

발간등록번호

11-1541000-001359-01

보안과제( ), 일반과제( 0 )

과제번호 109027-3

**동물복지 기준 설정을 위한 닭의 스트레스 측정  
표지 개발**

**Identification of Chicken Stress Biomarkers to Establish  
Guidelines for Animal Welfare**

**경남과학기술대학교**

**농림수산식품부**

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “동물복지 기준 설정을 위한 닭의 스트레스 측정 표지 개발” 과제(1세부과제 “닭 사육 방식에 따른 스트레스 실증 시험 및 생산성 비교 분석”, 2세부과제 “닭의 면역 및 스트레스 표지 물질 개발 및 실용화 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2012년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 경남과학기술대학교

주관연구책임자 : 손시환

세부연구책임자 : 손시환

세부연구책임자 : 장인석

연 구 원 : 이상호

연 구 원 : 고영현

연 구 원 : 이민희

연 구 원 : 조은정

연 구 원 : 강선영

연 구 원 : 손보람

연 구 원 : 윤서현

# 요 약 문

## I. 제 목

동물복지 기준 설정을 위한 닭의 스트레스 측정 표지 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 동물복지기준에 대한 과학적 근거가 미약한 실정이다. 따라서 닭의 면역, 스트레스 관련 유전자들의 발현 양상을 분석하여 닭의 스트레스 측정 표지를 개발하고, 이를 이용하여 각종 사육 형태가 스트레스에 미치는 영향을 고찰함으로써 친환경 동물복지형 사육 기준을 제시하고 자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. 닭의 면역, 스트레스 관련 유전자 및 단백질의 발현 양상 구명과 실용 스트레스 측정 표지 개발

- 1) 환경 스트레스에 의한 사이토카인 분석; iNOS, IL-4, IL-6, IFN-gamma, TNF-beta 등을 중심으로 스트레스 측정 표지 발굴
- 2) 혈액 중 백혈구 조성, DNA 손상율, Corticosterone, Telomere 및 HSP(heat shock protein) 등의 발현 양상을 중심으로 스트레스 측정 표지 발굴

2. 산란계의 사육 형태에 따른 스트레스 관련 표지 물질의 발현 양상 및 생산성 비교 분석

- 1) 케이지 및 방사 사육 방식에 따른 생산성 비교 분석; 생존율, 산란율, 난질, 난중, 체중 등
- 2) 케이지 및 방사 사육 방식에 따른 스트레스 정도 비교 분석; 사이토카인 및 Telomere 함량, DNA 손상율, HSP 발현량 분석

3. 육계의 사육밀도 및 항산화 물질 첨가 급여에 따른 스트레스 관련 표지 물질의 발현 양상과 생산성 비교 분석

- 1) 사육 밀도에 따른 스트레스 정도 및 생산성 비교 분석
- 2) Vitamin (C, E) 첨가 급여에 따른 생산성 및 스트레스 완화 정도에 미치는 영향 분석

4. 스트레스 정도 분석에 따른 산란계 및 육계의 친환경 동물복지 사육 기준 제시

## IV. 연구개발결과

1. 닭의 스트레스 관련 표지 물질 개발

- 1) 산란계(White Leghorn)에서 사육밀도증가에 따른 밀사와 사료섭취량 제한으로 인위적 스트레스를 유기하고 이에 따른 다양한 스트레스의 표지를 탐색하였다. 생리지표 탐색에서 22주령 및 64주령 공히 스트레스 유발에 따른 현저한 체중 감소가 나타났다. 그러나 장기 무게, 혈액성상에서 백혈구 감별계수(%), Heterophil/Lymphocyte 비율, corticosterone 등에서는 사

육밀도와 급이량 제한으로 유도된 스트레스에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.

- 2) 면역관련 장기에서 일부 친염증 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS) 등과 같은 유전자의 발현이 스트레스에 따라 현저히 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 동물복지와 관련된 biomarker 지표로서 체중변화를 비롯한 면역관련 친염증 사이토카인 발현 양상의 변화가 스트레스 및 면역지표로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.
- 3) 세포내 텔로미어 함량이 스트레스 표지 척도로 이용 가능한가를 검토하고 자 혈액 등 각종 조직 내 텔로미어 함량을 비교 분석하였다. 분석 결과 혈액 내 백혈구 세포의 텔로미어 함유량은 다른 조직과 달리 스트레스에 매우 민감하게 작용하여 급격한 감소를 보임에 따라 사육 밀도 및 급이량과 같은 스트레스 요인에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 따라서 면역과 밀접한 관련이 있는 백혈구 세포를 이용한 텔로미어의 상대적 함량 분석은 개체의 스트레스 예측을 위한 훌륭한 표지로서의 가능성을 시사한다.
- 4) 환경스트레스에 의해 유도되는 heat shock protein(HSP) 유전자들과 HMGCR 유전자의 발현 양상을 혈액 및 간 조직에서 분석하여 이를 산란계의 스트레스 마커로 활용할 수 있는가를 검토하였다. 분석 결과 HMGCR, HSP70, HSP90의 발현은 간 조직에서 HMGCR의 유의적 발현차이를 제외하고는 모든 처리 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 HMGCR의 경우 스트레스군이 대조군에 비해 2배 이상의 발현율을 보여 스트레스 예측 표지 유전자로서의 가능성을 나타내어 스트레스 관련 biomarker로 활용할 수 있음을 보여주었다.
- 5) DNA 손상율을 비교 분석하여 이를 스트레스 예측표지로서의 가능성을 탐색하고 자 Comet assay를 실시하였다. 분석 결과 % DNA in tail, Tail Moment 및 Olive Moment 등 모든 comet 분석값에서 스트레스군이 대조군에 비해 유의하게 높은 DNA 손상율을 나타내어 스트레스와 DNA 손상을 간에 밀접한 관련이 있음을 제시하였다. 따라서 이러한 기법은 세포의 apoptosis에 따른 DNA fragmentation의 정도를 측정하는 것으로 매우 단순하면서도 짧은 시간 내 분석이 가능하여 닭의 스트레스 예측 표지로 실용적 이용 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.
- 6) 생리적 스트레스 지표는 스트레스 종류와 강도, 유전, 연령, 환경적 요인에 의해 다양한 반응이 유기될 수 있다. 이러한 사실로 보아 닭에서 스트레스 지표는 체중, 사료섭취량, 혈중 스트레스 호르몬, H/L 비율 등과 더불어 본 시험에서 입증된 면역조직에서 친염증 사이토카인의 발현량, 혈중 백혈구내 telomeric DNA 함량, HMGCR 발현량 및 세포내 DNA 손상율 등을 종합하여 스트레스 지표로 활용하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

## 2. 산란계 사육 형태에 따른 스트레스 정도 및 생산성 분석

- 1) 계사 사육 형태에 따른 개체의 스트레스 정도를 알아보기 위한 것으로 백색레그혼종 및 한국재래닭을 대상으로 케이지 사육 및 방사 사육으로 관리 후 이들의 생산 능력을 비교 분석하였다. 개체의 생산능력에 있어 생존율, 산란율, 산란지수, 난중 및 체중은 방사 사육 개체들이 케이지 사육 개체에 비해 유의하게 높은 성적을 보였고, 반면 초산일령 및 난질의 경우 케이지 사육 개체가 양호한 결과를 나타내어 개체의 생리적 측면에서 방사 사육이 케이지 사육에 비해 보다 바람직한 사육형태로 사료된다.
- 2) 계사사육형태에 따른 닭의 스트레스 관련 유전자 및 단백질 발현분석에서 텔로미어 함량, DNA 손상율 및 HMGCR의 발현량을 비교 분석하였다. 텔로미어 함량 분석에서 혈액 세포

및 신장, 비장 세포의 경우 케이지 사육구 개체들의 텔로미어 함량이 방사 사육구에 비해 훨씬 높은 감소율을 보이고, 연령이 증가함에 따라 이의 차이는 더욱 커지는 것으로 나타났다. Comet assay에 의한 DNA 손상율에 있어서도 케이지 사육 개체들이 방사 사육 개체들에 비해 월등히 높은 손상율을 나타내었다. 반면 HMGCRC의 발현량에 있어서는 혈액의 경우 방사 개체의 발현값이 케이지 사육개체에 비해 높게 나타나 상반된 결과를 보였다. 따라서 HMGCRC를 제외한 텔로미어 함량 및 DNA 손상율 공히 유효한 개체의 스트레스 마커로 인정되며, 분석 결과 닭의 케이지 사육 형태가 개체들에게 생리적으로 매우 큰 스트레스 요인임을 시사한다.

- 3) 40주령 산란계의 corticosterone 농도는 케이지 사육군이 방사군에 비해 현저히 증가되는 것으로 나타나 케이지 사육 개체들의 스트레스가 방사사육군에 비해 월등히 높은 것으로 사료된다.
- 4) 면역관련 장기에서 일부 사이토카인 등과 같은 유전자의 발현이 사육방식에 따라 현저한 차이가 있는 것으로 나타났다. 케이지 사육군은 방사 사육군에 비해 간, 비장 등 여러 조직에서 IL-10, IFN- $\gamma$  등과 같은 친염증계열의 사이토카인 발현이 전반적으로 증가되었다. 그러나 방사사육군의 간, 비장 및 흉선 등 대부분 장기에서 모두 LITNF- $\alpha$ 의 발현이 현저히 증가되고 흉선에서 TRLs4의 유전자발현이 증가되는 것으로 관찰되었다. 본 시험의 결과로 보아 동물복지 및 스트레스와 관련된 biomarker로서 각종 혈액 지표, 면역 사이토카인, 감염에 따른 특정 유전자 발현 등은 닭에서 전반적인 사육체계를 평가하는 기초 지표로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 3. 육계의 사육밀도 및 항산화 물질 첨가 급여에 따른 스트레스 반응과 생산성 분석

- 1) 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 처리 구 차이가 나타나지 않아 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- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 및 TNF- $\alpha$  등의 사이토카인 유전자의 발현량을 분석한 바 처리구 간 유의적 차이가 없었으나 IL-10 유전자는 고밀도 사육군에서 현저하게 감소되었다. 그러나 흉선에서 사이토카인 유전자의 발현 양상을 조사한 바 TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ 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.
- 2) 육계의 사육 밀도가 생리적 활성도에 미치는 영향을 살펴보고자 35일령 개체들의 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 세포들에 대한 텔로미어 함량을 분석 한 바 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 유의적인 차이를 보이며, 저밀도구의 개체들이 월등히 높은 텔로미어 함유율을 나타내었다. 한편 스트레스 관련 유전자인 HSP 70과 HMGCRC의 발현은 고밀도 처리구가 저밀도와 표준 밀도에 비

해 약 2배 높은 발현양상을 보였다. 그러나 HSP 90은 처리 간 차이를 나타내지 않았다. 이는 사육 환경 조건 중 사육 밀도가 개체의 스트레스 요인 중 매우 중요한 요인임을 입증하는 것으로 혈액세포의 텔로미어 함유율 및 HSP70과 HMGR의 발현율이 신뢰할 수 있는 스트레스 표지임을 시사한다.

- 3) 스트레스 저감물질로서 항산화 비타민(C 및 E)을 투여하여 사양시험을 실시하고 사양성적이 우수한 비타민 C 급여 육계에서 LPS 감염 스트레스를 실시하여 항산화물질 투여에 따른 생리 및 면역반응을 조사하여 스트레스 정도를 조사하였다. 본 연구 결과에서 육계사양시험 결과 비타민 C 및 E 급여는 닭의 체중, 사료효율, 폐사율 등과 같은 생산성에 직접적인 영향을 미치지 않았으나, 흥선의 상대적 무게는 비타민C 및 E 첨가구에서 유의적으로 증가된 것으로 나타났다. 혈액에서 ALP, albumin, cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol 등은 vitamin C 급여에 따라 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 변화되고 LPS 처리에 따라 AST, ALT, BUN, glucose, Ca, P, uric acid,  $\gamma$ -GTP, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 등과 같은 성분이 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 변화되었다. 육계에서 감염스트레스로서 LPS 처리에 따라 corticosterone의 분비가 현저히 ( $P<0.05$ ) 증가되었으며, LPS처리 후 비타민 C를 급여할 경우 corticosterone 농도가 현저하게 ( $P<0.05$ ) 감소되는 것으로 보아 비타민 C가 감염스트레스를 완화하는 효과가 있는 것으로 기대된다. 면역기관인 비장에서는 고수준의 LPS 처리가 모든 친염증사이토카인 발현을 오히려 감소시키고 비타민 C 처리는 친염증사이토카인 mRNA 발현에는 어떠한 영향을 미치지 않았다. 한편 간 조직에서는 항산화 비타민 C의 친염증 유전자 완화작용이 뚜렷한 것으로 보아 간 조직에서 LPS의 감염독성을 완화시킬 수 있다는 것으로 해석된다. 따라서 닭에서 감염스트레스가 혈액에서 각종 대사산물 및 스트레스 호르몬 및 간의 친염증사이토카인 반응에 영향을 미쳐 스트레스를 야기하는 것으로 보이며, 비타민 C와 같은 항산화비타민 급여는 일부 스트레스지표를 완화하는 것으로 나타나 감염 스트레스 저감물질로서 가능성이 높다.
- 4) 항산화물질 첨가 급여(Vit C와 E)가 육계의 스트레스 완화 효과에 미치는 영향을 살펴보고자 혈액, 간, 비장 및 정소 세포들에 대한 텔로미어 함량을 분석하였다. 35일령 시험 종료시 혈액 및 간 세포들의 텔로미어 함유율은 비타민 C 및 E 첨가 급여 개체들이 무첨가 개체들에 비해 유의하게 높은 함유율을 보이고, 혈액 중 텔로미어 감축을 또한 비타민 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의하게 낮은 감축율을 나타내었다. 또한 비타민 첨가 급여구가 대조구에 비해 혈액 세포내 DNA 손상율도 유의하게 낮게 나타났다. 스트레스 표지 유전자로 알려진 HSP 70, 90 및 HMGR의 발현율에 있어서도 HSP 70을 제외하고 비타민 첨가 급여구가 대조구에 비해 월등히 낮은 발현양상을 보였다( $P<0.05$ ). 이상의 결과로서 본 시험에 이용된 Vit C 및 E의 첨가 급여는 개체의 항산화 및 면역 증강 효과에 매우 긍정적으로 작용하여 육계의 사육 스트레스 저감에 매우 효과적 영향을 미치는 것으로 사료된다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구 성과

#### 가. 기술적 측면

- 1) 닭의 환경스트레스와 유전자 발현양상의 상호관계를 규명하여 관련 유전자를 stress-marker로 제시
- 2) 사육 방식 및 사육밀도와 관련하여 스트레스 정도 분석

### 3) 육계의 스트레스 저감 향산화 소재 발굴

#### 나. 경제, 산업적 측면

- 1) 환경스트레스에 의한 동물 반응을 조절하는 유전자들을 분석함으로써 닭의 생산성 및 복지를 고려한 사육 환경 제안
- 2) 향산화 사료 첨가제 발굴로서 육계의 스트레스 저감 효과 제시
- 3) 스트레스 관련 적정 사육밀도 분석으로 복지개념의 사육환경 제시

#### 다. 학술적 측면

##### 1) 논문게재 9편 (SCI 4편, 학진등재 5편)

- ① J. Beloor, H. K. Kang, Y. J. Kim, V. K. Subramani, I. S. Jang, S. H. Sohn and Y. S. Moon. 2010. The effect of stocking density on stress related genes and telomeric length in broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23(4):437-443 (1 April. 2010)
  - ② Sun-Young Kang, Young-Hyun Ko, Yang-Soo Moon, Sea-Hwan Sohn and In-Surk Jang . 2011. Effects of the combined stress induced by stocking density and feed restriction on hematological and cytokine parameters as stress indicators in laying hens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(3): 414-420 (1 March 2011)
  - ③ Y. J. Kim, V. K. Subramani, S. H. Sohn. 2011. Age prediction in the chickens using telomere quantity by quantitative fluorescence in situ hybridization technique. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(5): 603-609 (1 May 2011)
  - ④ S. H. Sohn, V. K. Subramani, Y. S. Moon, and I. S. Jang. 2012. Telomeric DNA quantity, DNA damage and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens. *Poultry Science* 91(4):829 - 836 (April 1, 2012)
  - ⑤ 이수희 · Vinod K. Subramani · 손시환. 2009. 닭의 모체 연령에 따른 생산 배아의 염색체 이상 빈도 및 텔로미어 함량 분석. *한국가금학회지* 36(4):293-300 (2009. 12. 30.)
  - ⑥ 강선영, 이민희, 고영현, 손시환, 문양수, 장인석. 2010. 산란계에 천연 향산화원으로서 가시오갈피 및 두충 급여가 체내 향산화 작용에 미치는 영향. *한국가금학회지* 37(1):15-21 (2010. 3. 31.)
  - ⑦ 손시환, 조은정. 2010. 한국 재래닭 염색체의 텔로미어 분포 양상. *한국가금학회지* 37(3):247-253 (2010. 9. 30)
  - ⑧ 최나은, 김현섭, 최창용, 전광주, 손시환. 2010. 혈액세포의 텔로미어 함량을 이용한 소의 연령예측. *한국동물자원과학회지* 52(5):367-374 (2010. 10. 31)
  - ⑨ 손시환, 장인석, 손보람. 2011. 계사 사육 형태가 산란계의 생산성과 스트레스 반응에 미치는 영향. *한국가금학회지* 38(4):305-313 (2011. 12.30)
- ##### 2) 학술발표 16편 (국제 2편, 국내 14편)
- ##### 3) 산업재산권 2건 (국내 특허출원 2건)
- ① 텔로미어 함량을 이용한 닭의 나이 예측 방법 (10-2010-0071265)
  - ② 텔로미어 함량을 이용한 소의 나이 예측 방법 (10-2010-0071262)

## 2. 성과 활용 계획

- 1) 가금에서의 스트레스 반응을 조절하는 유전자들의 작용기전을 밝히는데 기초 자료를 제공
- 2) HSP(HSP90, HMGCR) 유전자 발현량, telomere 함유율, 혈액세포의 DNA 손상율 및 iNOS 등 일부 cytokine 유전자 발현량을 가금의 스트레스 측정 표지로 개발 활용
- 3) 닭의 스트레스 정도 및 생산성을 고려한 사육 방식 및 사육 밀도 제시
- 4) 육계에서 비타민 C, E의 첨가 급여가 스트레스 완화에 효과가 있는 것으로 나타남에 따라 이를 스트레스 저감제로 개발 활용
- 5) 산란계의 기존 사육방식인 케이지사 사육 및 육계의 고밀도 사육등이 동물복지를 고려한 사육체계로 바람직하지 않음을 과학적으로 입증함에 따라 개선된 사육체계의 필요성 시사



## **SUMMARY**

### **I. Title**

Identification of chicken stress biomarkers to establish guidelines for animal welfare

### **II. Research Objective**

The experiments were performed to identify the stress related biomarkers using immune related genes, gene expression of heat shock proteins, telomere length and the rate of DNA damage in chickens. This study was also investigated the effects of housing systems, stocking density and anti-oxidant supplements on the productivity and physiological response as stress indicators in chickens to suggest the guideline of poultry welfare.

