	Forward	AACATGCGTCAGCTCCTGAAT	350
	Reverse	TCTGCTAGGAACTTCTCCATTGAA	
β-actin	Forward	GTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGC	540
	Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

③ RT-PCR을 mRNA 발현 조사

추출한 RNA를 이용하여 분광광도계에서 OD값을 측정하여 RNA를 10 μg으로 정량한 후 oligo dT (Invitrogen) 1 μl와 dH₂O를 넣어 최종 부피가 12 μl가 되도록 하여 RT를 제조하였다. RT-product 2.5 μl, MgCl₂(Promega) 2.0 μl, 2.5mM dNTP (TaKaRa) 2.5 μl, 10X PCR buffer (TaKaRa) 2.5μl, 10 pmol primer 2.5 μl, Taq polymerase (TaKaRa) 0.2 μl, DEPC water 10.3 μl을 넣어 최종부피를 25 μl로 맞춘다. PCR조건은 혈액에서 94℃에서 3분, *[94℃에서 30초, 62℃~50℃에서 30초, 72℃에서 45초] × 32~35cycle, 72℃에서 10분, 4℃에서 ∞ 에서 실시하였으며, 조직에서는 94℃에서 3분, [94℃에서 30초, 59℃에서 30초, 72℃에서 45초] × 40cycle, 72℃에서 10분, 4℃에서 ∞ 로 실시하였다. PCR 반응물은 1.5~2.0% Agarose gel에서 20분간 전기영동 후, UV에서 관찰하여 Polaroid film (Kodak EDAS 120)으로 촬영 후 density를 측정하였다.

(3) 통계처리

제한 급여방법에 따라 얻은 결과는 Proc-GLM(SAS, 1996)에 의해 분산분석을 실시하였으며, 처리간 비교는 Duncan 방법에 의해 P<0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

다) 결과 및 고찰

(1) 제한 급여에 따른 증체, 사료섭취량 및 사료요구율

제한 급여에 따른 육계의 사양성적 결과(Table 5)를 살펴보면 1일령 및 7일령에서 예상되듯 모든 구에서 유사한 수준의 체중, 증체 및 사료 이용성을 나타내었다. 그러나 7일에서 14일령까지 7일 동안 제한 사양이 끝난후 나타난 결과를 살펴보면, 대조구(CON)에서 유의적(P<0.05)으로 높은 체중과 증체를 나타내었고 사료섭취량 85% 제한구(FI85) 및 에너지 85% 제한구(EN85), 사료섭취량 70% 제한 급여구(FI70), 에너지 85%(EN85) 제한 급여구 순서로 증체 및 체중을 보였다.

제한 급여가 종료되고 3주간 사료 급여를 완료하고 나타난 결과를 살펴보면, EN85구에서 가장 높은 증체 및 종료 체중을 나타내었다. 특히 EN85 제한 급여구는 증체 및 종료 체중이 대조구(CON)와 유의차 없었으나 다른 제한 급여구들 보다 유의하게 (P<0.05) 증가되었다.

사료섭취량 및 사료요구율을 살펴보면 기간별로는 제한 급여에 따른 통계적인 차이가 관찰되었지만, 전 기간(1-35일)에서 섭취한 사료량 및 사료 요구율은 모든 구에서 비슷한 것으로 관찰되었다.

Table 5. Effect of dietary energy and feed restriction on growth performance, feed intake and feed conversion ratio (FCR) in broiler chickens

Item	Con	EN85	EN70	FI85	FI70
Initial BW	34.18 ±0.09	34.15 ±0.09	34.25 ±0.10	34.14 ±0.11	34.25 ±0.09
BW, 7d	167.71 ±5.18	168.15 ±3.19	167.95 ±4.41	171.29 ±5.92	167.43 ±7.11
BW, 14d	404.73 ±15.70 ^a	360.16 ±9.88 ^b	280.08 ±6.15 ^d	368.29 ±1.82 ^b	316.14 ±2.22 ^c
BW, 21d	853.74 ±17.79 ^a	797.13 ±18.86 ^b	686.78 ±13.51 ^d	824.7 ±11.25 ^{ab}	748.84 ±12.14 ^c
Final BW	1979.06 ±54.96 ^{ab}	2029.13 ±62.87 ^a	1834 ±28.41 ^b	1882.19 ±44.01 ^b	1874.19 ±36.05 ^b
Gain 1-7d	133.54 ±5.19	134.03 ±3.18	133.7 ±4.42	137.14 ±5.85	133.18 ±7.13
Gain 8-14d	237.02 ±12.73 ^a	191.98 ±7.75 ^b	112.13 ±6.81 ^d	197 ±6.38 ^b	148.71 ±8.11 ^c
Gain 15-21d	449.01 ±16.10 ^a	436.96 ±13.48 ^{ab}	406.71 ±11.84 ^b	456.42 ±11.35 ^a	432.7 ±12.03 ^{ab}
Gain 22-35d	1125.32 ±48.44 ^{ab}	1232 ±61.61 ^a	1147.22 ±27.20	1057.49 ±44.03 ^b	1125.34 ±40.04 ^{ab}
Gain 15-35d	1574.33 ±46.78 ^{ab}	1668.96 ±60.72 ^a	1553.93 ±25.15 ^{ab}	1513.9 ±43.88 ^b	155.04 ±35.76 ^{ab}
Gain 1-35d	1944.89 ±55.03 ^{ab}	1994.98 ±62.83 ^a	1799.75 ±28.46 ^b	1848.05 ±43.99 ^b	1839.94 ±36.01 ^b
Feed intake 1-7d	121.48 ±4.44	128.02 ±5.39	123.86 ±5.62	124.31 ±4.09	126.56 ±6.62
Feed intake 8-14d	365.04 ±23.19 ^a	339.84 ±11.79 ^{ab}	315.47 ±3.97 ^{bc}	283.09 ±0.01 ^c	233.1 ±0.00 ^d
Feed intake 15-21d	579.59 ±30.70 ^b	599.49 ±20.45 ^b	539.65 ±4.74 ^b	666.75 ±33.88 ^a	595.86 ±12.13 ^b
Feed intake 22-35d	1842.38 ±59.81	1922.11 ±78.03	1713.05 ±18.78	2007.34 ±224.38	1961.69 ±118.79
Feed intake 15-35d	2421.96 ±53.59 ^{ab}	2521.6 ±88.92 ^{ab}	2252.7 ±19.40 ^b	2674.08 ±237.11 ^a	2557.55 ±125.44 ^{ab}
Feed intake 1-35d	2908.48 ±74.59	2989.45 ±91.99	2692.03 ±17.40	3081.47 ±240.44	2917.22 ±130.72
FCR 1-7d	0.91 ±0.04	0.96 ±0.04	0.93 ±0.05	0.91 ±0.02	0.95 ±0.02
FCR 8-14d	1.54 ±0.06 ^b	1.78 ±0.04 ^b	2.89 ±0.19 ^a	1.45 ±0.05 ^b	1.61 ±0.10 ^b
FCR 15-21d	1.29 ±0.04 ^b	1.37 ±0.02 ^{ab}	1.33 ±0.04 ^{ab}	1.47 ±0.08 ^a	1.38 ±0.02 ^{ab}
FCR 22-35d	1.64 ±0.04 ^{ab}	1.58 ±0.08 ^b	1.5 ±0.05 ^b	1.88 ±0.14 ^a	1.75 ±0.11 ^{ab}
FCR 15-35d	1.54 ±0.04 ^b	1.52 ±0.06 ^b	1.45 ±0.03 ^b	1.75 ±0.10 ^a	1.64 ±0.08 ^{ab}
FCR 1-35d	1.5 ±0.03	1.51 ±0.05	1.5 ±0.03	1.66 ±0.09	1.59 ±0.07

Values(mean±SE, n=10) with different letters are significantly (P<0.05) different among treatment groups.

(2) 혈액 생화학적 성분 및 백혈구 정상

제한급여에 따른 육계의 혈액 생화학적 성분 및 백혈구 구성 비율에 대한 결과는 Table 6 및 7에서 나타낸바와 같다. 먼저 혈액 생화학적 성분에서 7일 동안 제한 사양이 끝난후 14일령에서 나타난 결과를 살펴보면(at 14 days) AST, ALT, glucose, total protein, albumin, cholesterol, triglyceride 등과 같은 대부분의 생화학 성분은 대조구(CON)에서 가장 높은 유의적 (P<0.05) 수치를 나타내었고 사료섭취량 85%(FI85) 및 에너지 85%(EN85) 제한급여구, 사료섭취량 70% 제한급여구(FI70), 에너지 85%(EN85) 제한급여구 순으로 혈중 생화학 성분이 낮게

나타났다. 이와 같은 결과는 제한급이가 간 기능을 보호하고 혈당, 중성지방 및 콜레스테롤 등과 같은 체지방을 저하시키는 작용이 있음이 증명되었다. 절식이 끝나고 35일령에서 나타난 결과(at 35 day)을 살펴보면 AST가 저하되었으나, 대부분의 혈중 biomarker에서 에너지 및 사료 섭취량 제한구와 유사한 결과를 보였다. 제한급여를 종료하고 3주간 대기 사료를 자유급여한 결과, 모든 제한급여구에서 혈중 생화학 성분이 대조구와 비슷한 수준으로 나타났다. 따라서 이와 같은 결과로 보아 체 지방이 매우 활발하게 생성되는 7일간 사료급여 또는 에너지를 제한하는 제한절식은 육계의 생리적에 현상에 긍정적인 효과가 나타나는 것으로 추론할 수 있다. 한편 혈액의 백혈구 구성을 differential %를 조사한 결과, 호중구, 림프구, 단핵구, 호염기구 등의 상대적 %는 에너지 및 사료섭취량의 제한급이가 어떠한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 6. Effect of dietary energy and feed restriction on blood biochemical profiles in broiler chickens.

Item	Con	EN85	EN70	FI85	FI70
At 14days					
AST	228.00±25.34 ^a	209.40±20.82 ^{ab}	184.80±8.09 ^{ab}	175.40±19.81 ^{ab}	145.60±6.39 ^b
ALT	4.40±0.54 ^a	2.80±0.30 ^{bc}	3.60±0.31 ^{ab}	1.60±0.43 ^c	1.80±0.16 ^c
Glu	316.40±42.73 ^a	204.00±17.61 ^b	228.60±18.82 ^b	204.00±6.39 ^b	189.80±6.08 ^b
TP	3.26±0.35 ^a	2.16±0.22 ^b	2.20±0.17 ^b	2.18±0.14 ^b	1.96±0.05 ^b
Alb	1.26±0.15 ^a	0.88±0.08 ^b	0.88±0.08 ^b	0.86±0.05 ^b	0.82±0.03 ^b
CHO	212.00±30.91 ^a	126.00±9.95 ^b	131.20±13.69 ^b	155.20±14.28 ^{ab}	138.00±9.64 ^b
TG	40.00±7.74 ^a	14.20±2.04 ^b	20.20±5.85 ^b	12.40±0.69 ^b	13.20±1.49 ^b
CRE	0.68±0.07 ^a	0.42±0.03 ^b	0.40±0.02 ^b	0.42±0.02 ^b	0.38±0.02 ^b
At 35days					
AST	161.20±12.72 ^c	195.20±17.42 ^{bc}	272.20±24.52 ^a	230.60±12.64 ^{ab}	193.60±10.35 ^{bc}
ALT	0±0 ^b	0.20±0.16 ^{ab}	0.60±0.19 ^a	0.60±0.21 ^a	0±0 ^b
Glu	216.60±9.69 ^b	252.00±13.53 ^{ab}	255.40±8.72 ^a	243.00±5.66 ^{ab}	226.20±6.62 ^{ab}
TP	2.12±0.16 ^b	3.02±0.23 ^a	2.98±0.11 ^a	2.76±0.18 ^{ab}	2.76±0.14 ^{ab}
Alb	0.90±0.06 ^b	1.12±0.08 ^{ab}	1.16±0.05 ^a	1.12±0.05 ^{ab}	1.08±0.05 ^{ab}
CHO	124.70±9.16	128.20±12.20	146.80±9.82	165.40±8.21	151.00±10.72
TG	8.6±1.02 ^b	17.40±2.71 ^a	14.80±1.42 ^{ab}	9.0±0.71 ^b	11.20±1.16 ^b
CRE	0.22±0.01 ^b	0.26±0.02 ^{ab}	0.32±0.01 ^a	0.3±0.0 ^a	0.26±0.02 ^{ab}

Values(mean±SE, n=5) with different letters are significantly (P<0.05) different among treatment groups.

Table 7. Effect of dietary energy and feed restriction on WBC differential count in broiler chickens after treatment.

Item	Con	EN85	EN70	FI85	FI70
Neutrophill	9.47±2.87	9.47±2.32	11.63±2.34	11.87±2.53	12.23±1.86
Lymphocyte	72.93±4.49	65.83±8.03	66.87±1.10	65.40±3.29	64.27±2.93
Monocyte	12.13±1.66	16.63±3.55	14.57±1.10	13.87±1.51	14.77±1.67
Eosine	0.20±0.10	0.17±0.07	0.17±0.12	0.30±0.10	0.27±0.07
Basophile	0.43±0.25	0.37±0.17	0.43±0.07	0.37±0.07	0.53±0.09

Values(mean±SE, n=3).

(3) 제한 급여에 따른 면역 유전자 발현

동물체는 생물학적으로 내·외 환경에 반응하여 질병으로부터 면역방어 실시하여 항상성을 유지하고 있다. 면역계는 백혈구(leucocytes)와 림프기관 (흉선 및 F-낭)에서 특이적 및 비특이적 면역 반응에 따라 병원균이나 내적 환경에 저항한다. 비특이적 반응은 주로 염증반응이 발생되고 대식세포 등에 의해 식작용이 발생되며 세포의 비특이적 면역반응은 항체와 T-세포 등의 적응성 반응을 유기시킨다. 적응성 반응은 골수에서 생성되는 줄기(간)세포에서 T-임파구 및 B-임파구가 중요한 기능을 수행한다. 골수의 간세포에서 만들어진 B-세포는 체액성 면역으로 일단 활성화된 T-세포나 흉선에서 활성화되면 5종류의 면역항체(Ig)를 생산하는데 대개 IgG는 전체에서 약 75% 정도 생성되며, IgA는 15% 정도를 차지하며 주로 소장, 눈물, 타액에서 생산된다. IgM은 약 8% 정도, IgD 1%, IgE는 0.02% 정도로서 알러지 또는 염증 반응에 의해 활성화된다. T-세포 역시 골수에서 생성되어 흉선에서 활성화는 세포 매개성 면역작용으로 cytotoxic T-세포는 사이토키인(림포카인)을 생성하여 세포사를 유발하고 대식세포를 유인하여 식작용을 유발한다. Suppressor T-세포는 세포의 감염이 치유되면 면역작용을 종료시킨다. CD4 또는 CD8로 알려진 Helper T-세포는 cytotoxic T-세포의 활성화를 작용하는데 CD4 세포는 Th1과 Th2 두개의 subclass로 분류된다. Th1은 대식세포를 활성화하여 병원체를 사멸하고, 염증을 유발하며 항체를 생성하는데 주로 Interleukin-2(IL-2)와 Interferon-gamma(IFN-gamma)를 분비한다. Th-2은 IgE와 같은 항체를 분비하며 IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-30 사이토카인을 생성한다. 또한 친염증사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 유전자로서는 IL1 β , IL-6, IL-12 β 등이 존재하며, 이들 유전자는 감염부위에 면역세포가 모여드는 작용을 활성화시킨다. 염증 사이토카인은 닭의 단핵구(monocytes)와 같은 여러 가지 면역세포에서 주로 분비된다. 산화질소(NO)는 일종의 신호 물질로 작용해 적절한 수준은 면역계(immune system)에 활성을 부여하고 뇌에서도 중요한 신호전달 역할을 담당한다. 그러나 만약에 산화질소가 과다하게 세포에서 형성되면 세포 사멸을 유도하는데, 이런 영향 때문에 면역, 암발생, 알츠하이머병과 파킨슨병(Parkinson's disease)의 유발에도 산화질소가 관여한다. iNOS 효소는 산화질소를 생산하는데 필요한 촉매 물질로서 iNOS가 억제되면 산화질소 생성이 차단되는 것으로 보고되고 있다.

이와 같은 면역 유전자의 분류에 따라, 본 시험에서는 Th-1 계열유전자인 IL-6, Th1 cytokine 유전자 IFN-gamma 및 Th-2 유전자 IL-4 유전자의 발현을 혈액의 백혈구 및 흉선에서 에너지 및 사료급여량 제한급여에 따라 유전자의 발현을 RT-PCR로 조사하였다. 에너지 및

사료급이량 제한에 따른 혈액 림프구 및 흉선에서 IL-4, IFN-gamma, IL-6, iNOS 등과 같은 사이토카인 발현(14 일령 및 35 일령)에 대한 자료는 Fig 7과 8에서 제시된바와 같다. 7일간 제한급이가 끝난 후 14일령에 도축된 육계의 림프구에서 발현된 사이토카인 유전자 발현 양상을 살펴보면 림프구의 IL-4 및 IFN-gamma 유전자의 발현은 차이가 없었지만, IL-6 발현은 대조구에 비해 FI85(섭취량 85%제한구) 및 FI70(섭취량 85% 제한급이구)에서 유의적으로($p < 0.05$) 감소하는 것으로 관찰되었다. 또한 림프구 iNOS 발현 역시 사료섭취량 및 에너지 제한급이구(EN85, EN70, FI85 및 FI70)에서 자유급이(ad libitum)한 대조구에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 감소되는 것으로 나타났다. 14일령의 닭의 흉선에서 관찰된 결과를 살펴보면, IL-4 유전자는 FI85 및 FI70구에서 현저히($P < 0.05$) 증가된 것으로 나타난 반면, IL-6는 대조구에 비해 FI85 및 FI70구에서 유의적으로($P < 0.05$) 감소되는 것으로 나타났다. 그러나 대조구와 에너지 제한급이구(EN85 및 EN70) 사이에는 IL-4 및 IL-6 유전자발현의 차이가 나타나지 않았다. 한편 흉선 iNOS 발현은 대조구에 비해 에너지 및 사료 섭취량 제한급이구(EN85, EN70, FI85 및 FI70)에서 유의적으로($p < 0.05$) 감소되는 것으로 관찰되었다.

35일령 육계에서 관찰된 결과를 살펴보면 림프구의 IL-4, IL-6 및 IFN-gamma 발현역시 섭취량 및 에너지 제한구 모두 대조구와 비교시 유의적 변화가 나타나지 않는 것으로 관찰되었다(Fig 8). 그러나 림프구의 iNOS 발현은 섭취량 제한급이구 (FI85 및 FI70)에서 유의적으로($P < 0.05$) 감소하는 것으로 관찰되었다. 흉선에서 사이토카인의 발현을 조사한 결과 IL-4, IL-6, IFN-gamma 및 iNOS 유전자는 제한급이에 따른 어떠한 차이가 나타나지 않는 것으로 나타났다. 현재 나타난 결과에서 친염증사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 림프구 및 흉선 IL-6 사이토카인은 대조구에 비해 FI85 및 FI70구에서 현저히 감소하고 흉선에서 항염증사이토카인(anti-inflammatory cytokine)인 IL-4가 제한급이 기간 현저히 감소한 것으로 나타났다. 또한 림프구 iNOS에서도 사료섭취량 및 에너지 제한급이구에서 현저히 감소하는 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과는 제한급이가 혈액 림프구와 흉선과 같은 특정장기에서 세포성 면역작용에 긍정적인 효과를 미치는 것으로 사료된다. Khajavi 등(2003)의 연구에서도 육계성장 초기에 사료섭취량을 제한할 경우 CD4 항체가 증가되고 CD8 림프구는 감소하는 것으로 보고하여 제한급이가 면역작용에 긍정적인 영향을 미친다고 하였다. 그러나 육계에서 절식과 같은 제한급이가 사이토카인에 미치는 영향에 대한 연구보고는 아직 거의 없다. 대부분의 사이토카인 연구는 실험용 쥐를 대상으로 이루어져 이들의 연구를 살펴보면, 랫드와 마우스에서 에너지 제한 절식이 IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alpha 및 IFN-gamma 등과 같은 pro-inflammatory 사이토카인 mRNA 수준을 증가시킨다고 보고하고 있다 (Muthukumar 등, 2000; Bhattacharya 등, 2006). iNOS 역시 IL-1 and TNF-gamma 등과 같은 친염증 반응에 관여하는 사이토카인 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 (Guzik 등, 2003), 절식이 마우스에서 iNOS 발현을 감소시킨다는 결과와 일치하고 있다 (Kim 등, 2006). 그러나 지나치게 다량의 에너지 섭취량을 제한 할 경우 (에너지섭취량의 1/3 수준) 또는 장기간 에너지를 제한 경우에는 오히려 면역장기의 무게를 감소시키는 것으로 보고되고 있다(Payne 등, 1990; Cook, 1991; Hangalapura 등, 2005). Praharaj 등 (1996)의 보고에 따르면 적절한 수준의 에너지 제한 (2,800, 2,650 및 2,500 kcal/kg 대사에너지)에서는 면역장기의 무게에 전혀 영향이 없음을 보고하였다.

이상의 연구 결과를 종합하여 볼때, 육계성장 초기 1주일간 85%의 양적(사료섭취량) 및 질적(에너지) 제한은 오히려 IL-4 및 iNOS와 같은 사이토카인의 발현에 긍정적인 영향을 미치는

것으로 보인다. 또한 초기 1주일 동안 70% 제한급이 한 후 자유급이 하였을 경우에도 육계의 보상성장에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 현재 연구결과로 보아 육계성장에서 완전 자유급이 방법에 의한 과도한 영양소 급여가 항상 동물복지 및 면역작용에 긍정적인 영향을 미친다고 사료되지 않는다. 따라서 사료 급이량의 약 85% 수준의 적절한 사료섭취량 및 에너지 제한급이는 오히려 육계의 생산성에 부정적인 영향을 미치지 않고 면역력 증강을 나타낼 수 있다고 사료된다.

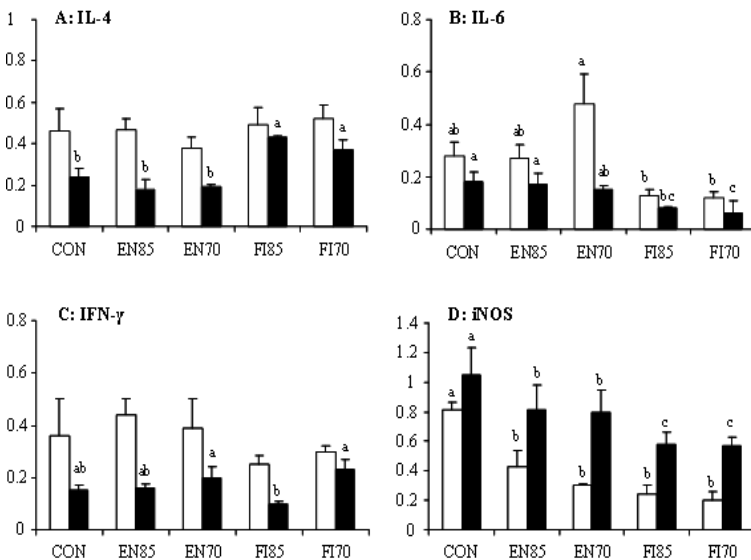


Fig. 7. Semi-quantification of mRNA expressions of IL-4 (A), IL-6 (B), IFN-gamma (C) and iNOS (D) in lymphocytes (□) and thymus (■) in 14-d old broiler chicks fed the diets manipulated by quantitative and qualitative feed restriction (FR) procedure. Levels of all mRNA were expressed as the value of signal intensity for genes relative to that for actin. Values are means per group with standard errors shown by vertical bars.

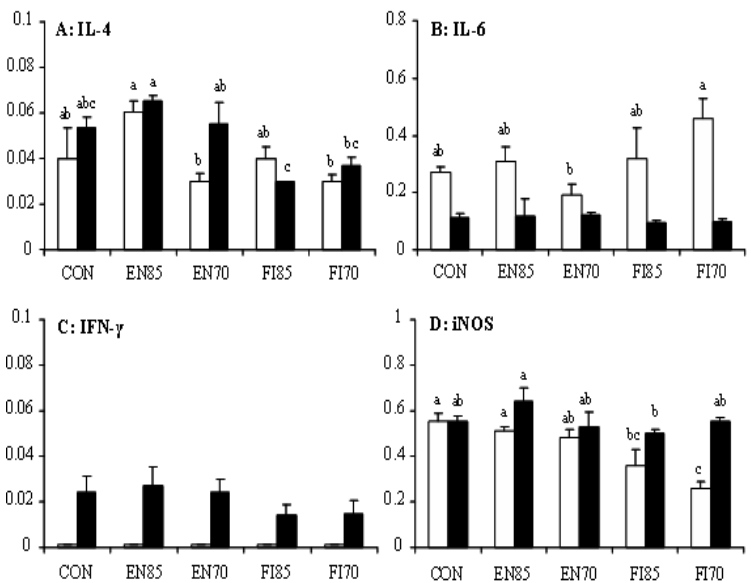


Fig. 8. Semi-quantification of mRNA expressions of IL-4 (A), IL-6 (B), IFN-gamma (C) and iNOS (D) in lymphocytes (□) and thymus (■) in 14-d old broiler chicks fed the diets manipulated by quantitative and qualitative feed restriction (FR) procedure. Levels of all mRNA were expressed as the value of signal intensity for genes relative to that for actin. Values are means per group with standard errors shown by vertical bars.

3. 육계의 급이 방법에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 양상 구명

가. 재료 및 방법

(1) 공시계

본 연구에 이용된 공시계는 실용브로일러(로스종) 240수 및 대조계로 한국재래닭 200수를 대상으로 하였고 처리별 각 5수씩 도살하여 분석 조직을 채취하였다.

(2) 조직 및 혈액 표본 제작

텔로미어의 기준 함량을 분석하고자 재래닭을 대상으로 산란 직후, 부화 1일, 2일 및 3일령 수정란을 파각하여 초기 배자 표본을 제작하고, 발생 조직 표본은 부화 7일, 9일, 13일, 18일째 및 부화 직후 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소를 대상으로 하였으며, 성장단계별 10주령, 30주령, 60주령 및 120주령 개체의 동일 조직을 대상으로 분석하였다. 한편 브로일러의 경우 급여 처리 별 7일령, 14일령 및 35일령 개체의 각 조직들을 떼어 분석하였다. 채집된 조직들은 D-PBS (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA)용액으로 세척 한 다음 RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA) 배양액이 들어있는 시험관으로 옮겨 200×g에서 10분간 원심분리 시켰다. 침전된 세포에 0.9% sodium citrate (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)용액을 첨가하여 15분간 저장처리하고 이후 고정액을 10방울 정도 첨가하여 원심분리 시켰다. 고정처리는 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 이용하고 이를 3회 반복 처리한 후 세포액을 3~5방울 정도 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하였다.

백혈구세포 표본의 제작은 개체의 날개 정맥으로부터 약 5ml의 혈액을 채취하여 백혈구만 순수 분리하여 이용하였다. 순수 백혈구의 분리는 손과 류 (1999)가 제시한 Ficoll (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)을 이용한 분리방법으로 시행하였고 분리된 세포는 0.06M KCl (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 이용하여 실온에서 15분간 저장 처리하였다. 저장처리가 끝나면 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 10 방울정도 첨가한 후 원심분리하고 이 후 동일 고정액으로서 3회 정도 반복 처리한 후 슬라이드 표본을 제작하였다.

(3) Q-FISH

FISH용 probe 제작을 위하여 (CCCTAA)₇으로 구성된 42mers 단일 oligomers를 primer로 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 수행하고 이의 증폭된 산물을 PCR-DIG Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로서 digoxigenin labeling을 하였다.

본 연구에서 수행한 FISH 방법은 조 등(2005)이 제시한 닭의 초기 배자 및 발생 조직에 대한 telomeric DNA분석을 위한 FISH법과 동일하게 실시하였다. 이를 간단하게 소개하면 슬라이드 표본을 RNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 에탄올로 탈수 건조시켰다. 이후 Hybridization 용액 (13μl formamide, 5μl hybridization buffer, 2μl(100ng/μl) chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨린 후 밀봉하고 85°C에서 5분간 변성(denaturation)시킨 후 38.5°C에서 12시간이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2×SSC로서 72°C에서 5분간 처리하고 실온의 PN buffer (0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로 세척하였다. 형광 접합 탐지를 위하여

anti-digoxigenin-fluorescein (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 처리하고 커버 글라스로 덮은 후 38.5°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 PN buffer로 세척하고 암소에서 건조시켰다. 배경염색은 propidium iodide solution (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮고 암소에서 건조시킨 후 검경하였다. 형광 접합 발현 양상은 523nm 파장대의 필터 (WIB filter)를 부착한 형광 현미경 (Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 처리된 슬라이드를 형광현미경으로 관찰한 후 100배의 대물렌즈 하에서 평균 5개의 간기 상을 한 프레임으로 하여 디지털 카메라 (Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하고 이를 컴퓨터에 저장하였다. 저장된 상은 이미지 분석 프로그램 (Image analyzer program, MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 대비 telomeric DNA 분포량을 분석하였다.

(4) TRAP

텔로머레이스 활성도의 분석은 Kim과 Wu(1997)가 제시한 TRAP방법을 이용하였다. TRAP의 수행은 Telomerase Detection Kit (Intergen Company, Purchase, NY, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 다음과 같이 실시하였다. 채취한 각 조직들은 3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propane-sulfonate (CHAPS) lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하고 정량하였다 (Bradford, 1976). 분리된 ribonucleoprotein을 대상으로 PCR을 수행하였고 이의 조건은 30°C에서 30분간 TS-telomerase product를 신장시킨 다음 94°C 30초, 59°C 30초 및 72°C에서 30초간 3단계로 35 사이클을 실시하였다. 증폭된 텔로머레이스는 15% polyacrylamide 겔 (Promega, Madison, WI, USA) 전기영동을 통해 75V에 이어 100V에서 2시간동안 실시하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma Chem, St Louis, MO, USA)로 염색한 후 ladder를 확인하였다.

(5) 통계분석

닭의 조직간 및 성장 주령 간 세포내 telomeric DNA 함량을 비교분석하기 위하여 SAS 통계 패키지 (SAS, 2000)를 이용하여 ANOVA/Turkey법으로 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 닭 발생 단계별 조직의 텔로미어 함량 분석

초기 배자 및 발생 개체 각 조직들의 텔로미어 함량 분석을 위하여 산란 직후 수정란 및 1일령, 2일령 배반과 부란 7일령, 13일령 및 부화 직후 병아리의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직을 대상으로 양적형광접합보인법 (quantitative fluorescence in situ hybridization; Q-FISH)을 수행하였다. 분석할 발생 개체의 각 조직은 실체현미경하에 채집한 후, 표본을 제작하여 FISH를 수행하고, 형광현미경하에서 5~6개의 세포 간기상을 한 개의 프레임으로 이미지를 획득하였다. 획득한 50개 이상의 이미지상을 이미지 분석 프로그램을 이용하여 각 조직별 세포내 텔로미어 함량을 분석하였다.

Table 8은 닭의 초기 배반 세포의 telomeric DNA의 상대적 함유율을 분석 제시한 것이고, Table 9는 닭의 발생 단계별 각 조직 세포의 telomeric DNA 함유율로서 부란 7일령, 13일령 및 부화 직후 병아리의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직의 분석 값이다. 이상의 분석 결과로부터 닭의 초기 배자상태에서는 발생 일령에 따른 배반 세포의 텔로미어 함량의 변화는 거의 없는

것으로 나타났다. 이러한 결과는 배반의 경우 조직 분화의 잠재성을 가진 증식성 세포이기 때문에 초기 분열단계에서 양적 변화 없이 지속적으로 높은 함유율을 나타내는 것으로 사료된다. 반면 발생 과정 중 기관 형성 이후 발육 단계가 진행됨에 따라 조직 내 텔로미어의 함유율은 감소되는 양상을 나타내었는데, 특히 간, 뇌, 심장 조직의 경우 발생이 진행되면서 유의적인 감소를 나타내고 있다. 그러나 생식선 조직인 정소와 신장에서는 발생 진행에 따른 함유율의 변화는 거의 없는 것으로 나타나는데 정소 조직의 경우 이를 구성하는 세포들이 지속적 분열 세포들이기 때문에 발생 기간에 따른 텔로미어 함량의 변화는 없는 것으로 생각되며, 이러한 결과는 사람을 포함한 포유동물에서도 동일 양상임이 확인 된 바 있다 (Bekaert 등, 2004). 하지만 비 증식성 세포인 신장 조직의 특이적인 양상은 신장 조직 중 사구체 세포가 표본의 대부분을 차지한 것에 기인된 것이라 사료되어 신장 조직을 구성하고 있는 세포의 특이성에 대해서는 또 다른 생리학적 연구가 뒷받침되어야 한다고 생각된다. 한편 동일 발생 시점의 조직 간 텔로미어 함유율에서도 유의적 차이를 나타내고 있는데 정소 및 초기 배자의 세포가 신장, 심장, 간, 뇌에 비해 월등히 높게 나타났다. 이러한 결과는 Taylor와 Delany (2000)가 텔로미어 제한 단편 길이 측정법 (telomere restriction fragment; TRF)으로 닭 발생 시 조직별 분석에서 텔로미어의 길이가 생식선 조직이 체세포 조직에 비해 평균 0.4 kb가 길고, 심장 세포보다는 무려 1.1kb가 길었다는 보고를 재 입증하는 결과라 할 수 있겠다.

닭의 초기 배 및 발생 과정 중 각 조직별 세포내 텔로미어의 함량을 Q-FISH 방법에 의해 분석한 것은 본 연구가 처음 시도한 것으로 분석 결과에서 나타난 발생 시기별, 조직별 텔로미어 함유율의 차이는 세포적 특이성을 설명할 수 있는 훌륭한 표지(marker)로 사료된다.

Table 8. The relative amounts of telomeric DNA in early chicken embryonic cells

	Number of analyzed cells	Percentage of telomeric DNA
Day-0 embryos	1,000	2.71±0.11
Day-1 embryos	1,000	2.49±0.10
Day-2 embryos	1,000	2.49±0.08

The values are means ± standard errors

Table 9. The relative amounts of telomeric DNA in chicken tissues during developmental stages

	No analyzed cells	Developmental tissues					Total mean
		Liver	Brain	Heart	Kidney	Testis	
Day-7 fetus	250	2.22±0.09 ^a	2.17±0.11 ^a	2.13±0.11 ^a	2.28±0.09 ^a	2.61±0.10 ^a	2.29±0.10 ^a
Day-13 fetus	250	1.89±0.08 ^{ab}	1.88±0.10 ^{ab}	2.01±0.10 ^{ab}	2.12±0.10 ^a	2.79±0.13 ^a	2.13±0.10 ^{ab}
Hatched	250	1.78±0.11 ^b	1.72±0.12 ^b	1.83±0.10 ^b	2.13±0.12 ^a	2.54±0.14 ^a	2.00±0.12 ^b

The values are means ± standard errors

^{a,b}Means with different superscripts in the same column significantly differ at p<0.01

(2) 닭 발생 단계별 조직의 텔로머레이스 활성도 분석

닭의 배 발생단계별 각 신생 조직에 대한 텔로머레이스 활성도를 TRAP법으로 비교 분석하였다. Fig. 9는 닭의 초기 배자 (whole embryo) 및 부화 7일령 이후부터 개체 발생시까지 각 발생 일령별 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직에 대한 TRAP 분석 결과이다.

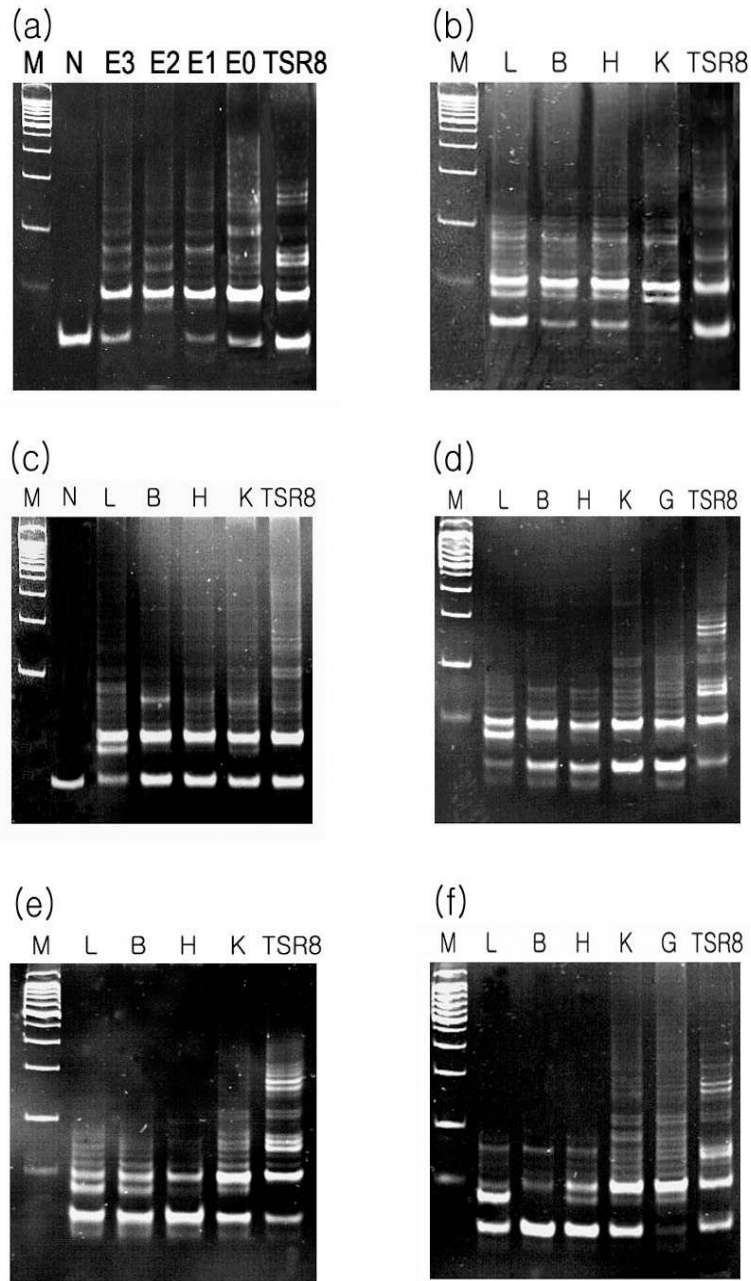


Fig. 9. Telomerase activity of whole embryos, liver, brain, heart, kidney and gonad tissues during chicken developmental stages; Samples from 0 to 3-days whole embryos (a), 7-days fetus (b), 9-days fetus (c), 13-days fetus (d), 18-days fetus (e), and hatched chicken (f). M: 100bp size marker, E0, E1, E2, E3: 0, 1, 2, 3-days whole embryos, N: negative control, L: liver, B: brain, H: heart, K: kidney, G: gonad, TSR8: positive control

본 Fig.에서 가장 아래의 층은 primer-dimer이고, 그 윗 층은 36 bp 위치의 substrate internal control (S-IC)을 나타내며, 이후 50 bp부터 텔로머레이스 활성도가 증가할 때마다 6 bp씩 telomeric DNA의 band가 부가하여 나타난다. 분석 결과, 초기배자에서는 지속적으로 강한 텔로머레이스의 활성도를 보이며, 7~9일령 부란 개체의 모든 조직에서도 비교적 강한 활성을 나타내었다. 하지만 9일령 이후 간, 뇌, 심장 조직의 텔로머레이스 활성도는 현저하게 떨어지는 반면 신장, 정소 조직에서는 지속적인 활성을 보였다. 이러한 결과는 초기 배자 및 생식선 조직은 증식성 세포들로서 분열능력이 높고 많은 세포들이 미분화 단계임에 따라 텔로머레이스의 지속적인 활성을 나타내고, 간, 뇌, 심장 조직의 경우 거의 비 증식성 세포들로 구성되어 있음으로 분화가 완료되는 시점에서부터 텔로머레이스의 활성도가 떨어지는 것으로 보인다. 사람의 경우에도 발생 단계에서 조직의 분화가 일어난 후 곧바로 대부분의 조직에서 텔로머레이스의 활성도가 감소되는데 심장, 뇌, 간, 폐, 근육, 신장의 순으로 활성 양상이 없어지며, 신생자 및 성체에서 생식선이나 골수를 제외한 거의 모든 조직에서 텔로머레이스 활성도는 나타나지 않는다고 알려져 있다 (Ulaner 등, 1998, 2001; Wright 등, 1996, 2001). 또한 소의 경우에서도 생식세포 및 초기 배자 상태, 즉 상실배 (morula)나 포배 (blastocyst)상태일 때 이들의 활성도가 발생 조직에 비해 상대적으로 높고 조직의 분화 이후 감소한다고 보고하고 있다 (Betts 와 King, 1999; Xu 와 Yang, 2000). 닭의 발생 과정 중 텔로머레이스의 활성 양상도 연구자간에 다소의 이견은 있으나 사람과 거의 유사하다고 보고하고 있다 (Taylor와 Delany, 2000; Delany 등, 2003). 즉, 초기 배자 단계에서 강한 텔로머레이스의 활성도를 보이다가 부란 10일경부터 뇌, 간, 심장, 근육 조직의 텔로머레이스의 활성이 감소하기 시작하여 부란 17일 이후부터 거의 없어지며, 폐와 신장 조직은 부화 시까지 감소가 지속되다가 신생자 이후 없어지고, 증식성 조직이라 할 수 있는 면역조직과 생식선 조직은 생후에도 지속적 활성을 나타낸다고 하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 분석된 결과와 거의 일치되는 것으로 부란 9일령 이후 발생 조직들의 텔로머레이스 활성도가 급격히 감소하는 양상은 닭의 배 발육 과정 중 부란 10일이 지나면 모든 조직이 형성되고 이후 분화 조직들이 발달단계에 들어감에 따라 세포 증식이 비 활성화되는 것과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

따라서 닭의 발생 단계별 텔로머레이스 활성도는 일령 및 조직에 따라 각기 다른 활성 양상을 보이며, 재생 능력이 있는 증식성 세포는 지속적인 활성 (constitutive activity)을 나타내고, 비 증식성 세포는 발생이 진행됨에 따라 텔로머레이스 활성도가 점진적으로 떨어지는 감소 (down-regulation) 양상을 보인다. 특히, 조직별 세포의 분화 및 증식성 특이성과 텔로머레이스 활성도 간에는 매우 밀접한 관련이 있으며, 더불어 본 분석에서 나타난 텔로미어의 양적 분석과도 매우 높은 상관관계가 있는 것으로 보여 닭의 경우 세포내 텔로미어의 함량은 텔로머레이스의 활성도에 절대적으로 영향을 받는 것으로 사료된다.

(3) 닭의 주령별 각 조직의 텔로미어 함량분석

닭 염색체의 telomeric DNA 분포 양상을 분석하고자 telomeric DNA probe를 이용하여 FISH를 수행한 바 이의 양상은 Fig. 10과 같다. 한국 재래닭 염색체의 텔로미어의 분포 양상은 모든 염색체 양 말단부에 이의 분포가 확인되었고, 1번, 2번 및 3번 염색체에는 양 말단뿐만 아니라 interstitial telomeres가 존재함을 확인하였다. 본 연구 결과에서 나타난 한국 재래계 염색체의 텔로미어의 분포 양상은 Nanda 등 (2002)이 제시한 닭의 염색체상 텔로미어 분포 양상과 거의 일치하였으며, 닭에 있어 interstitial telomeric DNA의 존재 양상은 Nanda와 Schmid

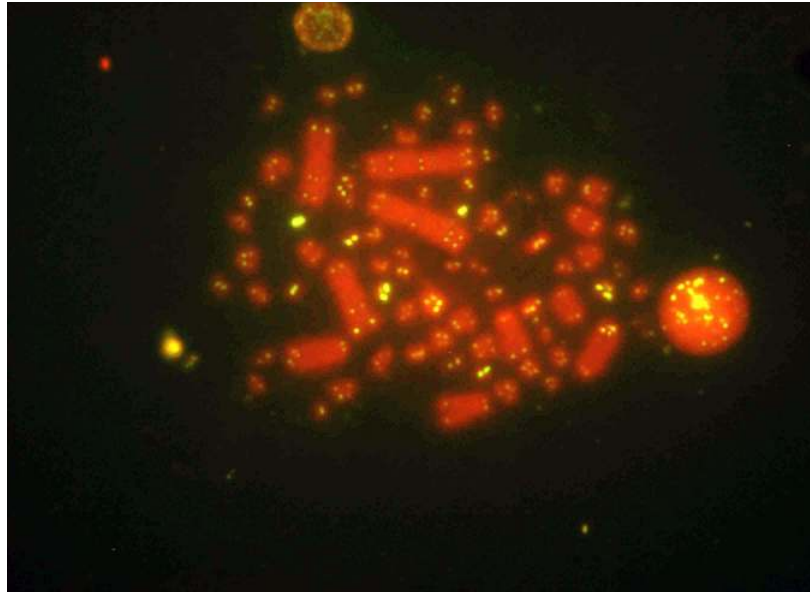


Fig. 10. Telomere distribution on Korean Native Chicken chromosomes by FISH using telomeric DNA probe

(1994) 및 Nanda 등 (2002)이 보고한 바 있다.

한국 재래닭의 발육, 성장, 노화단계의 각 조직에 대한 텔로미어의 양적분포 양상을 분석하기 위하여 발생시, 10주령, 30주령, 60주령 및 120주령 개체들의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 및 혈액 세포에 대한 Q-FISH를 수행하였다. 분석 결과 주령별 각 조직의 세포들에 대한 평균 telomeric DNA의 함유율은 Table 10에 제시된 바와 같고 이의 변화 양상을 Fig. 11에 제시하였다.

Table 10. The relative amount of telomeric DNA in each cell from several tissues along with aging in Korean Native Chicken

	No. of analyzed cells	Post-natal tissues						Total
		Kidney	Brain	Heart	Liver	Gonad	Blood	
Hatched	250	2.13±0.12 ^b	1.72±0.12 ^a	1.83±0.10 ^a	1.78±0.11 ^a	2.54±0.14 ^{ab}	N/A	2.00±0.12 ^a
10 Wks	1,000	2.44±0.08 ^a	1.78±0.06 ^a	1.75±0.05 ^a	1.69±0.05 ^a	2.78±0.11 ^a	2.61±0.05 ^a	2.13±0.08 ^a
30 Wks	1,000	1.71±0.05 ^c	1.71±0.06 ^a	1.67±0.05 ^a	1.69±0.05 ^a	2.41±0.11 ^{bc}	2.20±0.03 ^b	1.85±0.06 ^b
60 Wks	1,000	1.62±0.04 ^d	1.63±0.04 ^a	1.68±0.05 ^a	1.63±0.05 ^a	2.17±0.09 ^c	2.17±0.03 ^b	1.82±0.05 ^b
120 Wks	1,000	1.67±0.04 ^c	1.31±0.03 ^b	1.47±0.05 ^b	1.29±0.04 ^b	2.43±0.08 ^{bc}	2.02±0.06 ^c	1.65±0.05 ^c
Total		1.88±0.07 ³	1.61±0.06 ⁴	1.65±0.06 ⁴	1.59±0.06 ⁴	2.46±0.11 ¹	2.23±0.04 ²	

The values are means ± standard errors

^{a,b,c,d}Means with different superscripts in same column significantly differ at p<0.01

^{1,2,3,4}Means with different superscripts in same row significantly differ at p<0.01

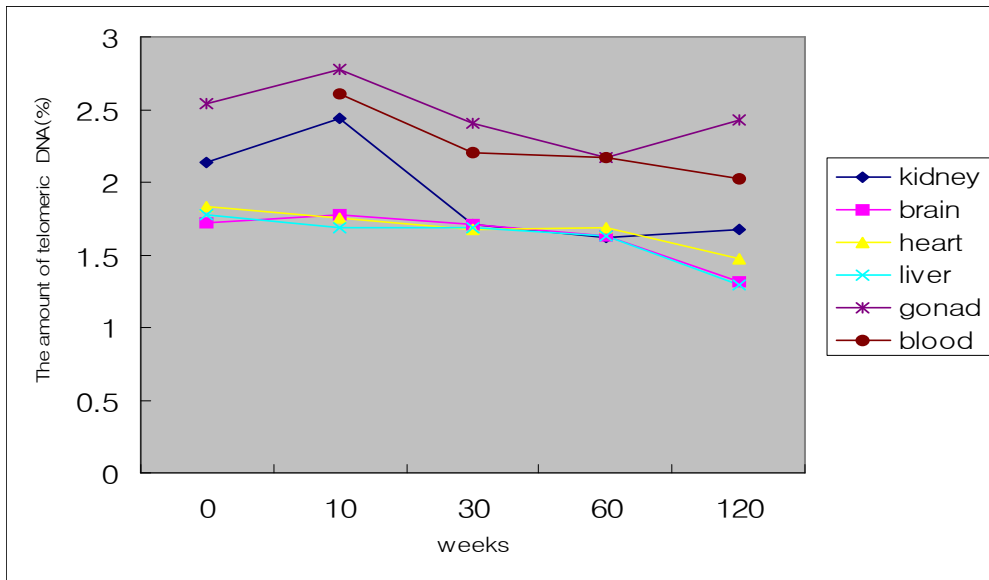


Fig. 11. The changes of telomeric DNA in several tissues along with aging in Korean Native Chicken.

한국 재래계의 세포내 telomeric DNA의 함유율은 계놈 당 1.3~2.8% 정도로 분석되었으나 동일 개체 내 조직 간 및 성장 주령 간 함유율에서 매우 큰 차이를 나타내고 있다. 닭이 발육, 성장하여 노화에 이르기까지 대부분의 조직에서 텔로미어 함유율은 유의적으로 감소되는 양상을 보였다. 특히 발육, 성장이 완료되는 30주령 단계와 노화 단계라고 할 수 있는 120 주령시 텔로미어의 함유율은 이전 단계에 비해 급진적 감소됨을 나타내고 있다. 한편 조직 간 telomeric DNA 함유율에 있어서도 많은 차이를 보이는 바 특히 정소와 백혈구세포 내의 텔로미어 함유율은 모든 주령에서 다른 조직내 세포에 비하여 상대적으로 높은 수준의 함유율을 나타내었다.

Fig. 12는 동일 주령 내 조직 간 및 동일 조직 내 주령 간 텔로미어의 분포 양상을 비교 제시한 그림으로서 60주령 개체의 정소 세포와 간 세포 및 10주령과 120주령의 백혈구 세포의 대표적 FISH 양상이다. 본 그림의 백혈구 세포에서 나타난 바와 같이 연령이 증가함에 따라 telomeric DNA의 분포 양상은 극단적으로 감소됨을 확인 할 수 있었고, 동일 연령에서 정소 세포와 간 세포의 비교에서 정소 조직 내 세포들의 텔로미어 함유율이 간 세포에 비해 월등히 높은 분포 비율을 나타내고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 조 등(2005)이 닭의 발생 과정 중 기관 형성 이후 발육 단계가 진행됨에 따라 조직 내 텔로미어의 함유율은 감소되는 양상을 나타내었다는 보고와 더불어 부화 후 개체의 성장, 노화 단계에서도 모든 세포내 텔로미어의 감소 양상을 나타내고 있는 것이다. 또한 조 등(2005)이 초기 배자 세포 내 평균 telomeric DNA 함유율을 2.56%로 제시한 것을 참고로 본 연구에서 발생 직후 개체의 함유율이 2.0%, 30 주령시 1.85%, 120주령시 1.65%로 분석됨에 따라 닭은 배자 발생에서부터 출생 후 연령의 증가에 따른 지속적인 텔로미어의 감소를 의미하는 것이다. 닭의 연령 증가에 따른 telomeric DNA의 감소는 모든 조직 내 세포들에서 공통적으로 나타나는 양상이며 특히 노화 단계라 할 수 있는 120주령시 이의 감소율이 급격히 높아짐을 나타내었다.

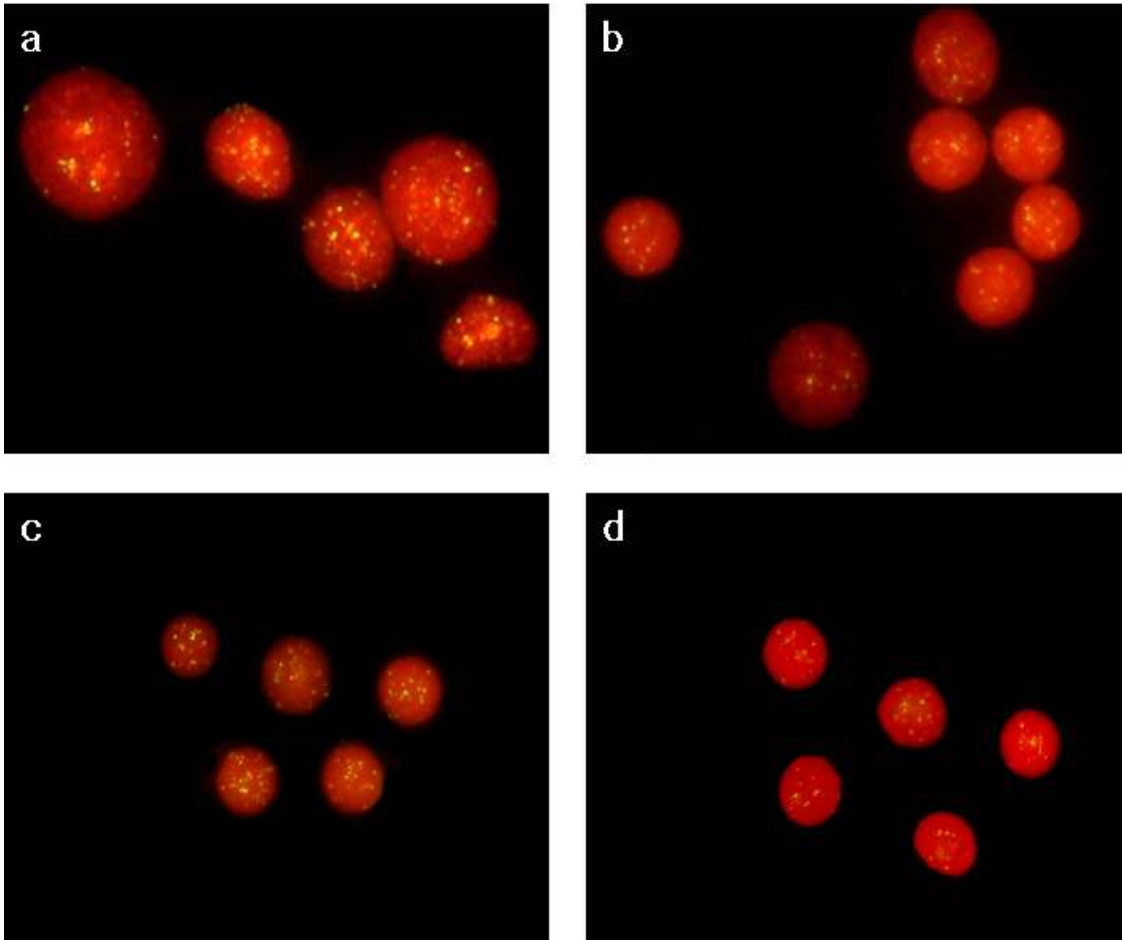


Fig. 12. The representative telomere distribution patterns of interphase nuclei in Korean Native Chicken by FISH using telomeric DNA probe; (a) testis cells from 60 wks chicken, (b) liver cells from 60 wks chicken, (c) lymphocytes from 10 wks chicken, (d) lymphocytes from 120 wks chicken.

이는 텔로미어가 노화와 밀접한 관련을 지닌다는 여러 보고들을 재 입증하는 것으로 닭에 있어서도 생리적 연령에 따른 세포내 텔로미어의 감소를 재 확인하는 것이다 (Harley, 1991; Counter, 1996; Engelhardt와 Martens, 1998; Cottliar와 Slavutsky, 2001; Sohn 등, 2002; Shay 와 Wright, 2005). 또한 본 연구에서 제시한 닭의 주령별 각 조직의 텔로미어 함량 분석 결과는 Delany 등 (2003)이 분석한 닭의 이배체내 텔로미어 함유율 3~4%보다는 다소 낮은 수치이기는 하나 이는 분석 방법의 차이인 것으로 생각되며, 사람이나 포유류에 비해서는 월등히 높은 함유율을 나타낸다는 보고와는 일치된 결과이다. 한편 동일 연령에서 조직 간에도 텔로미어 함유율의 유의적인 차이를 보이고 있는데 증식성 세포인 정소내의 함유율이 비 증식성 세포들에 비해 월등히 높은 분포율을 나타내었다. 이는 정소 조직의 경우 이를 구성하는 세포들이 증식성 분열 세포들이기 때문에 지속적인 텔로머레이스의 영향을 받고, 연령이 증가하더라도 세포 증식성은 유지하기 때문이다. 이러한 결과는 사람을 포함한 포유동물에서도 동일 양상임이 확인 된 바 있으며 (Bekaert 등, 2004) Taylor와 Delany (2000)가 텔로미어 제한 단편 길이 측정법 (TRF)으로 닭 발생 시 조직별 분석에서 텔로미어의 길이가 생식선 조직이 체세포 조직에 비해 평균 0.4 kb가 길고, 심장 세포보다는 무려 1.1kb가 길었다는 보고를 재 입증하는 결

과라 할 수 있겠다. 따라서 증식성 세포로 알려진 정소 조직과 비 증식성 세포인 간, 뇌, 심장 조직의 telomeric DNA의 분포율을 분석함으로써 조직별 세포의 분화 및 증식 특이성과 텔로미어 함량간의 밀접한 상관성을 확인하였다.

(4) 닭의 주령별 각 조직의 텔로머레이스 활성도 분석

한국 재래닭의 발육, 성장, 노화 단계별 각 조직에 대한 텔로머레이스 활성도를 비교 분석하기 위하여 발생시, 10주령, 30주령, 60주령 및 120주령 각 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소조직을 대상으로 TRAP을 시행하였다. TRAP 방법은 3' 말단 substrate oligonucleotide에 telomeric repeat가 반복되고, TS와 RP primer를 이용하여 PCR로 확장된 산물이 증폭되는 원리를 이용한 것이다.

Fig. 13은 닭의 성장 주령별 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직에 대한 TRAP 분석 결과이다. 본 그림에서 가장 아래의 층은 primer-dimer이고, 그 윗 층은 36 bp 위치의 substrate internal control (S-IC)을 나타내며, 이후 50 bp부터 텔로머레이스 활성도가 증가할 때마다 6 bp씩 telomeric DNA의 band가 부가하여 나타난다. 분석 결과, 발생 이전 모든 조직의 세포들에서 텔로머레이스의 활성도를 나타내고 있으나 발생 이후 성장 단계가 진행됨에 따라 이의 활성도가 서서히 약해지면서 10주령시 정소 조직을 제외하고는 모든 조직에서 미약한 텔로머레이스 활성을 보였다. 그러나 성 성숙 이후 노화 단계에서는 정소 조직을 제외한 다른 조직들에서는 거의 텔로머레이스 활성이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 이론적인 닭의 성장 과정과 매우 밀접한 관련성이 있는 결과로 보여 지는데 닭의 성장과정을 살펴보면, 0~20주령까지는 발육이 가장 왕성한 시기이며, 20주령에 들어서면 성 성숙이 이루어지고, 30주령이 되면 신체적 성 성숙이 완료되고 지방이 증가되기 시작하며 근육이 발달되어 진다고 알려져 있다. 따라서 성장 시기에 따른 조직별 세포 분화와 증식성 특이성을 텔로머레이스 활성도에서 잘 보여주고 있는 결과라 할 수 있겠다. 생식선 조직은 증식성 세포들로서 분열능력이 높고 많은 세포들이 미분화 단계임에 따라 텔로머레이스의 지속적인 활성을 나타내고, 간, 뇌, 심장 조직의 경우 거의 비 증식성 세포들로 구성되어 있음으로 분화가 완료되는 시점에서부터 텔로머레이스의 활성도가 떨어지는 것으로 보인다. 사람의 경우에도 발생 단계에서 조직의 분화가 일어난 후 곧바로 대부분의 조직에서 텔로머레이스의 활성도가 감소되는데 심장, 뇌, 간, 폐, 근육, 신장의 순으로 활성 양상이 없어지며, 신생자 및 성체에서 생식선이나 골수를 제외한 거의 모든 조직에서 텔로머레이스 활성도는 나타나지 않는다고 알려져 있다 (Ulaner 등, 1997; Wright 등, 1996). 닭에 있어서도 기관형성 이후 신생 개체의 체세포는 증식성이 강한 세포 및 생식세포를 제외하고는 출생 후 텔로머레이스 활성이 나타나지 않는다는 보고가 있다 (Taylor 와 Delany, 2000).