### **III. Content of Experiments**

1. Search and investigate the chicken stress markers
  - 1) Analysis of biochemical characteristics of blood plasma and liver; AST et al.
  - 2) Analysis of immune related (iNOS, IL-4, IL-6 and IFN gamma) gene expression levels.
  - 3) Analysis of telomere length, gene expression of HSPs and DNA damage
2. Effect of housing system on layer
  - 1) Effect of housing system (cage vs. floor pen) on the productivity in layer
  - 2) Comparison of the stress response between cage and floor pen system was analyzed by the immune related gene expressions, HSP gene expressions, telomere length and the rate of DNA damage as stress indicators.
3. Effect of stocking density and antioxidant supplements on broiler
  - 1) Analyzed growth performance and stress response under different stocking density.
  - 2) Analyzed growth performance and stress response in different antioxidant supplement treatments.
  - 3) Stress response was analyzed by the immune related gene expressions, HSP gene expressions, telomere length and the rate of DNA damage.
4. Suggest the guideline for poultry welfare according to the stress response of chickens.

### **IV. Results**

1. Telomeric DNA quantity, DNA damage and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens

In this longitudinal study with Single Comb White Leghorn chickens, we investigated the effects

of stress conditions in birds that were subjected to a high stocking density with feed restrictions on the quantity of telomeric DNA, the rate of DNA damage and the expression levels of heat shock proteins (HSPs) and hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) genes. The telomere length and telomere shortening rates were analyzed by quantitative fluorescence in situ hybridization on the nuclei of lymphocytes. The DNA damage rate of lymphocytes was quantified by the comet assay. The expression levels of HSP70, HSP90 and HMGCR genes were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction in lymphocytes. The telomere-shortening rate of the lymphocytes was significantly higher in the stress group than the control. The DNA damage also increased in birds raised under stress conditions, as compared to the control group. The stress conditions had a significant effect on the expressions of HMGCR and HSP90 $\alpha$  in lymphocytes, but had no significance on HSP70 and HSP90 $\beta$  in blood. We conclude that the telomere length, especially the telomere-shortening rates, the quantification of total DNA damage and the expression levels of the HMGCR and HSP90 $\alpha$  genes can be used as sensitive physiological stress markers in chickens.

## 2. Effect of housing systems of cage and floor on the production performance and stress response in layer

This study was conducted to investigate the effects of housing systems on the productivity and physiological response as stress indicators in White Leghorn chickens. The chickens subjected to the conventional cages had a significantly lower viability, hen-housed egg production, egg weight and body weight compared with those to the floor pens. However, the hens housed in the conventional cages had a shorter day of the first egg and a greater egg quality compared with those housed in the floor pens. In addition, this study was also investigated to identify biological markers for assessing the physiological response of chickens under stress conditions. As biological markers, the amount of telomeric DNA was analyzed by quantitative fluorescent in situ hybridization on the nuclei of cells. The DNA damage rate of lymphocytes was also quantified by the comet assay. The amount of telomeric DNA of the lymphocytes, kidney and spleen was significantly higher in the chickens under floor pens than those under conventional cages. The DNA damage also increased in chickens raised under conventional cages, as compared to the chickens under floor pens. As results, we conclude that the chickens housed in conventional cages have a greater stressful status than those housed in floor pens.

## 3. Effect of stocking density on the growth performance and the gene expressions associated with stress response 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. The effect of stocking density on telomere amount in blood, liver, lung, heart and testes tissues was investigated. 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. In results, we found that the amount of telomere decreases with increase in stocking density in blood lymphocytes. 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.

#### 4. Effect of dietary supplementation of vitamin C and E on the growth performance and the stress response in broiler chickens.

There is no significant difference among treatments in body weight, weight gain and feed intake. The blood biochemical profiles, albumin, ALP, triglycerides (TG) and cholesterol in Vit C supplement 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 spleen and thymus were not different among the treated groups. However, the expression levels of IL-1beta, IL-6 and IL-18 in liver were significantly lower in Vit C supplemented birds. The telomere-shortening rate of the lymphocytes was significantly lower in the vitamin supplemented group than the control. The DNA damage also decreased in birds supplemented vitamins, as compared to the control group. The stress conditions had a significant effect on the expressions of HMGCR, HSP90- $\alpha$  and HSP90- $\beta$  in lymphocytes, but had no significance on HSP70.

### V. Achievements and Further Plans

#### 1. Research achievements

##### 1) Technical aspect

- ① Provides a basic data regarding to stress related genes and gene expressions in chickens
- ② Identify the stress response in chickens raised under different housing systems and different stocking density.
- ③ Finding antioxidant supplements related to decline stress in broiler.

##### 2) Economic and industrial aspect

- ① Suggest the guideline of poultry welfare with the analysis of stress response using biomarkers about raising environment
- ② Improvement of stress decline by supplemented antioxidant materials, vitamin C and E

##### 3) Academic aspect

- ① Published papers: 9 papers (SCI 4)
- ② Proceeding results: 16 (international 2, domestics 14)
- ③ Industrial property 2 (Patent 2)

## 2. Further plans

- 1) Analysis of gene expression on immune, aging and stress-related will provide basic theory of gene mechanism, involving stress and bioactive response, in chicken
- 2) Development of the physiological stress markers of chickens using the analysis of telomeric DNA quantity, DNA damage and heat shock protein gene expression
- 3) Recommend the housing system with animal welfare in layer
- 4) Recommend the optimum stocking density with animal welfare in broiler
- 5) Provide the basic data of the mechanisms of the effect of antioxidant vitamins on physiological aspect in chicken.

## CONTENTS

CH 1. Introduction .....	15
1. Aims .....	15
2. Significances .....	15
3. Contents and scope .....	15
CH 2. Status of research and development .....	18
CH 3. Results .....	20
1. Telomeric DNA quantity, DNA damage and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens .....	20
2. Effect of housing systems of cage and floor on the production performance and stress response in layer .....	38
3. Effect of stocking density on the growth performance and the gene expressions associated with stress response in broiler chickens .....	60
4. Effect of dietary supplementation of vitamin C and E on the growth performance and the stress response in broiler chickens .....	76
CH 4. Achievements and contribution .....	92
1. Achievements .....	92
2. Research contribution .....	94
CH 5. Research products and further plans .....	95
1. Research products .....	95
2. Further plans .....	99
CH 6. New technical and scientific information .....	100
CH 7. References .....	101

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
1.	연구개발의 목적	15
2.	연구개발의 필요성	15
3.	연구개발의 내용 및 범위	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	18
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	20
1.	닭의 스트레스 관련 표지 물질 개발	20
2.	산란계 사육 형태에 따른 스트레스 정도 및 생산성 분석	38
3.	육계 사육밀도에 따른 스트레스 관련 표지 물질의 발현 양상과 생산성 비교 분석	60
4.	육계에 있어 항산화 물질 첨가 급여에 따른 스트레스 반응과 생산성 분석	76
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	92
1.	목표달성도	92
2.	관련분야 기여도	94
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	95
1.	연구개발 성과	95
2.	성과활용 계획	99
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	100
제 7 장	참고문헌	101

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발의 목적

본 연구는 닭의 면역, 스트레스 관련 유전자들의 발현 양상을 분석하여 닭의 스트레스 측정 표지를 개발하고, 이를 이용하여 각종 사육 형태가 스트레스에 미치는 영향을 고찰함으로써 친환경 동물복지형 사육 기준을 제시하고 자 한다.

## 2절 연구개발 필요성

최근 미국을 비롯한 유럽연합(EU)등 서구 여러 나라들과 FTA체결이 이루어지고 있다. 이와 같은 국제 무역환경의 급변이 국내 농업에 심각한 영향을 미치고 있고 특히 축산분야에 있어 이의 파급 효과가 상당하리라 예견하고 있다. 따라서 국내 가금 산업의 방향과 가치관도 상당한 변화를 요구하고 있는 실정이다. 지금까지 국내 닭의 사육방식은 밀사, 고에너지 사료, 성장 조절 및 사료효율 증대를 위한 개량에 매진하여 왔고 동물 자체의 건강 및 복지에 대해서는 거의 간과하였다. 육계(broiler)는 빠른 성장에 기초한 유전적 개량으로 팔목할 만한 능력의 개선이 이루어졌다. 이러한 결과는 육계의 성장은 빨라졌으나 과도한 체지방 축적, 면역 및 체내 항상성 부족에 따른 질병 및 대사성 질환이 다발하는 현상으로 이어져 질병발생 및 항생제 다량 사용 등과 같은 경쟁력을 악화시키는 주요한 원인으로 지적되고 있다. 특히 양계산업에서 사육방식이나 사육밀도 등과 같은 환경 스트레스에 대한 고찰 및 생산성과 동물복지 간의 관련성이나 이에 근거한 사육방법의 제시는 거의 이루어진 바가 없다. 한편으로 사람을 비롯한 닭 유전체의 기본적 유전 정보는 이미 완료가 된 상태로서 앞으로 이들 유전체의 기능과 발현 양상에 대한 연구가 향후 과제로 남아있으며, 이제는 밝혀진 유용유전자를 대상으로 산업적 선택과 적용 유무의 검증이 시도되어야 할 때이다. 특히 환경의 변화와 유전자 발현간의 상호 관계에 대한 연구는 사육이란 관점에서 산업적으로 매우 중요한 과제로 생각된다. 면역 및 스트레스 관련 표지 물질들은 인간을 중심으로 다수 소개되고 있으나 닭에 대하여 구체적이고 체계적으로 연구된 바가 없으며, 생리적 스트레스 완화를 위한 첨가 급여물질에 대한 연구도 상대적으로 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 육계 및 산란계를 대상으로 사육 방식, 사육밀도 및 항산화제 첨가 등에 따른 면역 및 항상성 증가에 관련된 스트레스 관련 유전자들을 탐색하고, 이의 발현 양상을 구명하여 현장에서 적용 가능한 stress-marker를 발굴하고, 이를 과학적 근거로 활용하여 동물 복지형 가금 사육 체계를 제시하고 자 한다.

## 3절 연구개발의 내용 및 범위

1. 닭의 면역, 스트레스 관련 유전자 및 단백질의 발현 양상 구명과 실용 스트레스 측정 표지 개발

(1) 시험 설계

62주령 백색레그혼을 대상으로 밀사 (368 cm<sup>2</sup>/bird) 및 섭취량 제한(75%) 급여를 2주일간 실시하여 인위적 스트레스를 가하고 대조구와 비교 분석을 실시

(2) 스트레스 유발에 따른 닭의 혈액학적 면역 및 스트레스 성상 조사

면역관련 장기 무게 변화 조사, 혈액내 corticosterone 분석, 백혈구 감별계수 및 H/L 비율 및 혈중 생화학성분 조사

(3) 스트레스에 따른 면역 관련 유전자 발굴 및 발현 양상 분석

면역조직에서 친염증 및 항염증 사이토카인 유전자(iNOS, IL-4, IL-6, IFN-gamma, TNF-beta 등) 발현 조사

(4) 스트레스에 따른 기능성 DNA 분석

Telomeric DNA 함량 분석 및 DNA 손상을 분석

(5) 스트레스 연관 유전자 및 단백질 발현 양상 분석

HSPs (heat shock proteins) 유전자의 발현 양상 분석

(6) 닭 스트레스 연관 표지 물질 발굴

혈장 생화학적 성분, 면역 관련 유전자, 열 스트레스 관련 유전자, 텔로미어 및 DNA 손상율의 분석을 통한 스트레스 민감성 표지 선정

2. 산란계의 사육 형태에 따른 스트레스 관련 표지 물질의 발현 양상 및 생산성 비교 분석

(1) 시험 설계

백색레그혼종을 공시하고 케이지 육추 후 16주령부터 개체 별 사육방식을 케이지 사육군 (Cage) 및 평사 사육군(Floor)으로 분리하여 동일 사육방식으로 사육하고 케이지군은 무창 계사 내 2단 4열 케이지 형태로 칸 당 90cm(W) x 90cm(L) x 66cm(H)의 철망 배터리형 케이지에 10수씩(♀9:♂1) 혼사하였고(810cm<sup>2</sup>/수), 평사군은 펜(pen) 형태의 개방식 계사로서 펜 당 400cm(W) x 700cm(L) x 380cm(H) 크기의 방에 100수씩(♀90:♂10) 혼사 후 비교 분석하였다.

(2) 케이지 및 방사 사육 방식에 따른 생산성 비교 분석

생존율, 산란율, 난질, 난중 및 체중 분석

(3) 사육 형태에 따른 닭의 혈액학적 면역 및 스트레스 성상 비교

혈액의 생화학 성분 및 생리학적 성분 조사(백혈구 감별계수, heterophil/lymphocyte 비율), 면역관련 장기 무게 변화 조사

(4) 계사 사육 형태에 따른 닭의 면역 관련 유전자 발굴 및 발현 양상 분석

면역장기에서 사이토카인 유전자, iNOS, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-gamma, TNF-beta, Toll-like receptors(TLRs)의 발현 분석

(5) 계사 사육 형태에 따른 기능성 DNA 비교 분석

Q-FISH에 의한 Telomeric DNA 함량 분석 및 comet assay에 의한 DNA 손상을 분석

(6) 스트레스 연관 유전자 및 단백질 발현 양상 분석

HMGCR 및 HSP 유전자의 발현 양상 분석

3. 육계 사육밀도에 따른 스트레스 관련 표지 물질의 발현 양상과 생산성 비교 분석

(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) 스트레스관련 유전자 발현 양상 비교

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

(4) 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

(5) 면역 유전자의 발현 양상 분석

사육 밀도에 따른 처리별 iNOS, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 및 TNF- $\alpha$ 의 발현 양상 비교 분석

(6) 사육 밀도에 따른 기능성 DNA 비교 분석

사육 밀도에 따른 처리별 개체 조직간 Telomeric DNA 함량 분석

4. 육계에 항산화제 첨가 급여가 스트레스 반응에 미치는 영향

(1) 시험 설계

실용브로일러(Ross종)를 대상으로 2일간의 적응기간을 거쳐 3일령부터 35일령까지 공시하고, 완전임의배치법에 의한 대조구 (CON, control)와 비타민 C (Ascorbic acid, 99.8%) 200mg/kg 및 비타민 E (Alpha-tocopherol acetate 50%) 분말을 100mg/kg 수준으로 첨가 및 Vit C+E 처리구로 비교 시험

(2) 항산화제 첨가 급여에 따른 생산능력 비교 분석

항산화제 첨가 급여구 간 체중, 증체량, 사료섭취량 및 사료효율 비교 분석

(3) 항산화제 첨가 급여에 따른 스트레스관련 유전자 발현 양상 비교

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

(4) 혈청 및 각종 조직내에 생화학적 성분분석

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

(5) 면역 유전자의 발현 양상 분석

항산화제 첨가 급여에 따른 면역장기(간, 비장, 흉선)에서 사이토카인 유전자, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IFN- $\gamma$ , Toll-like receptors(TLRs)4의 발현 분석

(6) 항산화제 첨가 급여에 따른 기능성 DNA 비교 분석

처리구별 Q-FISH에 의한 Telomeric DNA 함량 분석 및 comet assay에 의한 DNA 손상을 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

- 1) 유럽에서는 2006년부터 성장촉진을 위한 항생제 사용을 전면 금지하고 브로일러 사육밀도에 대한 엄격한 가이드라인을 제시함과 더불어 2012년부터는 케이지 사육 생산란에 대해 식란으로 사용을 금지하는 등 매우 강도 높은 동물복지정책을 시행하고 있음 (Langhout, 2005)
- 2) 최근 유럽은 가금의 복지기준(EU FP6 Welfare Quality®)을 설정하고 이를 평가 기준으로 하고 있음 (Butterworth, 2009)
- 3) 동물 복지적 측면에서 기존 케이지 사육 형태가 개체의 생리적 습성이나 건강적 측면에서 바람직하지 못하다는 다수의 학술적 연구들이 보고되었음 (Baxter, 1994; Freire 등, 2003; Albentosa와 Cooper, 2004)
- 4) 기존 케이지 사육의 대체 사육 방식으로 확장케이지(enriched cage), 에비어리(aviary system), 겸용케이지(furnished cage), 평사(floor pen) 및 방사 등의 사육 형태가 소개됨 (Rodenburg 등, 2005; Vits 등, 2005; Pohle과 Cheng, 2009; Singh 등, 2009; Tactacan 등, 2009; Sherwin 등, 2010; Lay 등, 2011; Tuytens 등, 2011).
- 5) 동물의 스트레스 반응 정도를 분석하기 위한 생리적 표지로서 혈액생화학적 지표와 혈장 코티코스테론(corticosterone) 농도를 제시 (Mashaly 등, 1984; Thaxton 등, 2006; Turkyilmaz, 2008)
- 6) interleukin-4(IL-4), IL-6, lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  및 inducible nitric oxide synthase와 같은 사이토카인(cytokine)의 발현량이 면역 표지로서 스트레스 측정에 널리 이용되고 있음 (Felten 등, 1998; Mashaly 등, 2004; Hangalapura 등, 2005; Kang 등, 2011)
- 7) 텔로미어의 감축 양상이 노화의 지표뿐만 아니라 개체의 생리적 표지로 알려짐 (Meeker와 Coffey, 1997; Cottliar와 Slavutsky, 2001)
- 8) 산화적 스트레스가 텔로미어 유실을 가속화 시킨다고 밝힘 (Von Zglinicki, 2002; Richter와 Proctor, 2007)
- 9) 생물체에 스트레스 요인을 가하게 되면 세포의 세포사(apoptosis)가 촉진되어 DNA 파손(fragmentation) 정도가 급격히 증가됨 (Chen 등, 2007)
- 10) 밀사, 환경온도, 이송, 급이제한, 사료오염, 행동제한 등이 닭의 외적 스트레스 요인임 (Thaxton 등, 2006; Zimmerman 등, 2006; Delezie 등, 2007; Keles 등, 2010).
- 11) 열 스트레스 요인이 heat shock proteins (HSPs)의 발현량 증대 (Schlesinger, 1986; Zulkifli

등, 2002).