이상의 결과를 종합하면, 닭의 발육, 성장, 노화 단계별 텔로머레이스 활성도는 주령 및 조직에 따라 각기 다른 활성 양상을 보이며, 증식성 세포는 지속적인 활성 (constitutive activity)을 나타내었고, 비 증식성 세포는 성장이 진행됨에 따라 텔로머레이스 활성도가 떨어지는 down-regulation 양상을 보였다. 따라서 닭의 조직별 세포의 분화 및 증식성 특이성과 텔로머레이스 활성도 간에는 매우 밀접한 관련이 있으며, 더불어 텔로미어의 양적 분포와도 매우 높은 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

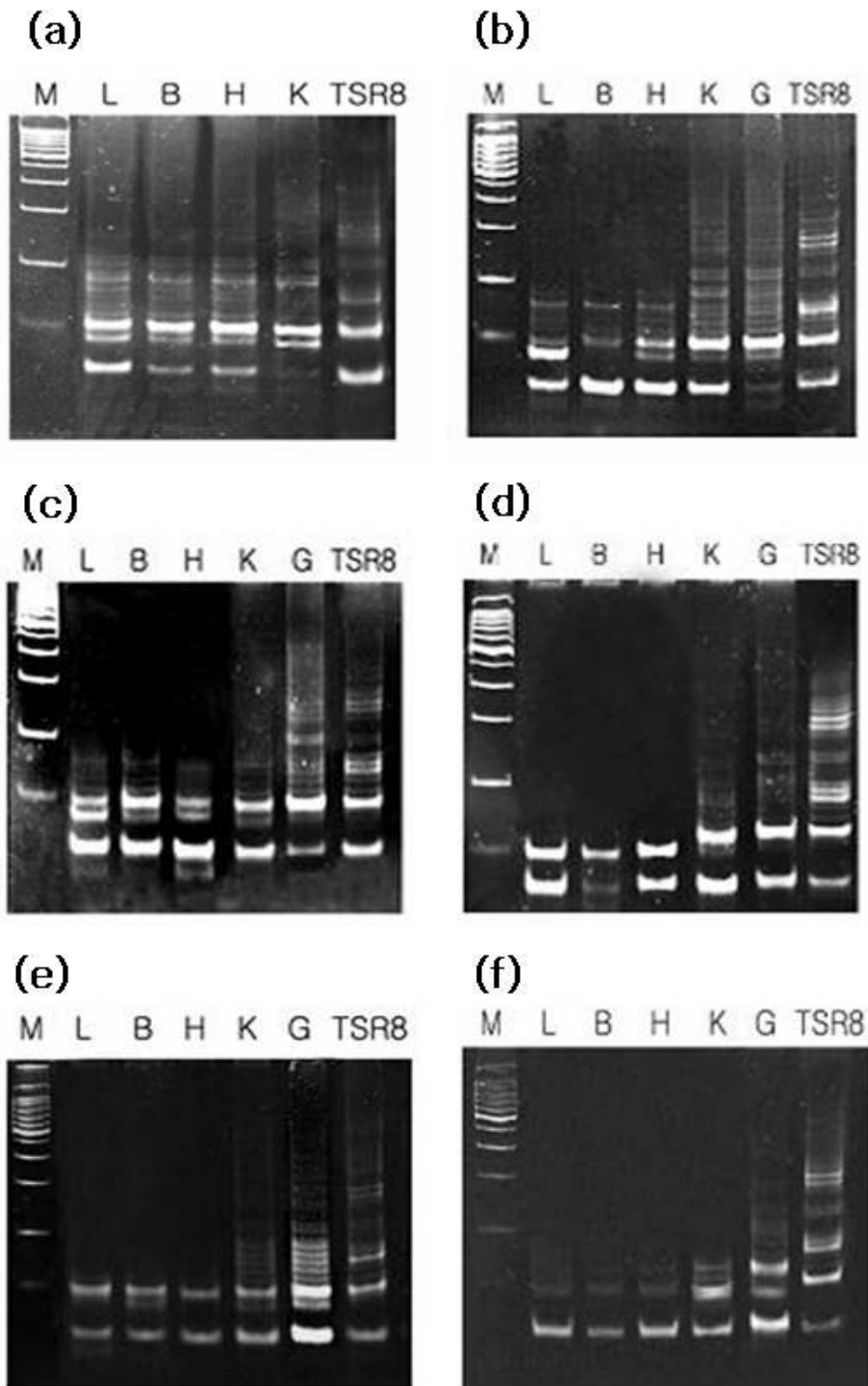
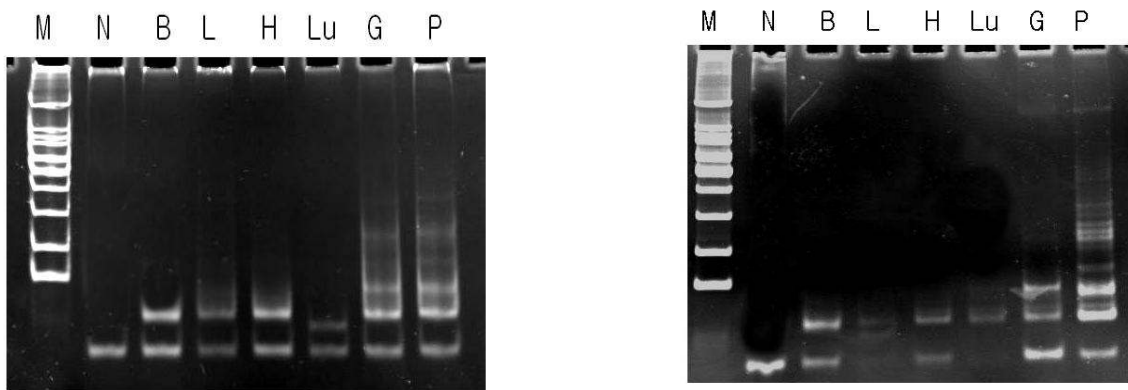


Fig. 13. TRAP assay with liver, brain, heart, kidney and testis cells along with age in Korean Native Chicken; Samples from 7-days fetus (a), hatching (b), 10 wks chicken (c), 30 wks chicken (d), 60 wks chicken (e) and 120 wks chicken (f), M: 100bp size marker, N: negative control, L: liver, B: brain, H: heart, K: kidney, G: testis, TSR8: positive control

(5) 제한급이에 따른 브로일러 각 조직의 텔로미어 함량분석 및 텔로머레이스 활성도 분석
 실용 브로일러를 대상으로 급이 에너지 제한 및 급이량의 제한이 세포의 생리적 활성도에 미치는 영향을 살펴보고자 개체의 각 조직별 세포들의 텔로미어 함량 및 텔로머레이스 활성도

를 분석하였다. 대조구(CON)는 관행적인 자유채식(ad libitum)을 시켰고, 섭취 에너지 제한은 NRC 사양 표준의 85% 수준 제한구(EN85) 및 70% 제한 급여구(EN70)로 하였으며, 섭취량 제한구는 사양표준 급여량의 85% 및 70% 제한 급여를 하였다. 각 처리별 7일령에서부터 14일령까지 급여 시험을 실시하였으며 14일령과 35일령에 처리별 5수씩 도살하여 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 세포의 텔로머레이스 활성도와 텔로미어의 함유율 분석하였다.

텔로머레이스 활성도의 분석 결과 Fig. 14에서와 같이 14일령과 35일령 공히 급여 처리간 활성도의 차이는 보이지 않았으며 이전 분석에서와 같이 증식성 세포인정소 세포에서만 positive activity를 나타내었다. Q-FISH 방법에 의한 처리별 각 조직 세포들의 텔로미어의 함량 분석은 Table 11과 12에 제시된 바와 같다. 14일령과 35일령 간 모든 조직의 세포에서 공히 일령이 증가함에 따라 현저한 텔로미어 함유율의 감소를 나타내고 있는데 이는 telomere가 age-dependent 함을 재차 확인하는 결과로서 노화 관련 bio-marker로서 충분한 활용 가능성을 시사한다 하겠다. 급여 처리간 분석에 있어 제한 직후인 14일령 개체의 백혈구, 간, 폐, 심장 및 정소 세포 등 모든 조직에서 급여 제한구와 대조구간에 텔로미어 함유율의 차이는 보이지 않았다. 그러나 시험 종료시 35일령에서는 모든 제한 급여 처리 개체들의 보상 효과가 나타나면서 급여 제한구가 대조구에 비해 훨씬 높은 텔로미어 함유율을 나타내었다. 특히 증식성 세포들인 백혈구, 간, 정소세포의 경우 유의적 차이($p < 0.01$)를 보여 세포 활성도의 긍정적 효과를 나타내었다. 이들 중 에너지 제한 85% 급여구의 경우 제한 급여의 효과가 다른 처리구에 비해 보다 바람직한 효과를 나타내었다. 이는 초기 제한 급여가 개체들의 텔로미어 감축을 상대적으로 적게하여 노화의 진행 양상을 지체시키는 경향을 나타낸 것이다. 이상의 결과로부터 브로일러에 있어 사육 초기 적절한 제한 급여는 후기에 생산성의 감소없이 개체의 생리 활성적 측면에서 바람직한 양상을 나타냄으로 기존 육계 사육에 널리 이용되는 사료의 에너지가 및 사육 방식이 제고되어야 할 것으로 생각된다.



14 days

35 days

Fig. 14. TRAP assay with brain, liver, heart, lung and testis cells of broiler at 14 days and 35 days

Table 11. Effect of dietary energy and feed restriction on the amount of telomeric DNA of intephase nuclei in the tissues of broiler chickens at 14 days

Item	Con	EN85	EN70	FI85	FI70
blood	2.00±0.65	2.07±0.52	2.23±0.50	1.90±0.59	1.81±0.64
liver	2.00±0.65	2.07±0.52	2.23±0.50	1.90±0.59	1.81±0.64
lung	2.07±0.45	1.99±0.27	2.01±0.58	1.88±0.64	1.72±0.42
heart	1.83±0.95	N/A	N/A	2.08±0.61	2.19±0.79
testis	2.09±0.67	2.01±0.30	2.17±0.45	1.99±0.44	2.31±0.33

Values(mean±SD, n=3-5) are represented as the percentage of telomeric DNA in each genome by Q-FISH

Table 15. Effect of dietary energy and feed restriction on the amount of telomeric DNA of intephase nuclei in the tissues of broiler chickens at 35 days

Item	Con	EN85	EN70	FI85	FI70
blood	1.59±0.39 ^b	1.88±0.40 ^a	1.96±0.39 ^a	1.78±0.34 ^{ab}	1.98±0.52 ^a
liver	1.77±0.55 ^{ab}	2.07±0.60 ^a	1.65±0.65 ^{ab}	1.78±0.34 ^{ab}	1.54±0.52 ^b
lung	1.52±0.62	1.58±0.31	1.70±0.57	1.57±0.43	1.24±0.57
heart	N/A	1.28±0.60	1.07±0.27	N/A	N/A
testis	1.39±0.47 ^b	1.90±0.62 ^a	1.53±0.39 ^{ab}	1.69±0.38 ^{ab}	1.56±0.12 ^{ab}

Values(mean±SD, n=3-5) are represented as the percentage of telomeric DNA in each genome by Q-FISH

2절 생리활성 물질 첨가 급여에 따른 유용유전자 발현양상 구명과 실용 표지유전자 발굴

1. 육계에서 가시오갈피와 두충의 첨가 급여가 항산화효소, 지방 및 근육 관련 유전자 발현에 미치는 영향

국민의 소득수준과 의식수준의 향상은 국민들의 소비형태에도 영향을 미치고 있다. 과거의 양적인 소비에서 질적인 소비 즉, 안전하면서도 질 좋고 우수한 축산물을 선호하는 방향으로 소비가 변하고 있다. 따라서 축산물생산자도 축산물의 생산성을 향상시키기 위한 생산기술에서 친환경축산물 생산을 위한 기술개발에 심혈을 기울이고 있다. 가금산업도 친환경적, 건강지향적인 방법 즉, 식품안전성, 무항생제, 저지방, 동물복지 등을 고려한 사육 방법에 많은 연구가 진행되고 있다. 축산물 생산에 사용되는 기능성 소재로서 다양한 천연물(생리활성)이 주목 받고 있다. 천연 식물에서 분리한 유기산과 flavonoids, beta-carotene 등의 다양한 생리활성물질은 질병의 예방, 치료 및 건강에 효과가 있는 것으로 보고되었다 (신, 1981; 진, 1990). 대표적인 생리활성물질인 flavonoids는 지질의 산화억제와 항병원성 등의 다양한 생리활성효과가 있는 것으로 알려져 있다(Son 등, 1998). 이외에도 천연물의 생리활성에 대한 효과는 항균력(Hong, 2000), 항산화 및 유해산소제거 등의 연구 보고가 있다(Mortensen 등, 1997). 그중 천연 식물 사료 첨가제는 주로 항산화 기능을 가지는 바, 이런 물질은 지방산의 산패에 의한 사료 품질을 보호하는 기능뿐만 아니라 가축이 섭취시 체조직의 항산화, 면역증진, 번식능력 등과 같은 생리적 작용에 중요한 영향을 미친다. 두충에는 phytochemicals이 많이 들어 있는데 대표적인 것이 polyphenolics pyrogallol, protocatechuic acid, coumaric acid, chlorogenic acid, triterpenes, 그리고 quercetin, kaempferol, astragalin을 함유한 flavonoids 등이 있다(Park 등, 2006). 이와 같이 두충에는 alkaloid, pectin, 지질, 유기산, 당류 및 vitamin C 등과 phenolic 화합물이 함유되어 있어 혈압 강하작용(Metori 등, 1997), 이노작용과 항당뇨 활성, cholesterol 저하 및 비만방지(Nakasawa 등, 1995) 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Hsieh(2000)등에 의하면 다양한 지질과산화 모델 시험에서 두충이 항산화 활성이 있음을 보여 주었다. 두충잎을 반추동물에(한우)에 급여할 경우 육질개선과 하리발생비율감소(김 등, 2005)와 두충의 이유자돈사료에 첨가시 설사빈도 감소와 생산성증가(김 등, 2006)등의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 가시오갈피에는 암이나 노화 등의 원인이 되는 과산화지질의 생성을 억제하는 타닌 성분중의 하나인 chlorogenic acid가 그 대표적 성분이다. 이 외에도 주요 성분에는 eleutherosides, chiisanoides, isofraxidin, acanthosides, daucosterine, sesamine, savinine 등이 있다 (Davydov 와 Krikorian, 2000). 가시오갈피는 스트레스에 의해 유발된 생리적 변화에 대한 치료물질로서 건강첨가제로 널리 애용되고 있다(Fujikawa 등, 1996; Gaffney 등, 2001). 가시오갈피를 섭취한 사람은 단백질의 산화억제 뿐만 아니라 혈구세포의 DNA손상도 억제하는 것으로 보고되었다 (Lee 등, 2008). 당뇨에 걸린 환자가 높은 혈중 포도당 농도에 지속적으로 노출되게 되면 항산화 방어 시스템의 조절 작용이 저하되는데 이의 측정지표인 SOD, CAT, GSH-Px 등 또한 활성이 감소하게 된다 (Dursun 등, 2005). 그러나 정상적인 생리적 상태에서 조류에게 천연 항산화 물질을 급여한 후 항산화 관련 반응 및 근육 및 지방합성 관련 유전자의 발현 등, 분자생물학적

지표에 의해 검증한 결과는 거의 없는 것으로 사료된다. 닭의 생산성을 높이는 것도 중요하지만 닭의 면역기능 증진 또한 중요하다. 따라서 산화적 스트레스를 감소시키는 방안으로 천연물 질인 두충과 가시오갈피를 첨가하였을 때 항생제 첨가 없이 닭의 건강을 증진 시킬 수 있는 방법을 강구할 필요성이 있다. 따라서 본 연구는 가시오갈피와 두충의 첨가가 육계의 산화적 스트레스, 근육 및 지방합성에 영향을 미치는지 관련 유전자들의 발현 양상을 조사하기 위하여 실시하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 공시동물

본 시험에 공시된 시험동물은 육계 수컷 Ross종을 (주)올팜에서 구입하였으며 구입 후 2일간의 적응 기간을 거친 후 4일령 병아리를 완전임의배치법에 의해 5개 처리구에 케이지 당 4수씩 8반복 배치하였다.

(2) 사양관리

시험에 사용한 기초사료는 상업용 육계사료를 이용하였고 가시오갈피 및 두충은 w/w 비율로서 0.5% 및 1.0% 수준으로 각각 첨가하였다. 시험사료의 조성 및 화학적 성분은 Table 1과 같다. 공시동물들은 35일령까지 control, T1(가시오갈피 0.5%), T2(가시오갈피 1.0%), T3(두충 0.5%), T4(두충 1.0%)의 처리 사료로 자유 급여를 실시하였다. 사양관리는 진주산업대학교 종합농장 무창 시험계사에서 Ross 육계 사육관리지침 (2002)에 따라 사육하였다.

(3) RNA 분리

시험 종료일에 근육과 간을 취하여 액체질소에 급냉 하였으며, 분석 때 까지 -80 C에서 보관하였다. RNA분리를 위하여 각 시료는 액체질소에 넣고 분쇄한 후 Trizol(Invitrogen, USA)을 넣고 실온에서 5분간 배양시킨 후 Trizol 1ml당 chloroform 0.2ml을 첨가하고 15초간 교반시키고 실온에서 2분 반응시켰다. 반응시킨 반응물을 12000g, 4°C, 15분간 원심분리한 후 상층액에 isopropanol 0.5ml을 첨가하고 10분간 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 반응물을 12000g, 4°C, 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 RNA 펠렛을 회수하였다. 각 시료의 RNA는 ND-1000 spectrophotometer(Nanodrop technologies. Inc. USA)를 이용하여 농도를 측정하였다.

(4) RT에 의한 cDNA 합성

Reverse transcription system(Promega, USA)을 이용하였으며 primer는 oligo(dT)를 이용하였다. 반응조성은 RNA 1.5µg, buffer 4µl, MgCl₂(25mM) 3µl, dNTP(2.5mM) 1µl, reverse transcriptase 1µl, primer 0.5µl이며 total volume은 DEPC로 20µl로 맞추었다. 이들 반응물은 25°C에서 5분간 접합과정과 42°C에서 60분간 확장과정을 통하여 cDNA를 합성하였으며 이후 70°C에서 15분간 열처리를 하여 역전사 효소를 불활성화 시켰다. 생성된 cDNA는 다음 단계의 실험을 위하여 -20°C에서 보관하였다.

(5) real-time PCR

본 시험에 이용된 PCR primer의 정보는 Table 2와 같다. Real-time PCR은 MyiQ(BIO-RAD, USA)을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. cDNA 1µl, primer(5pmole)는 각

각 0.5 μ l, SYBR Green 10 μ l, DEPC H₂O 8 μ l 반응물을 94 $^{\circ}$ C 5분간 최초의 변성을 시키고, 94 $^{\circ}$ C 15초간 두 번째 변성, 각각 유전자에 맞는 접합온도를 30초간 접합과 확장과정을 72 $^{\circ}$ C 30초간 실시하였다. 그리고 94 $^{\circ}$ C 1분간 재 접합 과정을 거친 후 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 재 확장 과정을 실시하였다. 마지막으로 유전자간 설정한 접합온도에서 94 $^{\circ}$ C까지 0.5 $^{\circ}$ C씩 상승하면서 94 $^{\circ}$ C에 이를 때까지의 형광접합물질인 SYBR Green이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다. 유전자발현의 상대적 발현양은 Livak and Schmittgen (2001)의 방법에 따라 계산하였다.

Table 1. Feed formula and chemical composition of basal diets

Items	Diets	
	Starter	Finisher
Ingredients (%)		
Corn	38.26	44.28
Wheat	20.00	20.00
Wheat bran	5.00	4.00
Animal fat	2.20	3.00
Corn gluten	4.00	4.00
Soybean meal (44% CP)	23.00	16.50
Rapeseed meal	1.50	2.00
Fish meal	1.00	1.00
Meat meal	2.00	2.00
Salt	0.20	0.23
Calcium carbonate	0.40	0.20
Tricalcium phosphate	1.40	1.60
Lysine (liquid)	0.46	0.66
Methionine	0.13	0.12
Choline-HCl	-	0.01
Vitamin premix ¹	0.20	0.20
Mineral premix ²	0.20	0.20
Maduramycin+ nicarbazine	0.05	-
Antibiotics	0.0133	0.001
Total	100.00	100.00
Chemical composition (%)		
Crude protein	21.00	19.00
Ether Extract	4.80	5.20
Crude fiber	4.30	3.90
Crude ash	5.00	4.90

¹Contained per kg : vit. A, 5,500,000 IU; vit D3, 1,500,000 IU; vit E, 15,000 mg; vit K, 800 mg; thiamin, 1,000 mg; riboflavin, 4,000 mg niacin, 25,000 mg; biotin, 30 mg; folic acid, 500 mg pantothenic acid, 5,000 mg, pyridoxine, 1,500 mg; vitamin B12, 15 mg. ²contained per kg : Cu, 12,000 mg; Fe, 35,000 mg; Zn, 25,000 mg, Co, 150 mg; Co, 150 mg; Se,120 mg; Mn, 38,000 mg.

Table 2. Oligonucleotide primers used for real-time PCR

Item	Direction	Sequence(5'-3')	Size(bp)
actin	F	5'-CAAAGCGCTCGATTTTCATCGC-3'	180
	R	5'-TCTCTTCCACGGAGATGTCCT-3'	
FAS	F	5'-CACCCCAAACAAGCTCATACA-3'	200
	R	5'-GCCAGTCATACTGTATCCCAA-3'	
Myogenin	F	5'-ATGGAGCTTTTTGAGACCAAC-3'	170
	R	5'-GTCAGATCCTTCTCCTCCAAA-3'	
MyoD	F	5'-ACTCCGACGTTCCCAGTCGCC-3'	193
	R	5'-GGTGCTCCTCGGGCTTCAGCA-3'	
PPAR γ	F	5'-CAATGGTTGACACAGAAATGC-3'	180
	R	5'-GCTTGTTTGATCAGCTCTTCC-3'	
GST	F	5'-GTCAATTCGGTGGCTGTTAGC-3'	281
	R	5'-AAGGGAGAGCCATGATCATTC-3'	
CAT	F	5'-GGCTCATTTTGACAGAGAGAG-3'	251
	R	5'-GATCCCAGTTACGTTCTTCTG-3'	
GPX	F	5'-ACGGTGTCTGTCACAAGTACA-3'	281
	R	5'-GATGTTGGTGACAGAGTGAGC-3'	
SOD	F	5'-TGAAGGCCGTGTGCGTGATGA-3'	190
	R	5'-GCCTTCAGGATTAAGTGAGC-3'	

FAS(fatty acid synthase), MyoD(myoblast determination protein)

PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors), GST(glutathione S-transferase)

CAT(catalase), GPX(glutathione peroxidase), SOD(superoxide dismutase)

(6) 통계분석

통계분석은 SAS package program (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)을 이용하여 one-way ANOVA 및 Turkey 다중검정분석법으로 처리간 평균간 유의성 검증을 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 가시오갈피 및 두충 첨가 급여에 따른 증체, 사료섭취량 및 사료 요구율

가시오갈피와 두충 등 천연물 첨가에 따른 육계의 사양성적 결과(Table 3)를 살펴보면 대조구와 처리구, 또는 처리구간에 체중 및 증체율의 차이가 없었다. 가시오갈피와 두충을 각각 사료에 1%을 첨가한 경우 체중과 증체에 부정적 영향을 미치는 경향을 보이거나 유의적 차이는 없었다. 사료섭취량 또한 대조구와 처리구간에 유의적 차이가 나타나지 않았다.

T2구에서 대조구와 T3구와 비교시 사료 요구율이 유의적으로($P<0.05$) 낮은 결과를 보였다.

가시오갈피 및 두충 0.5% 첨가구에서는 대조구와 유사한 사양 성적을 보였으나, 가시오갈피와 두충1% 급여구는 사료요구율이 대조구와 비교시 감소되었다(P<0.05). 이와 같은 결과로 보아 가시오갈피 및 두충 0.5% 급여는 체중, 증체, 사료섭취량 및 사료요구율의 부정적인 영향 없이 생리활성 소재로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. Effect of dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae* on growth performance, feed intake and feed conversion ratio(FCR) in broiler chickens

Item	Diets*				
	CON	T1	T2	T3	T4
Initial BW(g)	69.38 ± 0.72	70.14 ± 0.69	69.38 ± 0.49	69.69 ± 0.59	70.00 ± 0.64
Final BW(g)	2035.00 ± 46.55	2016.79 ± 54.54	1893.91 ± 45.93	2014.84 ± 2.28	1973.75 ± 56.14
Total gain(g)	1965.63 ± 46.83	1946.64 ± 54.32	1824.53 ± 45.93	1945.16 ± 27.66	1903.75 ± 55.83
Total FI(g)	2854.90 ± 64.83	3129.52 ± 122.94	3135.69 ± 183.85	2844.38 ± 57.83	2962.81 ± 125.11
Total FCR	1.46 ± 0.04 ^b	1.61 ± 0.05 ^{ab}	1.72 ± 0.10 ^a	1.46 ± 0.02 ^b	1.56 ± 0.06 ^{ab}

*Con(control). T1(*Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), T4(*Eucommiaceae*, 1%). ^{abc}Values with different superscripts differ significantly(p<0.05) among treatments.

(2) 육계에서 가시오갈피 및 두충 첨가가 지방 및 근육관련 유전자 발현에 미치는 영향

가시오갈피와 두충을 0.5%와 1%수준으로 첨가한 사료를 육계에 급여 한 후 시장 출하 일령인 35일령에 근육과 간을 취하여 근육 및 지방합성관련 유전자의 발현을 측정하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 간에서 지방을 합성하는 효소 유전자인 FAS(fatty acid synthase)의 발현은 처리간에 차이가 없었다. 지방합성관련 유전자를 조절하는 전사인자인PPAR γ 의 경우 대조구에 비하여 가시오갈피와 두충 처리구에서 발현이 증가함을 볼 수 있었으며 두충이 가시오갈피보다 상대적 발현량이 높았다.(P<0.05). PPAR γ 의 발현 증가는 일반적으로 지방합성 또는 지방세포분화관련 유전자들의 발현을 유도하므로 지방합성을 증가시키는 방향으로 작용하기 때문에 혈중 지방성분에 영향을 미칠 수 있다. 손 등(2008)의 보고에 의하면 가시오갈피와 두충을 0.5% 또는 1% 육계사료에 첨가한 경우 혈중 중성지방의 함량이 대조구에 비하여 높은 수준을 보였는데 특히 두충 처리구에서 더 높은 경향을 보였으며, 콜레스테롤 또한 두충 첨가구에서 높은 수준을 나타내었다. 가시오갈피를 사람이 섭취한 결과를 보면 6개월 이상 장기 섭취를 하여도 혈중 중성지방의 함량에는 영향을 미치지 않고 다만 LDL cholesterol의 함량이 감소하였다는 보고(Lee 등 2008)가 있으나 가금을 이용한 관련 보고는 손 등(2008)의 보고 이외에는 아직까지 없는 것으로 사료된다. 어떤 기작에 의하여 가시오갈피 또는 두충의 급여가 육계의 혈중 지방함량을 증가시켰는지에 대한 구체적 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 간에서 지방합성효소(FAS) 유전자의 발현에는 큰 변화가 없음에도 불구하고 단지 전사인자의 발현증가가 혈중 지방함량을 증가시킨 것 또한 앞으로 밝혀져야 할 것으로 사료된다. 시험 종료 35일령에 근육관련 유전자인 MyoD와 Myogenin의 발현을 조사 분석하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 가시오갈피와 두충을 처리한 구에서 MyoD의 발현이 증가하였음을 알 수 있다

($P < 0.05$). 가시오갈피에 비하여 두충처리에 의해 이 유전자의 발현이 증가함을 보였다. MyoD의 발현 증가는 근육의 재생, satellite 세포의 분화유도 및 근육의 발달 유도등 근육성장에 긍정적으로 작용하는데(Pownall 등, 2002) 가시오갈피보다는 두충 처리구에서 이 유전자의 발현이 높게 나타나 시험을 35일령 이후 연장할 경우 증체에 영향을 미칠 것으로 사료된다. Myogenin은 근육세포의 최종분화에 관여 (Berkes 와 Tapscott, 2005)하는데, 본 시험에서 이 유전자 또한 MyoD와 유사한 결과이나 다만 두 항산화제 처리에 따른 차이는 없었다. 이들 유전자의 발현결과를 종합하여 보면 항산화제처리가 근육의 증식과 분화에도 긍정적으로 작용하는 것으로 사료되어 이에 대한 추가적인 시험이 필요한 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae* on lipogenic and myogenic gene expressions in broiler chickens

Items	Treatment									
	CON		T1		T2		T3		T4	
	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
FAS	15.42±1.17	1 ^a	15.27±0.54	1.11 ^a	15.98±0.43	0.67 ^a	15.53±1.11	0.92 ^a	15.00±0.87	1.33 ^a
PPAR	15.98±0.37	1 ^a	13.83±2.35	4.43 ^b	13.44±1.74	5.85 ^b	11.15±2.81	28.44 ^c	1.75±2.58	37.53 ^c
Myogenin	17.04±2.11	1 ^a	13.80±2.20	9.45 ^b	13.58±0.79	11.00 ^b	12.41±0.83	24.76 ^b	12.39±1.46	25.10 ^b
MyoD	23.84±0.77	1 ^a	21.06±2.12	6.86 ^b	20.51±0.81	10.05 ^b	18.78±1.57	33.35 ^c	18.48±1.03	41.06 ^c

CON(control), T1(*Acanthopanax senticosus* 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus* 1.0%), T3(*Eucommiaceae* 0.5%), T4(*Eucommiaceae* 1.0%) The ΔCt values are represented the Ct of each target gene corrected by Ct of control actin gene. The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value. ^{a,b} Values with different superscripts differ significantly($p < 0.05$) among treatments.

(3) 육계에서 가시오갈피 및 두충 첨가가 항산화효소 유전자의 발현에 미치는 영향

육계에 가시오갈피와 두충을 급여하는 목적은 이들 첨가물이 항산화효과가 높다는데 기인하기 때문에 항산화효소 관련 유전자들의 발현에 영향을 미치는지를 조사 분석하였다. Table 5에서 보는바와 같이 GST(gluthathione-S-transferase)의 경우 가시오갈피 1%와 두충1% 처리 간에 차이가 있을 뿐 다른 처리들 간에는 발현의 차이가 없었다. 그러나 이들 발현의 차이 또한 대조구와 차이가 없는 것으로 분석됨에 따라 가시오갈피와 두충의 첨가가 육계의 GST활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 두 번째로 분석한 CAT(catalase)의 경우 또한 첨가제의 종류나 농도에 관계없이 이 효소의 활성에는 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. SOD(superoxide dismurase)의 경우 가시오갈피 처리에서는 대조구와 차이가 없었으나 두충 1%처리구에서 이 항산화효소의 유전자 발현이 증가하는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 두충 0.5%처

리구에서도 또한 SOD의 발현이 증가하였으나 1%처리구 보다는 낮게 나타났다.