- 12) Hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR)는 cholesterol 합성 조절 인자로서 산화적 스트레스와 밀접한 관련이 있음 (Gornati 등, 2004, Beloor 등, 2010).
- 13) 브로일러 사육밀도 증가가 HSP 유전자 발현 및 telomere 감축량을 증대시킴 (Beloor 등, 2010)
- 14) 산란계에 있어 절식 및 밀사와 같은 환경적 스트레스가 혈액생화학적 지표 및 사이토카인 발현율에 영향을 미침 (Kang 등, 2011)
- 15) Telomeric DNA 함량, DNA 손상을 및 HSP 유전자 발현율이 닭에 있어 훌륭한 생리적 스트레스 표지임을 입증 (Sohn 등, 2012)
- 16) 산란계에 천연 항산화원으로서 가시오갈피 및 두충 급여가 체내 항산화 작용에 미치는 영향을 보고 (강 등, 2010)
- 17) 계사 사육 형태가 산란계의 생산성과 스트레스 반응에 미치는 영향을 분석 (손 등, 2011)

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1절 닭의 스트레스 관련 표지 물질 개발

##### 1. 스트레스에 따른 산란계 사양 및 혈액 생화학적 성분 분석

###### 가. 재료 및 방법

###### (1) 공시동물 및 시험설계

본 시험에 공시된 시험동물은 산란계 White leghorn 종으로서 진주산업대학교 종합농장에서 부화하여 사육중인 22주령 및 64주령 총 56수를 이용하였다. 산란기간별 스트레스에 따른 차이를 조사하기 위하여 산란초기(22주령) 및 산란후기(64주령)의 동물을 각각 사용하였다. 본 시험에 공시된 시험동물은 대조군(Control) 및 스트레스군(Stress) 등 2개의 군으로 설정하여 케이지에 사육하였다. 대조군의 사육밀도는 1,350cm<sup>2</sup>/수로서 자유급이를 실시하고, 스트레스군은 368cm<sup>2</sup>/수의 사육밀도로서 자유급이의 75% 수준에서 사료를 12일간 제한급이를 실시하였다. 스트레스 요인으로 밀사와 제한급이 방법을 동시에 실시한 것은 스트레스군에서 먹이투쟁을 유발하여 스트레스 요인을 가중시키자 하는 것이 목적이었다. 온도 및 광선조절을 갖춘 사육시설에서 본 대학의 산란계 사육 관리 지침에 따라 일령별 사육을 실시하였다.

Table 1-1. Chemical composition of experimental diets fed to laying hens

Items	Basal diet	
	-----	(%) -----
Moisture		13.93
Crude protein		17.98
Nitrogen free extract		44.34
Crude fat		4.03
Crude fiber		4.95
Crude ash		14.77
Ca		4.03
P		0.84

###### (2) 분석 항목

###### (가) 체중 측정

시험 개시 및 시험 종료시 체중을 측정하였다. 사양시험 종료 후 부검을 실시하여 간, 비장, 흉선 및 F-낭 등을 획득하고 생체중 100g 당 상대적인 중량으로 환산하여 장기무게를 조사하였다.

###### (나) 혈액 생화학적 성분분석, corticosterone 및 백혈구 감별계수

백혈구 감별계수(%)는 자동 혈구분석기(Hemavet 500, Dasct.)를 이용하여 분석하였다. 분석내용은 총 백혈구 수(WBC), 이형구(Heterophil), 림프구(Lymphocyte), 단핵구(Monocyte), 호염기구(Eosinophil), 호산성구(Basophil), Heterophil: lymphocyte(H:L) 비율을 측정하였다. 혈장에서 스트레스호르몬인 corticosterone 수준은 corticosterone EIA kit (No 500651, Cayman chemical Co.)을 이용하여 사용자 지침에 따라 분석하였다. 혈장 AST, ALT, albumin, total

protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 분석은 자동생화학분석기(Hitachi 747, Japan)를 사용하여 실시하였다.

(3) 통계처리

스트레스 유발에 따른 결과는 Proc-GLM(SAS, 1996)에 의해 분산분석을 실시하고 처리간 비교는 t-test 방법에 의해  $P < 0.05$  수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 스트레스에 따른 체중 및 장기무게

스트레스(사육밀도와 제한급이) 유발에 따른 22주령 및 64주령 산란계의 사양성적 결과 (Table 1-2 및 1-3)를 살펴보면 체중은 인위적 유발스트레스에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 22주령의 산란계에서 12일 동안 스트레스 사양이 끝난 후 나타난 결과 스트레스군이 대조군에 비해 체중이 감소하는 경향으로 대조군에서는 112.2g의 체중 증체를 보였지만 스트레스군에서는 오히려 30g의 체중 감소 현상이 나타났다. 그러나 체중 100g당 상대적 간, 흉선 및 F-낭의 무게는 스트레스 유발에 따른 영향을 받지 않았다. 64주령 산란계에서도 22주령에서와 유사하게 체중의 감소( $P < 0.003$ )를 보였으나 장기무게는 스트레스에 따른 차이가 없었다.

Table 1-2. Effect of induced stress body weight and relative organ weight in White leghorn aged 22 wks

Item	Treatment		
	Control	Stress	P
Initial BW, g	1254.4 ± 42.12	1310.0 ± 19.50	0.179
Final BW, g	1366.6 ± 33.38	1280.0 ± 26.81	0.063
Liver, g/100g BW	1.86 ± 0.06	2.10 ± 0.25	0.364
Spleen, g/100g BW	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.563
Fabricius, g/100g BW	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.571

Values(mean±SE).

Table 1-3. Effect of induced stress on body weight and organ weight in White leghorn aged 64 wks

Item	Treatment		
	Control	Stress	P
Initial BW, g	1626.4 ± 57.77	1610.2 ± 22.08	0.754
Final BW, g	1705.9 ± 55.25*	1523.2 ± 26.81	0.003
Liver, g/100g BW	2.59 ± 0.11	2.59 ± 0.11	0.975
Spleen, g/100g BW	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.00	0.120

Values(mean±SE).

Table 1-4. Effect of induced stress on the composition of blood cells and WBC differential count in White leghorn aged 22 wks

Item	Treatment		
	Control	Stress	P
WBC (K/ $\mu\ell$ )	19.20 $\pm$ 2.08	19.39 $\pm$ 4.36	0.97
Heterophil ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	4.72 $\pm$ 0.91	5.25 $\pm$ 1.79	0.80
Lymphocyte ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	11.89 $\pm$ 0.73	11.47 $\pm$ 1.81	0.83
Monocyte ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	2.13 $\pm$ 0.27	1.92 $\pm$ 0.42	0.69
Eosinophil ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	0.39 $\pm$ 0.14	0.62 $\pm$ 0.30	0.50
Basophil ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	0.09 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.07	0.66
Heterophil (%)	23.81 $\pm$ 1.75	24.01 $\pm$ 3.45	0.96
Lymphocyte (%)	62.94 $\pm$ 2.52	63.20 $\pm$ 4.56	0.96
Monocyte (%)	11.01 $\pm$ 0.34	9.95 $\pm$ 0.41	0.08
Hetero/Lympho ratio	0.39 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.09	0.86
RBC (M/ $\mu\ell$ )	4.15 $\pm$ 0.87	3.64 $\pm$ 0.21	0.59
Hb (g/dl)	10.12 $\pm$ 1.10	8.94 $\pm$ 0.79	0.41

Values(mean $\pm$ SE).

Table 1-5. Effect of induced stress on the composition of blood cells and WBC differential count in White leghorn aged 64 wks

Item	Treatment		
	Control	Stress	P
WBC (K/ $\mu\ell$ )	34.11 $\pm$ 1.29	30.79 $\pm$ 0.93	0.07
Heterophil ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	9.28 $\pm$ 0.88	8.17 $\pm$ 0.51	0.31
Lymphocyte ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	19.84 $\pm$ 0.98	18.03 $\pm$ 0.47	0.13
Monocyte ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	3.62 $\pm$ 0.14	3.42 $\pm$ 0.14	0.33
Eosinophil ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	1.01 $\pm$ 0.33	0.96 $\pm$ 0.09	0.88
Basophil ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	0.37 $\pm$ 0.10	0.21 $\pm$ 0.04	0.18
Heterophil (%)	27.06 $\pm$ 1.94	26.47 $\pm$ 1.12	0.80
Lymphocyte (%)	58.36 $\pm$ 2.93	58.64 $\pm$ 1.39	0.93
Monocyte (%)	10.63 $\pm$ 0.15	11.10 $\pm$ 0.19	0.09
Hetero/Lympho ratio	0.48 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.03	0.75
RBC (M/ $\mu\ell$ )	5.79 $\pm$ 2.02	3.62 $\pm$ 0.26	0.38
Hb (g/dl)	17.40 $\pm$ 3.60	12.70 $\pm$ 0.40	0.29

Values(mean $\pm$ SE).

## (2) 혈액 생화학적 성분 및 백혈구 정상

스트레스 유발에 따른 산란계의 혈액 백혈구 구성 비율에 대한 결과(Table 1-4 및 1-5)를 살펴보면 혈액의 백혈구 조성 감별계수에서 호중구, 림프구, 단핵구, 호염기구 등의 상대적 %는 차이가 없는 것으로 나타났다. Heterophil/lymphocyte 비율에서도(H:L ratio) 스트레스에 따른 차이가 없었으며, 혈중 corticosterone 농도에서도 22 및 64주령 산란계에서 모두 스트레스 유발에 따른 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 1-6 및 1-7). Thaxton 등(2006)은 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 및 55kg BW/m<sup>2</sup> 사육밀도 조건하에서 혈중 heterophil: lymphocyte(H:L) 비율,

corticosterone, glucose, cholesterol, nitric oxide 함량을 조사한 결과 사육밀도에 따른 이들 생리적 지표에는 어떠한 차이도 발견 할 수 없었다고 보고하였다. Puvadolpirod와 Thaxon(2000)의 연구에 따르면, 정상 0.5 H:L 비율이 스트레스를 받을시 2.76 비율로 증가하였다고 보고한 바 있거나 본 시험에서는 0.39-0.48 비율로 정상적인 범위에 있었다. Turkyilmaz(2008)은 육계를 이용하여 0.04 m<sup>2</sup>/수, 0.05 m<sup>2</sup>/수, 0.067 m<sup>2</sup>/수의 사육밀도 조건하에서 스트레스 반응을 조사한 결과 H:L 비율, corticosterone, Newcastle disease(ND) 항체반응에서 차이가 없었다고 보고하였다. Feddes 등(2002)은 0.042 m<sup>2</sup>/수, 0.056 m<sup>2</sup>/수, 0.070 m<sup>2</sup>/수, 0.084 m<sup>2</sup>/수 사육밀도 조건에서 관찰한 결과 고밀도 사육군이 가장 낮은 사료섭취량을 보였지만, 폐사율 등에는 영향이 없었음을 보고하였다.

Table 1-6. Effect of induced stress on corticosterone level in White leghorn aged 22 wks

Item	Treatment		P
	Control	Stress	
Corticosterone	82.64 ± 26.90	138.51 ± 25.19	0.16

Values (Mean±SE).

Table 1-7. Effect of induced stress on corticosterone level in White leghorn aged 64 wks

Item	Treatment		P
	Control	Stress	
Corticosterone	223.58 ± 18.84	195.15 ± 11.13	0.22

Values (Mean±SE).

## 2. 스트레스에 따른 면역유전자 발굴 및 발현양상 분석

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 조직에서 RNA 분리

각 처리군 별로 5수씩 선택한 공시동물의 조직으로부터 RNAsol™ kit(TEL-TEST, INC)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 조직을 RNazol 용액에서 균질화한 후 chloroform을 혼합한 후 원심분리하고 2-propanol을 혼합하여 RNA를 침전시켜 분리하고 분리된 RNA를 이용하여 즉시 cDNA를 합성하였다.

#### (2) RT-PCR을 mRNA 발현 조사

추출한 RNA를 이용하여 분광광도계에서 OD값을 측정하여 RNA를 10 µg으로 정량한 후 oligo dT(Invitrogen) 1 µl와 ddH<sub>2</sub>O를 넣어 최종 부피가 12 µl가 되도록 하여 RT를 제조하였다. RT-product 2.5 µl, MgCl<sub>2</sub>(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 H<sub>2</sub>O 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, 조직은 94℃에서 3분, [94℃에서 30초, 59℃에서 30초, 72℃에서 45초] × 40cycle, 72℃에서 10분, 4℃에서 ∞로 실시하였다. PCR산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 EasyDoc

Gel documentation system(EasyDoc, Korea)을 이용하여 density를 측정하여,  $\beta$ -actin량에 대한 상대적 density를 계산하여 mRNA양을 확인하였다.

Table 1-8. The sequences of primer

Item	Direction	Sequence(5' to 3')	Size(bp)
IL-4	Forward	AACATGCGTCAGCTCCTGAAT	350
	Reverse	TCTGCTAGGAAGCTTCTCCATTGAA	
TNF- $\alpha$	Forward	GAAGTATCCTCACCCCTACC	223
	Reverse	TGACTCATAGCAGAGACGTG	
iNOS	Forward	GCATCCAAAATATGAGTGGT	274
	Reverse	AAGCACAGCCACATTTATCT	
IL-6	Forward	GCTCGCCGGCTTCGA	188
	Reverse	GGTAGGTCTGAAAGGCGAACAG	
$\beta$ -actin	Forward	GTGGGGCGCCCCAGGCACCCAGGGC	540
	Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

#### 나. 결과 및 고찰

##### (1) 사육밀도와 사료급여량제한 급여에 따른 면역 유전자 발현

22주령 및 64주령 산란계에서 스트레스 유발에 따른 면역 조직에서 IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS 등과 같은 사이토카인 발현에 대한 결과는 Table 1-9와 1-10 및 Fig 1-1과 1-2에서 제시된바와 같다. 밀사와 제한급이가 끝난 후 22주령 산란계에서 간 조직에서 발현된 사이토카인 유전자 발현 양상을 살펴보면 IL-4, IL-6 및 iNOS 사이토카인의 발현은 차이가 없었지만, TNF- $\alpha$  발현은 스트레스군에서 현저히( $P < 0.05$ ) 증가되는 것으로 나타났다. 비장에서는 스트레스에 따른 친염증 cytokine중 IL-6, iNOS의 발현에는 차이를 관찰할 수 없었지만 TNF- $\alpha$  유전자는 스트레스에 따라 유의적으로( $P < 0.05$ ) 감소되었다. 흉선에서는 대부분의 사이토카인의 발현에는 차이가 없었으나, iNOS 발현이 스트레스군에서 증가되었다. F-낭에서는 IL-4와 같은 항염증 사이토카인과 TNF- $\alpha$ 과 같은 친염증 사이토카인이 스트레스군에서 감소되었다. 64주령 산란계에서 스트레스 유발후 간 조직에서 발현된 사이토카인 유전자 발현 양상을 살펴보면, IL-4의 발현에는 차이가 없었지만, 친염증 유전자인 TNF- $\alpha$ 와 iNOS 발현은 스트레스군에서 증가되는 것으로 나타났다. 비장에서 발현된 사이토카인의 발현 양상을 살펴보면, IL-4, IL-6 및 iNOS 발현은 차이가 없었지만 TNF- $\alpha$  발현은 stress 군에서 현저히( $P < 0.05$ ) 증가되는 것으로 나타났다.