GPX 또는 GSHPX(Gluthathione peroxidase)유전자의 발현은 두층 처리구 모두에서 높게 발현되었으며 가시오갈피 0.5%처리구에서도 대조구에 비하여 높은 발현율을 나타내었다($P<0.05$). 제2형 당뇨가 있는 쥐에게 두층을 급여하였을 때, SOD, GSHPX에 영향을 미치지 않고 다만 CAT활성에만 큰 영향을 주었다(Park 등, 2006)는 보고에서와 같이 두층과 가시오갈피와 같이 천연항산화물질의 섭취시 항산화 관련 유전자들이 모두 활성화 되는 것 같지는 않으며 항산화 물질의 종류 및 대상 종에 따라 다르게 반응하는 것으로 보인다. 위의 결과들을 종합하여 보면 두층의 육계사료첨가는 항산화효소의 활성을 증진시키는 측면에서 긍정적으로 평가되며 사료내 0.5%수준보다는 1% 수준에서 보다 좋은 성과를 나타내었다. 그러나 가시오갈피의 경우 0.5% 처리구의 GPX 증진효과 이외에는 항산화효소증진에 대조구와 차이를 보이지 않아 항산화효소의 활성목적으로 위의 항산화물질을 사료첨가에 이용하는 것은 추가적인 연구가 더 진행 된 후에 결정해야 될 것으로 사료된다.

Table 5. Effect of dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae* on the RNA expressions of antioxidant enzymes in broiler chickens

Items	Treatment									
	CON		T1		T2		T3		T4	
	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GST	4.08±1.09	1 ^{ab}	4.78±1.28	0.65 ^{ab}	5.14±0.43	0.48 ^a	4.03±0.95	1.03 ^{ab}	3.6±0.98	1.39 ^b
CAT	7.60±0.67	1 ^a	7.37±0.90	1.17 ^a	7.33±0.36	1.21 ^a	6.78±0.73	1.76 ^a	7.30±0.93	1.23 ^a
SOD	5.85±0.99	1 ^a	5.21±0.99	1.56 ^{ab}	4.88±0.99	1.94 ^{ab}	4.77±0.65	2.11 ^{ab}	4.37±1.57	2.79 ^b
GPX	23.37±0.84	1 ^a	20.87±3.93	5.65 ^b	22.00±1.11	2.58 ^b	19.92±1.05	10.92 ^c	19.68±1.05	12.82 ^c

CON(control), T1(*Acanthopanax senticosus* 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus* 1.0%), T3(*Eucommiaceae* 0.5%), T4(*Eucommiaceae* 1.0%) The ΔCt values are represented the Ct of each target gene corrected by Ct of control actin gene. The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value. ^{a,b} Values with different superscripts differ significantly($p<0.05$) among treatment.

2. 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 면역 관련 유용 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

가. 재료 및 방법

(1) 육계 사양시험

(가) 공시동물 및 사양관리

본 시험에 공시된 시험동물은 육계 수컷 Ross종 200수로서 (주)올팜에서 구입하였다. 구입

후 스트레스로 인한 부작용을 줄이기 위하여 4일령 병아리를 완전임의배치법에 의해 5개 처리구에 케이지 당 4수씩 배치하였다. 시험에 사용한 기초사료는 상업용 육계사료를 이용하였으며 가시오갈피(*Acanthopanax senticosus*) 및 두충(*Eucommiaceae*)은 산청지역에서 생산된 것으로 주로 푸른 잎 부분을 수거하여 50°C에서 건조시킨 후 분쇄기로서 가는 입자로 분쇄하여 사용하였다. 시험에 사용한 천연물의 첨가 농도는 w/w 비율로서 0.5% 및 1.0% 수준으로 첨가하였으며, 혼합 한 후 밀봉하여 보관하였다. 본 사양관리는 온도 및 명암조절을 갖춘 사육시설에서 본 대학의 육계 사육 관리 지침에 따라 일령별로 사육을 실시하였다.

(나) 시험 샘플채취

사양시험이 종료된 후 각 시험구 당 8수 모두 40수에서 경정맥을 절개하여 헤파린 튜브에 채혈을 실시하고 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 혈장을 획득하였다. 각 장기를 획득하기 위하여 복강을 가위로 절개하고 위장의 유문부에서 맹장앞 부분까지 절단하여 소장을 획득하고 이어서 간, 비장, 흉선 및 F-낭 등의 조직을 채취하여 무게를 측정하였다. 이어서 멸균된 생리식염수로서 각 장기를 세척하고 여분의 수분을 제거하고 액체질소에 냉동하여 -70°C에 보관하여 분석에 사용하였다.

(2) 분석항목

(가) 체중 및 사료섭취량 측정

체중 측정은 시험 개시(4일령), 21일령 및 시험 종료(35일령)에 정해진 시간에 일정하게 체중을 측정하였다. 본 사양시험동안 사료섭취량을 조사하여 사료 요구율을 계산하였다.

(나) 혈장 생화학적 성분분석

혈장 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 분석은 자동생화학분석기 (Hitachi 747, Japan)를 사용하여 실시되었다.

(다) 면역 유전자 mRNA 발현

① 혈액에서 백혈구 및 RNA분리

각 처리군당 5수씩 혈액을 채취한 후 3ml 넣고 채취한 신선한 혈액과 0.9% NaCl을 혼합하고 Lymphocyte Separation Medium(LSM) 시약을 조심스럽게 분주하여 400xg에서 20분 동안 원심 분리하였다. 이어서 혈장층을 제거한 후, 백혈구층과 LSM층 50%을 흡입하여 동량의 0.9% NaCl를 다시 넣은 뒤 200xg에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 버리고 생리식염수를 다시 넣어 원심 분리하여 세척하여 pellet(백혈구)를 분리하여 취하였다. 백혈구 Total RNA는 GIAmp mini kit를 사용하여 분리하였다. 간단하게 소개하면, EL buffer 에 백혈구를 혼합하고 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 상청액을 제거하였다. 다시 RLT buffer를 넣은 뒤 백혈구 세포를 파괴하기 위해 잘 혼합하고 위의 분해산물을 QIAshredder spin column에 넣은 뒤 14,000rpm에서 2분 동안 균질화하였다. 균질액에 70% Alcohol을 넣고 잘 혼합하여 다시 QIAamp spin column에 넣은 뒤 8,000xg에서 1분 동안 원심분리후 RW1 buffer로 세척하고 8,000xg에서 1분 동안 재세척하였다. 이어서 RPE buffer을 수 차례 원심분리하여 RNase free water을 membrane에 정확히 분주한 후 다시 10,000rpm 1분 동안 용출하여 total RNA를 추출

하였다.

② 흉선, F-낭, 비장 및 간 조직에서 total RNA 분리

각 처리군 별로 5수씩 선택한 공시동물의 흉선, F-낭, 비장 및 간 조직으로부터 RNAsol™ kit(TEL-TEST, INC)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 조직을 RNAzol reagent용액에서 homogenization한 후 chloroform을 혼합한 후 원심분리하고 aqueous phase에 2-propanol을 혼합하여 RNA를 침전시켜 분리하고 분리된 RNA를 이용하여 즉시 cDNA를 합성하여 냉장 보관하였다.

③ Real Time-PCR을 이용한 mRNA 발현 조사

RT-product 2 µl, SYBR Green supermix(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 10 µl, 5 pmol의 primer 2 µl, dH₂O 6 µl을 넣어 최종부피 20 µl로 맞춘 다음 real-time PCR(Bio-Rad Laboratories, USA)를 실시하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분, [94°C에서 15초(denaturation), 59°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초(extension)] x 40 cycle, 94°C에서 1분, 55°C에서 94°C까지 0.5°C씩 온도를 서서히 올리며 각 온도마다 10초씩 반응시켰으며, 4°C에서 ∞로 맞추었다. 실시간으로 변화하는 형광의 양상을 관찰하여 Ct값을 구하였다.

(3) 통계처리

제한 급여방법에 따라 얻은 결과는 Proc-GLM(SAS, 1996)에 의해 분산분석을 실시하였으며, 처리간 비교는 Duncan 방법에 의해 P<0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

Table 6. Sequences of primers used in Real-time PCR

Item	Direction	Sequence(5' to 3')	Size(bp)
TNF-α	Forward	GAA CTA TCC TCA CCC CTA CC	223
	Reverse	TGA CTC ATA GCA GAG ACG TG	
iNOS	Forward	GCA TCC AAA ATA TGA GTG GT	274
	Reverse	AAG CAC AGC CAC ATT TAT CT	
IFN-γ	Forward	TTC CTT CAT TTT CCT CTT GA	223
	Reverse	ACT GGA AAA CAC AAG GTC AC	
IL-1β	Forward	GCT CTA CAT GTC GTG TGT GA	167
	Reverse	TGT CGA TGT CCC GCA TGA	
IL-4	Forward	AAC ATG CGT CAG CTC CTG AA	350
	Reverse	TCT GCT AGG AAC TTC TCC AT	
IL-6	Forward	GCT CGC CGG CTT CGA	188
	Reverse	GGT AGG TCT GAA AGG CGA AC	
IL-10	Forward	GCA GAC CAG CAC CAG TCA TC	185
	Reverse	ACT CCC CCA TGG CTT TGT AG	
β-actin	Forward	CAA AGC GCT CGATTT CAT CGC	180
	Reverse	TCT CTT CCA CGG AGA TGT CCT	

나. 결과 및 고찰

(1) 가시오갈피 및 두충 첨가 급여에 따른 증체, 사료섭취량 및 사료 요구율

가시오갈피와 두충 등 천연물 첨가에 따른 육계의 사양성적 결과(Table 7)를 살펴보면 육계 성장 전기(4-21일령)에서는 대조구를 포함한 모든 구에서 유사한 수준의 체중 및 증체율을 나타내었으나, 사료 요구율은 가시오갈피 0.5%(T1) 및 1.0%(T2) 및 두충 0.5%(T3) 첨가구에서 대조구 및 두충 1.0%(T4) 첨가구에 비해 유의적(P<0.05)으로 저하되었다. 육계 성장 후기(22-35일)의 결과를 살펴보면, 모든 구에서 유사한 체중, 증체, 사료섭취량 및 사료요구율을 보였다. 특히 사료요구율에서 T3(두충 0.5%)에서 가장 좋은 결과를 보였으며, 대조구(CON), T1, T3 및 T4구에서 모두 비슷한 결과를 나타내었다.

전 기간(4-35 일령) 동안의 사양성적을 살펴보면 증체 및 사료섭취량은 유의적 차이를 보이지 않았으나, T2구에서 대조구와 T3구와 비교시 사료 요구율이 유의적으로(P<0.05) 낮은 결과를 보였다. 전반적으로 나타난 결과를 살펴보면, 가시오갈피 및 두충 0.5% 첨가구에서는 대조구와 유사한 사양 성적을 보였으나, 1% 급여구는 대부분의 사양성적이 대조구와 비교시 감소되었다.

이와 같은 결과로 보아 가시오갈피 및 두충 0.5% 급여는 체중, 증체, 사료섭취량 및 사료요구율의 부정적인 영향 없이 생리활성 소재로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 7. Effect of dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae* on growth performance, feed intake and feed conversion ratio(FCR) in broiler chickens

Item	Diets*				
	Con	T1	T2	T3	T4
Initial BW	69.38±0.72	70.14±0.69	69.38±0.49	69.69±0.59	70.00±0.64
4-21 days					
BW	807.29±11.78	811.19±42.37	774.06±49.21	799.38±13.88	789.69±9.18
Gain	737.92±11.98	741.05±42.06	704.69±49.08	729.69±13.83	719.69±9.23
FI	1118.96±17.42 ^b	1305.96±65.88 ^a	1288.61±77.36 ^a	1226.29±30.38 ^{ab}	1100.63±19.86 ^b
FCR	1.52±0.02 ^c	1.77±0.06 ^{ab}	1.84±0.04 ^a	1.68±0.02 ^b	1.53±0.04 ^c
22-35 days					
BW	2035.00±46.55	2016.79±54.54	1893.91±45.93	2014.84±2.28	1973.75±56.14
Gain	1227.71±36.61	1205.60±81.72	1119.84±41.63	1215.47±20.42	1184.06±49.65
FI	1735.94±56.14	1774.41±58.57	1797.88±90.53	1623.28±50.02	1815.57±75.06
FCR	1.42±0.06 ^{ab}	1.50±0.08 ^{ab}	1.63±0.13 ^a	1.34±0.03 ^b	1.55±0.07 ^{ab}
4-35 days					
Total gain	1965.63±46.83	1946.64±54.32	1824.53±45.93	1945.16±27.66	1903.75±55.83
Total FI	2854.90±64.83	3129.52±122.94	3135.69±183.85	2844.38±57.83	2962.81±125.11
Total FCR	1.46±0.04 ^b	1.61±0.05 ^{ab}	1.72±0.10 ^a	1.46±0.02 ^b	1.56±0.06 ^{ab}

* Con(control), T1(*Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), and T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

^{a,b,c}Values with different superscripts differ significantly(p<0.05) among treatments.

(2) 장기 무게 변화

사료내 가시오갈피 및 두충 첨가에 따른 육계의 각종 장기 무게의 변화를 조사한 결과는 Table 8에서 나타낸 바와 같다. 시험 결과 간, 비장 및 흉선의 무게는 가시오갈피 및 두충 급여와 수준에 상관없이 대조구와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 F-낭은 T4(두충 1.0%) 구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 증가되었으며, 모든 천연물 첨가구에서 대조구에 비해 수치상 증가되었다. 이와 같이 가시오갈피 및 두충 급여는 면역에 관련된 장기의 무게를 증가시키는 것으로 사료되어 면역작용의 활성화가 기대된다.

Table 8. Effect of dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae* on organ weights of broiler chickens

Item	Diets*				
	Con	T1	T2	T3	T4
Liver, g/100g BW	2.26±0.10	2.35±0.25	2.26±0.11	2.20±0.08	2.30±0.15
Spleen, g/100g BW	0.13±0.01	0.15±0.03	0.12±0.02	0.15±0.02	0.13±0.02
Thymus, g/100 g BW	0.25±0.02	0.36±0.08	0.30±0.03	0.42±0.06	0.36±0.04
Fabricius, g/100g BW	0.18±0.02 ^b	0.25±0.02 ^{ab}	0.26±0.03 ^{ab}	0.24±0.02 ^{ab}	0.31±0.04 ^a

*Con(control), T1(*Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), and T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

^{a,b}Values with different superscripts differ significantly($p<0.05$) among treatments.

(3) 혈액 생화학적 성분 변화

천연 항산화 물질인 가시오갈피 및 두충 급여에 따른 육계의 혈액 생화학적 성분에 대한 결과는 Table 9에서 나타낸바와 같다. 먼저 혈액 생화학성분에서 시험 종료후 35일령에서 나타난 결과를 살펴보면 albumin, AST, ALT, total protein 등과 같은 대부분의 생화학 성분은 대조구(CON) 및 처리구에서 비슷한 수치를 보였다. 그러나 triglycerides는 대조구에 비해 T2 구에서 유의적($P<0.05$)으로 높게 나타났으며, cholesterol은 T3 및 T4구에서 높게 나타났다. 혈중 glucose 수준 역시 대조구에 비해 가시오갈피 및 두충 급여에서 현저히 ($P<0.05$) 증가되었다. 이와 같은 결과는 대조구에 비해 천연물 급여구에서 낮은 증체에 따라 혈중 생화학 성분중 에너지 대사에 관련된 혈중 성분이 증가된 것으로 보이나 정확한 연구기 요구된다. 한편 천연물 급여에 따른 간 기능 수치 등에서는 모든 구에서 유사한 결과를 나타내고 있어 0.5% 수준의 가시오갈피 및 두충 급여는 육계의 생리적 대사작용에 부정적인 영향이 없는 것으로 기대된다.

(4) 가시오갈피 및 두충 급여에 따른 면역 유전자 발현

동물체는 생물학적으로 내·외부 환경에 반응하여 질병의 방어작용을 하는데 면역작용이 그 핵심을 이루고 있다. 면역계는 백혈구와 림프기관 (흉선 및 F-낭)에서 특이적 및 비특이적 면역 반응에 따라 병원균이나 내적 환경에 저항한다. 비특이적반응은 주로 염증반응이 발생되고 대식세포 등에 의해 식작용이 발생되며 이러한 비특이적 면역반응은 항체와 T-세포 등의

Table 9. Effect of dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae* on blood biochemical profiles in broiler chickens.

Item	Treatment				
	Control	T1	T2	T3	T4
Albumin (g/dl)	1.2 ± 0.03	1.2 ± 0.04	1.2 ± 0.05	1.3 ± 0.06	1.3 ± 0.09
ALP (IU/ μ l)	2165.7 ± 428.2	2219.0 ± 189.2	2983.0 ± 400.7	3209.9 ± 466.9	1947.0 ± 293.0
AST (IU/ μ l)	305.1 ± 25.01	309.2 ± 25.46	302.7 ± 16.81	333.0 ± 15.61	330.7 ± 25.46
ALT (IU/ μ l)	3.6 ± 0.30	3.3 ± 0.42	3.4 ± 0.37	4.0 ± 0.22	3.9 ± 0.51
Total protein (g/dl)	3.8 ± 0.24	3.3 ± 0.11	3.4 ± 0.09	3.4 ± 0.19	4.0 ± 0.31
Triglyceride (mg/dl)	19.3 ± 1.51 ^b	19.8 ± 1.28 ^b	29.4 ± 3.39 ^a	26.0 ± 2.43 ^{ab}	23.9 ± 2.03 ^{ab}
Cholesterol (g/dl)	147.7 ± 5.94 ^b	160.0 ± 6.45 ^{ab}	169.9 ± 9.41 ^{ab}	182.0 ± 6.66 ^a	181.7 ± 14.65 ^a
Glucose (mg/dl)	216.9 ± 5.64 ^b	256.0 ± 10.76 ^a	254.1 ± 6.34 ^a	253.1 ± 8.83 ^a	253.9 ± 15.66 ^a

*Con(control), T1(*Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), and T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

^{a,b,c}Values with different superscripts differ significantly(p<0.05) among treatments.

적응성 반응을 유기시킨다. 적응성 특이적 반응은 골수에서 생성되는 줄기(간)세포에서 T-임파구 및 B-임파구가 중요한 기능을 수행한다. 골수의 간세포에서 만들어진 B-세포는 체액성 면역으로 일단 활성화된 T-세포나 흉선에서 활성화되면 면역항체(Ig)를 생산한다. T-세포 역시 골수에서 생성되어 흉선에서 활성화는 세포 매개성 면역작용으로 cytotoxic T-세포는 사이토카인을 생성하여 세포사를 유발하고 대식세포를 유인하여 식작용을 유발한다. Suppressor T-세포는 세포의 감염이 치유되면 면역작용을 종료시킨다. CD4 또는 CD8로 알려진 Helper T-세포는 cytotoxic T-세포의 활성화를 작용하는데 CD4 세포는 Th1과 Th2 두개의 subclass로 분류된다. Th1은 대식세포를 활성화하여 병원체를 사멸하고, 염증을 유발하며 항체를 생성하는데 주로 Interleukin-2, (IL-2)와 Interferon-gamma를 분비한다. Th-2은 IL-4, IL-6, IL-10 및 IL-13 사이토카인을 생성한다. 또한 친염증 유발(Pro-inflammatory) cytokine 유전자로서는 TNF- α , IFN- γ , IL1 β , IL-6, IL-12 β 등이 존재하며, 이들 유전자는 감염부위에 면역세포가 모여드는 작용을 활성화시킨다. 염증 사이토카인은 닭의 단핵구(monocytes)와 같은 여러 가지 면역세포에서 주로 분비된다. 산화질소는 일종의 신호 물질로 작용해 적절한 수준은 면역계(immune system)에 활성을 부여하고 뇌에서도 중요한 역할을 담당한다. 그러나 만약에 산화질소가 과다하게 세포에서 형성되면 세포 사멸을 유도하는데, 이런 영향 때문에 면역, 암 발생, 알츠하이머병과 파킨슨병(Parkinson's disease)의 유발에도 산화질소가 관여한다. iNOS 효소는 산화질소를 생산하는데 필요한 촉매 물질로서 iNOS가 억제되면 산화질소 생성이 차단되는 것으로 보고되고 있다. 반면에 iNOS는 여러 가지 원인으로 인해 그 생성량이 과량으로 많아질 경우 대식세포 등에서 생성되는 superoxide anion 등과 같은 ROS(Reactive oxygen substance)와 상호작용을 통해 세

포를 손상시키거나 죽이는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과들로 보아 항산화 물질은 anti-inflammatory 기전을 촉진시키고 pro-inflammatory에 관련된 사이토카인을 억제하는 것으로 보인다. 염증 발생기전은 활성산소와 지질과산화 작용에 따른 산화적 스트레스에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다. 지금까지 많은 연구에서 항산화 물질은 항산화 방어 작용에 관련된 효소인 NADH-ascorbate free radical reductase, NADH-quinone oxidoreductase, NADH-ferrocyanide reductase, superoxide dismutase 등과 같은 효소 및 항산화 물질(α -tocopherol, coenzyme Q10) 등이 증가된다고 보고 된다. 이들 항산화효소 및 물질은 산화적 스트레스를 방지하여 면역작용에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구는 천연 식물성 항산화물질을 급여에 따라 육계의 체 조직(혈액, 흉선, F-낭, 비장 및 간)에서 iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6 및 TNF- α 등의 사이토카인 유전자 등의 발현을 Real Time-PCR로 조사하여 천연 생리활성 항산화 물질이 면역작용에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

시험결과를 살펴보면, 먼저 혈액(whole blood)에서 조사한 면역 사이토카인의 발현은 천연물 첨가에 따라 이들 유전자 발현의 통계적 차이가 나타나지 않았다. 흉선(thymus)에서 사이토카인 유전자의 발현 양상을 조사한 결과를 살펴보면, TNF- α 와 IL-6와 같은 친염증 유전자의 발현의 차이는 없었다. 그러나 iNOS, IFN- γ , IL-1 β 및 IL-10과 같은 사이토카인 유전자는 가시오갈피 급여구(T1 및 T2)에서 유의적 ($P<0.05$)으로 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 두충급여구(T3 및 T4)에서는 가시오갈피 급여에 비해 이러한 증가 현상이 비교적 낮게 나타나거나 대조구와 비슷한 수준을 보였다. 한편, 대표적인 항염증 유전자(anti-inflammatory cytokine)인 IL-4는 두충 급여구인 T3 및 T4구에서 유의적으로($P<0.05$) 증가되어 긍정적인 효과를 보였다. F-낭(fabricius)에서 사이토카인의 발현은 대부분 유의적 차이가 없이 경향이 일정하지는 않은 것 같았으나, 친염증 사이토카인인 IL-6는 가시오갈피 1.0% 급여구에서 증가되었다. 비장(spleen)에서 조사한 결과 역시 다소 차이는 있지만 친염증 사이토카인 종류인 TNF- α 와 IL-6 등은 가시오갈피 또는 두충 급여에 따라 일정한 경향을 나타내지 않았다. 간(liver) 조직에서 나타난 결과를 살펴보면, TNF- α , iNOS, IL-6, IL-10 등과 같은 친염증 사이토카인의 발현이 두충 급여구에서 유의적으로 ($P<0.05$) 감소하여 면역작용에 긍정적인 효과를 보였으나 IL-4 유전자는 가시오갈피 및 두충 급여구 모두 대조구와 비슷한 수준을 보였다.

이러한 결과로 보아 천연생리활성 물질인 가시오갈피 및 두충급여는 가금에서 면역작용에 중요한 역할을 수행하는 흉선 및 간 조직에서 일부 사이토카인의 발현에 영향을 미쳐 긍정적인 효과가 기대되며 증체 및 경제성 등을 고려할 경우 가시오갈피 및 두충 0.5% 급여가 가장 바람직한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다.

Table 10. Effect of dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae* on mRNA expression of cytokines with RT(Real-time) PCR in various tissues of broiler chickens

Item	Treatment*				
	Control	T1	T2	T3	T4
Blood					
TNF- α	8.59 \pm 3.05	37.00 \pm 30.37	19.58 \pm 9.85	14.30 \pm 10.25	12.61 \pm 2.80
iNOS	1491.0 \pm 1293.3	4841.2 \pm 3870.5	2213.1 \pm 1371.2	1885.7 \pm 1422.5	860.40 \pm 277.63
IFN- γ	90.04 \pm 68.46	553.01 \pm 421.43	118.72 \pm 59.07	214.55 \pm 167.48	95.85 \pm 31.78
IL-1 β	32.46 \pm 21.82	12.9 \pm 6.08	15.77 \pm 6.65	6.84 \pm 3.34	33.57 \pm 15.20
IL-4	46.75 \pm 24.42	109.02 \pm 78.94	109.39 \pm 52.00	80.51 \pm 52.99	29.07 \pm 5.50
IL-6	14.24 \pm 10.40	18.68 \pm 9.94	13.44 \pm 8.22	8.15 \pm 5.36	15.24 \pm 5.80
IL-10	32.33 \pm 21.88	85.05 \pm 55.40	84.55 \pm 48.41	96.76 \pm 79.09	44.05 \pm 17.10
Thymus					
TNF- α	36.67 \pm 2.69	45.09 \pm 7.51	47.82 \pm 6.81	39.64 \pm 9.27	58.65 \pm 8.89
iNOS	1.33 \pm 0.08 ^c	2.23 \pm 0.17 ^{ab}	2.50 \pm 0.30 ^a	1.28 \pm 0.10 ^c	1.80 \pm 0.28 ^{bc}
IFN- γ	2.09 \pm 0.67 ^b	4.45 \pm 0.85 ^a	6.14 \pm 0.67 ^a	1.62 \pm 0.22 ^b	4.87 \pm 0.83 ^a
IL-1 β	2.13 \pm 0.42 ^b	4.89 \pm 0.95 ^a	2.52 \pm 0.28 ^b	2.00 \pm 0.22 ^b	2.72 \pm 0.73 ^b
IL-4	15.78 \pm 2.97 ^b	24.22 \pm 5.51 ^b	23.00 \pm 6.77 ^b	39.65 \pm 2.20 ^a	42.76 \pm 5.59 ^a
IL-6	9.48 \pm 1.75	10.23 \pm 2.70	11.31 \pm 0.89	11.79 \pm 3.27	8.92 \pm 1.44
IL-10	1.73 \pm 0.11 ^b	3.47 \pm 0.40 ^a	2.59 \pm 0.76 ^{ab}	3.52 \pm 0.51 ^a	1.99 \pm 0.34 ^b
Fabricius					
TNF- α	5.07 \pm 0.18	4.14 \pm 0.62	3.44 \pm 0.56	4.43 \pm 0.67	3.67 \pm 0.28
iNOS	3.99 \pm 0.30	4.15 \pm 0.68	3.08 \pm 0.29	3.59 \pm 0.36	2.82 \pm 0.19
IFN- γ	1.24 \pm 0.13	3.01 \pm 0.31	2.27 \pm 0.44	4.29 \pm 0.74	4.68 \pm 1.31
IL-1 β	5.49 \pm 1.82	6.42 \pm 2.82	6.20 \pm 1.88	6.68 \pm 2.08	5.75 \pm 1.19
IL-4	1.41 \pm 0.15	3.15 \pm 0.53	2.80 \pm 0.69	2.72 \pm 0.27	2.14 \pm 0.30
IL-6	2.45 \pm 0.25 ^{bc}	3.54 \pm 0.31 ^{ab}	4.04 \pm 0.81 ^a	2.08 \pm 0.29 ^c	2.07 \pm 0.65 ^c
IL-10	5.01 \pm 0.86 ^{ab}	7.56 \pm 0.88 ^a	2.67 \pm 0.54 ^b	7.52 \pm 1.69 ^a	4.84 \pm 0.58 ^{ab}
Spleen					
TNF- α	5.47 \pm 0.99 ^a	3.73 \pm 1.27 ^{ab}	5.08 \pm 1.06 ^a	4.21 \pm 0.47 ^a	1.29 \pm 0.18 ^b
iNOS	1.84 \pm 0.41 ^c	1.79 \pm 0.31 ^c	7.04 \pm 1.41 ^a	5.24 \pm 1.28 ^{ab}	3.01 \pm 0.51 ^{bc}
IFN- γ	2.32 \pm 0.51 ^c	3.39 \pm 0.54 ^{bc}	4.00 \pm 0.64 ^{abc}	4.89 \pm 0.29 ^{ab}	5.43 \pm 0.73 ^a
IL-1 β	3.15 \pm 0.64 ^b	6.39 \pm 1.49 ^b	7.37 \pm 1.61 ^b	19.41 \pm 5.99 ^a	6.70 \pm 1.07 ^b
IL-4	4.44 \pm 0.72	5.97 \pm 1.05	10.33 \pm 2.29	4.94 \pm 1.09	7.19 \pm 1.89
IL-6	5.31 \pm 1.25 ^{ab}	2.21 \pm 0.45 ^b	10.43 \pm 3.54 ^a	3.88 \pm 0.41 ^b	5.11 \pm 0.56 ^{ab}
IL-10	3.97 \pm 0.61 ^{ab}	7.06 \pm 1.56 ^a	4.14 \pm 1.02 ^{ab}	5.82 \pm 1.24 ^a	1.77 \pm 0.33 ^b
Liver					
TNF- α	2.88 \pm 0.35 ^a	2.97 \pm 0.59 ^a	2.09 \pm 0.20 ^{ab}	1.53 \pm 0.17 ^b	1.41 \pm 0.11 ^b
iNOS	4.86 \pm 1.12 ^a	1.89 \pm 0.23 ^b	1.44 \pm 0.13 ^b	1.23 \pm 0.09 ^b	1.71 \pm 0.18 ^b
IFN- γ	4.5 \pm 1.98	4.20 \pm 1.14	4.37 \pm 0.90	3.41 \pm 0.60	3.05 \pm 0.42
IL-1 β	3.56 \pm 0.54 ^{abc}	5.04 \pm 1.19 ^a	4.66 \pm 0.56 ^{ab}	2.36 \pm 0.67 ^c	2.51 \pm 0.34 ^{bc}
IL-4	2.96 \pm 1.21	2.71 \pm 0.60	2.72 \pm 0.38	2.15 \pm 0.22	2.01 \pm 0.33
IL-6	12.99 \pm 2.05 ^a	2.55 \pm 0.52 ^b	3.94 \pm 0.63 ^b	2.63 \pm 0.27 ^b	4.62 \pm 0.47 ^b
IL-10	11.86 \pm 3.10 ^a	2.68 \pm 0.30 ^b	10.67 \pm 1.52 ^a	2.20 \pm 0.49 ^b	3.68 \pm 0.40 ^b

*Con(control), T1(*Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), and T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

^{a,b,c}Values with different superscripts differ significantly(p<0.05) among treatments.