동물체는 내·외 환경에 반응하여 질병으로부터 체 항상성을 유지하는데, 특히 면역계는 백혈구와 림프기관(흉선 및 F-낭)에서 특이적 및 비특이적 면역반응에 따라 그 역할을 수행한다. 비특이적 면역 반응은 주로 염증반응이 발생되고 대식세포에 의해 식 작용이 발생되며 세포의 비특이적 면역반응은 항체와 T-세포 등의 적응성 반응을 유기시킨다. T-세포 역시 골수에서 생성되어 흉선에서 활성화되는 세포 매개성 면역으로 cytotoxic T-세포는 사이토카인을 생성하여 세포사 유발 및 대식세포를 유인하여 식 작용을 한다. 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 IL-2와 IFN- $\gamma$ 를 분비한다. Th-2은 IL-4, IL-10 및 IL-30을 생성한다. 또한 친염증사이토카인 (pro-inflammatory cytokine) 유전자로서는 IL-6, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  등이 존재하며, 이들 유전자



는 감염부위에 면역세포 작용을 활성화시킨다. 산화질소(NO)는 일종의 신호 물질로 작용해 적절한 수준은 면역계에 활성을 부여하고 만약에 산화질소가 과다하게 세포에서 형성되면 세포 사멸을 유도하는데, 이런 영향 때문에 면역, 암발생에도 산화질소가 관여한다. iNOS 효소는 산화질소를 생산하는 효소로서 iNOS가 억제되면 산화질소 생성이 차단된다.

본 연구에서는 인위적 스트레스(사육밀도증가와 제한급이)를 유발하여 친염증 사이토카인들인 IL-6, iNOS 및 TNF- $\alpha$ 와 항염증 사이토카인 IL-4 mRNA 발현을 면역 조직에서 조사하였다. 스트레스군에서 산란초기 및 후기 닭에서 특히 항염증에 관련된 사이토카인의 발현이 현저히 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 현재 산란계에서 스트레스 유발에 따른 면역관련 사이토카인에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 거의 보고되고 있지 않는 실정이다. 대부분의 사이토카인 연구는 실험용 쥐를 대상으로 이루어져 이들의 연구를 살펴보면, 랫드와 마우스에서 에너지 제한 절식이 IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  등과 같은 친염증 사이토카인 mRNA 수준을 증가시킨다고 보고하고 있다(Muthukumar 등, 2000; Bhattacharya 등, 2006). iNOS 역시 IL-1와 TNF- $\alpha$  등과 같은 친염증 반응에 관여하는 사이토카인 형성에 중요한 역할을 한다(Guzik 등, 2003). 많은 연구에서 사육밀도가 증가되면 증체는 감소되는 것으로 즉 사육밀도와 닭의 성장은 역의 상관관계가 있음이 보고되고 있다. Feddes 등(2002) 보고에 따르면 사육밀도(23.8, 17.0, 14.3, 11.9 수/m<sup>2</sup>)가 42일령에서 육계의 생산성을 조사한 결과 가장 밀도가 높은 23.8 수/m<sup>2</sup> 가장 체중이 감소되었으며 14.3 수/m<sup>2</sup>에서 가장 체중이 증가되었다. Imaeda(2000) 연구에 따르면 사육밀도(12, 15, 18 수/m<sup>2</sup>) 조건하에서, 체중 및 사료요구율에서는 유의적 차이가 없었으나, 급사병은 사육밀도와 밀접한 관계가 있음을 보고하여 사육밀도가 닭의 스트레스 및 면역작용에 연관성이 있음을 보고하였다.

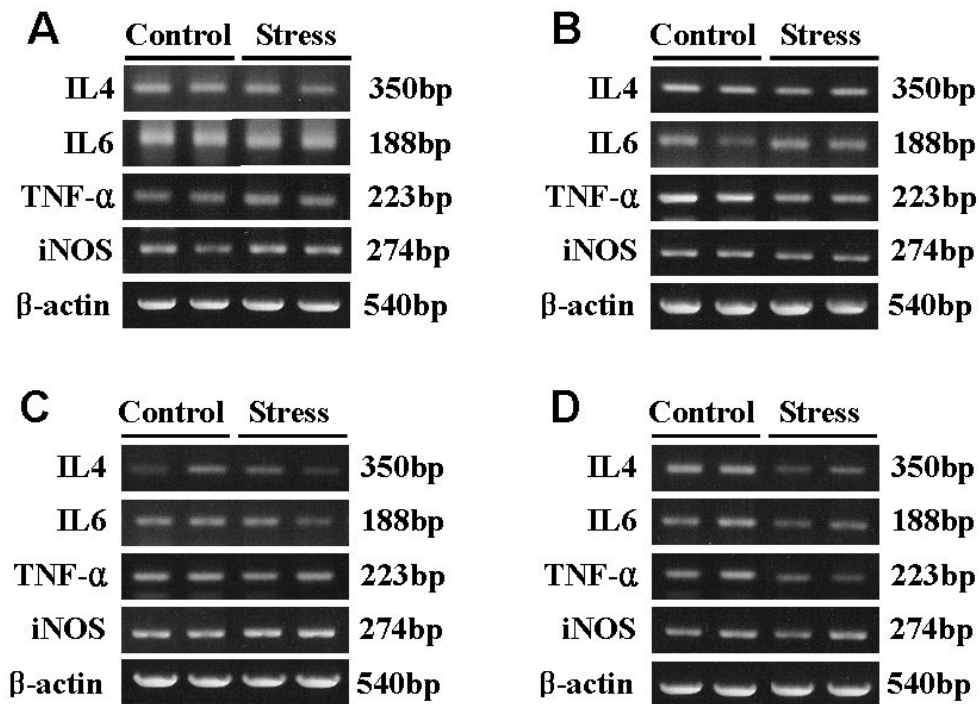


Fig 1-1. Effect of induced stress on the expression of cytokine of white leghorn aged 22 wks (A: liver, B: spleen, C:thymus and D: Fabricius)

Table 1-9. Effect of induced stress on the expression of cytokine of white leghorn aged 22 wks

Item	Treatment		P
	Control	Stress	
Liver			
IL-4	0.89 ± 0.10	0.86 ± 0.36	0.830
IL-6	0.94 ± 0.27	1.55 ± 0.09	0.235
TNF-α	0.40 ± 0.02	0.50 ± 0.02*	0.004
iNOS	0.46 ± 0.05	0.59 ± 0.06	0.162
Spleen			
IL-4	1.18 ± 0.15	1.15 ± 0.43	0.941
IL-6	0.89 ± 0.14	0.58 ± 0.01	0.051
TNF-α	1.04 ± 0.06*	0.77 ± 0.09	0.026
iNOS	0.54 ± 0.06	0.49 ± 0.04	0.453
Thymus			
IL-4	0.79 ± 0.07	0.84 ± 0.10	0.678
IL-6	1.00 ± 0.05	0.95 ± 0.16	0.720
TNF-α	1.02 ± 0.05	1.11 ± 0.08	0.398
iNOS	0.76 ± 0.09	1.03 ± 0.08	0.053
Fabricius			
IL-4	0.45 ± 0.04*	0.29 ± 0.03	0.015
IL-6	0.45 ± 0.07	0.30 ± 0.03	0.077
TNF-α	0.35 ± 0.03*	0.22 ± 0.03	0.036
iNOS	0.30 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.358

(Mean ± SE).

Table 1-10. Effect of induced stress on the expression of cytokine of 64wks white leghorns

Item	Treatment		P
	Control	Stress	
Liver			
IL-4	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.401
IL-6	0.24 ± 0.06	0.18 ± 0.05	0.481
TNF-α	0.39 ± 0.04	0.57 ± 0.02*	0.002
iNOS	0.44 ± 0.02	0.60 ± 0.03*	0.003
Spleen			
IL-4	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.953
IL-6	0.28 ± 0.05	0.24 ± 0.02	0.488
TNF-α	0.99 ± 0.10	1.58 ± 0.10*	0.001
iNOS	0.45 ± 0.03	0.56 ± 0.07	0.170

(Mean ± SE).

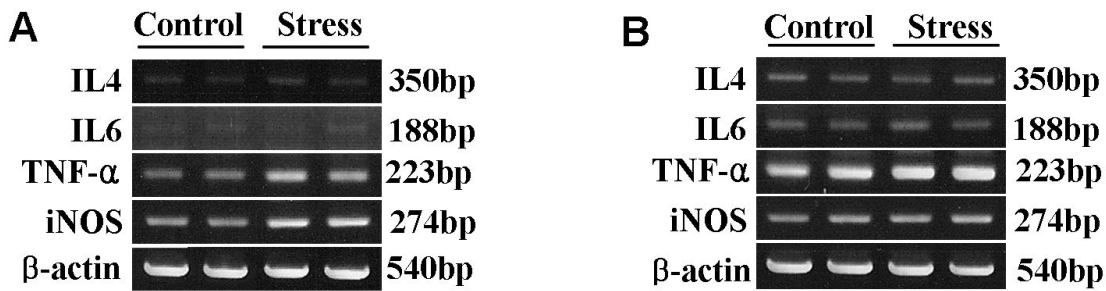


Fig 1-2. Effect of induced stress on the expression of cytokine of white leghorn aged 64 wks (A: liver, B: spleen)

그러나 Thaxton 등(2006)의 연구에 의하면 사육밀도가 스트레스에 관련된 생리적 지표가 유의적인 영향을 미치는 않는 것으로 보고하였다. 사육밀도와 스트레스작용 미치는 영향에 대한 연구는 많이 보고되고 있지 않지만, 사육밀도가 증가되면 심장, 비장, F-낭, 흉선 등의 무게가 일부 감소되는 것으로 보고되고 있다(Pesti와 Howarth, 1983; Dafwang 등, 1987). 최근의 연구보고에 따르면 가축에서 사육밀도 증가가 혈액 IgG 농도를 감소시켜 면역기능을 저하시킬 수 있음을 보고하였다(Caroprese 등, 2009).

#### 다. 결론

본 연구 결과를 종합하여 볼 때, 산란계에서 사육밀도증가에 따른 밀사와 사료섭취량제한으로 유도된 스트레스는 22주령 및 64주령 산란계에서 투쟁을 유발하여 상당한 스트레스를 유발할 것으로 사료되어, 체중의 감소 등이 나타났다. 그러나 장기 무게, 혈액성상에서 백혈구 감별계수(%), Heterophil/lymphocyte 비율, corticosterone 등에서는 사육밀도와 급이량 제한으로 유도된 스트레스와 상관없이 대조구와 비슷한 결과를 보였다. 면역관련 장기에서 일부 친염증 사이토카인(IL-6, TNF-α, iNOS) 등과 같은 유전자의 발현이 스트레스에 따라 현저히 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 동물복지와 관련된 biomarker 지표로서 체중변화를 비롯한 면역관련 친염증 사이토카인 발현 양상의 변화가 스트레스 및 면역지표로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 현재까지는 여러 가지 사육방법에서 스트레스 및 면역관련 지표분석을 통해 동물복지에 관련된 biomarker를 개발하고 탐색하는 연구는 많지 않다. 스트레스 지표는 스트레스 종류와 강도, 유전, 연령, 다양한 환경적 요인에 의해 다양한 생리적 지표에서 다양한 반응이 유기될 수 있다. 이러한 사실로 보아 산란계에서 스트레스 지표는 체중, 사료섭취량, 혈중 스트레스 호르몬, H/L 비율 등과 본 시험에서 입증된 면역조직에서 사이토카인의 발현 등을 종합하여 스트레스지표로서 활용하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다. EU의 동물복지정책에 따라 2012년부터 산란계는 케이지 사육을 전면 금지키로 하고 국내에서도 2008년 동물보호법을 전면 개정하여 동물보호 및 복지시책을 강화하였으므로, 사육밀도나 사육방법에 따른 동물복지와 관련된 스트레스나 면역작용 biomarker 등을 개발하는 지속적인 연구가 요구된다.

### 3. Telomeric DNA 함량 분석을 이용한 세포노화 지표 개발

## 가. 서론

텔로미어(telomere)라 함은 염색체의 양 말단부로서 세포 분열이 거듭됨에 따라 길이가 짧아지는데, 이는 텔로머레이스(telomerase)의 활성이 결핍되어 나타나는 현상이다. 이러한 텔로미어의 감축 양상이 노화의 지표뿐만 아니라 다양한 생리적 표지로서 많은 연구가 되고 있다(Meeker와 Coffey, 1997; Ulaner와 Giudice, 1997; Cottliar와 Slavutsky, 2001). 텔로미어의 감소가 세포의 노화에 따른 telomeric DNA의 유실에 의해서 나타나는 것이기는 하나, 이의 감축 정도는 단지 유전적 생리현상에 의해서만 이루어지는 것이 아니고 제반 환경적 요인에 의해서도 영향을 받는 것으로 나타난다. 이러한 환경 요인들 중 특히 산화적 스트레스가 텔로미어 유실을 가속화 시킨다고 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 개체들의 세포내 텔로미어 함량이 스트레스 표지 척도로 이용 가능한가를 검토하고 자 스트레스 계군과 대조계군간의 각종 조직 내 텔로미어 함량을 비교 분석하였다.

## 나. 재료 및 방법

### (1) 공시계 및 시험구

본 시험에 공시된 시험동물은 62주령 단관백색레그혼종 56수로서 12일간 사육밀도 및 급이제한에 따라 스트레스군(368 sq.cm/bird, feed restriction 75%)과 대조군(1350 sq.cm/bird, ad libitum)으로 완전임의배치하고, 처리당 2반복으로 사육하였다. 사양관리는 산란후기사료를 급여하였으며 경남과학기술대학교 종합농장 내 무창 계사에서 본 대학의 산란계 사육 관리 지침에 따라 사육하였다. 텔로미어 함량 분석을 위한 공시계는 시험 종료시 처리별 각 10수씩 도살하여 조직을 획득하였다.

### (2) 조직 및 혈액 표본 제작

텔로미어의 함량 분석은 혈액, 간 및 비장 조직을 대상으로 하였으며, 시험 개시시 채혈 및 시험 종료시 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× 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) 양적형광접합보인법 (Q-FISH)

FISH용 probe 제작을 위하여 (CCCTAA)<sub>7</sub>으로 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 $\mu$ l formamide, 5 $\mu$ l hybridization buffer, 2 $\mu$ l(100ng/ $\mu$ l) chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨린 후 밀봉하고 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성(denaturation)시킨 후 38.5 $^{\circ}$ C에서 12시간이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2 $\times$  SSC로서 72 $^{\circ}$ 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 커버글라스로 덮은 후 38.5 $^{\circ}$ 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 처리별 조직내 세포간 telomeric DNA 함량의 비교분석은 SAS 통계 패키지 (SAS, 2000)의 T-test를 이용하였다.

### 다. 결과 및 고찰

단관백색레그혼을 대상으로 개체의 스트레스 감응도가 텔로미어 함량에 미치는 영향을 살펴 보았다. 62주령에 사육밀도 및 급이제한에 따른 인위적 스트레스구와 대조구로 구분하고 12일간 사양시험을 수행 후 처리별 10수씩 도살하여 혈액, 간 및 비장 세포의 텔로미어의 함유율을 분석하였다.

각 조직들의 텔로미어 함량은 양적형광접합보인법 (quantitative fluorescence in situ hybridization; Q-FISH)을 이용하여 개체별 100개 이상의 세포에 대해 분석하였으며 본 분석 방법으로 획득한 대표적 텔로미어의 접합 간기 세포들의 양상은 Fig. 1-3과 같다.

분석 결과 혈액 내 백혈구 세포의 텔로미어 함유율은 62주령 시험 개시시 평균 1.47%로서 시험 종료시 대조구에는 큰 함량의 변화를 보이지 않았으나 스트레스구는 1.21%로 유의한 감소 양상을 나타내어 대조구와 큰 차이를 보였다 (Fig. 1-4). 한편 시험 종료 후 간 및 비장 세포내 텔로미어 함유율은 스트레스군과 대조군간에 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 1-11).

이상에서와 같이 개체들의 백혈구 내 텔로미어 함유량의 감축율은 다른 조직과 달리 스트레스에 매우 민감하게 작용하는 것으로 나타나 사육 밀도 및 급이량과 같은 스트레스 요인에 큰 영향을 받는 것으로 보여진다. 특히 백혈구 세포들은 면역과 밀접한 관련이 있는 것으로 스트레스 등과 같은 외적 요인에 보다 민감하게 반응함으로 혈액을 이용한 텔로미어의 상대적 함량 분석은 개체의 스트레스 예측을 위한 훌륭한 표지로서의 가능성을 시사한다.