3. 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

가. 재료 및 방법

(1) 공시계 및 시험구

본 연구에 이용된 공시계는 실용브로일러(로스종) 200수를 대상으로 하였고, 가시오갈피 (*Acanthopanax senticosus*) 및 두충(*Eucommiaceae*)을 급여량 대비 0.5% 및 1.0% 수준으로 각각 첨가하여 대조구 포함 5개 처리구로 하였다. 시험은 처리별 각 5수씩 도살하여 조직별 개체의 텔로미어 함량을 분석하였다.

(2) 조직 및 혈액 표본 제작

텔로미어의 함량 분석은 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 조직을 대상으로 하였으며, 성장단계별 14일령 및 35일령 개체의 각 조직들을 떼어 분석하였다. 채집된 조직들은 D-PBS (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA)용액으로 세척 한 다음 RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA) 배양액이 들어있는 시험관으로 옮겨 200× g에서 10분간 원심분리 시켰다. 침전된 세포에 0.9% sodium citrate (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)용액을 첨가하여 15분간 저장처리하고 이후 고정액을 10방울 정도 첨가하여 원심분리 시켰다. 고정처리는 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 이용하고 이를 3회 반복 처리한 후 세포액을 3~5방울 정도 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하였다.

백혈구세포 표본의 제작은 개체의 날개 정맥으로부터 약 5ml의 혈액을 채취하여 백혈구만 순수 분리하여 이용하였다. 순수 백혈구의 분리는 손과 류 (1999)가 제시한 Ficoll (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)을 이용한 분리방법으로 시행하였고 분리된 세포는 0.06M KCl (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 이용하여 실온에서 15분간 저장 처리하였다. 저장처리가 끝나면 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 10 방울정도 첨가한 후 원심분리하고 이 후 동일 고정액으로서 3회 정도 반복 처리한 후 슬라이드 표본을 제작하였다.

(3) Q-FISH

FISH용 probe 제작을 위하여 (CCCTAA)₇으로 구성된 42mers 단일 oligomers를 primer로 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 수행하고 이의 증폭된 산물을 PCR-DIG Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로서 digoxigenin labeling을 하였다.

본 연구에서 수행한 FISH 방법은 조 등(2005)이 제시한 닭의 초기 배자 및 발생 조직에 대한 telomeric DNA분석을 위한 FISH법과 동일하게 실시하였다. 이를 간단하게 소개하면 슬라이드 표본을 RNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 에탄올로 탈수 건조시켰다. 이후 Hybridization 용액 (13μl formamide, 5μl hybridization buffer, 2μl(100ng/μl) chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨린 후 밀봉하고 85°C에서 5분간 변성(denaturation)시킨 후 38.5°C에서 12시간이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2×SSC로서 72°C에서 5분간 처리하고 실온의 PN buffer (0.1% sodium

phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로 세척하였다. 형광 접합 탐지를 위하여 anti-digoxigenin-fluorescein (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 처리하고 커버 글라스로 덮은 후 38.5°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 PN buffer로 세척하고 암소에서 건조시켰다. 배경염색은 propidium iodide solution (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮고 암소에서 건조시킨 후 검경하였다. 형광 접합 발현 양상은 523nm 파장대의 필터 (WIB filter)를 부착한 형광 현미경 (Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 처리된 슬라이드를 형광현미경으로 관찰한 후 100배의 대물렌즈 하에서 평균 5개의 간기 상을 한 프레임으로 하여 디지털 카메라 (Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하고 이를 컴퓨터에 저장하였다. 저장된 상은 이미지 분석 프로그램 (Image analyzer program, MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 대비 telomeric DNA 분포량을 분석하였다.

(4) 통계분석

닭의 조직간 및 성장 주령 간 세포내 telomeric DNA 함량을 비교분석하기 위하여 SAS 통계 패키지 (SAS, 2000)를 이용하여 ANOVA/Turkey법으로 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

실용 브로일러를 대상으로 생리활성물질 첨가 급여가 개체별 세포의 생리적 활성도에 미치는 영향을 살펴보고자 각 조직별 세포들에 대한 텔로미어 함량을 분석하였다. 대조구(CON)는 시판 육계 배합 사료로 자유채식(ad libitum)을 시켰고, 생리활성물질 첨가 급여구로서는 가시오갈피 및 두충을 총 급여량 대비 0.5%와 1%를 각각 급여하였다. 급여기간은 각 처리별 7일령에서부터 35일령까지 급여 시험을 실시하였으며 14일령에 각 처리별 5수씩 혈액을 채취하여 처리구간 텔로미어의 함량을 분석하였고, 35일령 시험종료에는 처리별 5수씩 도살하여 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 세포의 텔로미어의 함유율을 분석하였다.

각 조직들의 텔로미어 함량은 양적형광접합보인법 (quantitative fluorescence in situ hybridization; Q-FISH)의 분석 방법을 이용하였다. 분석할 개체들의 각 조직은 분쇄 후 세포만을 분리하고 고정한 후 표본을 제작한 다음 FISH를 수행하였다. 처리된 표본들은 형광현미경 하에서 5~6개의 세포 간기상을 한 개의 프레임으로 이미지를 획득하였다. 획득한 30개 이상의 이미지상을 이미지 분석 프로그램(Metamorph[®])을 이용하여 각 조직별 세포내 텔로미어 함량을 분석하였다.

Fig. 1은 본 분석 방법으로 획득한 대표적 텔로미어의 접합 간기상들로서 각 genome당 텔로미어의 상대적 함유율이 0.71, 1.41, 2.19 및 2.86%로 분석된 세포양상이다.

Table 11은 처리구별 14일령 개체들의 혈액내 백혈구 세포의 텔로미어 함유율을 분석 제시한 값으로 평균 2.96%로 처리구별 유의적 차이는 없었다. 본 결과에서 나타난 바와 같이 초기 생리활성물질 첨가 급여가 단 시간에 개체의 백혈구 세포에 생리활성도에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 그러나 35일령 시험 종료시 개체들의 혈액 내 백혈구 세포의 텔로미어 함유율은 평균 2.83%로 14일령에 비해 감소됨을 보이나 처리 간 생리활성물질 첨가 급여에 따른 유의적인 ($p < 0.01$) 영향이 있음을 나타내고 있다 (Table 12).

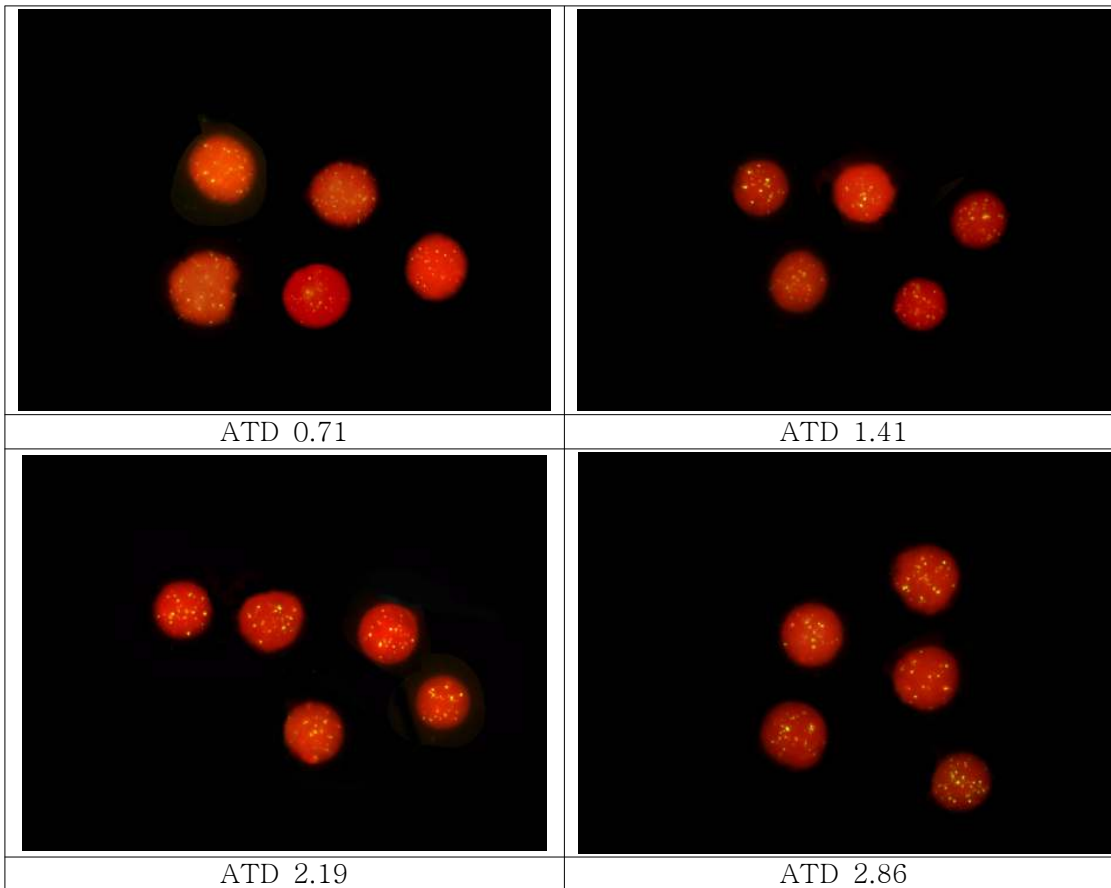


Fig. 1. The representative telomere distribution patterns of lymphocytes interphase nuclei in broiler by FISH using telomeric DNA probe; ATD(Amount of Telomeric DNA)

Table 11. The amount of telomeric DNA of the intephase nuclei in lymphocytes of broiler chickens at 14 days

Treatments	Con	T1	T2	T3	T4
No. of cells	600	700	700	600	800
Amount of telomeres(%)	2.88±0.06	3.02±0.04	2.98±0.04	2.93±0.04	2.99±0.04

Con(control), T1(*Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), and T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

Values are not significantly different among treatments.

가시오갈피 및 두충의 첨가 급여가 급여치 않은 개체들에 비해 현저히 높은 텔로미어 함유율을 보이고, 특히 가시오갈피 첨가가 두충에 비해 더욱 효과적임을 나타낸다. 반면 0.5% 및 1%의 첨가 농도간에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 가시오갈피와 두충의 첨가 급여가 브로일러의 백혈구 세포의 생리활성도에 영향을 미침으로 특히 개체의 노화 및 면역과 관련하여 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다 (Fig. 2)

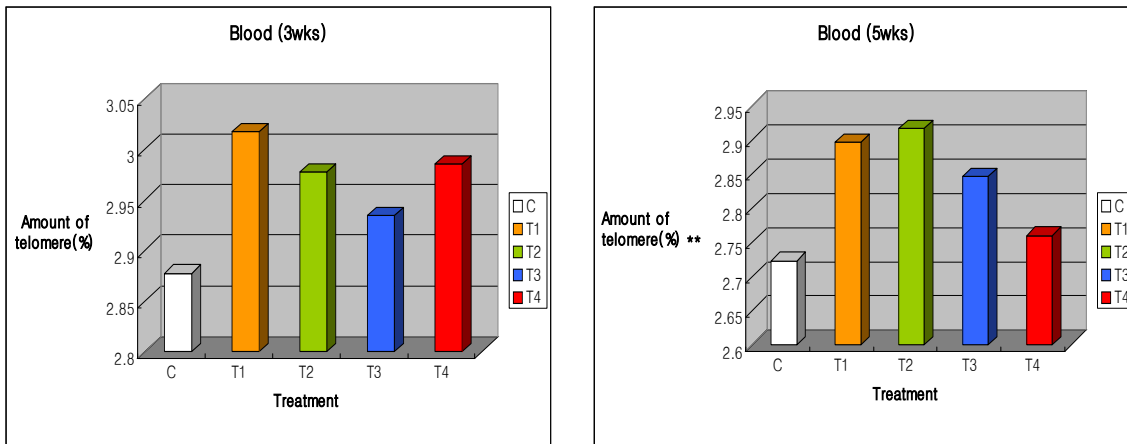


Fig. 2. The histogram of telomere quantities of lymphocytes of 14d and 35d-broiler chickens with dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae*

Table 12는 35일령 시험 종료시 처리구 별 개체 간 혈액, 간, 폐, 심장 정소 세포들의 텔로미어 함유율을 분석 제시한 값이다. 전체적으로 조직별 세포간 텔로미어의 함유율은 거의 차이가 없는 것으로 나타나나 생리활성물질 첨가 급여구간에는 조직 별 다소 차이를 보이고 있다. 이들 중 폐와 같은 호흡기 세포의 경우 생리활성 물질 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 텔로미어 함유율을 보이고 있으며, 첨가 물질 및 농도 간에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 가시오갈피와 두충의 첨가가 텔로미어 함유율에 미치는 효과를 요약하여 Fig. 3과 같다. 이상의 결과로서 본 시험에 이용된 첨가 물질들이 개체의 항 산화와 관련하여 매우 긍정적 효과를 보임에 따라 브로일러의 생리활성에 유의한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 12. The amount of telomeric DNA of intephase nuclei in the tissues of broiler chickens at 35 days

Treatments	Con	T1	T2	T3	T4
Blood	2.72±0.06 ^b (n=700)	2.90±0.04 ^a (n=700)	2.92±0.04 ^a (n=700)	2.85±0.04 ^{ab} (n=600)	2.76±0.04 ^{ab} (n=700)
Liver	2.25±0.06	2.36±0.04	2.38±0.04	2.31±0.06	2.32±0.07
Lung	2.22±0.06 ^b (n=150)	2.26±0.05 ^{ab} (n=150)	2.33±0.04 ^a (n=150)	2.30±0.04 ^a (n=150)	2.32±0.05 ^a (n=150)
Heart	2.30±0.04 (n=150)	2.37±0.07 (n=150)	2.40±0.24 (n=150)	2.36±0.04 (n=150)	2.37±0.04 (n=150)
Testis	2.33±0.04 (n=150)	2.36±0.04 (n=150)	2.37±0.03 (n=150)	2.32±0.05 (n=150)	2.33±0.04 (n=150)

Con(control), T1(*Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), and T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

^{a,b}Values (Means±SE) with different superscripts differ significantly among treatments. (p<0.01)

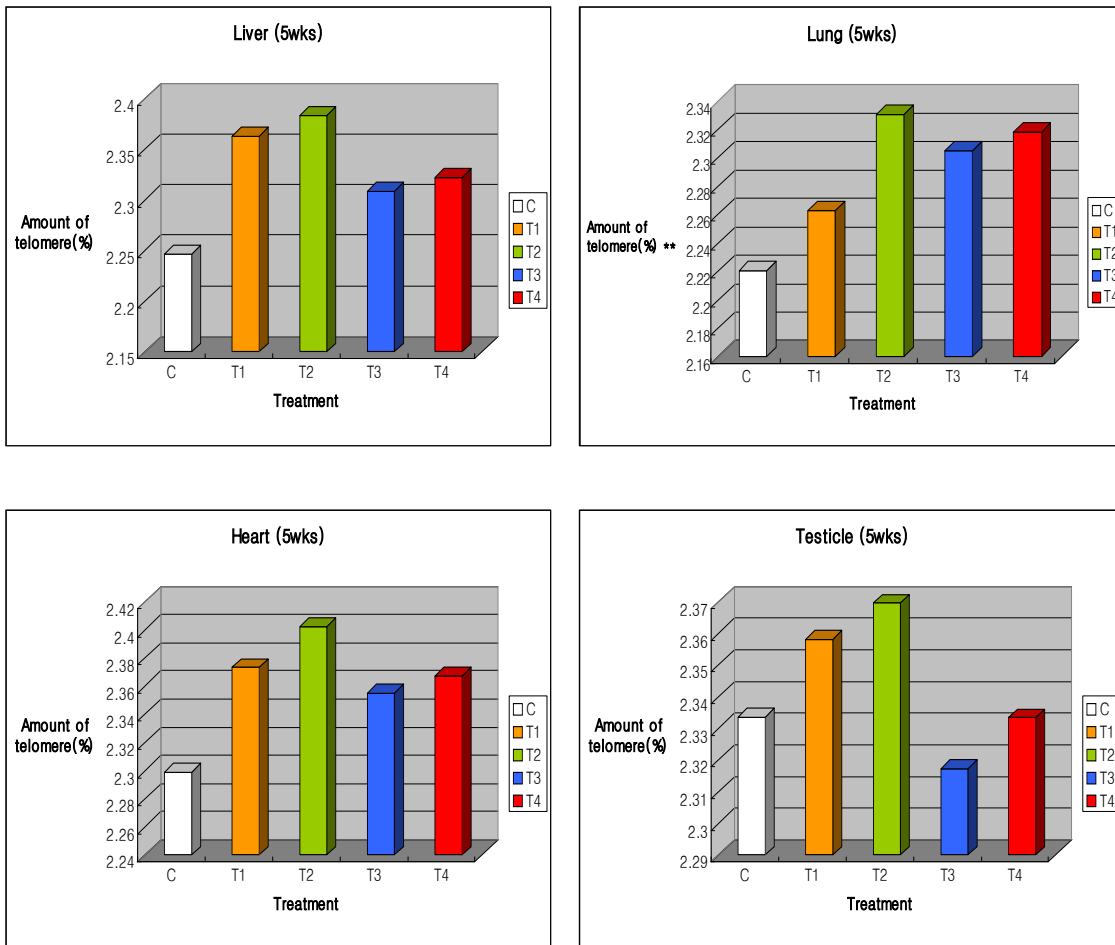


Fig. 3. The histogram of telomere quantities of liver, lung, heart, and testis cells of 35d-broiler chickens with dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommiaceae*; C(control), T1(*Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), and T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

4. 산란계에서 천연 항산화 사료첨가제 개발

가. 재료 및 방법

(1) 공시동물 및 실험설계

산란계 친환경 사육방법을 모색하고 항산화 사료첨가제 개발을 위하여 경남 산청군 소재 산골농장에서 하이라인브라운 상업용 산란계 360수를 대상으로 본 시험을 실시하였다. 본 시험에 이용된 항산화 사료첨가제로서 육계 시험에서와 동일하게 가시오갈피 및 두충을 이용하였고 급여 수준 또한 급여량 대비 0.5% 및 1%로 제한하였다. 급여기간은 초기산란시부터 피크기까지 20주령부터 30주령으로 제한하고 30주령말 개체의 생산 능력 및 생리적 지표를 분석하였다. 본 시험의 시험설계는 Table 13과 같다.

Table 13. Experimental design of dietary supplementation of Siberian ginseng leaf and Eucommia bark leaf on layer

Item	Treatment				
	Contol	Siberian ginseng			Eucommia bark
level	0%	0.5%	1.0%	0.5%	1.0%
replication(n)	12	12	12	12	12
No. hens	72	72	72	72	72

(2) 시험분석 항목 및 방법

(가) 시험샘플 채취

사양시험이 종료된 후 각 처리구 당 8수 모두 40수에서 경정맥을 절개하여 헤파린 튜브에 채혈을 실시하고 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 혈장을 획득하였다. 소장 및 간장을 획득하기 위하여 복강을 가위로 절개하고 위장의 유문부에서 맹장앞 부분까지 절단하여 소장을 획득하고 간 조직을 채취하여 무게를 측정하였다. 이어서 냉각된 생리식염수로서 소장내부를 세척하고 소화물을 제거한 후 가위로 장간막 부위를 절개하여 생리식염수에 세척하였다. 이어서 얼음으로 냉각된 알루미늄판위에서 절개된 소장을 펴서 glass slide를 이용하여 점막층을 채취하여 무게를 측정하였다. 모든 조직은 액체질소에 냉동하여 -70℃에 보관하여 분석에 사용하였다.

(나) 조직분리

세포내 cytosol 및 mocrosome의 분리는 Jang 등 (2001)이 사용한 방법으로 간단히 기술하면 다음과 같다. 조직내 항산화 효소의 활성도를 측정분석하기 위해 소장 점막 및 간 조직을 일정량 채취하여 가위로 세절한 후 sucrose 용액 (0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA; pH: 7.4)을 1:6 용량으로 혼합하였다. 혼합 후 유리균질기로서 12회 연속적으로 균질화한 후 4℃, 10,000 ×g에서 10분간 원심 분리하였으며, 다시 상층액을 초고속원심분리기 (Beckman, J2-21-M/E)를 사용하여 4℃, 105,000 ×g에서 60 분간 초고속원심 분리하였다. 이때 상층액은 cytosol로 분획하였고, pellet은 microsome 분획으로 150 mM KCl, 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)로서 단백질 농도가 약 20 mg/ml가 되도록 부유시켜 일정량씩 분주하였다.

(다) 소장 점막 및 간조직에서 항산화 효소 및 지표 분석

세포조직의 cytosol에 존재하는 superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정은 xanthionine이 xanthine oxidase system에 의하여 superoxide anion이 환원형 cytochrome C로 전환되는 속도를 550 nm에서 전환되는 속도를 1분간 측정하였다(McCord와 Fidovich, 1969). Glutathione peroxidase (GSHPx) 활성도 측정은 cumen hydroxide 첨가에 의하여 환원형 glutathionine 으로부터 산화형 glutathionine의 생성되는 속도를 측정하였으며, 과량의 glutathionine reductase 와 일정량의 NADPH 존재 하에서 산화형 glutathionine이 다시 환원되는 속도를 조사하였다 (Tappel, 1978). 세포 조직내 cytosolic glutathione-S-transferase (GST) 활성도 chloro-

dinitrobenzene (CDNB)을 기질로 하여 340 nm에서 conjugated CDNB 양을 측정하였으며, 단위는 mg 단백질당 1분간 생성된 conjugated CDNB의 μmol 수로 표시하였다 (Nijhoff와 Peters, 1992). 간의 microsome 내 지질과산화물은 thiobarbituric acid (TBA) 방법에 의해 생성된 malondialdehyde (MDA)양을 측정하는 방법으로 과산화지질물 형성을 측정하였다. 반응물은 532 nm에서 분광광도계로서 흡광도를 측정하여 malondialdehyde (MDA) 생성량을 측정하였다 (Bidlack과 Tappel, 1973). 단백질은 bicinchoninate (BCA) 방법으로 (Pierce Assay) ELISA를 이용하여 570nm에서 측정하였다.

(라) 난질 분석 및 텔로미어 함량분석

난질의 분석은 시험 종료시(30주령) 산란된 총 148개의 계란을 대상으로 난중, 난백고, 호우유니트, 난각색, 난황색, 난각두께, 난각무게 및 난각밀도를 조사하였고, 텔로미어의 함량분석은 Q-FISH 방법 (육계에서와 동일)을 이용하여 처리구별 5마리의 개체로부터 채혈 후 백혈구 내 상대적 함량을 측정하였다.

(마) 통계처리

사료 처리에 따른 산란계의 항산화 효소 특이적 활성도, 난질 및 텔로미어 함량 분석에 대한 결과를 SAS package program (SAS, 1999)을 이용한 Duncan 다중비교에 의해 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 항산화 효소 및 지표 분석

산란계에서 20주령에서 30주령까지 10주 동안 가시오갈피 및 두충 급여에 따른 소장 점막 세포 및 간 조직의 항산화 효소 및 관련 생화학 지표에 대한 결과는 Table 14 및 15에서 제시한 바와 같다. 가시오갈피 급여에 따른 소장 점막 조직에 존재하는 항산화 효소인 SOD 특이적 활성도는 유의적 변화가 없는 것으로 나타났으나, 두충 0.5% 급여구(T3)에서 대조구에 비해 SOD 활성도가 유의적으로 ($P<0.05$) 감소하였다. 항산화 및 이물질 배설에 관여하는 효소인 GST 효소는 가시오갈피 1.0% 및 두충 1.0% 급여구에서 대조구에 비해 유의적으로 ($P<0.05$) 증가되었다. 한편 GSHPx 효소는 가시오갈피 처리구에서는 유의적 차이가 없었으나, 두충 0.5% 급여구(T3)에서 현저히 ($P<0.05$) 감소되었다. 세포내 microsome의 지질과산화(MDA)를 조사한 결과에서는 모든 구에서 비슷한 수준을 보였다(Table 14).

간 조직내 항산화 효소 및 생화학 관련지표를 살펴보면 (Table 15), 항산화 효소인 SOD 활성도는 가시오갈피 및 두충 급여구와 대조구 모두 비슷한 활성도를 나타내었다. GSHPx 및 과산화지질물의 표시물인 MDA 함량 모두 처리 간 비슷한 결과를 보여 가시오갈피 및 두충 첨가는 뚜렷한 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 그러나 간 조직내 GST 활성도는 가시오갈피 급여구 (T1 및 T2) 및 두충 0.5% 급여구 (T3)에서 대조구 보다 유의적으로 ($P<0.05$) 증가되었다

본 연구는 생체내 지질과산화 작용으로 발생하는 유해 산소기의 생성을 억제하여 체내 항상성을 증가시키는 작용이 있는 천연생리활성 물질이 다량 함유된 가시오갈피 및 두충을 0.5% 1.0%를 배합사료에 첨가하여 산란계의 산란지표 및 체내 항산화 방어기능에 대하여 조사하였다. 본 연구 결과, 가시오갈피 및 두충 급여가 산란능력의 절정기에 있는 30주령 산란계의 소

Table 14. Effect of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommia* on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the intestinal mucosa of laying chickens aged 30 weeks

Treatment*	Specific SOD activity (U/mg protein)	Specific GST activity (U/mg protein)	Specific GSHPx activity (U/mg protein)	MDA (mg/ml)
Con	0.94 ±0.12 ^a	0.075 ±0.005 ^c	0.38 ±0.03 ^a	1.14 ±0.07
T1	0.98 ±0.08 ^a	0.093 ±0.007 ^b	0.33 ±0.04 ^a	1.39 ±0.13
T2	0.88 ±0.08 ^a	0.109 ±0.003 ^a	0.30 ±0.04 ^a	1.16 ±0.11
T3	0.41 ±0.03 ^b	0.072 ±0.006 ^c	0.13 ±0.01 ^b	1.29 ±0.10
T4	1.02 ±0.06 ^a	0.112 ±0.004 ^a	0.31 ±0.03 ^a	1.48 ±0.14

*Con(control), T1(Siberian ginseng; *Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

^{a,b,c}Values with different superscripts differ significantly(p<0.05) among treatments.

장 및 간장 조직에 미치는 영향은 GST 효소 활성도가 증가되는 등 비교적 긍정적인 것으로 판단된다. GST 효소는 체 조직내 항산화 방어 작용 및 이물질의 해독에 미치는 작용에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 천연물에 함유된 항산화 성분은 환경적 스트레스에 의해 야기되는 소장 점막세포에서 생성되는 활성 산소를 제거하여 위장관 점막세포의 손상의 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다. 소장은 내·외부 환경이 만나는 첫 번째 막으로 소화기 질병은 물론 일상적인 가축의 생산성에 중요한 영향을 미친다. 또한 동물이 섭취하는 물질의 종류에 따라 체내 방어 작용에 있어서 간 보다 소장에서 더욱 민감하게 외부 물질에 반응하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서도 가시오갈피 및 두충을 산란계 사료에 급여할 경우 소장 점막세포내 이물질 배설에 관여하는 GST 효소의 활성도를 증가시키는 것으로 관찰되어 이러한 가능성을 뒷받침해주는 결과를 얻었다. GST는 GSHPx와는 달리 그 구조내 selenium을 함유하지 않으나 hydroperoxide에 작용하여 수용성 물질로 전환하여 쉽게 배설하도록 도와주는 효소로서 세포 조직내 microsome의 지질과산화물을 방지하여 생체막을 보호하는 역할도 가진 것으로 알려져 있다. SOD는 superoxide 이온을 제거하는 효소로서 세포내 2O⁻ 와 2H⁺의 존재 하에서 O₂와 H₂O₂를 생성한다. GSHPx는 환원형 glutathione을 산화형 glutathione으로 산화시키며, hydroperoxide (ROOH)를 hydrolipid(ROH)로 또한 H₂O₂를 H₂O로 환원시키는 작용을 한다.

특히 천연생리활성 물질을 사료로 통해 급여할 경우, 생체세포막막의 불포화 지방산 과산화 방지 기능과 항산화 효소를 증가시킴으로써 과산화 반응으로부터 세포막을 방어하는 역할을 동시에 수행하는 것으로 생각되고 있다. 최근에는 곰팡이 독소인 mycotoxin 감염된 곡류사료를 섭취할 경우 체내 유해 산소가 다량 발생되어 간 등과 같은 체내 장기의 손상을 유발하여 가금의 생산성에 심각한 부작용을 초래하는데, 항산화제를 급여할 경우 체내 독성을 감소시킬 수 있다. 또한 가축에서 지속적인 산화적 스트레스는 특히 육계와 같은 가금에서 대사성 질환인 복수증을 유발시키는 것으로 알려져 있으며 천연 물질에는 GST 효소와 같은 독성물질 해독 효소의 활성도를 증가시켜 독성물질을 체외로 배설하거나 무독화시킨다.

Table 15. Effect of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommia* on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the liver of laying chickens aged 30 weeks

Treatment*	Specific SOD activity (U/mg protein)	Specific GST activity (U/mg protein)	Specific GSHPx activity (U/mg protein)	MDA (mg/ml)
Con	0.77 ±0.04	0.083 ±0.002 ^c	0.25 ±0.07	1.40 ±0.08
T1	0.74 ±0.04	0.958 ±0.002 ^a	0.21 ±0.04	1.73 ±0.30
T2	0.73 ±0.01	0.085 ±0.002 ^{bc}	0.28 ±0.05	1.31 ±0.08
T3	0.72 ±0.04	0.092 ±0.004 ^{ab}	0.24 ±0.03	1.24 ±0.08
T4	0.69 ±0.06	0.088 ±0.002 ^{bc}	0.29 ±0.04	1.31 ±0.25

*Con(control), T1(Siberian ginseng; *Acanthopanax senticosus*, 0.5%), T2(*Acanthopanax senticosus*, 1.0%), T3(*Eucommiaceae*, 0.5%), T4(*Eucommiaceae*, 1.0%).

^{a,b,c}Values with different superscripts differ significantly(p<0.05) among treatments.

본 실험 결과 가시오갈피 및 두충과 같은 천연물질을 산란계에게 급여할 경우 소장 점막에서 GST 활성도를 유의적으로 증가시키는 것으로 소화관에서 이물질 해독 및 배설에 일부 긍정적인 작용이 있는 것으로 판단된다.

(2) 난질 및 텔로미어 함량 분석

생리활성물질로 알려진 가시오갈피와 두충을 사료내 첨가 급여하여 30주령시 산란계가 산란한 계란의 난질 및 텔로미어의 함유율을 비교 분석하고 이의 결과를 Table 16에 제시하였다. 분석 결과 난중, 난백고, 호우유니트 및 텔로미어의 함유율에 있어 생리활성물질 급여 처리구가 무처리구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다. 반면 난각 두께는 무처리구가 생리활성물질 첨가 급여구에 비해 높게 나타났으며, 난각색, 난황색, 난각무게 및 난각밀도는 처리구별 차이가 없었다. 한편 생리활성물질 급여 농도 간 (0.5%:1%)에는 난질에 차이가 없는 것으로 나타났고, 또한 가시오갈피와 두충 간에도 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 천연 생리활성 물질 급여가 생체 기능 향상을 촉진시켜 난질에 매우 긍정적 효과를 유발한다는 것을 입증하는 것이다. 더불어 백혈구 핵 내 텔로미어의 함유율에서 모든 급여 처리구가 무 첨가구에 비해 현저히 높은 결과를 보이는데 이는 생리활성 물질의 급여가 개체의 생리 활성도 및 기능을 향상 시킨다는 것을 강력히 뒷받침하는 증거라 사료된다. 이상의 결과로 부터 산란계에 있어 소량의 가시오갈피와 두충의 첨가는 체내에 미치는 독성이 없이 개체의 기능성 증가와 더불어 난 형성에 매우 긍정적 영향을 미침으로 향후 기능성 사료 첨가제로 개발 가능성이 매우 높은 천연 소재 물질로 사료된다.

Table 16. Effects of dietary supplementation of Siberian ginseng leaf and Eucommia bark leaf on egg quality and the amount of telomeres of lymphocytes from 30wks layer

Treatments	Control	Siberian ginseng 1%	Siberian ginseng 0.5%	Eucommia bark 1%	Eucommia bark 0.5%
Egg weight*	59.32±0.72 ^b	62.03±0.84 ^{ab}	61.90±1.15 ^{ab}	60.69±0.78 ^{ab}	63.03±0.90 ^a
Albumin height**	9.18±0.27 ^b	9.63±0.33 ^{ab}	10.44±0.28 ^a	9.46±0.29 ^{ab}	10.51±0.25 ^a
Haugh unit**	95.07±1.31 ^b	96.72±1.41 ^{ab}	100.42±1.22 ^a	95.95±1.36 ^{ab}	100.46±1.07 ^a
Egg yolk color	9.12±0.08	9.38±0.11	9.40±0.13	9.27±0.09	9.28±0.10
Egg shell color*	17.12±0.62 ^{ab}	18.67±0.82 ^{ab}	16.36±0.71 ^b	18.95±0.45 ^a	19.0±0.71 ^a
Egg shell thickness**	0.45±0.003 ^a	0.41±0.006 ^{cd}	0.43±0.006 ^{ab}	0.42±0.005 ^{bc}	0.40±0.005 ^d
Egg shell weight	7.67±0.08	7.64±0.10	7.75±0.10	7.78±0.10	7.90±0.12
Egg shell density	108.0±0.73	104.44±1.13	106.16±0.87	107.92±1.15	106.94±1.23
Amount of telomere**	1.82±0.06 ^b	2.11±0.04 ^a	2.12±0.04 ^a	2.15±0.04 ^a	2.16±0.04 ^a

^{a,b,c,d} Values (Mean±SE) with different superscripts within same row significantly differ at P<0.05* and P<0.01**

3절 육계의 사육 밀도에 따른 유용유전자 발현양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

1. 육계의 사육 밀도에 따른 지방 및 근육발달 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴

본 세부과제에서는 사육밀도에 따른 육계의 지방 및 근육관련 유전자들의 발현 양상 비교에 주안점을 두었으나 사육밀도 대한 효과는 이들 항목 보다는 스트레스에 미치는 영향이 더 크다고 판단되어 이들 지방 및 근육관련 유전자의 발현 외에 스트레스관련 유전자들의 발현도 분석하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 공시동물 및 사양관리

본 시험에 공시된 시험동물은 육계 수컷 Ross종을 (주)올품에서 구입하였으며 구입 후 2일 간의 적응 기간을 거친 후 4일령 병아리를 완전임의배치법에 의해 고밀도(HD) (575 sq.cm/bird), 표준(SD)(770 sq.cm/bird) 그리고 저밀도(LD)(1150sq.cm/bird)로 나누어 처리당 8 반복으로 구분하였다. 시험사료의 조성 및 화학적 성분은 세부2과제에서 제시한 Table 1에 나타난바와 같다. 공시동물들은 35일령까지 자유 급이를 실시하였고 시험 종료일에 근육과 간을 취하여 즉시 액체질소에 급랭 하였으며, 분석 때까지 -80℃에서 보관하였다.

(2) RNA 분리

각 샘플을 액체질소에 넣고 분쇄한 후 Trizol(invitrogen)을 넣고 실온에서 5분간 배양시킨 후 Trizol 1ml당 chloroform 0.2ml을 첨가하고 15초간 교반시키고 실온에서 2분 반응시켰다. 반응시킨 반응물을 12000g, 4℃, 15분간 원심분리한 후 상층액에 isopropanol 0.5ml을 첨가하고 10분간 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 반응물을 12000g, 4℃, 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 RNA 펠렛을 회수하였다.

(3) RT에 의한 cDNA 합성

reverse transcription system(promega)을 이용하였으며 primer는 oligo(dT)를 이용하였다. 반응조성은 RNA 1.5μg, buffer 4μl, MgCl₂(25mM) 3μl, dNTP(2.5mM) 1μl, reverse transcriptase 1μl, primer 0.5μl이며 total volume은 DEPC로 20μl로 맞추었다. 이들 반응물은 25℃에서 5분간 접합과정과 42℃에서 60분간 확장과정을 통하여 cDNA를 합성하였으며 이후 70℃에서 15분간 열처리를 하여 역전사 효소를 불활성화 시켰다. 생성된 cDNA는 다음 단계의 실험을 위하여 -20℃에서 보관하였다.

(4) real-time PCR

(가) primer information

Table 1. Primers used for semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	size	Tm(°C)
HSP70	Forward	AATCTATCATCATGTCTGGCAAAGGGCCGG	220bp	55
	Reverse	GCGGCCGATGAGACGCTTGGCATCAAAGAT		
HSP90	Forward	ATGCCGGAAGCTGTGCAAACACAGGACCAA	242bp	55
	Reverse	GGAATCAGGTTAATTTTCAGGTCTTTTCCA		
HMGR	Forward	ATGCATGGCCTTTTTGTGGCTCTCATCCA	270bp	55
	Reverse	CTTGAGAAGATTGTGAGGAGACCAGCAATA		
HSP25	Forward	ATGCTTTGCCGGATGCACCTCGCTCATTTC	220bp	65.5
	Reverse	CGAAGTTCTTCACATCCTGGCAGACGGAGA		
Bcl-X	Forward	ATGTCCAGCAGTAACCGGGAGTTAGTGATT	200bp	68
	Reverse	AGCGCCTGCCTCACGTCGGATGCTCGAACA		
Bcl-2	Forward	CGCTGCTTCCCCTCGGAAACCATGGCTCAC	200bp	67.5
	Reverse	GCCGGGGGCACCACTCTAGCAGCAGCCGAG		
PPAR gamma	Forward	CAATGGTTGACACAGAAATGC	200bp	53
	Reverse	GCTTGTTTGATCAGCTCTTCC		
FAS	Forward	CACCCCAAACAAGCTCATACA	520bp	57
	Reverse	ACCTTGGCTAATGCAGCAAG		
Myogenin	Forward	ATGGAGCTCTTTGAGACCAAC	520bp	55
	Reverse	GTCAGATCCTTCTCCTCCAAA		
Myo-D	Forward	ACTCCGACGTTCCCAGTCGCC	520bp	55
	Reverse	GGTGCTCCTCGGGCTTCAGCA		
Myf-5	Forward	ATGGAGGTGATGGACAGCTGC	520bp	60
	Reverse	GGAATCCTTCTCCTTGTGCAG		
Beta-actin	Forward	AGGACATCTCCGTGGAAGAGA	520bp	55
	Reverse	TCCTGTAGAGGCACCTTCTCT		

(나) PCR condition

cDNA 1 μ l, primer(5pmole)는 각각 0.5 μ l, SYBR Green 10 μ l, DEPC H₂O 8 μ l 반응물을 94°C 5분간 최초의 변성을 시키고, 94°C 15초간 두 번째 변성, 각각 유전자에 맞는 접합온도를 30초간 접합과 확장과정을 72°C 30초간 실시하였다. 그리고 94°C 1분간 재 접합 과정을 거친 후 55°C에서 1분간 재 확장 과정을 실시하였다. 마지막으로 유전자간 설정한 접합온도에서 94°C까지 0.5°C씩 상승하면서 94°C에 이를 때까지의 형광접합물질인 SYBR이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 육계의 사육밀도에 따른 지방, 근육 및 스트레스관련 유전자 발현에 미치는 영향

(가) 지방 및 근육관련 유전자 발현양상 비교

육계의 사육밀도가 지방 및 근육관련 유전자의 발현에 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 지방 합성효소유전자인 FAS(fatty acid synthase)와 지방세포분화 관련 유전자들의 전사조절자인 PPAR γ 를 RT-PCR을 이용하여 간 조직에서 분석하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이 PPAR gamma mRNA의 발현은 브로일러의 사육밀도에 영향 받지 않는 것으로 나타났다. 지방합성효소 유전자인 FAS 또한 사육밀도에 관계없이 처리간의 발현의 차이를 볼 수 없었다. 사육밀도가 근육의 발달에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 근육발달관련 전사인자인 myf5, Myo-D, Myogenin을 육계의 근육조직에서 분석하였다. 이들 전사인자들의 유전자발현은 육계의 사육밀도에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

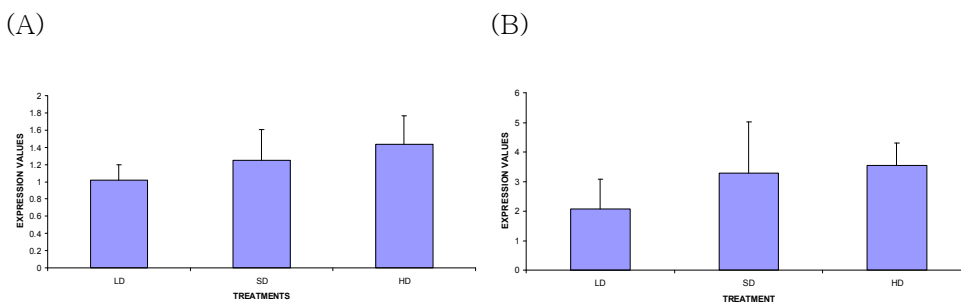


Fig. 1. The mRNA expression levels of PPAR gamma(A) and FAS(B) in liver of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD). Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis. The graphical data represent mean \pm S.D of eight samples per treatment.

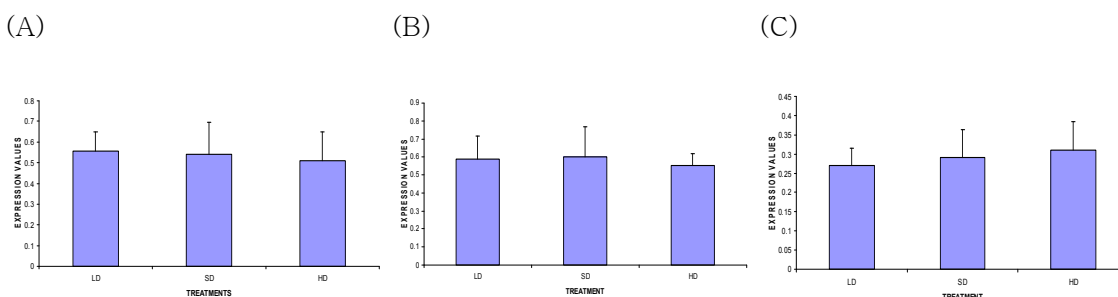


Fig. 2. The mRNA expression levels of Myf5(A), Myogenin(B) and MyoD(C) in Muscle of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD). Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis. The graphical data represent mean \pm S.D of eight samples per treatment.

육계의 사육밀도는 실질적으로 위와 같이 근육 및 지방관련 인자들에는 영향을 미치지 않지만 사육밀도는 동물의 스트레스에 직접적으로 영향을 미친다. 따라서 본 연구에서는 스트레스관련 지표인자들을 선정하여 이들 인자가 육계의 사육밀도에 어떻게 반응하는지를 조사하였다.

(나) 스트레스관련 유전자 발현 양상비교

육계의 사육밀도는 체중, 사료섭취량, 사료효율 등 생산성 지표뿐만 아니라 사육환경에 따른 질병 유발, 면역력 약화 및 스트레스 등에 영향을 미친다. 따라서 본 과제에서는 환경스트레스에 의해 유도되는 heat shock protein(HSP) 유전자들(Basu et al., 2002; Schlesinger, 1986)과 스트레스 마커로 가장 일반적으로 조사되는 호르몬인 cortisol의 전구물질로 이용되는 콜레스테롤의 생합성의 제한효소인 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR)(Gornati et al., 2004)의 발현 양상을 분석함으로써 육계의 사육밀도에 따라 이들 유전자들이 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다.

사육밀도에 따른 육계의 생산능력은 사료섭취량을 제외하고는 큰 차이가 없는 것으로 나타났으나 스트레스 관련 유전자들의 발현에는 큰 영향을 나타내었다. HSP와 HMGCR 유전자들의 발현은 35일령 육계의 혈액과 간 조직에서 조사 분석하였다. 그림에서 보는 바와 같이 HSP70과 HMGCR의 발현은 혈액과 간 조직 모두에서 사육밀도에 따라 영향을 받았음을 알 수 있다 ($P < 0.05$)(Fig. 3, 4). HSP70과 HMGCR 모두 고밀도 사육구에서 높은 발현을 보였으며, 저밀도와 표준사육 밀도 사이에는 발현의 차이를 볼 수 없었다. 고밀도 사육 처리구에서의 이들 유전자의 발현량은 저밀도 및 표준사육밀도의 발현량의 약 2배를 나타내었다. Heat shock protein 들은 환경적 스트레스에 의해 합성되어지는 잘 보존된 단백질 계(family)로서 환경변화에 대처할 수 있도록 관련 기작들을 유도한다. HMGCR은 cortisol의 생합성에 영향을 미치는데, 고밀도 사육에 따른 HMGCR의 발현 증가는 간접적으로 혈액과 간에서 cortisol의 증가를 뒷받침하여 준다고 할 수 있다.

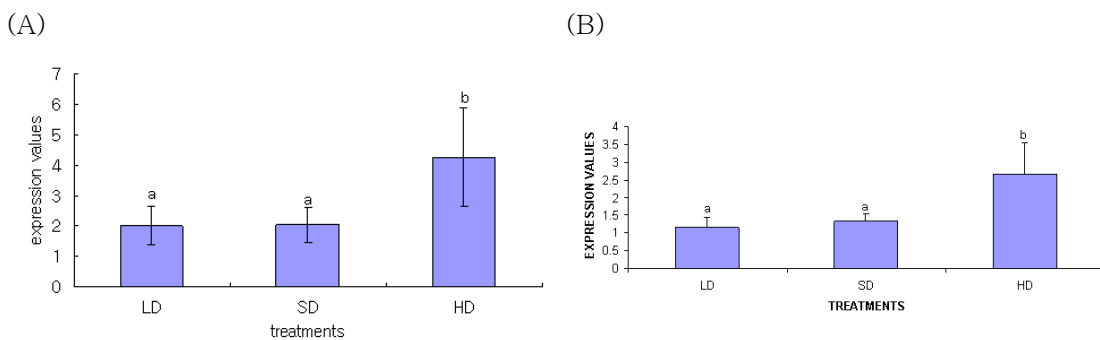


Fig. 3. The mRNA expression levels of HSP70 in Blood(A) and Liver(B) of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD). Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis. The graphical data represent mean \pm S.D of eight samples per treatment. The bars representing the treatment with different superscripts (a,b)are significantly different with $P < 0.05$.

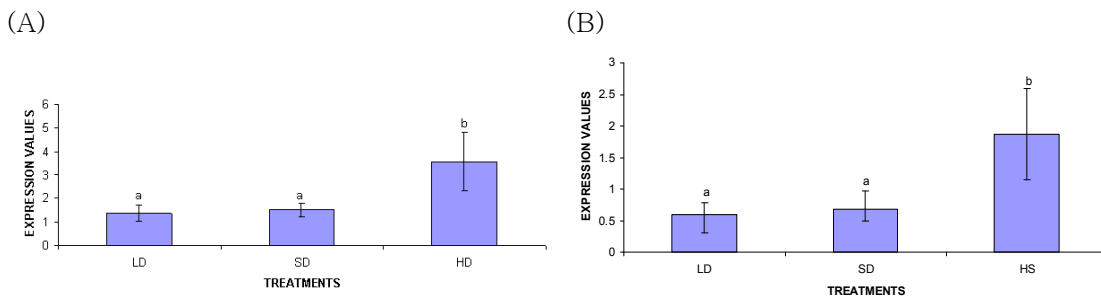


Fig. 4. The mRNA expression levels of HMGCR in blood(A) and liver(B) of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD). Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis. The graphical data represent mean \pm S.D of eight samples per treatment. The bars representing the treatment with different superscripts (a,b)are significantly different with $P < 0.05$

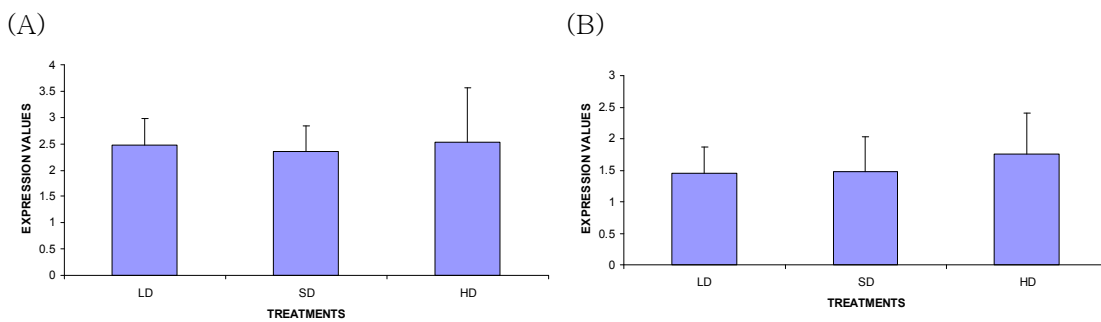


Figure 5. The mRNA expression levels of HSP90 in blood(A) and liver(B) of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD). Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis. The graphical data represent mean \pm S.D of eight samples per treatment.

본 시험에서는 HSP90유전자 또한 위와 같은 방법으로 조사 분석하였다. HSP90유전자의 발현 또한 고밀도 사육시에 저밀도 및 표준밀도보다 높게 나타났으나 유의성은 없었다(Fig. 5). 사육밀도와 HSP의 발현의 상호관계는 가금류에서 조사 보고된 바 없으나 Sea bass(어류)를 이용한 시험결과(Gornati et al., 2004)를 보면 사육밀도(stocking density)는 HSP70과 HMGCR의 발현에 영향을 미쳤으나 HSP90에는 영향을 하지 못한 것과 유사한 결과임을 알 수 있다. HSP25유전자를 간에서 조사분석한 결과 처리에 차이가 없었다(Fig. 6). HSP family에 속한 유전자들이라도 사육밀도에 따른 발현 양상은 다르게 나타남을 볼 수 있었다. HSP 및 HMGCR의 발현을 혈액과 간에서의 발현을 비교한 결과 두 시료 간에 차이가 없음을 알 수 있었다. 따라서 스트레스와 관련한 육계의 스트레스 지수를 확인하기 위하여 혈액을 이용하여 측정할 수 있음을 알 수 있다. 본 시험은 HSP와 HMGCR를 스트레스관련 biomarker로서 활용할 수 있음을 보여준다. 스트레스와 세포의 사멸(apoptosis)과의 연관성을 확인하기 위하여 Bcl-x와

Bcl-2유전자의 발현을 간에서 조사 분석 하였다(Fig. 7). 포유동물이 스트레스를 받게 되면 세포 사멸관련 유전자들이 발현되어 anti-apoptotic response 기작을 유발하기 때문에 본 과제에서도 위의 두 유전자의 발현을 조사하였다. 그러나 육계에서 사육밀도에 따른 스트레스는 간 조직에서의 세포사멸 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

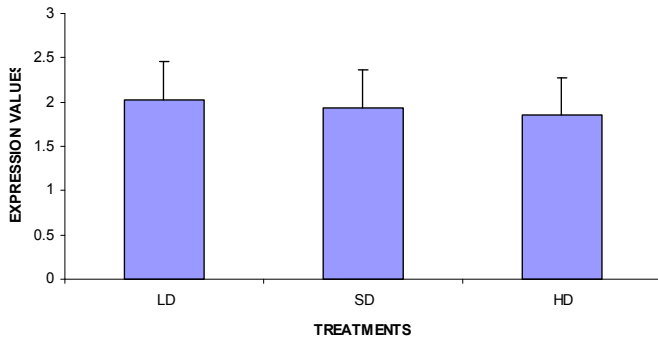
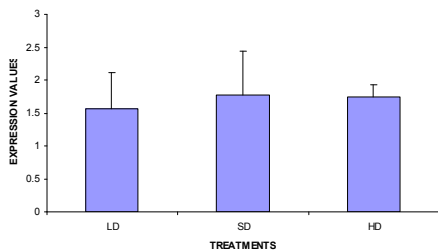


Fig. 6. The mRNA expression levels of HSP25 in liver of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD). Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis. The graphical data represent mean \pm S.D of eight samples per treatment.

(A)



(B)

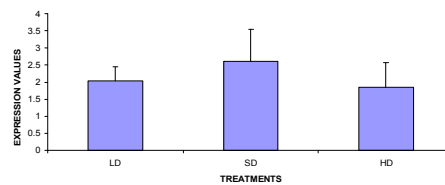


Fig. 7. The mRNA expression levels of Bcl-2(A) and Bcl-X(B) in liver of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD). Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis. The graphical data represent mean \pm S.D of eight samples per treatment.

2. 육계의 사육밀도에 따른 면역 관련 유용 유전자 발현 연구

가. 재료 및 방법

(1) 육계 사양시험

(가) 공시동물 및 사양관리

본 시험은 1일령 육계(Ross 308)을 무감별로 184수를 (주)올팜에서 공급받아 7일령 (BW : 185.63±0.53g)까지 적응기간을 거친 후 사육밀도에 따라 저밀도(LSD), 중밀도(MSD) 및 고밀도(HSD) 3개의 처리구로 설정하였다. 병아리 케이지의 크기는 60cm(L)×77cm(W)×40cm(H)로서 저밀도구 4수/cage(12반복, 0.116m²/수), 중밀도구 6수/cage(10반복, 0.077m²/수) 및 고밀도구는 8수/cage(8반복, 0.0578m²/수)로서 완전임 배치하였다. 7일령부터 35일령까지의 사육밀도에 따른 사양성적을 조사하기 위하여 시험에 사용한 사료는 상업용 육계사료를 이용하였으며 본 사양관리는 온도 및 명암조절을 갖춘 사육시설에서 본 대학의 육계 사육 관리 지침에 따라 일령별로 사육을 실시하였다. 점등은 24시간 실시하였으며 사육온도는 시험개시 34±1℃로 조절 한 뒤 한 주마다 2℃씩 감소시켜 시험 종료시에 24℃를 유지하였다. 시험사료의 화학적 성분은 Table 2에서 나타낸바와 같다.

Table 2. Chemical composition of basal diets¹

Items	Starter	Finisher
Crude protein, %	20.0	18.0
Crude fat, %	3.0	3.0
Crude fiber, %	6.5	6.0
Crude ash, %	8.0	8.0
Ca, %	0.8	0.70
P, %	1.00	1.00
MEn Mcal/kg	3.05	3.15

¹calculated basis (%)

(나) 시험 샘플채취

사양시험이 종료된 후 각 시험구 당 8수 모두 24수에서 경정맥을 절개하여 헤파린 튜브에 전혈액을 채혈하였다. 획득한 혈액은 mRNA 추출용 및 혈장 생화학성분 분석용으로 각기 나누어 보관하였다. 혈장분리는 3,000 rpm(4℃)에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 획득한 후 -70℃에 보관하여 분석에 사용하였다. 각 장기를 획득하기 위하여 복강을 가위로 절개하고 위장의 유문부에서 맹장앞 부분까지 절단하여 소장을 획득하고 간, 비장, 흉선 및 F-낭 등의 조직을 채취하여 무게를 측정하였다. 이어서 멸균생리식염수로서 각 장기를 세척하여 혈액 및 여분의 수분을 제거하고 액체질소에 급냉한 후 -70℃에 보관하여 분석에 사용하였다.

(2) 분석항목

(가) 체중 및 사료섭취량 측정

체중 측정은 시험 개시(3일령) 및 시험 종료(35일령)에 각기 정해진 시간에 일정하게 체중을 측정하였다. 본 사양시험동안 체중 및 사료섭취량을 조사하여 사료 요구율 및 효율을 계산하였다.

(나) 혈장 생화학적 성분분석

혈장 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 분석은 자동생화학분석기(Hitachi 747, Japan)를 사용하여 실시되었다.

(다) 장기무게 측정

획득한 간, 비장, 흉선 및 F-낭 등과 같은 장기무게는 생체중 100g 당 상대적인 중량으로 환산하여 표시하였다.

(라) 면역 유전자 mRNA 발현

① 혈액에서 백혈구 및 total RNA 분리

각 처리군당 5수씩 혈액을 채취한 후 3ml 넣고 채취한 신선한 혈액과 0.9% NaCl을 혼합하고 Lymphocyte Separation Medium (LSM) 시약을 조심스럽게 분주하여 400x g에서 20분 동안 원심 분리하였다. 이어서 혈장층을 제거한 후, 백혈구층과 LSM층 50%을 흡입하여 동량의 0.9% NaCl를 다시 넣은 뒤 200x g에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 버리고 생리식염수를 다시 넣어 원심 분리하여 세척하여 pellet(백혈구)를 분리하여 취하였다.

백혈구 Total RNA는 GIAmp mini kit를 사용하여 분리하였다. 간단하게 소개하면, EL buffer 에 백혈구를 혼합하고 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 상청액을 제거하였다. 다시 RLT buffer를 넣은 뒤 백혈구 세포를 파괴하기 위해 잘 혼합하고 위의 분해산물을 QIAshredder spin column에 넣은 뒤 14,000rpm에서 2분 동안 균질화하였다. 균질액에 70% Alcohol을 넣고 잘 혼합하여 다시 QIAamp spin column에 넣은 뒤 8,000x g에서 1분 동안 원심분리 후 RW1 buffer로 세척하고 8,000x g에서 1분 동안 다시 세척하였다. 이어서 RPE buffer를 수차례 원심 분리하여 RNase free water를 membrane에 정확히 분주한 후 다시 10,000rpm 1분 동안 용출하여 total RNA를 추출하였다.

② 흉선, F-낭, 비장 및 간 조직에서 total RNA 분리

각 처리군 별로 5수씩 선택한 공시동물의 흉선, F-낭, 비장 및 간 조직으로부터 RNAsol™ kit(TEL-TEST, INC)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 자세한 추출방법은 회사에서 제공된 방법에 따라 실시하였다. 조직을 RNAzol reagent용액에서 homogenization한 후 chloroform을 혼합한 후 원심분리하고 aqueous phase에 2-propanol을 혼합하여 RNA를 침전시켜 분리하고 분리된 RNA를 이용하여 즉시 cDNA를 합성하여 냉장 보관하였다.

③ Real Time-PCR을 이용한 mRNA 발현 조사

RT-product 2 µl, SYBR Green supermix(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 10 µl, 5 pmol의 primer 2 µl, dH₂O 6 µl을 넣어 최종부피 20 µl로 맞춘 다음 real-time PCR(Bio-Rad Laboratories, USA)를 실시하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분, [94°C에서 15초(denaturation), 59°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초(extension)] x 40 cycle, 94°C에서 1분, 55°C에서 94°C까지 0.5°C씩 온도를 서서히 올리며 각 온도마다 10초씩 반응시켰으며, 4°C에서 ∞로 맞추었다. 실시간으로 변화하는 형광의 양상을 관찰하여 Ct값을 구하여 mRNA 발현정도를 측정하였다. 본 실험에서 사용한 사이토카인 종류와 RT-PCR에 사용된 primer의 sequence는 Table 3에서 나타낸바와 같다.

Table 3. Sequences of primers used in Real-time PCR

Item	Direction	Sequence(5' to 3')	Size(bp)
TNF- α	Forward	GAA CTA TCC TCA CCC CTA CC	223
	Reverse	TGA CTC ATA GCA GAG ACG TG	
iNOS	Forward	GCA TCC AAA ATA TGA GTG GT	274
	Reverse	AAG CAC AGC CAC ATT TAT CT	
IFN- γ	Forward	TTC CTT CAT TTT CCT CTT GA	223
	Reverse	ACT GGA AAA CAC AAG GTC AC	
IL-1 β	Forward	GCT CTA CAT GTC GTG TGT GA	167
	Reverse	TGT CGA TGT CCC GCA TGA	
IL-4	Forward	AAC ATG CGT CAG CTC CTG AA	350
	Reverse	TCT GCT AGG AAC TTC TCC AT	
IL-6	Forward	GCT CGC CGG CTT CGA	188
	Reverse	GGT AGG TCT GAA AGG CGA AC	
IL-10	Forward	GCA GAC CAG CAC CAG TCA TC	185
	Reverse	ACT CCC CCA TGG CTT TGT AG	
β -actin	Forward	CAA AGC GCT CGATTT CAT CGC	180
	Reverse	TCT CTT CCA CGG AGA TGT CCT	

(3) 통계처리

사육밀도에 따른 체중 등과 같은 생산성적, 혈액성상, 장기무게 및 사이토카인 등의 발현량은 Proc-GLM(SAS, 1999)에 의해 분산분석을 실시하였으며, 처리간 비교는 Duncan 방법에 의해 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 사육밀도에 따른 증체, 사료섭취량 및 사료 요구율

사육밀도에 따른 육계의 사양성적 결과는 Table 4에서 나타낸바와 같다. 전 사육기간 동안 (7-35일령)에서 측정된 체중의 변화를 살펴보면 모든 처리구에서 유의적 차이는 없었지만 저밀도구(LSD) 구에서 가장 높은 수준의 체중 및 증체율을 나타내었다. 체중비교시 저밀도구는 중밀도(MSD) 및 고밀도(HSD)에 비해 유의적인 차이 없이 각각 6.48% 및 6.1%의 체중 증가를 보였다. 사료섭취량은 저밀도구가 중밀도 및 고밀도구에 비해 유의적 ($P < 0.05$)으로 증가되는 것으로 나타났다. 사료요구율 (FCR)를 살펴보면 유의적 차이는 없었지만 저밀도구가 다른 구에 비해 감소되는 경향을 보였다.