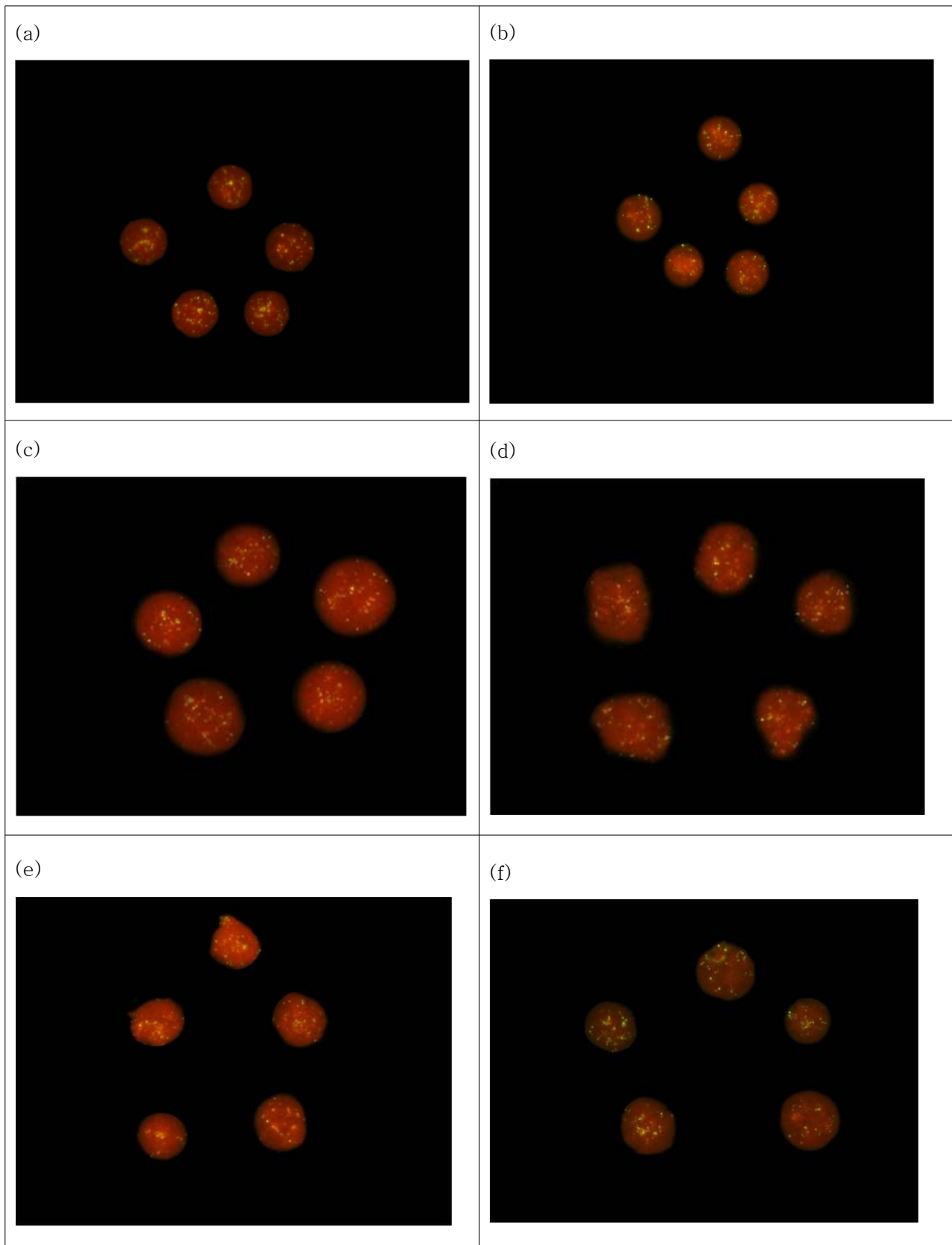


Fig. 1-3. The representative telomere distribution of interphase nuclei in White Leghorn by FISH using telomeric DNA probe; The amount of telomeric DNA is 1.93(a) and 1.67(b) in lymphocytes, 1.50(c) and 1.49(d) in liver, 2.60(e) and 2.16(f) in spleen.

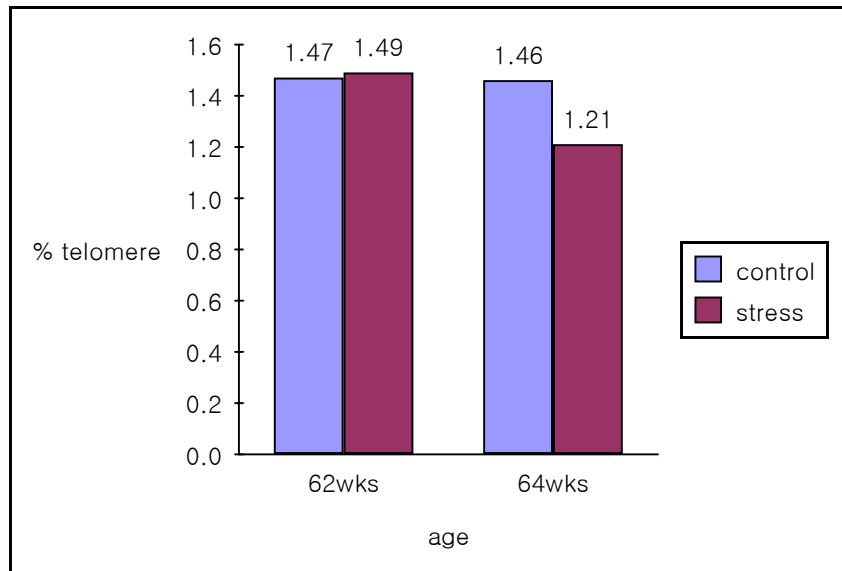


Fig. 1-4. Relative amount of telomeric DNA in White Leghorn lymphocytes under stressed and non-stressed raising condition.

Table 1-11. The amount of telomeric DNA of interphase nuclei of tissues in 64wks White Leghorn raised stressed and non-stressed condition

Treatment*	Lymphocytes	Liver	Spleen
Non-stressed chicken(control)	1.49±0.39 <sup>a</sup> (n=800 cells)	1.41±0.25 (n=500)	2.31±0.56 (n=400)
Stressed chicken	1.21±0.35 <sup>b</sup> (n=900 cells)	1.41±0.20 (n=400)	2.15±0.61 (n=500)

<sup>a,b</sup>Values (Means±SD) with different superscripts within column significantly differ (p<0.05).

\*Non-stressed chicken were raised under full feeding(110g/day) and low density(1350 sq.cm/bird) but stressed chicken under restricted feeding(83g/day) and high density(368 sq.cm/bird).

#### 4. 스트레스 관련 유전자 및 단백질 발현 양상 분석

##### 가. 서론

본 과제에서는 환경스트레스에 의해 유도되는 heat shock protein(HSP) 유전자들 (Basu 등, 2002; Schlesinger, 1986)과 스트레스 마커로 가장 일반적으로 조사되는 호르몬인 cortisol의 전구물질로 이용되는 콜레스테롤의 생합성의 제한효소인 3-hydroxyl-3-methyl-glutayl coenzyme A reductase (HMGCR) (Gornati 등, 2004)의 발현 양상을 분석함으로써 사육밀도 및 제한급이에 따라 이들 유전자들이 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다.

나. 재료 및 방법

(1) 공시동물 및 사양관리

본 시험에 공시된 시험동물 및 시험설계는 사육밀도 및 제한급이에 따른 스트레스군과 대조군으로 하고 동일하게 수행하였다.

(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°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.

(3) RT에 의한 cDNA 합성

reverse transcription system(promega)을 이용하였으며 primer는 oligo(dT)를 이용하였다. 반응조성은 RNA 1.5µg, buffer 4µl, MgCl<sub>2</sub>(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.

(4) real-time PCR

RT PCR을 위한 HMGCR, HSP70 및 HSP90의 primer의 제작은 Table 1-12와 같다. PCR condition은 cDNA 1µl, primer(5pmole)는 각각 0.5µl, SYBR Green 10µl, DEPC H<sub>2</sub>O 8µl 반응물을 94°C 5분간 최초의 변성을 시키고, 94°C 15초간 두 번째 변성, 각각 유전자에 맞는 접합 온도를 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.

Table 1-12. 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	GGAATCAGGTTAATTTTCAGGTCCTTTTCCA		
HMGCR	Forward	ATGCATGGCCTTTTTGTGGCCTCTCATCCA	270bp	55
	Reverse	CTTGAGAAGATTGTGAGGAGACCAGCAATA		
Beta-actin	Forward	AGGACATCTCCGTGGAAGAGA	520bp	55
	Reverse	TCCTGTAGAGGCACCTTCTCT		



다. 결과 및 고찰

분석 결과 White Leghorn에 있어 사육밀도 및 제한급이에 따른 스트레스 관련 유전자들의 발현에 부분적 영향을 미치는 것으로 나타났다. HSP70, HSP90 및 HMGCR 유전자들의 발현을 64주령 개체의 혈액과 간 조직에서 조사 분석하였다. Table 1-13에 제시된 바와 같이 스트레스 군과 대조군에 대한 HMGCR, HSP70, HSP90의 발현은 간 조직에서 HMGCR의 발현을 제외하고는 모든 처리 간에 차이가 없으므로 나타났다. (Fig. 1-5, 1-6). 그러나 HMGCR의 경우 스트레스군이 대조군에 비해 2배 이상의 발현율을 보여 스트레스 예측 표지 유전자로서의 가능성을 나타내었다. Heat shock protein들은 환경적 스트레스에 의해 합성되어지는 잘 보존된 단백질계(family)로서 환경변화에 대처할 수 있도록 관련 기작들을 유도한다. HMGCR은 cortisol의 생합성에 영향을 미치는데, 스트레스 사육에 따른 HMGCR의 발현 증가는 간접적으로 혈액과 간에서 cortisol의 증가를 뒷받침하여 준다고 할 수 있다.

Table 1-13. The mRNA expression levels of HMGCR, HSP70 and HSP90 in blood and liver of White Leghorn chickens raised stressed and non-stressed condition

Treatment*	HMGCR		HSP70		HSP90	
	liver	blood	liver	blood	liver	blood
Non-stressed chicken(control)	0.81±0.3 <sup>b</sup>	-	1.35±0.64	0.37±0.08	2.09±0.78	1.18±0.43
Stressed chicken	1.65±0.89 <sup>a</sup>	-	2.26±0.87	0.42±0.20	1.87±0.66	1.11±0.50

<sup>a,b</sup>Values (Means±SD) with different superscripts within column significantly differ (p<0.05).

\*Non-stressed chicken were raised under full feeding(110g/day) and low density(1350 sq.cm/bird) but stressed chicken under restricted feeding(83g/day) and high density(368 sq.cm/bird).

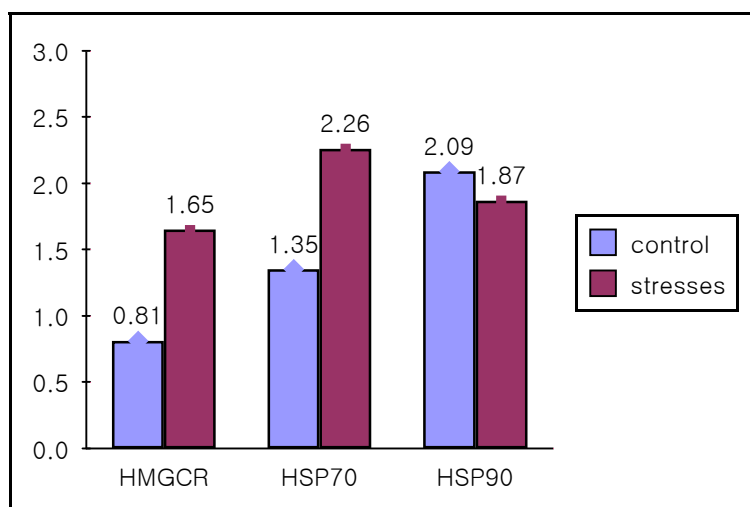


Fig. 1-5. The mRNA expression levels of HMGCR, HSP70 and HSP90 in liver of White Leghorn chickens subjected to control and stressed condition. Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis.

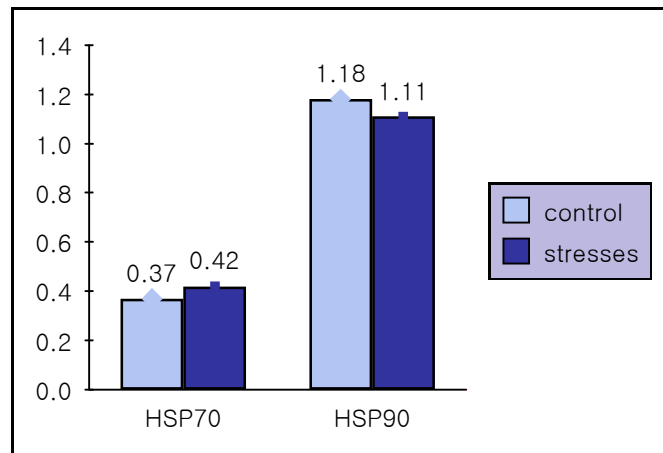


Fig. 1-6. The mRNA expression levels of HSP70 and HSP90 in blood of White Leghorn chickens subjected to control and stressed condition. Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis.

HSP70과 HSP90유전자의 발현은 스트레스군에서 유의적 차이를 보이지 않았는데 사육밀도와 HSP의 발현의 상호관계는 가금류에서 조사 보고된 바가 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 못하였다고 하였다. HSP family에 속한 유전자들이라도 스트레스에 따른 발현 양상은 다르게 나타남을 볼 수 있었다. HSP 및 HMGCR의 발현을 혈액과 간에서 비교한 결과 두 시료 간에 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 스트레스와 관련한 산란계의 스트레스 지수를 확인하기 위하여 혈액 및 간을 이용하여 다소의 예측이 가능함을 시사한다. 본 시험은 HMGCR을 스트레스관련 biomarker로서 활용할 수 있음을 보여준다.

## 5. COMET assay에 의한 DNA 손상을 분석

### 가. 서론

Single-cell electrophoresis 방법으로 세포내 DNA 손상을 정도를 측정하는 것으로 일반적으로 Comet assay라 한다. 밀사 등에 따른 스트레스 요인이 세포의 apoptosis를 촉진함에 따라 본 기법을 이용하여 apoptosis 동안 DNA fragmentation의 정도를 측정한다. 따라서 본 연구에서는 사육밀도 및 제한급이에 따른 스트레스군과 대조군 간의 DNA 손상을 비교 분석하여 이를 스트레스 예측표지로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### (1) 공시동물 및 사양관리

본 시험에 공시된 시험동물 및 시험설계는 사육밀도 및 제한급이에 따른 스트레스군과 대조군으로 하고 동일하게 수행하였다.

#### (2) Single cell gel electrophoresis (Comet assay)

1% agarose gel에 슬라이드를 담군 후 이를 제거하고 건조시킨다. 10 $\mu$ l 혈액을 75 $\mu$ l 0.5%LMPA(low melting point agarose made in Dulbecco's buffered saline)에 혼합하여 슬라이드 위에 떨어뜨리고 커버슬라이드로 덮은 후 냉장 상태로 굳힌다. 굳은 상태에서 커버슬라이드를 제거하고 80 $\mu$ l 1%LMPA를 도포하여 굳힌 후 4 $^{\circ}$ C lysis solution에 60분간 침지한다. lysis solution을 제거 후 조심스럽게 전기영동장치에 거치 후 electrophoresis buffer(pH>13)를 채운다. 10분정도 침지 후 25V, 300mA로 30분간 전기영동하고 건조 후 중성 buffer에 5분간 정지한다. 건조된 슬라이드는 80 $\mu$ l propidium iodide(0.4 $\mu$ g/ml)로 5분간 염색한다. 냉장 초자수로 헹구어 염색을 종료 후 형광현미경(AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰한다. 관측된 상은 디지털카메라로 촬영하고 Comet Score software v1.5(TriTek Corp. Sumerduck, VA, USA)로 분석하였다. 분석항목으로는 1) % DNA in tail로 전체 Comet intensity 대비 tail intensity의 비율, 2) Tail Moment로서 tail내 DNA생성률(%) 및 3) Olive Moment로 (tail intensity $\times$ head까지의 상대적거리)/total Comet intensity를 조사하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

본 연구에서는 사육밀도 및 제한급이에 따른 스트레스 개체군과 대조군간의 DNA 손상을 comet assay법으로 분석하여 이들 간의 차이를 검토하고 이러한 기법이 스트레스 예측표지로서 가능한가를 탐색하였다. Comet assay에 의한 대표적 양상은 Fig. 1-7과 같다. 그림에서 나타난 바와 같이 스트레스군에서 DNA fragmentation의 정도가 대조군에 비해 현저히 높은 양상을 나타내고 있다. Comet score 분석 결과 전체 Comet intensity 대비 tail intensity의 비율 (% DNA in tail), tail내 DNA생성률 (Tail Moment) 및 tail intensity $\times$ head까지의 상대적거리/total Comet intensity (Olive Moment)등 모든 분석 값에서 스트레스군이 대조군에 비해 유의하게 높은 DNA 손상을 나타내었다(Table 1-14, Fig. 1-8). 이는 밀사와 제한급이 등 스트레스 요인이 세포의 apoptosis를 현저히 촉진시킨다는 것을 의미하는 것으로 스트레스와 DNA 손상간에 밀접한 관련이 있음을 시사한다. 따라서 이러한 기법은 세포의 apoptosis에 따른 DNA fragmentation의 정도를 측정하는 것으로 매우 단순하면서도 짧은 시간 내 분석이 가능하여 닭의 스트레스 예측 표지로 실용적 이용 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

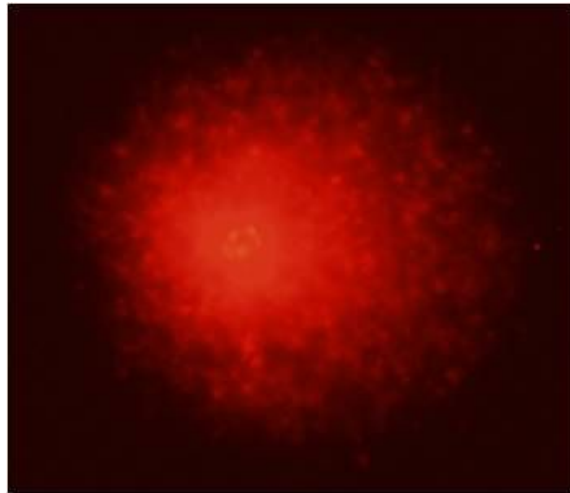
Table 1-14. The comet score of lymphocytes in White Leghorn raised from stressed and non-stressed condition

Treatment*	% DNA in tail	Tail Moment	Olive Moment
Non-stressed chicken(control)	31.55 $\pm$ 3.68 <sup>b</sup>	28.93 $\pm$ 6.85 <sup>b</sup>	29.19 $\pm$ 4.53 <sup>b</sup>
Stressed chicken	54.28 $\pm$ 9.33 <sup>a</sup>	98.82 $\pm$ 38.55 <sup>a</sup>	64.6 $\pm$ 19.89 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Values (Means $\pm$ SD) with different superscripts within column significantly differ (p<0.05).