이와 같은 결과로 보아 육계에서 저밀도구사육은 체중 및 사료요구율 등에는 유의적 영향을 미치지 않았고 사료 섭취량은 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 비록 유의적인 차이는 없었지만 저밀도구에서 고밀도구에 비해 약 6% 이상의 증체율이 증가되고 사료섭취량이 증가되는 것으로 보아 동물체로서는 사육밀도에 따른 스트레스 요인이 저밀도 사육에 의해 완화되고 있음을 의미하는 지표로 생각되어진다.

Table 4. Effect of stocking density on growth performance, feed intake, and feed conversion ratio (FCR) in broiler chickens

Items	Treatments*		
	LSD	MSD	HSD
Initial BW (g/bird)	185.08 ± 0.87	185.88 ± 0.53	185.93 ± 0.18
Final BW (g/bird)	2098.38 ± 67.63	1970.72 ± 53.69	1977.75 ± 44.43
Feed intake (g/bird)	3308.38 ± 61.63 ^a	2941.88 ± 42.72 ^b	2993.35 ± 42.47 ^b
Gain (g/bird)	1913.29 ± 67.92	1784.83 ± 53.50	1791.83 ± 44.37
ADG (g/bird/day)	65.98 ± 2.35	61.55 ± 1.85	61.79 ± 1.53
ADFI (g/bird/day)	114.08 ± 2.13 ^a	101.45 ± 1.47 ^b	103.22 ± 1.46 ^b
FER (gain/feed)	0.58 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.60 ± 0.01
FCR (feed/gain)	1.74 ± 0.05	1.66 ± 0.05	1.67 ± 0.02

Mean±SE. * LSD: 0.116m²/bird, MSD : 0.077m²/bird, and HSD : 0.0578m²/bird.

^{a,b} Values with different superscripts in the same row differ significantly(p<0.05)among treatments.

(2) 장기 무게 변화

사육밀도에 따른 육계의 각종 장기 무게의 변화를 조사한 결과는 Table 5에서 나타낸 바와 같다. 시험 결과 체중 100g 각 장기의 상대적 무게를 측정한 결과 간, 비장 및 흉선의 무게는 사육밀도 수준과 상관없이 모든 구에서 유사한 결과를 나타내었다. 이와 같이 본 실험에서 육계사육밀도의 변화는 면역에 관련된 장기들의 무게에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 5. Effect of stocking density on weights of organs in broiler chickens

Item	Treatments		
	LSD	MSD	HSD
Liver, g/100g BW	1.830 ± 0.019	1.840 ± 0.021	1.839 ± 0.015
Spleen, g/100g BW	0.124 ± 0.002	0.125 ± 0.002	0.125 ± 0.002
Fabricius, g/100g BW	0.261 ± 0.003	0.260 ± 0.003	0.263 ± 0.002
Thymus, g/100g BW	0.127 ± 0.002	0.128 ± 0.001	0.129 ± 0.001

Mean±SE. * LSD: 0.116m²/bird, MSD : 0.077m²/bird, and HSD : 0.0578m²/bird.

^{a,b} Values with different superscripts in the same row differ significantly(p<0.05)among treatments.

3) 혈액 생화학적 성분 변화

사육밀도에 따른 육계의 혈액 생화학적 성분에 대한 결과는 Table 6에서 나타낸바와 같다. 먼저 혈액 생화학적성분에서 시험 종료후 35일령에서 나타난 결과를 살펴보면 **albumin**, **total protein**, 중성지방, **glucose** 등과 같은 대부분의 생화학 성분은 사육밀도에 상관없이 모두 비슷한 수치를 보였다. 또한 사육밀도에 따른 AST 및 ALT와 같은 간 기능 수치 등에서 모든 구에서 유사한 결과를 나타내고 있어 현재 설정한 사육밀도 조건은 육계의 혈액생화학적 대사작용에 유의적인 영향을 미치지 않는 것이다.

Table 6. Effect of stocking density on blood biochemical profiles in broiler chickens.

Items	Treatments		
	LSD	MSD	HSD
Albumin (g/dl)	1.04 ± 0.04	1.0 ± 0.03	1.09 ± 0.03
AST (IU/ μ l)	366.8 ± 13.5	316.0 ± 23.2	324.9 ± 7.99
ALT (IU/ μ l)	11.9 ± 0.94	11.0 ± 1.57	10.4 ± 0.75
Total protein (g/dl)	2.9 ± 0.12	3.0 ± 0.16	3.09 ± 0.12
Triglyceride (mg/dl)	22.0 ± 1.59	19.6 ± 3.41	19.9 ± 1.84
Cholesterol (g/dl)	122.4 ± 5.23	120.6 ± 6.34	124.4 ± 3.54
Glucose (mg/dl)	222.0 ± 6.29	223.7 ± 11.6	226.0 ± 8.02

Mean±SE.

* LSD: 0.116m²/bird, MSD : 0.077m²/bird, and HSD : 0.0578m²/bird.

^{a,b} Values with different superscripts in the same row differ significantly(p<0.05)among treatments.

4) 사육밀도 변화에 따른 면역관련 유전자 발현

면역반응은 동물체의 내·외부 환경 변화에 적응하여 질병 방어에 중요한 작용을 하는 것으로 백혈구와 림프기관 (흉선 및 F-낭)에서 특이적 및 비특이적 면역 반응에 따라 질병에 방어 작용을 개시한다. 특히 닭과 같은 조류에서는 Bursa of Fabricius에서 B 림프구로 분화된다. 비특이적 반응은 주로 염증반응이 발생되고 대식세포 등에 의해 식작용이 발생되며 이러한 비특이적 면역반응은 항체와 T-세포 등의 적응성 반응을 유기시킨다. 적응성 특이적 반응은 골수에서 생성되는 줄기(간)세포에서 T-임파구 및 B-임파구가 중요한 기능을 수행한다. 골수의 간세포에서 만들어진 B-세포는 체액성 면역으로 일단 활성화된 T-세포나 흉선에서 활성화되면 면역항체(Ig)를 생산한다. T-세포 역시 골수에서 생성되어 흉선에서 활성화는 세포 매개성 면역작용으로 cytotoxic T-세포는 사이토카인을 생성하여 세포사를 유발하고 대식세포를 유인하여 식작용을 유발한다. Suppressor T-세포는 세포의 감염이 치유되면 면역작용을 종료시킨다. CD4 또는 CD8로 알려진 Helper T-세포는 cytotoxic T-세포의 활성화를 작용하는데 CD4 세포는 Th1과 Th2 두개의 subclass로 분류된다. Th1은 대식세포를 활성화하여 병원체를 사멸하고, 염증을 유발하며 항체를 생성하는데 주로 Interleukin-2, (IL-2)와 Interferon-gamma를 분비한다.

Table 7. Effect of stocking density on mRNA expression of cytokines with RT(Real-time) PCR in various tissues of broiler chickens

Item	Treatment					
	LSD		MSD		HSD	
Blood						
TNF- α	5.09 \pm 1.15		7.85 \pm 4.57		1.77 \pm 0.25	
iNOS	4.32 \pm 0.94		8.48 \pm 1.02		2.67 \pm 0.51	
IFN- γ	2.99 \pm 0.49		5.03 \pm 1.92		1.94 \pm 0.34	
IL-1 β	5.42 \pm 1.13		4.81 \pm 1.15		2.83 \pm 0.25	
IL-4	6.00 \pm 1.55		24.99 \pm 19.82		3.63 \pm 1.26	
IL-6	4.07 \pm 1.09		6.78 \pm 2.96		2.50 \pm 0.89	
IL-10	11.36 \pm 3.08 ^a		8.55 \pm 2.92 ^{ab}		1.54 \pm 0.28 ^b	
Fabricius						
TNF- α	2.40 \pm 0.49		1.92 \pm 0.55		2.32 \pm 0.17	
iNOS	2.57 \pm 0.18		2.32 \pm 0.23		2.86 \pm 0.28	
IFN- γ	2.47 \pm 0.48		2.87 \pm 0.94		1.83 \pm 0.36	
IL-1 β	1.55 \pm 0.24		2.69 \pm 0.44		1.81 \pm 0.40	
IL-4	2.40 \pm 0.22		1.77 \pm 0.39		3.11 \pm 0.61	
IL-6	2.19 \pm 0.33		1.84 \pm 0.10		1.57 \pm 0.16	
IL-10	1.32 \pm 0.21		2.55 \pm 1.03		1.63 \pm 0.18	
Liver						
TNF- α	2.41 \pm 0.68		2.84 \pm 0.63		2.96 \pm 0.58	
iNOS	2.11 \pm 0.32		1.23 \pm 0.04		1.84 \pm 0.47	
IFN- γ	6.63 \pm 2.13		2.16 \pm 0.72		6.84 \pm 0.72	
IL-1 β	5.53 \pm 0.49		3.73 \pm 0.42		4.23 \pm 1.18	
IL-4	4.40 \pm 0.35		1.93 \pm 0.62		4.40 \pm 1.60	
IL-6	5.20 \pm 0.18		4.05 \pm 0.36		6.38 \pm 1.99	
IL-10	4.87 \pm 0.98 ^b		18.16 \pm 6.02 ^a		1.67 \pm 0.10 ^b	
Spleen						
TNF- α	2.14 \pm 0.48		1.79 \pm 0.28		2.10 \pm 0.84	
iNOS	2.57 \pm 0.34		1.76 \pm 0.29		1.77 \pm 0.19	
IFN- γ	4.91 \pm 1.05		6.01 \pm 3.74		3.86 \pm 0.66	
IL-1 β	3.17 \pm 1.00		6.81 \pm 3.06		3.64 \pm 1.28	
IL-4	2.73 \pm 0.65		1.66 \pm 0.32		1.58 \pm 0.26	
IL-6	4.01 \pm 1.95		7.94 \pm 2.76		2.78 \pm 1.74	
IL-10	12.88 \pm 2.24 ^a		6.13 \pm 1.95 ^b		1.75 \pm 0.64 ^b	
Thymus						
TNF- α	18.77 \pm 5.35 ^b		18.70 \pm 8.06 ^b		71.79 \pm 17.18 ^a	
iNOS	11.39 \pm 2.00 ^b		8.72 \pm 1.18 ^b		53.69 \pm 8.47 ^a	
IFN- γ	80.11 \pm 24.28		49.69 \pm 18.50		96.62 \pm 25.30	
IL-1 β	80.59 \pm 4.66 ^b		110.07 \pm 13.22 ^b		259.20 \pm 72.08 ^a	
IL-4	76.07 \pm 49.01		66.45 \pm 38.27		90.97 \pm 24.11	
IL-6	63.78 \pm 21.91 ^b		69.53 \pm 17.69 ^b		143.84 \pm 24.02 ^a	
IL-10	62.76 \pm 23.14		108.26 \pm 63.3		24.25 \pm 8.89	

Mean \pm SE.

* LSD: 0.116m²/bird, MSD : 0.077m²/bird, and HSD : 0.0578m²/bird.

^{a,b} Values with different superscripts in the same row differ significantly at (p<0.05).

Th-2은 IL-4, IL-6, IL-10 및 IL-30 사이토카인을 생성한다. 이들 사이토카인 유전자는 IL-4와

같은 항염증인자(Anti-inflammatory), IFN- γ , IL1 β , IL-6, IL-12 β 등과 같은 친염증 유발(Pro-inflammatory)으로 분류할 수 있으며, 이들 유전자는 감염부위에 면역세포가 모여드는 작용을 활성화시킨다. 염증 사이토카인은 닭의 단핵구와 같은 여러 가지 면역세포에서 주로 분비된다. 산화질소는 일종의 신호 물질로 작용해 적절한 수준은 면역계(immune system)에 활성을 부여하고 뇌에서도 중요한 역할을 담당한다. 그러나 만약에 산화질소가 과다하게 세포에서 형성되면 세포 사멸을 유도하는데, 이런 영향 때문에 면역, 암발생, 알츠하이머병과 파킨슨병(Parkinson's disease)의 유발에도 산화질소가 관여한다. iNOS 효소는 산화질소를 생산하는데 필요한 촉매 물질로서 iNOS가 억제되면 산화질소 생성이 차단되는 것으로 보고되고 있다. 반면에 iNOS는 여러 가지 원인으로 인해 그 생성량이 과량으로 많아질 경우 대식세포 등에서 생성되는 superoxide anion 등과 같은 ROS(Reactive oxygen substance)와 상호작용으로 세포를 손상시키거나 죽이는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구는 사육밀도에 따른 육계의 체 혈액(전 혈액), 흉선, F-낭, 비장 및 간 등의 장기조직에서 iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6 및 TNF- α 등의 사이토카인 유전자 등의 발현을 Real Time-PCR로 mRNA 발현을 조사하여 사육밀도 스트레스가 면역작용에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 시험결과를 살펴보면, 먼저 혈액, 간 비장 조직에서 나타난 면역 사이토카인의 발현을 조사한 결과 iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현에는 유의적 차이가 없었으나 IL-10 유전자는 고밀도사육군(HSD)에서 현저하게(P<0.05) 감소되었다. F-낭(fabricius)에서도 사이토카인의 발현 역시 모든 구에서 유사하여 유의적 차이가 없었다. 따라서 사육밀도가 혈액, 간, F-낭 및 비장 조직에서 이들 사이토카인(cytokine)의 발현에 유의적인 영향을 미치지 않았다. 흉선(thymus)에서 사이토카인 유전자의 발현 양상을 조사한 결과를 살펴보면, TNF- α , iNOS, IL-6, IFN- γ , IL-1 β 와 같은 친염증 유전자의 발현이 고밀도군에서 유의적(P<0.05)으로 증가되는 것으로 나타났다. 한편 대표적인 항염증 유전자(anti-inflammatory cytokine)인 IL-4는 저밀도군에서 고밀도군에 비해 유의적으로 (P<0.05) 감소되었다. 위에서 관찰한 면역관련 사이토카인 유전자 발현을 조사한 결과, 고밀도 사육은 혈액, F-낭, 간 등과 같은 장기에는 유의적인 차이가 발견되지 않았으나, 가끔의 면역작용에 중요한 역할을 수행하는 흉선에서 친염증 사이토카인 발현을 증가시키므로 고밀도에 따른 면역력 저하가 발생할 수 있음을 시사한다.

사육밀도가 육계 생산성에 미치는 연구는 다수 보고가 되고 있으나, 면역작용에 미치는 영향에 관해서는 아직 다양하게 보고되고 있지 않다. 특히 사육밀도가 면역관련 사이토인 발현에 미치는 영향을 조사한 연구는 현재까지 거의 보고되어 있지 않는 실정이다. 많은 연구에서 사육밀도가 증가되면 증체는 감소되는 것으로 즉 사육밀도와 육계의 성장은 역의 상관관계가 있음이 보고되고 있다. Feddes 등(2002) 보고에 따르면 사육밀도(23.8, 17.0, 14.3, 11.9 수/m²)가 42일령에서 육계의 생산성을 조사한 결과 가장 밀도가 높은 23.8 수/m² 가장 체중이 감소되었으며 14.3 수/m²에서 가장 체중이 증가되었다. 따라서 적정 사육밀도가 유지될 경우 체중의 증가는 정상적으로 유지될 수 있다고 하였으며 육계의 도체 성적 및 폐사율에는 사육밀도에 따른 차이가 없었다고 보고하였다. Imaeda(2000) 연구보고에 따르면 사육밀도(12, 15, 18 수/m²) 조건하에서 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율을 조사한 결과, 여름, 가을, 겨울사양에서 체중 및 사료요구율에서는 유의적 차이가 없었다고 보고하였다. 그러나 이들 육계에서 급사병(sudden death syndrome)은 사육밀도와 밀접한 관계가 있음을 보고하여 사육밀도가 육계의

스트레스 및 면역작용에 연관성이 있음을 보고하였다. 그러나 Thaxton 등(2006)의 연구보고서에 따르면 사육밀도가 스트레스에 관련된 생리적 지표가 유의적인 영향을 미치는 않는 것으로 보고하였다. 육계에서 사육밀도가 면역작용 등에 미치는 영향에 대한 연구는 다양하게 많이 보고되고 있지 않다. 몇몇 연구에서 사육밀도가 증가되면 심장, 비장, F-낭, 흉선 등의 (g/100g) 무게가 일부 감소되는 것으로 보고되고 있다(Pesti와 Howarth, 1983; Dafwang 등, 1987). 가장 최근의 연구보고에 따르면 면양에서 사육밀도가 증가가 혈액내 면역항체 (IgG)의 농도를 감소시켜 면역기능을 저하시킬 수 있음을 보고하였다(Caroprese 등, 2009).

이상의 연구결과에서 육계의 사육밀도에 따른 결과를 종합하면 다음과 같다. 저밀도 사육은 체중, 증체, 사료섭취량 증가현상을 보이지만 사료 효율에서는 고밀도사육군보다 낮은 것으로 나타났다. 대부분의 장기 무게, 혈액성상 등은 사육밀도와 상관없이 비슷한 결과를 나타내고 있으나, 면역 사이토카인 중 친염증 사이토카인은 고밀도 사육시 특히 흉선에서 발현량이 현저히 증가되는 것으로 나타났다. 현재까지는 여러 가지 사육방법에서 스트레스 및 면역관련 지표 분석을 통해 동물복지에 관련된 biomarker를 개발하고 탐색하는 연구는 그리 많지 않다. 그러나 EU의 동물복지정책에 따라 2012년부터 산란계는 케이지 사육을 전면 금지키로 하고 국내에서도 2008년 동물보호법을 전면 개정하여 동물보호 및 복지시책을 강화하였으므로, 특히 사육밀도나 사육방법에 따른 스트레스나 면역작용 등을 조사하여 동물복지와 관련된 biomarker 등을 개발하는 지속적인 연구와 투자가 절실히 요구된다.

3. 육계의 사육 밀도에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 양상

가. 재료 및 방법

(1) 공시계 및 시험구

본 시험에 공시된 시험동물은 실용 브로일러 수컷 (Ross종) 184수로서 7일령까지 적응기간을 거친 후 사육밀도에 따라 고밀도구(HD; 575 sq.cm/bird), 표준밀도구(SD; 770 sq.cm/bird) 및 저밀도구(LD; 1150sq.cm/bird) 3개 처리구로 완전임의배치하고, 처리당 8~12반복으로 사육하였다. 7일령부터 35일령까지의 사양관리는 상업용 육계사료를 이용하였으며 진주산업대학교 종합농장 내 무창 계사에서 본 대학의 육계 사육 관리 지침에 따라 사육하였다. 점등은 종아 점등을 실시하였으며, 사육온도는 시험개시 $34\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 조절한 뒤 한 주마다 2°C 씩 감소시켜 시험 종료시에 24°C 를 유지하였다. 텔로미어 함량 분석을 위한 공시계는 시험 개시시 10수를 도살하여 혈액을 채혈하고, 35일 시험 종료시 처리별 각 8수씩 도살하여 조직을 획득하였다.

(2) 조직 및 혈액 표본 제작

텔로미어의 함량 분석은 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 조직을 대상으로 하였으며, 시험 개시 7일령 및 시험 종료 35일령에 밀사 처리별 개체의 각 조직들을 떼어 분석하였다. 채집된 조직들은 D-PBS (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA)용액으로 세척 한 다음 RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA) 배양액이 들어있는 시험관으로 옮겨 $200\times g$ 에서 10분간 원심분리 시켰다. 침전된 세포에 0.9% sodium citrate (Sigma Chem, St

Louis, MO, USA) 용액을 첨가하여 15분간 저장처리하고 이후 고정액을 10방울 정도 첨가하여 원심분리 시켰다. 고정처리는 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 이용하고 이를 3회 반복 처리한 후 세포액을 3~5방울 정도 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하였다.

백혈구세포 표본의 제작은 개체의 날개 정맥으로부터 약 5ml의 혈액을 채취하여 백혈구만 순수 분리하여 이용하였다. 순수 백혈구의 분리는 손과 류 (1999)가 제시한 Ficoll (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)을 이용한 분리방법으로 시행하였고 분리된 세포는 0.06M KCl (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 이용하여 실온에서 15분간 저장 처리하였다. 저장처리가 끝나면 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 10 방울정도 첨가한 후 원심분리하고 이 후 동일 고정액으로서 3회 정도 반복 처리한 후 슬라이드 표본을 제작하였다.

(3) Q-FISH

FISH용 probe 제작을 위하여 (CCCTAA)₇으로 구성된 42mers 단일 oligomers를 primer로 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 수행하고 이의 증폭된 산물을 PCR-DIG Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로서 digoxigenin labeling을 하였다.

본 연구에서 수행한 FISH 방법은 조 등(2005)이 제시한 닭의 초기 배자 및 발생 조직에 대한 telomeric DNA 분석을 위한 FISH법과 동일하게 실시하였다. 이를 간단하게 소개하면 슬라이드 표본을 RNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 에탄올로 탈수 건조시켰다. 이후 Hybridization 용액 (13 μ l formamide, 5 μ l hybridization buffer, 2 μ l(100ng/ μ l) chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨린 후 밀봉하고 85°C에서 5분간 변성(denaturation)시킨 후 38.5°C에서 12시간이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2 \times SSC로서 72°C에서 5분간 처리하고 실온의 PN buffer (0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로 세척하였다. 형광 접합 탐지를 위하여 anti-digoxigenin-fluorescein (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 처리하고 커버 글라스로 덮은 후 38.5°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 PN buffer로 세척하고 암소에서 건조시켰다. 배경염색은 propidium iodide solution (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮고 암소에서 건조시킨 후 검경하였다. 형광 접합 발현 양상은 523nm 파장대의 필터 (WIB filter)를 부착한 형광 현미경 (Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 처리된 슬라이드를 형광현미경으로 관찰한 후 100배의 대물렌즈 하에서 평균 5개의 간기 상을 한 프레임으로 하여 디지털 카메라 (Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하고 이를 컴퓨터에 저장하였다. 저장된 상은 이미지 분석 프로그램 (Image analyzer program, MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 대비 telomeric DNA 분포량을 분석하였다.

(4) 통계분석

닭의 조직간 및 성장 주령 간 세포내 telomeric DNA 함량을 비교분석하기 위하여 SAS 통계 패키지 (SAS, 2000)를 이용하여 ANOVA/Turkey법으로 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

실용 브로일러를 대상으로 사육 밀도가 개체의 스트레스 감응도에 미치는 영향을 살펴보고자 각 조직별 세포들에 대한 텔로미어 함량을 분석하였다. 7일령부터 사육밀도에 따라 고밀도구(HD; 575 sq.cm/bird), 표준밀도구(SD; 770 sq.cm/bird) 및 저밀도구(LD; 1150sq.cm/bird)로 배치하여 35일령까지 사육하였다. 시험 개시시 대조 표본을 위해 10수를 도살하여 채혈하고, 35일령 시험종료시 사육 밀도별 8수씩 도살하여 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 세포의 텔로미어의 함유율을 분석하였다.

각 조직들의 텔로미어 함량은 양적형광접합보인법 (quantitative fluorescence in situ hybridization; Q-FISH)의 분석 방법을 이용하였다. 분석할 개체들의 각 조직은 분쇄 후 세포만을 분리하고 고정한 후 표본을 제작한 다음 FISH를 수행하였다. 처리된 표본들은 형광현미경 하에서 5~6개의 세포 간기상을 한 개의 프레임으로 이미지를 획득하였다. 획득한 30개 이상의 이미지상을 이미지 분석 프로그램(Metamorph[®])을 이용하여 각 조직별 세포내 텔로미어 함량을 분석하였다.

우선 사육 밀도별 사육 후 텔로미어의 감축 양상을 비교 분석하기 위하여 시험 개시시 기본 값을 얻고자 7일령 개체들의 혈액 내 백혈구 세포의 텔로미어 함유율을 분석한 바 이의 평균값은 2.43%였다(Table 8).

Table 8. The relative amount of telomeric DNA of the interphase nuclei of lymphocytes in 7d broiler chickens

Age	No. chicks	No. analyzed cells	Amount of telomeric DNA
7 days	10	160	2.428±0.570*

*Value is mean±standard deviation

이후 35일령까지 사육 밀도별 사양 시험 후 개체들의 혈액 및 조직을 채집하고 이들 각 조직에 대한 텔로미어 함유율을 분석하였다. 시험 종료시 개체들의 혈액 내 백혈구 세포의 텔로미어 함유율은 평균 2.24%로 7일령에 비해 현저히 감소됨을 보여 텔로미어가 age-dependent 한 노화 지표임을 재 확인하였다. 또한 사육 밀도 간 백혈구의 텔로미어 함유율은 처리 간 유의적 차이가 있음으로 나타났다 (Table 9). 저밀도구(LD; 1150sq.cm/bird) 및 표준밀도구(SD; 770 sq.cm/bird)에서 사육한 개체들의 백혈구 내 텔로미어 함유율이 고밀도구(HD; 575 sq.cm/bird)에 비해 상대적으로 높은 텔로미어 함유율을 보이는데 이는 텔로미어의 감축율이 사육 밀도에 따라 큰 영향을 받음을 시사한다 하겠다. 백혈구 세포들은 면역과 밀접한 관련이 있는 것으로 스트레스 등 외적 요인에 민감하게 반응하는 세포로 알려져 있다. 브로일러에서 사육 밀도와 같은 외적 환경 요인이 큰 스트레스 요인임이 많은 보고를 통해 익히 알려져 있다. 이러한 사실을 토대로 본 연구에서는 노화 및 생리활성 표지로 알려진 텔로미어의 함량을 이용하여 스트레스 감응 분석에 적용한 바 사육 밀도에 따른 유의한 결과를 얻게 되었다. 이는 텔로미어의 상대적 함량이 개체의 스트레스 예측을 위한 지표로서 개발 가능성이 있음을 시사하는 것이다. Table 9 및 Fig. 8에서는 백혈구를 포함한 간, 폐, 심장, 정소 세포들에 대한 사육

Table 9. The amount of telomeric DNA of interphase nuclei of tissues in 35d broiler chickens raised different density

Tissues	Low density (1150 sq.cm/bird)	Standard density (770 sq.cm/bird)	High density (575 sq.cm/bird)
blood	2.286±0.456 ^a (n=160)	2.273±0.511 ^{ab} (n=160)	2.151±0.479 ^b (n=160)
liver	2.263±0.541 (n=60)	2.211±0.445 (n=59)	2.101±0.521 (n=60)
lung	2.283±0.526 (n=59)	2.243±0.478 (n=60)	2.188±0.383 (n=60)
heart	2.082±0.535 (n=40)	2.023±0.595 (n=50)	1.940±0.468 (n=40)
testis	2.184±0.525 (n=60)	2.141±0.472 (n=60)	2.020±0.485 (n=60)

^{a,b}Values (Means±SE) with different superscripts differ significantly among treatments. (p<0.05)

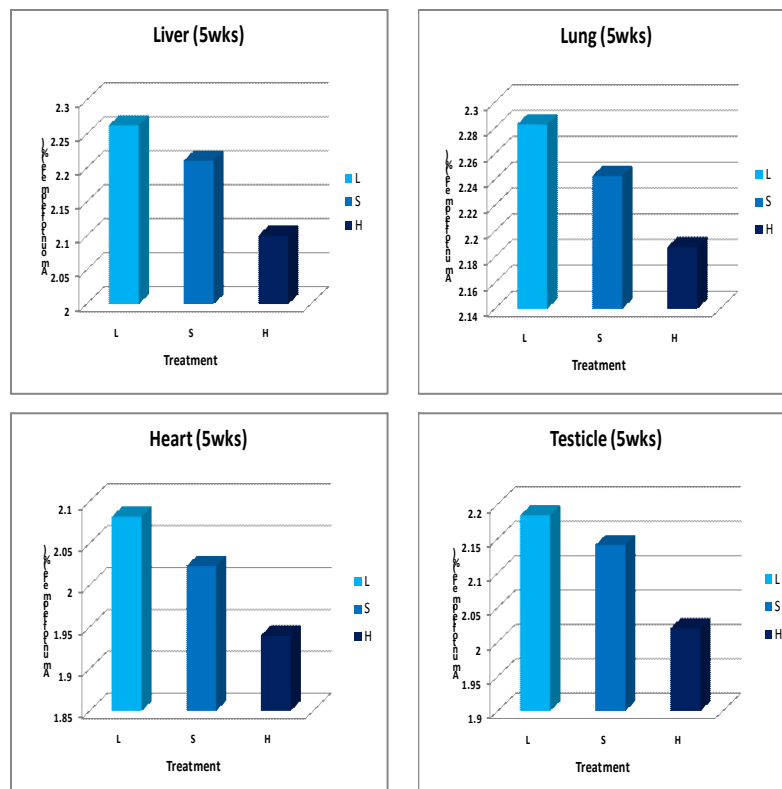


Fig. 8. The histogram of telomere quantities of liver, lung, heart, and testis cells of 35d-broiler chickens raising at high density(575 sq.cm/bird), standard density(770 sq.cm/bird) and low density(1150 sq.cm/bird)

밀도 별 텔로미어 함유율을 나타낸 것이다. 백혈구를 제외한 모든 조직들에 있어서 처리별 텔로미어 함유율의 차이는 없는 것으로 분석되었다. 그러나 모든 조직에서 저밀도의 사육 개체들이 고밀도의 사육 개체에 비해 전반적으로 높은 텔로미어 함유율을 보이고 있다.

이상의 결과로서 사육 밀도가 개체의 환경적 스트레스 요인임을 재차 확인하였고 텔로미어 함유율을 기준으로 저 밀도 사육이 스트레스와 관련하여 보다 긍정적 효과를 보이는 것으로 사료되어 동물복지적 차원에서 브로일러의 경우 최소 표준밀도구(SD; 770 sq.cm/bird) 이상의 사육 공간이 요구됨을 제시하는 바이다. Fig. 9는 본 분석 방법으로 획득한 대표적 텔로미어의 접합 간기상들로서 각 genome당 텔로미어의 상대적 함유율이 2.16, 2.27 및 2.29%로 분석된 세포양상이다.