\*Non-stressed chicken were raised under full feeding(110g/day) and low density(1350 sq.cm/bird) but stressed chicken under restricted feeding(83g/day) and high density(368 sq.cm/bird).

(a)



(b)

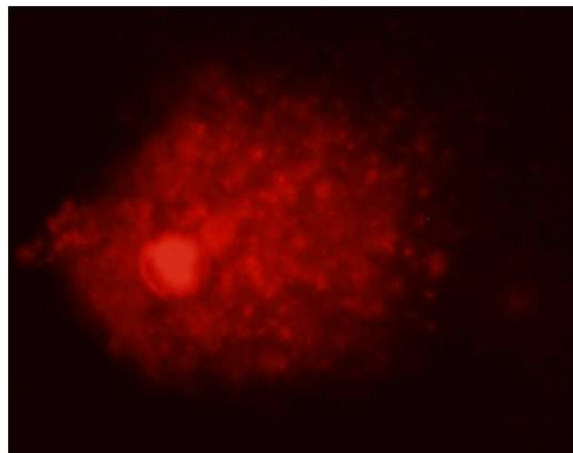


Fig. 1-7. Lymphocyte treated by comet assay in White Leghorn raised from non-stressed(a) and stressed(b) condition

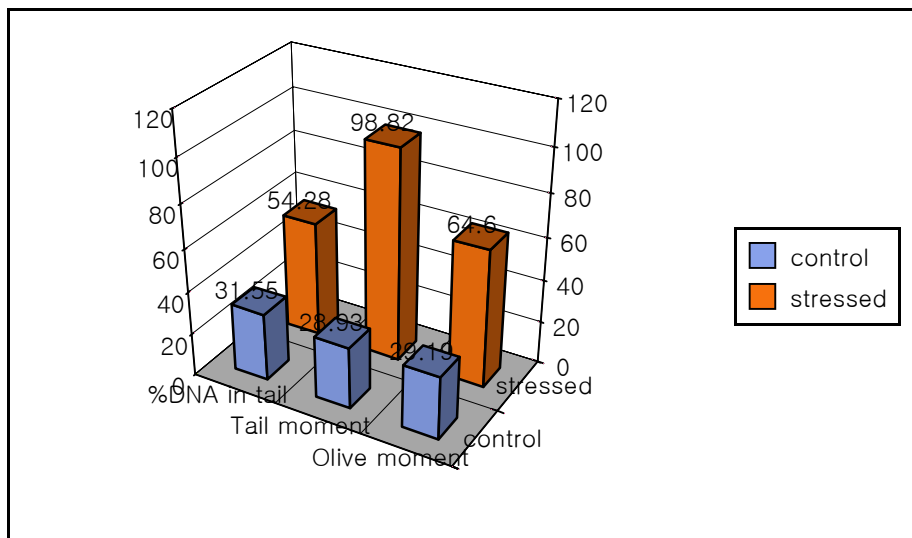


Fig. 1-8. DNA fragmentation by comet assay on lymphocytes in White Leghorn raised from stressed and non-stressed condition

## 6. 닭의 스트레스 관련 표지 물질 선정

- 1) 산란계(White Leghorn)에서 사육밀도증가에 따른 밀사와 사료섭취량제한으로 인위적 스트레스를 유기하고 이에 따른 다양한 스트레스의 표지를 탐색하였다. 생리지표 탐색에서 22주령 및 64주령 공히 스트레스 유발에 따른 현저한 체중 감소가 나타났다. 그러나 장기 무게, 혈액 성분에서 백혈구 감별계수(%), Heterophil/Lymphocyte 비율, corticosterone 등에서는 사육밀도와 급이량 제한으로 유도된 스트레스에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.
- 2) 면역관련 장기에서 일부 친염증 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS) 등과 같은 유전자의 발현이 스트레스에 따라 현저히 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 동물복지와 관련된 biomarker 지표로서 체중변화를 비롯한 면역관련 친염증 사이토카인 발현 양상의 변화가 스트레스 및 면역 지표로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.
- 3) 세포내 텔로미어 함량이 스트레스 표지 척도로 이용 가능한가를 검토하고 자 혈액 등 각종 조직 내 텔로미어 함량을 비교 분석하였다. 분석 결과 혈액 내 백혈구 세포의 텔로미어 함유량은 다른 조직과 달리 스트레스에 매우 민감하게 작용하여 급격한 감소를 보임에 따라 사육 밀도 및 급이량과 같은 스트레스 요인에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 따라서 면역과 밀접한 관련이 있는 백혈구 세포를 이용한 텔로미어의 상대적 함량 분석은 개체의 스트레스 예측을 위한 훌륭한 표지로서의 가능성을 시사한다.
- 4) 환경스트레스에 의해 유도되는 heat shock protein(HSP) 유전자들과 HMGCRC 유전자의 발현 양상을 혈액 및 간 조직에서 분석하여 이를 산란계의 스트레스 마커로 활용할 수 있는 가를 검토하였다. 분석 결과 HMGCRC, HSP70, HSP90의 발현은 간 조직에서 HMGCRC의 유의적 발현차이를 제외하고는 모든 처리 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 HMGCRC의 경우 스트레스군이 대조군에 비해 2배 이상의 발현율을 보여 스트레스 예측 표지 유전자로서의 가능성을 나타내어 스트레스관련 biomarker로 활용할 수 있음을 보여주었다.
- 5) DNA 손상을 비교 분석하여 이를 스트레스 예측표지로서의 가능성을 탐색하고 자 Comet assay를 실시하였다. 분석 결과 % DNA in tail, Tail Moment 및 Olive Moment등 모든 분석 값에서 스트레스군이 대조군에 비해 유의하게 높은 DNA 손상을 나타내어 스트레스와 DNA 손상율간에 밀접한 관련이 있음을 제시하였다. 따라서 이러한 기법은 세포의 apoptosis에 따른 DNA fragmentation의 정도를 측정하는 것으로 매우 단순하면서도 짧은 시간 내 분석이 가능하여 닭의 스트레스 예측 표지로 실용적 이용 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.
- 6) 스트레스 지표는 스트레스 종류와 강도, 유전, 연령, 환경적 요인에 의해 다양한 생리적 지표에서 다양한 반응이 유기될 수 있다. 이러한 사실로 보아 산란계에서 스트레스 지표는 체중, 사료섭취량, 혈중 스트레스 호르몬, H/L 비율 등과 더불어 본 시험에서 입증된 면역조직에서 사이토카인의 발현량, 혈중 백혈구내 telomeric DNA 함량, HMGCRC 발현량 및 세포내 DNA 손상율 등을 종합하여 스트레스지표로 활용하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

## 2절 산란계 사육 형태에 따른 스트레스 정도 및 생산성 분석

### 1. 계사사육형태에 따른 생산능력의 비교 분석

#### 가. 서론

본 연구에서는 계사 사육 형태에 따른 개체의 스트레스 정도를 알아보기 위한 것으로 백색 레그혼종 및 한국재래닭을 대상으로 케이지 사육 및 방사 사육으로 관리 후 이들의 생산 능력을 비교 분석 하였다. 개체의 생산능력은 생존율, 초산일령, 산란율, 산란지수, 난중, 난질 및 체중을 조사하고 사육 형태 간 능력들을 비교 분석하였다. 따라서 본 장에서는 케이지 사육에 따른 사육면적 및 본능적 행동제한이 산란계에게 스트레스 요인으로 작용하는지 여부를 개체의 생산 능력으로 비교 평가하고 자 하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### (1) 공시동물 및 시험설계

본 시험에 공시된 시험동물은 경남과학기술대학교 종합농장에서 부화하여 사육중인 단관백색레그혼 순계(Single Comb White Leghorn Pure Line) 500수 및 한국재래닭 580수를 대상으로 하였다. 공시계들은 케이지 육추 후 16주령부터 개체별 사육방식을 케이지 사육군(Cage) 및 방사 사육군(Floor)으로 분리하여 동일 사육방식으로 사육하였다. 케이지군은 무창계사 내 2단 4열 케이지에 칸 당 11수씩(♀9:♂1) 혼사하였고(736cm<sup>2</sup>/수), 방사군은 전시계사 형태의 평사에서 방 당 100수씩(♀90:♂10) 혼사하였다(2,800cm<sup>2</sup>/수). 두 사육방식 모두 자유급이 및 자유급수를 실시하였고, 케이지 사는 인공점등 하에, 방사군은 자연일조 하에 사육하였다. 생산능력은 16-64주령까지, 각종 시험 분석은 40주령 및 60주령 개체들을 대상으로 각 조직을 채취하였다. 세부적인 사양관리 방법은 본 대학교 산란계 사육 관리 지침에 따랐다.

Table 2-1. Chemical composition of experimental diet fed to laying hens

Items	Diet	
	(%)	
Moisture	14.0	
Crude protein	18.0	
Nitrogen free extract	44.2	
Crude fat	4.0	
Crude fiber	5.0	
Crude ash	14.8	
Ca	4.0	
P	0.8	

##### (2) 조사 항목

###### (가) 생존율

16주령부터 64주령까지 각 군별 반복 집단 의 성계 생존수수로 분석하였다.

###### (나) 초산일령

각 군별 반복 집단 의 산란율이 5%에 도달하는 시점을 초산일령으로 하였다.

(다) 산란율 및 산란지수

초산 후 64주령까지 일계산란율(총산란수/생존연수수 × 100, %) 및 산란지수(총산란수/입실수수, 개)를 분석하였다.

(라) 난질

40주령 산란한 계란을 대상으로 각 군별 난중, 난각색, 난백높이, 하우유니트(HU), 난황색, 난각두께, 난각무게 및 난각밀도를 조사하였다.

마) 체중

60주령 암수 각 개체별 체중을 조사하였다.

(3) 통계처리

각 군별 조사 항목 간 비교는 SAS package를 이용한 t-test로 평균간 유의성 검정을 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 생존율

백색레그혼종 496수(방사:400수, 케이지사:96수) 및 한국재래닭 585수(방사:400수, 케이지사:185수)를 공시하고 16주령부터 64주령까지 생존율을 조사하였다. 사육 결과 백색레그혼종, 한국재래닭 모두 사육형태에 따른 생존율의 차이를 나타내었고, 두 품종 공히 방사 사육군이 케이지 사육군에 비해 높은 생존율을 보였다 (Table 2-2). 본 결과에서 케이지 사육 개체들이 방사 사육 개체들에 비해 월등히 높은 폐사율을 나타내고 있는데 이는 닭의 케이지 사육형태가 개체들에게 생리적으로 매우 큰 스트레스 요인으로 작용하는 것을 의미한다.

Table 2-2. Viability of White Leghorns and Korean Native Chickens raised on floor and cage types

Housing types	White Leghorn	Korean Native Chicken
Floor	90.33±3.14 <sup>a</sup>	92.34±2.50 <sup>a</sup>
Cage	72.34±13.57 <sup>b</sup>	81.82±10.94 <sup>b</sup>
p values	<0.0001	<0.0001

(2) 산란능력

(가) 초산일령

백색레그혼종 암컷 397수 및 한국재래닭 암컷 416수에 대한 계사 사육형태별 초산일령을 조사하였다. 분석 결과 두 품종 모두 사육형태에 따른 초산일령의 차이를 보였는데 공히 케이지 사육군이 방사 사육군에 비해 9-15일정도 빠른 초산일령을 나타내었다 (Table 2-3). 이는 케이지 사육 개체들은 인공 점등 상태로 사육하였고, 방사군의 경우 자연일조 상태로 사육한데 영향이 있는 것으로 생각된다. 즉, 방사 사육군의 경우 초산의 시기가 7월 중순임을 감안 할 때 일조량의 점감기가 초산을 지연시킨 주된 원인으로 사료된다. 따라서 방사 사육의 경우 부화계절에 따른 요인으로 일장시간이 초산일령에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 사료되어 방

사 사육과 케이지 사육이 초산일령에 미치는 영향을 밝히기에는 다소 애매함이 있는 것으로 여겨진다.

Table 2-3. Age at first egg of White Leghorns and Korean Native Chickens raised on floor and cage types

Housing types	White Leghorn	Korean Native Chicken
Floor	149.50±1.73 <sup>a</sup>	174.25±4.19 <sup>a</sup>
Cage	140.75±0.96 <sup>b</sup>	158.67±10.05 <sup>b</sup>
p values	0.0001	0.0001

(나) 일계산란율 및 산란지수

백색레그혼종 496수(방사:400수, 케이지사:96수)와 한국재래닭 585수(방사:400수, 케이지사:185수)에 대하여 초산시부터 64주령까지 일계산란율(hen-day egg production) 및 산란지수(hen-housed egg production)를 조사하였다. 각 품종별 산란 곡선은 Fig. 2-1 및 2-2와 같다. 백색레그혼종 및 재래닭 공히 방사군에 비해 케이지 사육 개체들의 산란율이 낮은 것으로 나타났다. 레그혼 종의 경우 방사군은 산란 peak가 40주령이 되어 도달하고 약 73%의 peak 산란율을 보인 후 급격한 산란 감소를 보인 반면, 케이지군은 33주령시 약 40%의 peak 산란율을 보이고 지속적 감소를 보였다. 한국재래닭 방사군의 경우는 레그혼보다 더욱 늦은 50주령 이후에서야 52%정도의 peak 산란율을 보이고, 케이지군은 40주령쯤 40%의 peak 산란율을 나타내었다. 이들 모두 일반 실용산란계에 비해 산란 peak가 늦게 도달하였고, peak 산란 주기가 짧게 나타났으며 산란율 또한 매우 저조한 것으로 보인다. 이는 본 시험에 공시한 공시계종이 모두 순계(pure inbred line)로서 잡종강세를 극대화 한 일반 실용산란계와는 생산능력에서 많은 차이가 날 수 밖에 없다. 한편, 일계산란율 및 산란지수 모두 백색레그혼종은 방사군이 케이지 사육군에 비해 높은 결과를 나타내었으나 (Table 2-4), 한국재래닭은 사육 형태 간 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 2-5). 이와 같은 결과는 백색레그혼종의 경우 유전적으로 산란계종임에 따라 산란율에 미치는 환경적 요인이 크게 작용하는 반면, 한국재래닭은 육용 혹은 겸용종으로서 산란보다는 체중 등에 더욱 크게 영향하기 때문인 것으로 사료된다. 이상의 결과로부터 닭의 사육 형태, 즉 방사 및 케이지 사육형태가 닭의 산란능력에 유의한 영향을 미치는 것으로 사료되고, 산란계의 경우 방사 사육군이 케이지 사육군에 비해 훨씬 높은 산란능력을 보인다. 따라서 산란계에 있어 케이지 사육형태가 개체의 산란능력에 직접적인 스트레스 요인으로 작용한다는 것을 시사한다.



Table 2-4. Egg production of White Leghorns raised on floor and cage types (20~64wks)

Housing types	Hen-day egg production (%)	Hen-housed egg production (eggs)
Floor	60.29±10.44 <sup>a</sup>	177.95±12.97 <sup>a</sup>
Cage	31.83±4.03 <sup>b</sup>	101.85±9.69 <sup>b</sup>
p values	0.006	0.002

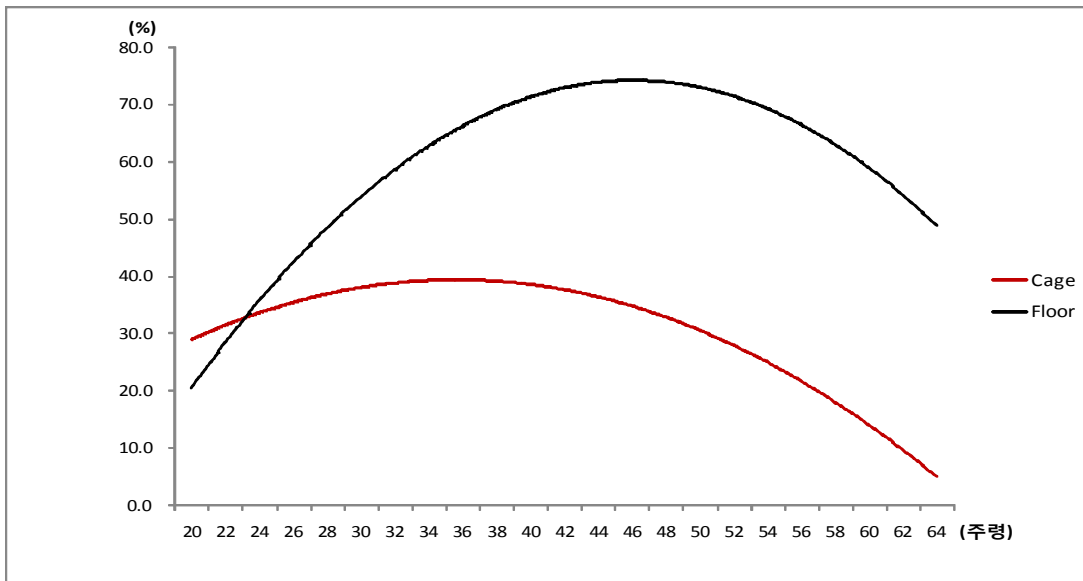


Fig. 2-1. Egg production curve of White Leghorns raised on floor and cage types

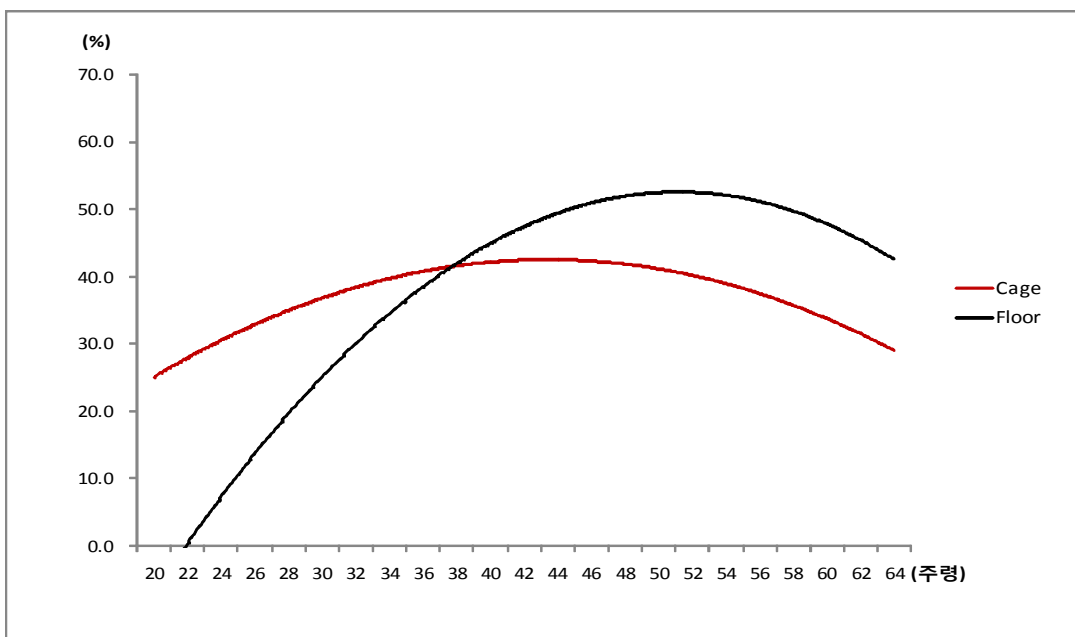


Fig. 2-2. Egg production curve of Korean Native Chickens raised on floor and cage types

Table 2-5. Egg production of Korean Native Chickens raised on floor and cage types (20~64wks)

Housing types	Hen-day egg production (%)	Hen-housed egg production (eggs)
Floor	38.10±4.14	112.92±25.55
Cage	39.24±9.36	97.59±12.08
p values	0.82	0.27

(다) 난질

방사 사육 및 케이지 사육으로부터 생산된 계란의 난질을 비교 분석하고 자 40주령 백색레그혼종이 산란한 각 100개의 계란을 분석 하였다. 분석 결과 난중을 포함한 모든 난질 지표에 사육 형태 간 유의한 차이를 나타내었다 (Table 2-6). 난중을 포함한 난각색, 난황색과 같은 외부 난질의 경우 방사 계군으로부터 생산된 계란이 케이지 사육군으로부터 생산된 계란에 비해 훨씬 양호한 결과를 보인 반면, 난백고, 하우유니트와 같은 내부 난질 및 난각두께, 난각무게, 난각밀도와 같은 난각질에서는 케이지 사육군이 방사 사육군에 비해 월등히 나은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 산란능력과 연관된 난중이나 사료이용성과 결부된 난각색 및 난황색 등은 방사 사육 계란이 우수하였고, 산란된 계란의 관리요인에 의해 주로 영향을 받는 내부 난질이나 난각질의 경우 케이지 사육군의 계란이 보다 나은 양상을 보였다. 따라서 방사군의 경우 개체의 생리활성도에 기인하여 외부 난질이 우수한 것으로 사료되며, 케이지 사육의 경우 생산된 계란들이 보다 위생적이고 빠른 관리 요인에 의해 내부 난질이 우수한 것으로 생각된다.

Table 2-6. Egg quality of laying eggs at 40 weeks White Leghorns raised on floor and cage types

	egg shell color	egg weight	albumin height	Haugh Unit	york color	egg shell thickness	egg shell weight	egg shell density
Floor	77.46±2.66 <sup>a</sup>	66.26±4.26 <sup>a</sup>	7.50±1.53 <sup>b</sup>	83.79±9.50 <sup>b</sup>	7.95±0.67 <sup>a</sup>	0.014±0.001 <sup>b</sup>	5.27±0.84 <sup>b</sup>	68.99±10.47 <sup>b</sup>
Cage	75.68±2.96 <sup>b</sup>	63.67±4.96 <sup>b</sup>	7.93±1.46 <sup>a</sup>	87.26±8.44 <sup>a</sup>	7.53±0.74 <sup>b</sup>	0.015±0.001 <sup>a</sup>	5.61±0.86 <sup>a</sup>	75.29±10.44 <sup>a</sup>
P	<0.0001	0.0001	0.04	0.007	<0.0001	0.0002	0.006	<0.0001

\* Each number of analyzed eggs was 100

(라) 체중

60주령 백색레그혼종 및 한국재래닭 암수 각 40수에 대한 방사 사육 개체와 케이지사 사육 개체에 대한 개체별 체중을 측정하였다 (Table 2-7, 2-8). 분석 결과 백색레그혼종의 경우 암수 모두 방사 사육 개체들이 케이지 사육 개체들에 비해 훨씬 높은 체중을 보였고, 한국재래닭의 경우는 암컷만 방사 개체들이 케이지 사육 개체들에 비해 높은 체중을 나타내었다. 또한 두 품종 암수 공히 케이지 사육 개체들의 체중의 변이도가 평사에 비해 큼을 알 수 있었다. 이 같은

결과들은 사육 형태가 체중과 같은 생산 능력에 직접적으로 영향을 미치는 환경 요인임을 시사하는 것으로 케이지 사육과 같은 외부 환경 요인이 개체들에게 직접적 스트레스로 작용하여 성장률의 둔화를 야기 시킨 것으로 사료된다.

Table 2-7. Body weight at 60 weeks White Leghorns raised on floor and cage types

Housing types	♂ (n=40)	♀ (n=40)
Floor	2293.90±146.00g	1552.61±133.84g
Cage	1804.50±446.69g	1182.47±109.87g
p values	<0.0001	<0.0001

Table 2-8. Body weight at 60 weeks Korean Native Chickens raised on floor and cage types

Housing types	♂ (n=40)	♀ (n=40)
Floor	2230.68±255.45g	1598.40±134.76g
Cage	2123.05±339.89g	1245.60±181.59g
p values	0.415	<0.0001

## 2. 계사사육형태에 따른 스트레스 관련 유전자 및 단백질 발현분석

### 가. 서론

염색체의 양 말단부를 지칭하는 텔로미어(telomere)는 세포 분열이 거듭됨에 따라 길이가 짧아지는데 이러한 텔로미어의 감축 양상이 노화의 지표뿐만 아니라 개체의 생리적 표지로 알려지고 있다 (Meeker와 Coffey, 1997; Ulaner와 Giudice, 1997; Cottliar와 Slavutsky, 2001). 텔로미어의 감소가 세포의 노화에 따라 나타나는 것이기는 하나, 이의 감축 정도가 제반 환경적 요인에 의해서 많은 영향을 받는 것으로 나타난다. 이러한 환경 요인들 중 특히 산화적 스트레스가 텔로미어 유실을 가속화 시킨다고 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 레그혼종과 한국재래닭에 대하여 케이지 사육과 방사 사육간의 스트레스 정도를 비교하기 위하여 조직 내 세포들의 텔로미어 함량을 분석하였다. 한편으로 스트레스 요인이 세포의 apoptosis를 촉진함에 따라 DNA fragmentation의 정도가 다르다는 지난 연차의 결과에 따라 스트레스 마커로서 세포내 DNA 손상율 정도를 측정하는 Comet assay를 본 시험에 적용코자 하였다. 즉, 본 실험에서는 케이지 사육과 방사 사육간의 개체간 DNA 손상율을 comet assay를 이용하여 비교 분석함으로써 스트레스 정도를 살펴보고자 하였다. 또한 본 사육 조건하에서 스트레스 관련 단백질로 널리 알려진 cortisol의 전구물질로서 콜레스테롤 생합성 제한효소인 3-hydroxyl-3-methyl-glutayl coenzyme A reductase (HMGCR)의 발현 양상을 분석함으로써 스트레스 정도를 비교하고자 하였다.

## 나. 재료 및 방법

### (1) 공시계

본 시험에 공시된 닭은 단관백색레그혼종 및 한국재래닭으로 케이지 사육 및 방사 사육 형태로 사육 조건 및 사양 방법은 전술한 바와 같다.

### (2) 텔로미어 함량분석을 위한 조직 표본 제작

텔로미어의 함량 분석은 혈액, 간, 심장, 신장, 비장, 정소 및 난소 조직을 대상으로 하였으며, 40주령 및 60주령에 채혈 및 도살 후 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. 혈액세포 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) 양적형광접합법에 의한 telomeric DNA 함량 분석

Chicken telomeric DNA probe를 이용하여 다음과 같이 간기 핵 양적형광접합법 (quantitative fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei ; IQ-FISH)을 수행하였다. 슬라이드 표본을 RNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 에탄올로 탈수 건조시켰다. 이후 Hybridization 용액 (13μl formamide, 5 μl hybridization buffer, 2μl(100ng/μl) chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨린 후 밀봉하고 85℃에서 5분간 변성(denaturation)시킨 후 38.5℃에서 12시간이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2× SSC로서 72℃에서 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℃에서 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 적녹 파장대의 필터 (WIB filter)를 부착한 형광 현미경 (Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 처리된 슬라이드를 형광현미경으로 관찰한 후 평균 5개의 간기 핵을 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) Comet assay

1% agarose gel에 슬라이드를 담근 후 이를 제거하고 건조시켰다. 10 $\mu$ l 혈액을 75 $\mu$ l 0.5%LMPA(low melting point agarose made in Dulbecco's buffered saline)에 혼합하여 슬라이드 위에 떨어뜨리고 커버슬라이드로 덮은 후 냉장 상태로 굳혔다. 굳은 상태에서 커버슬라이드를 제거하고 80 $\mu$ l 1%LMPA를 도포하여 굳힌 후 4 $^{\circ}$ C lysis solution에 60분간 침지하였다. Lysis solution을 제거 후 조심스럽게 전기영동장치에 거치 후 electrophoresis buffer(pH>13)를 채웠다. 10분정도 침지후 25V, 300mA로 30분간 전기영동하고 건조 후 중성 buffer에 5분간 정지한다. 건조된 슬라이드는 80 $\mu$ l propidium iodide(0.4 $\mu$ g/ml)로 5분간 염색하고 냉장 초자수로 수세후 형광현미경(AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 관측된 상은 디지털카메라로 촬영하고 Comet Score software v1.5(TriTek Corp. Sumerduck, VA, USA)로 분석하였다. 분석항목으로는 1) % DNA in tail로 전체 Comet intensity 대비 tail intensity의 비율, 2) Tail Moment로서 tail내 DNA생성률(%) 및 3) Olive Moment (tail intensity $\times$ head까지의 상대적거리/total Comet intensity)를 조사하였다.

#### (5) HMGCRC 단백질 발현량 분석

##### (가) 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 $^{\circ}$ C, 15분간 원심분리한 후 상층액에 isopropanol 0.5ml을 첨가하고 10분간 실온에서 반응시킨 후 상층액을 제거하고 RNA 펠렛을 회수하였다.

##### (나) RT에 의한 cDNA 합성

reverse transcription system(promega)을 이용하였으며 primer는 oligo(dT)를 이용하였다. 반응조성은 RNA 1.5 $\mu$ g, buffer 4 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub>(25mM) 3 $\mu$ l, dNTP(2.5mM) 1 $\mu$ l, reverse transcriptase 1 $\mu$ l, primer 0.5 $\mu$ l이며 total volume은 DEPC로 20 $\mu$ l로 맞추었다. 이들 반응물은 25 $^{\circ}$ C에서 5분간 접합과정과 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 확장과정을 통하여 cDNA를 합성하였으며 이후 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 열처리를 하여 역전사 효소를 불활성화 시켰다. 생성된 cDNA는 다음 단계의 실험을 위하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

##### (다) real-time PCR

RT PCR을 위한 HMGCRC primer의 제작은 Table 2-9와 같다. PCR condition은 cDNA 1 $\mu$ l, primer(5pmole)는 각각 0.5 $\mu$ l, SYBR Green 10 $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 8 $\mu$ 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 SYBR이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다.

#### (6) 통계분석

닭의 처리별 조직내 세포간 telomeric DNA 함량, DNA fragmentation 정도 및 HMGCRC 발현량을 비교분석하기 위하여 SAS 통계 패키지 (SAS, 2000)를 이용하여 t-test로 처리 평균간 비교분석하였다.

Table 2-9. Primers used for semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	size	Tm(°C)
HMGCR	Forward	ATGCATGGCCTTTTTGTGGCCTCTCATCCA	270bp	55
	Reverse	CTTGAGAAGATTGTGAGGAGACCAGCAATA		
Beta-actin	Forward	AGGACATCTCCGTGGAAGAGA	520bp	55
	Reverse	TCCTGTAGAGGCACCTTCTCT		

다. 결과 및 고찰

(1) 사육형태에 따른 텔로미어 함량 비교 분석

단관백색레그혼종을 대상으로 케이지 사육 및 방사 사육 형태가 개체의 스트레스 감응도에 미치는 영향을 텔로미어 함량으로 비교 분석하였다. 16주령 이후 사육형태를 달리하고 40주령 때 각 사육형태별 20수씩 도살하여 혈액, 간, 심장, 신장, 비장, 정소 및 난소 조직을 채취하여 이들 세포들의 텔로미어의 함유율을 분석하였고, 60주령 때는 혈액 세포만을 대상으로 분석하였다.

각 조직들의 텔로미어 함량은 간기 핵 양적형광접합법 (IQ-FISH)을 이용하여 개체별 100개 이상의 세포에 대해 분석하였다. 분석 결과, 혈액 내 백혈구 세포의 텔로미어 함유율은 16주령 시험 개시시 평균 2.58%로서 연령이 증가함에 따라 두 사육 형태 공히 텔로미어 함유율이 감소함을 보였다. 그러나 혈액 세포의 경우 케이지 사육구 개체들의 텔로미어 함량이 방사사육구에 비해 훨씬 높은 감소율을 보이고, 연령이 증가함에 따라 이의 차이는 더욱 커지는 것으로 나타났다 (Table 2-10). 한편 40주령 개체들의 간, 심장, 신장, 비장, 정소 및 난소 조직의 텔로미어 함유율은 사육형태에 따라 신장과 비장을 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 2-11). 이러한 결과들로 부터 백혈구 세포들의 텔로미어 함유량은 다른 조직과 달리 스트레스에 매우 민감하게 작용하는 것으로 나타나 사육 형태와 같은 스트레스 요인에 큰 영향을 받는 것으로 보여진다. 즉 백혈구 세포들은 면역과 밀접한 관련이 있는 것으로 스트레스와 같은 외적 요인에 보다 민감하게 반응하기 때문인 것으로 사료된다. 또한 증식성 세포인 신장의 경우와 면역 물질 분비기관인 비장의 경우 혈액세포와 마찬가지로 사육형태에 따라 텔로미어 함량의 차이를 보임으로서 환경적 스트레스가 텔로미어의 함량에 직접적 영향을 미치는 요인임을 알 수 있었다.

Table 2-10. The relative amount of telomeric DNA of lymphocytes in White Leghorns raised on cage and floor types

Housing types	Relative amount of telomeric DNA of lymphocytes at	
	40 weeks	60 weeks
Cage	1.65±0.17 <sup>b</sup> (n=20)	1.36±0.22 <sup>b</sup> (n=23)
Floor	1.76±0.14 <sup>a</sup> (n=20)	1.52±0.19 <sup>a</sup> (n=38)
p value	0.02	<0.01

Table 2-11. The relative amount of telomeric DNA of tissues at 40 weeks White Leghorns raised on cage and floor types

Housing type	Relative amount of Telomeric DNA(%)					
	liver	heart	kidney	spleen	testis	ovary
Cage	1.56±0.21 (n=16)	1.46±0.20 (n=16)	1.59±0.18 <sup>b</sup> (n=13)	1.51±0.13 <sup>b</sup> (n=14)	2.10±0.19 (n=7)	2.01±0.15 (n=10)
Floor	1.66±0.20 (n=18)	1.50±0.22 (n=12)	1.73±0.13 <sup>a</sup> (n=14)	1.63±0.14 <sup>a</sup> (n=15)	2.07±0.15 (n=9)	2.02±0.16 (n=8)
p values	0.16	0.64	0.02	0.03	0.57	0.82

(2) 사육형태에 따른 DNA 손상을 비교 분석

본 연구에서는 40주령 및 60주령 레그혼종 산란계를 대상으로 케이지 사육 개체군과 방사 사육군 간의 DNA 손상을 comet assay 방법으로 분석하고, 이들 간의 차이를 검토하여 사육형태가 개체의 스트레스 요인으로 작용하는 가를 살펴보았다.