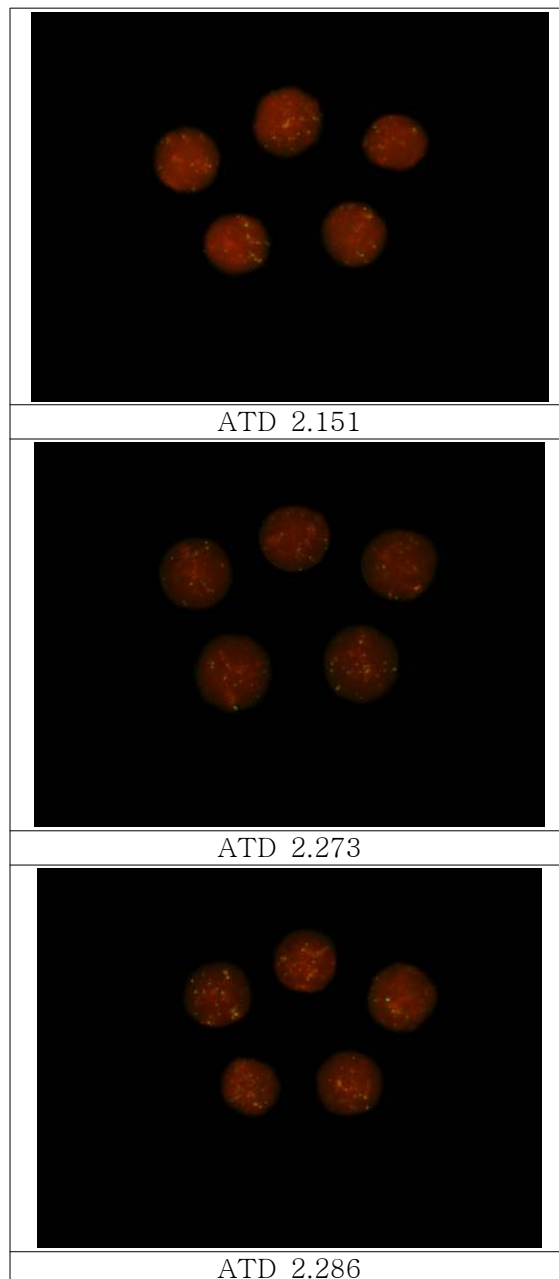


Fig. 9. The representative telomere distribution patterns of lymphocytes interphase nuclei in broiler by FISH using telomeric DNA probe; ATD(Amount of Telomeric DNA)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절 목표 달성도

1. 육계의 급이 방법에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴(1차년도)

연구 개발 목표	평가 착안점 및 연구개발 내용	달성도(%)
1. 육계의 급이 방법에 따른 지방 및 근육발달 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	브로일러를 대상으로 에너지제한 (85%, 70%) 및 섭취량 제한(85%, 70%) 급여 시험 실시	100%
	제한 급여 처리별 생산능력 비교 분석; 체중, 증체량, 사료섭취량 및 사료효율 분석	100%
	지방 및 근육발달 관련 유전자 cloning; PPAR γ , C/EBP α , SREBP, FAS, MyoD, Myf5 및 Myogenin gene cloning 완료	100%
	제한 급이 방법에 따른 지방 관련 유전자 발현 양상 탐색; FAS, SREBP, malic enzyme, PPAR- γ , C/EBP- α 의 발현 양상 비교 분석	100%
	제한 급이 방법에 따른 근육 관련 유전자 발현 양상 탐색; Myo-D, Myf-5, Myogenin의 발현 양상 비교 분석	100%
2. 육계의 급이 방법에 따른 면역 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	제한 급이에 따른 면역 및 스트레스 관련 생화학 지표 분석; 혈청내 AST, ALT, glucose, total protein, albumin, cholesterol, triglyceride 분석 및 백혈구 differential count 비교 분석	100%
	제한 급이에 따른 면역 유전자의 발현 양상 구명; iNOS, IL-4, IL-6, IFN-gamma의 발현 양상 분석	100%
3. 육계의 급이 방법에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	노화 관련 유전자의 발현 분석을 통한 실용 표지 개발; 텔로미어 함량을 이용한 노화 표지 제시	100%
	급이 방법에 따른 생리적 활성도 및 노화 관련 유용 유전자의 발현 양상 구명; 제한 급여 처리별 개체 조직간 telomere 함량 및 telomerase activity 비교 분석	100%
4. 산란계에서 천연 항산화 사료첨가제 개발	산란계에서 사료첨가제로 천연항산화 소재 개발 ; 가시오갈피 및 두충을 이용한 가공법 및 추출법 확립	100%
	사양시험을 위한 산란 육추 실시; 실용 산란계(하이라인 브라운) 360수를 대상으로 시험 설계 및 육추 개시	100%

2. 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴(2차년도)

목표	연구개발 수행 내용	달성도(%)
1. 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 지방 및 근육발달 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	실용브로일러 수컷 160수를 대상으로 가시오갈피와 두충 0.5% 및 1% 수준으로 첨가 시험 실시	100%
	첨가 급여 처리별 생산능력 비교 분석; 체중, 증체량, 사료섭취량 및 사료효율 분석	100%
	생리활성물질 첨가 급여에 따른 지방 및 근육관련 유전자 발현 양상 탐색; MyoD, Myogenin, PPAR- γ 및 FAS 유전자의 발현 양상 비교 분석	100%
	생리활성물질 첨가 급여에 따른 항산화효소 유전자의 발현 양상 탐색; GST, CAT, GPX 및 SOD 발현량 비교 분석	100%
2. 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 면역 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	생리활성물질 첨가 급여에 따른 생화학 지표 분석; 혈장 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 비교 분석	100%
	생리활성물질 첨가 급여에 따른 면역 및 스트레스 관련 유전자 발현 조사; iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 및 TNF- α 의 발현 양상 비교 분석	100%
3. 육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	생리활성물질 첨가 급여에 따른 생리적 활성도 및 노화 관련 유용 유전자의 발현 양상 구명; Q-FISH를 이용한 처리별 telomere 함량 비교 분석	100%
	노화 관련 유전자의 발현 분석을 통한 실용 표지 개발; telomere 함량 분석을 이용한 개체 생리 지표 제시	100%
4. 산란계에서 천연 항산화 사료첨가제 개발	20주령부터 30주령까지 가시오갈피와 두충을 0%(대조구) 0.5%, 1% 수준으로 첨가 급여 시험	100%
	혈청 및 간 조직내에 생화학적 성분분석; 혈장 AST, ALT, albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 비교 분석	100%
	항산화효소 발현에 미치는 영향; GST, SOD, GSHPx 및 MDA 발현 양상 비교 분석	100%
	사료첨가제 급여에 따른 생리활성 및 노화유전자의 발현 양상; 처리별 개체 조직간 telomere 함량 비교분석	100%
	천연 항산화 사료첨가제 급여에 따른 난질 분석; 난중, 난백고, 호우유니트, 난각색, 난황색, 난각두께, 난각무게 및 난각밀도 분석	100%

3. 육계의 사육 밀도에 따른 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴(3차년도)

목표	연구개발 수행 내용	달성도(%)
1. 육계의 사육밀도에 따른 지방 및 근육발달 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	실용브로일러를 대상으로 고밀도(575sq.cm/bird), 표준밀도(770sq.cm/bird),저밀도(1150sq.cm/bird)로 사육 시험 실시	100%
	사육 밀도별 생산능력 비교 분석; 체중, 증체량, 사료 섭취량 및 사료효율 분석	100%
	생리활성물질 첨가 급여에 따른 지방 및 근육관련 유전자 발현 양상 탐색; MyoD, Myogenin, Myf5, PPAR- γ 및 FAS 유전자의 발현 양상 비교 분석	100%
	사육 밀도에 따른 스트레스관련 유전자 발현 양상 비교; HSP 및 HMGCR 유전자들의 발현 양상 비교 분석	100%
2. 육계의 사육밀도에 따른 면역 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	사육 밀도에 따른 생화학 지표 분석; 혈장 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 비교 분석	100%
	사육 밀도에 따른 면역 및 스트레스 관련 유전자 발현 조사; iNOS, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 및 TNF- α 의 발현 양상 비교 분석	100%
3. 육계의 사육밀도에 따른 노화 관련 유용 유전자 발현 양상 구명과 실용 표지 유전자 발굴	사육 밀도에 따른 생리적 활성화도 및 노화 관련 유용 유전자의 발현 양상 구명; Q-FISH를 이용한 처리별 telomere 함량 비교 분석	100%
	노화 관련 유전자의 발현 분석을 통한 실용 표지 개발; telomere 함량 분석을 이용한 개체 스트레스 예측 지표 제시	100%

2절 관련 분야 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 육계에서 제한사양관련 근육 및 지방합성관련 인자, 면역관련 인자 및 노화 관련 인자의 발현분석을 통한 분자생물학적 기초자료 제시
- 나. 육계에서 천연항산화물질 관련 지표인자의 발현분석 구명
- 다. 육계에서 사육 밀도에 따른 근육 및 지방합성관련, 면역관련 및 노화 관련 인자의 발현분석과 스트레스 표지 인자 발굴
- 라. 산란계에서 천연 식물성 소재를 급여를 통한 생리활성 인자의 발현분석 구명

2. 경제, 산업적 측면

- 가. 근육 및 지방합성관련, 면역관련 및 노화 관련 인자를 분석함으로써 육계의 제한사양의 적정범위를 생리학적 자료의 뒷받침으로 최적 사육 방법 제시
- 나. 천연항산화제의 사료첨가와 항산화효소의 활성화 유도에 의한 육계의 건강성 향상 및 생산성 증대 방안 제시
- 다. 적정 사육밀도의 생리학적 지표 개발로 복지개념의 사육환경 개선과 건강한 육계 사육 체계 제시
- 마. 산란계에 가시오갈피 및 두충과 같은 천연 항산화 첨가 사료 소재 개발로 개체의 면역성 향상 및 생산성 증대 방안 제시

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 연구 성과

1. 논문게재 성과

가. 연구 논문

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2007. 3.	천연 항산화제로서 포도씨앗분말첨가가 육용계의 성장 및 항산화 작용에 미치는 영향	장인석	장인석	손시환 문양수 고영현 강선영	한국가금학회지	34(1)	국내	등재후보
2008. 9.	산란계에 항산화 물질 급여가 텔로미어 함량 및 난질에 미치는 영향	이민희	손시환	이상호 김영주 고영현 장인석 문양수 최양호	한국가금학회지	35(3)	국내	등재후보
2008. 9.	가시오갈피와 두층의 첨가 급여가 브로일러의 생산 능력, 혈장 생화학 지표 및 텔로미어 함량에 미치는 영향	손시환	손시환	장인석 문양수 김영주 이수희 고영현 강선영 강혜경	한국가금학회지	35(3)	국내	등재후보
2009. 3	Effect of qualitative and quantitative feed restriction on growth performance and immune function in broiler chickens	I.S. Jang	S.H. Sohn	S.Y. Kang, Y.H. Ko, Y.S. Moon	Asian-Aust. J. Anim. Sci.	22 (3)	국외	SCI
2009. 3.	육계에서 가시오갈피와 두층 첨가 급여가 항산화 효소, 지방 및 근육 관련 유전자 발현에 미치는 영향	강혜경	문양수	자가디 쉬 벨로 손시환 장인석	한국가금학회지	36(1)	국내	등재후보

나. 학술 발표

발표 연도	발표 제목	발표자	대회명	학술지	국내외 구분	SCI구분
2006. 11.	Telomere length and telomerase activity of Korean Native Chicken	Choi D. S., M. J. Lee, J. A. Park, Y. J. Kim, C. Park, I. S. Jeon, S. H. Sohn	한국가금학회 제23차 학술발표회	Proceedings:112-114	국내(서울)	등재후보
2006. 11.	육계에 생리활성물질 첨가 급여가 혈액지표 및 텔로미어 함량에 미치는 영향	고영현, 조은정, 최덕순, 이민정, 강선영, 장인석, 문양수, 손시환.	한국가금학회 제23차 학술발표회	Proceedings:140-141	국내(서울)	등재후보
2007. 6.	닭의 품종별, 성별 및 연령별 각 조직의 텔로미어 함량 분석	김영주, 박지애, 이수희, 박원철, 손시환	2007 한국동물자원 과학회 학술발표회	Proceedings Vol. II:64.	국내(안성)	등재
2007. 6.	닭의 제한급여에 따른 지방 및 근육관련 유전자의 발현양상 비교분석	채은진, 정한민, 박경자, 강혜경, 문양수	2007 한국동물자원 과학회 학술발표회	Proceedings Vol. II	국내(안성)	등재
2007. 7.	Effects of feed restriction on lipogenic gene expression in liver of broiler chickens	문양수	ADSA-ASAS Joint Annual Meeting	Proceedings	국외(미국)	SCI
2007. 11.	닭의 생리적 특성에 따른 텔로미어 함량 변화	김영주, 손시환, 문양수, 장인석	한국가금학회 제24차 학술발표회	Proceedings	국내	등재후보
2007. 11.	육계의 제한급여에 따른 지방 합성, 근육관련 유전자의 발현양상 비교 분석	채은진, 문양수, 손시환, 장인석	한국가금학회 제24차 학술발표회	Proceedings	국내	등재후보
2007. 11.	산란계에 두충 및 가시오갈피 첨가가 난질 및 생리활성도에 미치는 영향	이민희, 손시환, 문양수, 장인석	한국가금학회 제24차 학술발표회	Proceedings	국내	등재후보
2007. 11.	육계에서 제한급여가 사양성적, 혈액 성분 및 면역 유전자 발현에 미치는 영향	강선영, 장인석, 문양수, 손시환	한국가금학회 제24차 학술발표회	Proceedings	국내	등재후보
2008. 6.	닭의 텔로미어 양적분석을 이용한 연령 예측 지표 개발	김영주, 이수희, 최나은, Vinod Subramani, 손시환	2008 한국동물자원 과학회 학술발표회	Proceedings Vol. II:72	국내(서울)	등재
2008. 6.	육계의 생리활성물질 급여에 따른 Telomere의 함량 변화	손시환, 김영주, 이수희, 정경옥, 손보람, 장인석, 문양수	2008 한국동물자원 과학회 학술발표회	Proceedings Vol. II:59	국내(서울)	등재
2008. 6.	산란계에 있어 항 산화물질 첨가가 난질 및 텔로미어 함량에 미치는 영향	손시환, 이민희, 이상호, 김영주, 이수희, 장인석, 문양수	2008 한국동물자원 과학회 학술발표회	Proceedings Vol. II:59	국내(서울)	등재
2008. 6.	육계의 생리활성물질 첨가 급여에 따른 항산화효소 관련 유전자 발현 양상 분석	강혜경, 자가디쉬벨로, 김명섭, 박경자, 장인석, 손시환, 문양수	2008 한국동물자원 과학회 학술발표회	Proceedings Vol. II:94	국내(서울)	등재

발표 연도	발표 제목	발표자	대회명	학술지	국내외 구분	SCI구분
2008. 9.	The amount of telomeric DNA in chicken	Sea-Hwan Sohn	13th Animal Science Congress of AAAP	Proceedings:223	국외(Vietnam)	SCI
2008. 11.	The effect of stocking density on HSP70 and HSP90 in broiler chickens	Beloor J, Kang HK, Kim MS, Kim TS, Park KJ, Sohn SH, Jang IS, Moon YS	한국가금학회 제25차 학술발표회	Proceedings:102-103	국내(성환)	등재후보
2008. 11.	가시오갈피와 두충의 첨가 급여가 브로일러의 생산능력, 혈장 생화학 지표 및 텔로미어 함량에 미치는 영향	손시환, 장인석, 문양수, 김영주, 이수희, 고영현, 강선영, 강혜경	한국가금학회 제25차 학술발표회	Proceedings:87-89	국내(성환)	등재후보
2008. 11.	Chick age prediction by telomeric DNA quantification	Kim YJ, Subramani VK, Lee SH, Choi NE, Sohn SH	한국가금학회 제25차 학술발표회	Proceedings:92-94	국내(성환)	등재후보
2008. 11.	산란계에 항산화물질 첨가 급여가 텔로미어 함량과 난질에 미치는 영향	이민희, 이상호, 김영주, 고영현, 장인석, 문양수, 최양호, 손시환	한국가금학회 제25차 학술발표회	Proceedings:90-91	국내(성환)	등재후보
2009. 6.	Effect of Siberian Ginseng (<i>Acanthopanax senticosus</i>) and <i>Eucommia ulmoides</i> on growth performance and immune functions in broiler chickens	장인석, 손시환, 문양수, 이철영, 고영현, 강선영	Amer. Animal Science Congress	Proceedings	국외(Canada)	SCI

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명(상표출원)	출원인	출원국	출원번호
2008.10.20	가시란	진주산업대산학협력단, 손시환	한국	40-2008-0049796호
2008.10.20	유코란	진주산업대산학협력단, 손시환	한국	40-2008-0049807호

등록된 특허의 경우				
등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2006. 9. 27	염색체 텔로미어의 상 대적 함량 분석법	진주산업대산학협력단 (손시환, 조은정)	한국	특허 제 10-0631338호
2008. 1. 16	매실추출물 및 유산 함 유 항생제 대체 가축 사료첨가제 개발	진주산업대산학협력단 (장인석 외)	한국	특허 10-0796986호

3. 인력활용/양성 성과

가. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
15	2	3	7	3	8	7			15

나. 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
창업농후계농업 경영인경영기술 교육	창업농교육	진주산업대	연1회	80	150명
친환경동물생명 산업연구회기술 교육	교육 및 전문가초청세미 나	진주산업대 동물생명과학과	연 4회	40	100명

4. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
6			6			

2절 성과활용 계획

1. 학술적 측면

- 가. 제한사양과 보상성장에 따른 근육발달과 지방합성관련 유전자, 성장과 면역 관련 유전자 및 노화 관련 유전자들의 발현 양상 분석은 가금에서의 생리 반응을 조절하는 유전자들의 작용기전을 밝히는데 기초 자료를 제공 할 것이다.
- 나. 육계에서 천연항산화제 처리에 대한 생리적 효과를 분자생물학적으로 분석하여 그 기작에 대한 기초 자료를 제공할 것이다.
- 다. 육계의 사육밀도와 연관된 스트레스관련 인자인 HSP와 HMGCR 유전자 및 telomere 유전자의 관련 여부에 대한 분자생물학적 작용기작을 밝히는데 활용할 것이다.
- 라. 천연식물성 사료첨가제는 체내 항상성 유지 및 생리활성 증진에 효과가 입증됨에 따라 이에 대한 기전 연구 및 대사성 질환 예방을 위한 사양방법 연구에 적극 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 산업적 측면

- 가. 닭의 생리적 활성도 및 생산성을 고려한 제한 사양 및 사육 밀도에 대한 근거 제시로 농가 활용 가능성 제시
- 나. 육계에서 두충 및 가시오갈피의 첨가가 산화적 스트레스 관련 효소(SOD, superoxide dismutase; GPX, glutathione peroxidase)의 활성과 연관이 있는 것으로 나타남에 따라 천연 항산화제로의 개발 가능성 제시
- 다. 산란계에서 두충 및 가시오갈피의 첨가가 생리활성 뿐만 아니라 난질 향상에 효과를 보임으로 산업적 이용 가능성 제시
- 라. 육계의 사육 밀도가 스트레스 관련 HSP계 유전자(HSP70, HMGCR) 및 telomere 유전자 발현에 영향을 미침에 따라 이들 유전자들을 가금의 사육밀도 관련 스트레스 측정 지표로 개발 활용 기대
- 마. 기존 사육방식인 에너지 과잉 급이 및 밀사 등의 체계가 과학적으로 바람직하지 않음을 입증함에 따라 동물복지를 고려한 사육체계의 전환 제시
- 바. 천연식물성 사료첨가제가 육계 산업현장에서 문제시되는 급성 폐사병 및 복수증을 예방할 수 있는 신 소재로서의 활용 가능성 제시

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

- Basu N, Todgham AE et al. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295(2):173-83.
- Bekaert S, Derradji H, Baatout S. 2004. Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev Biol.* 274(1):15-30.
- Berkes CA, Tapscott SJ. 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 16:585-595.
- Bhattacharya A, Chandrasekar B, Rahman MM, Banu J, Kang JX, Fernandes G. 2006. Inhibition of inflammatory response in transgenic fat-1 mice on a calorie-restricted diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 349(3):925-30.
- Bidlack WR, Tappel AL. 1973. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. *Lipids.* 8(4):203-7.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Caroprese M, G Annicchiarico, L Schena, A Muscio, R Migliore, A Sevi. 2009. Influence of space allowance and housing conditions on the welfare, immune response and production performance of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 76(1):66-73.
- Cook ME. 1991. Nutrition and immune response of the domestic fowl. *CRC Crit. Rev. Poult. Biol.* 3:167-189.
- Dafwang II, ME Cook, ML Sunde. 1987. Interaction of dietary antibiotic supplementation and stocking density on broiler chick performance and immune response. *Br. Poult Sci.* 28(1):47-55.
- Davydov M, Krikorian AD. 2000. *Eleutherococcus senticosus* as an adaptogen: closer look. *J Ethnopharm* 72:345-393.
- Delany ME, Daniels LM, Swanberg SE, Taylor HA. 2003. Telomeres in the chicken: genome stability and chromosome ends. *Poult Sci* 82(6):917-926
- Dursun E, Dursun B, Suleymanlar G, Ozben T. 2005. Effect of haemodialysis on the oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 42:123-128.
- Feddes JJ, Emmanuel EJ, Zuidhof MJ. 2002. Broiler performance, body weight variance, feed and water intake, and carcass quality at different stocking densities. *Poult Sci.* 81(6):774-9
- Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita L, Takeda H, Nishible S. 1996. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol Pharm Bull* 19:1227-1230.
- Gaffney BT, Hugel HM, Rich PA. 2001. *Panax ginseng* and *Eleutherococcus senticosus* may exaggerate an already existing biphasic response to stress via inhibition of enzymes which limit the binding of stress hormones to their receptors. *Med Hypotheses*

56:567-572.

- Gornati R, Papis E. et al. 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* 341:111-8.
- Guzik TJ, R Korbut, T Adamek-Guzik. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation - Review. *J. Physiol. Pharmacol.* 54(4):469-487.
- Hangalapura BN, MG Nieuwland, G De Vries Reilingh, J Buyse, H Van Den Brand, B Kemp, HK Parmentier. 2005. Severe feed restriction enhances innate immunity but suppresses cellular immunity in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poult. Sci.* 84(10):1520-1529.
- Hong JH, Lee MH, Kang MC, Hur SH. 2000 Separation and identification of antimicrobial compounds from Korean leek. *J Safety* 15:235-235.
- Hsieh CL, Yen GC. 2000. Antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci* 66(15):1387-1400.
- Imaeda N. 2000. Characterization of lactic acid formation and adenosine triphosphate consumption in calcium-loaded erythrocytes of broiler chickens. *Poult Sci.* 79(11):1543-7.
- Jang I et al., 2001. Effects of age and strain on small intestinal and hepatic antioxidant defense enzymes in Wistar and Fisher 344 rats. *Mechanism of ageing and development* 122:561-570
- Jang I. et al. 2004. Influence of essential oil components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 17(3):394-400.
- Jang IS, Hwang DY, Chae KR, Lee JE, Kim YK, Kang TS, Hwang JH, Lim CH, Huh YB, Cho JS. 2003. Role of dietary fat type in the development of adiposity from dietary obesity-susceptible Sprague-Dawley rats. *Br J Nutr.* 89(3):429-38.
- Jang IS, SY Kang, YH Ko, YS. Moon, SH Sohn. 2009. Effect of qualitative and quantitative feed restriction on growth performance and immune function in broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22(3):388-395
- Kablar B, Rudnicki MA. 2002. Information provided by the skeletal muscle and associated neurons is necessary for proper brain development. *Int J Neurosci.* 20(7):573-584.
- Khajavi M, S Rahimi, ZM Hassan, MA Kamali, T Mousavi. 2003. Effect of feed restriction early in life on humoral and cellular immunity of two commercial broiler strains under heat stress conditions. *Br. Poult. Sci.* 44(3):490-497.
- Kim NW, Wu F. 1997. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Research* 25(13): 2595-2597
- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285(5432):1390-3.
- Lee YJ, Chung HY, Kwak HK, Yoon S. 2008. The effects of *A. senticosus* supplementation on serum lipid profiles, biomarkers of oxidative stress, and lymphocyte DNA damage in postmenopausal women. *Biochemical and Biophysical Research Communications*

375:44-48.

- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Method* 25:402-408.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocypreïn). *J Biol Chem.* 244(22):6049-55
- McMurtry JP, Rosebrough RW, Plavnik I, Cartwright AL. 1998. Influence of early plane of nutrition on enzyme systems and subsequent tissue deposition. In: *Biomechanisms Regulating Growth and Development, Beltsville Symposium on Agricultural Research No. 12*(Eds Steffens, GL. and Rumsey, T.S.), Klumer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 329-341.
- Metori K, Furutsu M, Takahashi S. 1997. The preventive effect of ginseng with du-zhong leaf on protein metabolism in aging. *Biol Pharm Bull* 20(3):237-242.
- Moon YS, Latasa MJ, Griffin MJ, Sul HS. 2002. Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res.* 43(5):691-8
- Moon YS, Latasa MJ, Kim KH, Wang D, Sul HS. 2000. Two 5'-regions are required for nutritional and insulin regulation of the fatty-acid synthase promoter in transgenic mice. *J Biol Chem.* 275(14):10121-7.
- Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS. 2002. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol.* 22(15):5585-92.
- Mortensen A, Skibsted LH, Sampson J, Rice-Evans C, Everett SA. 1997. Comparative mechanism and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett* 418:91-97.
- Muthukumar AR, CA Jolly, K Zaman, G Fernandes. 2000. Calorie restriction decreases proinflammatory cytokines and polymeric Ig receptor expression in the submandibular glands of autoimmune prone (NZBNZW) F1 mice. *J. Clin. Immunol.* 20(5):354-361.
- Nagasawa H, Mitamura T, Sakamoto S, Yamamoto K. 1995. Effects of lycopene on spontaneous mammary tumour development in SHN virgin mice. *Anticancer Res* 15(4):1173-1178.
- Nijhoff WA, Peters WH. 1992. Induction of rat hepatic and intestinal glutathione S-transferases by dietary butylated hydroxyanisole. *Biochem Pharmacol.* 44(3):596-600
- Park SA, Choi MS, Jung UJ, Kim MJ, Kim DJ, Park HM, Park YB, Lee MK. 2006. *Eucommia ulmoides* oliver leaf extract increases endogenous antioxidant activity in type 2 diabetic mice. *J Med Food* 9:474-479.
- Payne CJ, TR Scott, JW Dick, B Glick. 1990. Immunity to *Pasteurella multocida* in protein-deficient chickens. *Poult. Sci.* 69(12):2134-2142.
- Pesti GM, Howarth B. 1983. Effects of population density on the growth, organ weights, and plasma corticosterone of young broiler chicks. *Poult. Sci.* 62(6):1080-1083.
- Pfaff FE Jr, Benson JD, Austic RE. 1977. Influence of diet on adiposal lipoprotein lipase and hepatic triacylglyceride synthetase activities in the developing pullet (*Gallus domesticus*).

- Comp Biochem Physiol B. 58(4):345-348.
- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. 2002. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:747-783.
- Praharaj NK, Gross WB, Dunnington EA, Nir I, Siegel PB. 1996. Immunoresponsiveness of fast-growing chickens as influenced by feeding regimen. *Br Poult Sci.*37(4):779-86.
- Rosebrouh RW, Steele NC, Mcurtry JP, Plavnik I. 1986. Effect of early feed restriction in broilers II. Lipid metabolism Growth. 50:217-227.
- Ross Broiler Management Manual. 2002. Aviagen Incorporated, Huntsville, Alabama
- SAS Institute. 1999. SAS User's Guide, Version 6.12. Statistical Analysis System SAS Institute Inc. Cary NC. USA
- Schlesinger JM. 1986. Heat shock proteins. *Journal of cell Biology* 103: 321-325.
- Sohn SH, Multani AS, Gugnani PK, Pathak S. 2002. Telomere erosion-induced mitotic catastrophe in continuously grown Chinese hamster Don cells. *Exptl Cell Res* 279(2):271-276.
- Son MW, Ko JI, Doh HM, Kim WB, Park TS, Shim MJ, Kim BK. 1998. Protective effect of taurine on TNBS-induced inflammatory bowel disease in rats. *Arch Pharm Res* 21(5):531-536.
- Tappel AL. 1978. Protection against free radical lipid peroxidation reactions. *Adv Exp Med Biol.* 97:111-31
- Taylor HA, Delany ME. 2000. Ontogeny of telomerase in chicken: Impact of downregulation on pre- and postnatal telomere length *in vivo*. *Develop Growth Differ* 42:613-621
- Thaxton JP, WA Dozier 3rd, SL Branton, GW Morgan, DW Miles, WB Roush, BD Lott, Y Vizzier-Thaxton. 2006. Stocking density and physiological adaptive responses of broilers. *Poult. Sci.* 85:819-824.
- Ulaner GA, Giudice LC. 1997. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol. Hum. Reprod.* 3(9):769-773.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Development Genetics* 18(2):173-179.
- Xu J, Yang X. 2000. Telomerase Activity in Bovine Embryos During Early Development. *Biology of Reproduction* 63:1124-1128
- Yu ME, Robinsin FE. 1992. The application of short-term feed restriction to broiler chicken production: a review. *Journal of Applied Poultry Research.* 1:147-153.
- Zubair AK, Leeson S. 1994. Effect of early feed restriction and realimentation on heat production and changes in sizes of digestive organs of male broilers. *Poult Sci.* 73(4):529-38.
- 강혜경, 자카디쉬 벨로, 손시환, 장인석, 문양수. 2009. 육계에서 가시오갈피와 두충의 첨가 급여가 항산화 효소, 지방 및 근육 관련 유전자 발현에 미치는 영향. *한국가금학회지* 36:39-45.
- 김재황, 김영민, 이문도, 신재형, 고영두. 2005. 볏짚을 두충잎으로 대체급여 시 거세한우의 생

- 산성, 도체특성 및 육의 지방산 조성에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 47:963-974.
- 김재황, 안경호, 고영두. 2006. 생리활성 물질(숙, 두충 및 어성초)의 첨가가 이유자돈의 성장, 영양소 이용율, 혈액특성, 장내 미생물 및 설사빈도에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 48:383-392.
- 손시환, 장인석, 문양수, 김영주, 이수희, 고영현, 강선영, 강혜경. 2008. 가시오갈피와 두충의 첨가 급여가 브로일러의 생산 능력, 혈장 생화학 지표 및 텔로미어 함량에 미치는 영향. 한국가금학회지 35:283-290.
- 손시환, 류은경. 1999. Ficoll을 이용한 닭 염색체 분리 기법에 관한 연구. 진주산업대 농업기술 연구소보 12:131-140
- 신길구. 1981. 신씨본초학 수문사.
- 이민희, 이상호, 김영주, 고영현, 장인석, 문양수, 최양호, 손시환. 2008. 산란기에 항산화 물질 급여가 텔로미어 함량 및 난질에 미치는 영향. 한국가금학회지 35:267-274.
- 장인석, 고영현, 강선영, 문양수, 손시환. 2007. 천연 항산화제로서 포도씨앗 분말첨가가 육용계의 성장 및 항산화 작용에 미치는 영향. 한국가금학회지 34:1-8.
- 조은정, 최철환, 손시환. 2005. 닭의 발생 단계별 세포내 telomere의 양적 분포양상과 telomerase 활성도 분석. 한국동물자원과학회지 47(2):187-194
- 진재인. 1990. 원설한방의학대사전(중국약학대전) 송옥출판사.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.