Fig. 2-3은 세포들의 DNA 손상을 comet assay로 분석한 대표적 양상이다. 그림에서 나타난 바와 같이 DNA fragmentation의 정도가 (a), (b)가 현저히 다를 수 있음은 육안으로서도 식별이 가능한데, 파손된 DNA율(% DNA in tail)이 (a)의 경우 34%정도이고, (b)는 20%정도이다. 사육형태 별 comet score는 전체 대비 tail intensity의 비율(% DNA in tail), tail내 DNA생성률(Tail Moment) 및 tail intensity×head까지의 상대적거리/total Comet intensity(Olive Moment)로 분석하였다. 분석 결과 모든 항목에서 연령이 증가함에 따라 분석 값이 높아지는 것으로 나타나 텔로미어 함유율과 같이 연령에 따라 DNA 손상이 높아지는 것으로 생각된다. 그럼으로 텔로미어 함유율과 % DNA in tail간에는 -0.24정도의 부(負)의 상관관계가 존재하는 것으로 분석되었다. 한편, 케이지사 사육 개체들이 방사 사육 개체들에 비해 대부분의 분석 값에서 높은 DNA 손상을 나타내고 있으며, 40주령에 비해 60주령에서 이러한 차이가 보다 현격하게 나타남으로 연령이 증가함에 따라 스트레스의 민감도가 더욱 증가하는 것을 보였다 (Table 2-12, Table 2-13). 이상의 결과들은 케이지사 사육 개체들이 방사 사육 개체들에 비해 세포의 apoptosis가 현저히 높다는 것을 의미하는 것으로 닭의 사육 형태가 개체들에게 중요한 스트레스 요인임을 시사한다.

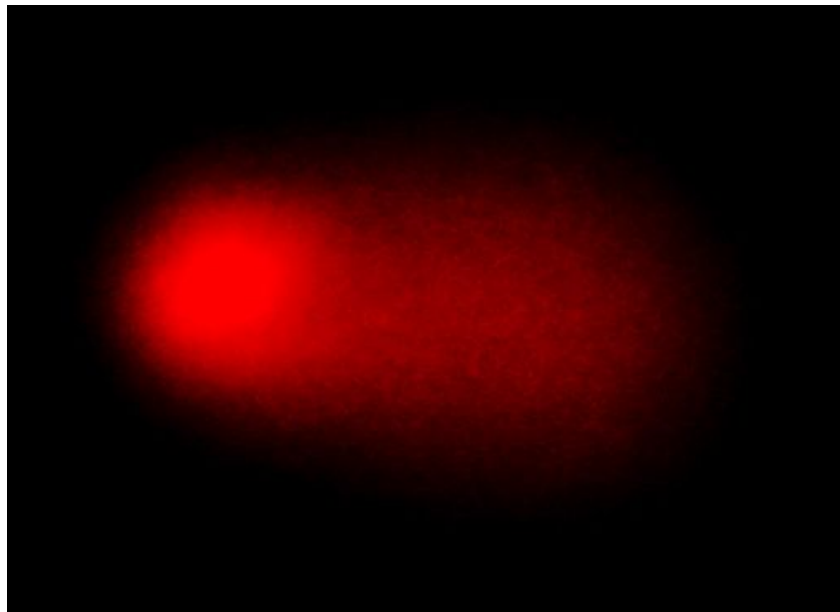
Table 2-12. The rates of DNA fragmentation of lymphocytes at 40 weeks White Leghorns raised on cage and floor types by comet assay

Housing types	No of chickens	%DNA in tail	tail moment	olive moment
Cage	20	24.94±5.70 <sup>a</sup>	16.32±8.82	21.66±8.66
Floor	18	21.20±4.39 <sup>b</sup>	12.83±6.63	18.17±6.21
p values		0.03	0.19	0.17

Table 2-13. The rates of DNA fragmentation of lymphocytes at 60 weeks White Leghorns raised on cage and floor types by comet assay

Housing types	No of chickens	%DNA in tail	tail moment	olive moment
Cage	22	33.15±6.84 <sup>a</sup>	53.58±9.91 <sup>a</sup>	42.52±12.29 <sup>a</sup>
Floor	36	30.64±5.73 <sup>b</sup>	42.81±26.78 <sup>b</sup>	39.71±8.84 <sup>b</sup>
p values		0.03	<0.001	0.006

(a)



(b)

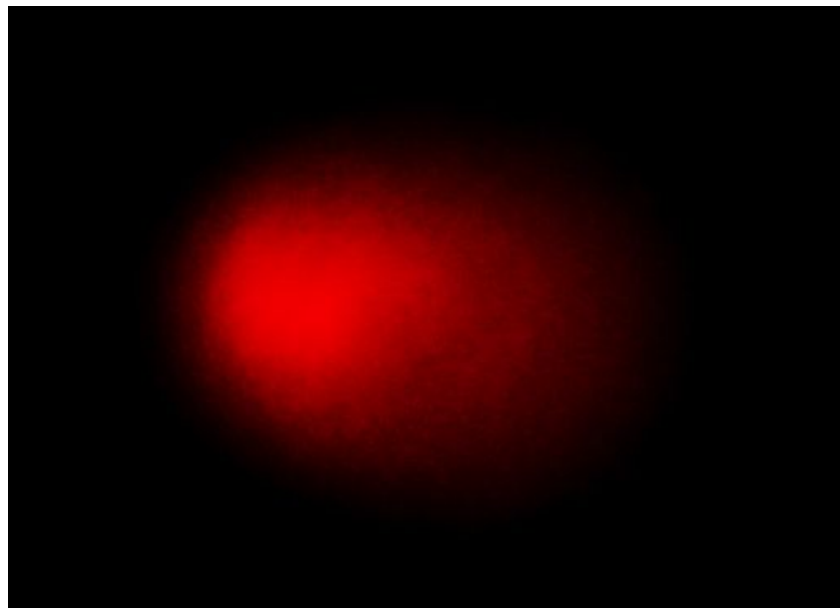


Fig. 2-3. Representative patterns of lymphocyte treated by comet assay in White Leghorns; (a) 34.1% DNA in tail and (b) 20.2% DNA in tail



(3) 사육형태에 따른 HMGCR 발현량 비교 분석

본 연구에서는 스트레스 마커로 가장 일반적으로 조사되는 호르몬인 cortisol의 전구물질로서 콜레스테롤의 생합성 제한효소인 3-hydroxyl-3-methyl-glutayl coenzyme A reductase (HMGCR)의 발현 양상을 케이지사 사육 개체와 방사 사육 개체 간에 비교 분석하였다. 지난 연차의 스트레스 관련 유전자 탐색에 관한 연구에서 닭 사육밀도 및 제한급이에 따라 heat shock protein 유전자(HSP70, HSP90) 및 HMGCR유전자의 발현량을 분석한 결과 특정 유전자에 있어 부분적 발현량의 차이가 있는 것으로 나타났다. 스트레스군과 대조군에 대한 HMGCR, HSP70, HSP90의 발현은 간 조직에서 HMGCR의 발현을 제외하고는 모든 처리 간에 차이가 없는 것으로 나타났으나 HMGCR의 경우 스트레스군이 대조군에 비해 2배 이상의 발현율을 보여 스트레스 예측 표지 유전자로서의 가능성을 나타내었다. 따라서 본 연차에서는 HMGCR만을 대상으로 사육 형태에 따른 발현 양상을 비교 하였다. 40주령 White Leghorn을 대상으로 케이지 사육과 방사 사육 개체간의 혈액 및 간 조직에서 HMGCR의 발현량을 분석한 결과 혈액에서만 방사사육 개체군이 케이지 사육 개체군에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다 (Table 2-14). 이러한 결과는 지난 연차에서 분석된 결과와 매우 상이한 형태로 이의 발현량을 스트레스 마커로 인증할시 방사 사육군이 케이지 사육군에 비해 더욱 높은 스트레스 환경이라는 결론이다. 이는 상기 생산능력의 결과와 텔로미어 함량 및 DNA 손상율의 비교 분석 결과들과는 매우 상반된 결과이다. 따라서 이러한 결과는 HMGCR 발현량 분석에 다소의 문제가 있었거나, 표본 추출의 편이(bias)로 사료된다. 그러나 본 분석 결과가 정상적인 값이라면 HMGCR 발현량을 닭 스트레스 마커로 보기에 는 다소의 문제가 있는 것으로 판단된다.

Table 2-14. The mRNA expression levels of HMGCR in blood and liver at 40 weeks White Leghorn chickens raised on cage and floor types

Housing types	Blood	Liver
Cage	1.98±0.93 <sup>b</sup>	1.34±0.56
Floor	3.53±1.68 <sup>a</sup>	1.50±0.35
p value	<0.001	0.3519

3. 산란계의 사양방식에 따른 사양 및 혈액학적 지표 분석

가. 재료 및 방법

(1) 공시동물 및 시험설계

본 시험에 공시된 시험동물은 White Leghorn 산란계종으로 케이지 사육 및 방사 사육 형태로 사육하고, 이들의 사육 조건 및 사양 방법과 시험설계는 전술한 바와 같다.

(2) 분석 항목

(가) 체중 및 장기무게 측정

40주령 및 60주령별로 시험 개시 및 시험 종료에 일정한 시간에 체중을 측정하였다. 사양시험 종료 후 각 처리별로 8수를 선발하여 부검을 실시하고 획득한 간, 비장, 흉선 및 F-낭 등을 생체중 100g 당 상대적인 중량으로 환산하여 장기무게를 조사하였다.

(나) 혈액 생화학적 성분, 백혈구 감별계수 및 corticosterone 분석

혈장 AST, ALT, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 분석은 자동생화학분석기 (IDEXX-vet test, USA)를 사용하여 실시하였다. 백혈구 감별계수 (%)는 자동 혈구분석기 (Hemavet 500, Dasct.)를 이용하여 분석하였다. 분석내용은 총 백혈구 수 (WBC), 이형구 (Heterophil), 림프구 (Lymphocyte), 단핵구 (Monocyte), 호염기구(Eosinophil), 호산성구 (Basophil), Heterophil : Lymphocyte (H:L) 비율을 측정하였다. 혈장에서 스트레스호르몬인 corticosterone 수준은 corticosterone EIA kit (Catalog No ADI-901-097, Enzo Life Science, USA)을 이용하여 사용자 지침에 따라 ELISA reader 로서 405nm에서 분석하였다.

(3) 통계처리

사육방식에 따라 측정한 지표의 결과는 Proc-GLM(SAS, 1996)에 의해 분산분석을 실시하고 처리간 비교는 t-test 방법에 의해 P<0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 닭의 사육방식이 체중 및 면역장기 무게에 미치는 영향

사육방식 (케이지 사육 및 방사사육)에 따른 40주령 및 60주령 산란계의 사양성적 및 상대적 장기무게에 대한 결과는 Table 2-15 및 2-16에 나타난 바와 같다. 40주령에서 살펴보면 방사 사육방식은 케이지 형태의 사육방법에 비해 약 323g 정도의 체중이 증가되어 유의적으로 (P<0.05) 높게 나타났다. 그러나 체중 100g당 상대적 간, 비장 및 F-낭의 무게는 사육형태에 따라 영향을 받지 않았으나, 흉선의 상대적 무게는 케이지사육군 (Cage)에서 현저히 (P<0.05) 증가되었다.

Table 2-15. Effect of housing system (cage vs floor) on body weight and relative organ weight in sacrificed White Leghorn aged 40 wks

Item	Treatment		P
	Cage	Floor	
Body weight, g	1433.9 ± 78.9	1757.5 ± 33.85*	0.01
Liver, g/100g BW	2.91 ± 0.14	2.67 ± 0.16	0.29
Spleen, g/100g BW	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.004	0.36
Thymus, g/100g BW	0.04 ± 0.005	0.01 ± 0.002*	0.01
Bursa of Fabricius, g/100g BW	0.02 ± 0.004	0.03 ± 0.01	0.38

Values(mean±SE).

Table 2-16. Effect of housing system (cage vs floor) on body weight and relative organ weight in sacrificed White Leghorn aged 60 wks (mean±SE)

Item	Treatment		P
	Cage	Floor	
Body weight, g	1195.2 ± 43.68	1483.2 ± 68.66*	0.01
Liver, g/100g BW	1.48 ± 0.05	2.86 ± 0.13*	0.01
Thymus, g/100g BW	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.78

60주령의 산란계에서 관찰된 결과를 살펴보면 체중 역시 케이지사육군에 비해 방사사육군에서 288g 정도 유의적 ( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다. 간 무게는 방사사육군 (Floor)에서 높게 나타났으며 ( $P<0.05$ ), 흥선의 무게는 차이가 없었다.

(2) 혈액 생화학 성분, 백혈구 정상 및 corticosterone 분석

40주령 산란계에서 사육방식에 따른 혈장 생화학성분을 살펴보면 (Table 2-17) 먼저 혈중 ALT 및 cholesterol 수준은 케이지사육군에서 현저히 ( $P<0.05$ ) 증가되었다. 그러나 AST, glucose, triglyceride 및 total protein 등 다른 생화학 성분은 사육방식에 따른 차이가 없는 것으로 나타났다.

60주령 산란계에서 사육방식에 따른 혈장의 생화학성분을 살펴보면 (Table 2-18) 혈중 glucose 및 triglyceride 수준은 케이지사육군에 비해 방사사육군에서 현저히 증가되었다 ( $P<0.05$ ). 간 독성지표인 ALT 수준은 케이지사육군에서 현저히 증가되었다 ( $P<0.05$ ).

Table 2-17. Effect of housing system (cage vs floor) on the biochemical composition of plasma in White Leghorn aged 40 wks

Item	Treatment			P
	Cage		Floor	
ALT (IU/ $\mu$ l)	31.88	$\pm$ 3.10*	21.00 $\pm$ 1.86	0.01
AST (IU/ $\mu$ l)	153.75	$\pm$ 6.30	155.88 $\pm$ 6.42	0.82
Cholesterol (g/dl)	132.88	$\pm$ 18.93*	78.25 $\pm$ 9.42	0.02
Glucose (mg/dl)	281.38	$\pm$ 6.67	262.25 $\pm$ 10.62	0.15
Triglyceride (mg/dl)	1327.80	$\pm$ 274.5	1257.6 $\pm$ 289.0	0.86
Total protein (g/dl)	5.46	$\pm$ 0.08	5.48 $\pm$ 0.12	0.93

Values (Mean  $\pm$  SE).

Table 2-18. Effect of housing system (cage vs floor) on the biochemical composition of plasma in White Leghorn aged 60 wks

Item	Treatment			P
	Cage		Floor	
ALT (IU/ $\mu$ l)	36.00	$\pm$ 2.99*	22.00 $\pm$ 3.04	0.01
AST (IU/ $\mu$ l)	167.38	$\pm$ 7.16	158.25 $\pm$ 6.86	0.37
Cholesterol (g/dl)	98.25	$\pm$ 4.22	111.88 $\pm$ 6.93	0.12
Glucose (mg/dl)	236.38	$\pm$ 1.65	260.75 $\pm$ 2.56*	0.01
Triglyceride (mg/dl)	1089.63	$\pm$ 51.21	2044.75 $\pm$ 186.60*	0.01
Total protein (g/dl)	5.74	$\pm$ 0.11	5.64 $\pm$ 0.15	0.61

Values (Mean  $\pm$  SE).

사육방식에 따른 산란계의 혈액 백혈구 구성 비율에 대한 결과 (Table 2-19)를 살펴보면 혈액의 백혈구 조성 감별계수에서 림프구, 단핵구, 이형구 등의 상대적 %는 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 Heterophil/lymphocyte (H:L) 비율에서도 사육방식에 따른 유의적 차이가 없었다. 일반적으로 사육형태 및 사육밀도가 백혈구감별계수 및 H:L 비율을 현저하게 변화시키지는 않은 것으로 보고되고 있다 (Thaxton 등, 2006). Puvadolpirod와 Thaxon (2000)의 연구에 따르면, 정상 0.5 H:L 비율이 스트레스를 받을시 2.76 비율로 증가하였다고 보고한바 있어 본

시험에서는 0.36-0.40 비율로 정상적인 범위에 있었다. Turkyilmaz (2008)은 육계를 이용하여 0.04 m<sup>2</sup>/수, 0.05 m<sup>2</sup>/수, 0.067 m<sup>2</sup>/수의 사육밀도 조건하에서 스트레스 반응을 조사한 결과 H:L 비율, corticosterone, Newcastle disease (ND) 항체반응에서 차이가 없었다고 보고하였다. 한편, Shini (2003) 연구에 따르면 산란계를 battery cage, 변형 cage 및 방사 (intensive free-range system) 등 3종류의 사육방식에서 H:L 비율을 측정된 결과 방사 (intensive free-range system) 시설에서 사육된 닭에서 가장 낮은 H:L 비율을 보여 가장 낮은 스트레스 양상을 보였다고 보고하였다.

Table 2-19. Effect of housing system (cage vs floor) on the composition of WBC differential count in White Leghorn aged 60 wks

Item	Treatment		P
	Cage	Floor	
WBC (K/ $\mu$ l)	14.40 $\pm$ 4.03	16.61 $\pm$ 0.94*	0.01
Lymphocyte (%)	64.84 $\pm$ 1.57	67.57 $\pm$ 1.62	0.67
Monocyte (%)	4.32 $\pm$ 0.21	5.14 $\pm$ 0.32	0.62
Heterocyte (%)	22.37 $\pm$ 1.89	24.99 $\pm$ 1.92	0.62
Hetero/Lympho (H:L)	0.36 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.04	0.92
RBC (M/ $\mu$ l)	4.15 $\pm$ 0.09	3.99 $\pm$ 0.20	0.78
Hb (g/dl)	14.21 $\pm$ 0.64	13.40 $\pm$ 0.67	0.77

Values (Mean  $\pm$  SE).

40 및 60주령 산란계 혈액에서 스트레스 호르몬으로서 중요한 지표인 corticosterone 농도를 조사한 결과를 Table 2-20 및 2-21에 나타내었다. 본 시험 결과 스트레스 지표인 corticosterone 은 40주령에서 케이지사육군이 방사사육군에 비해 약 5.9배의 높은 수준을 보여 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았다. 60주령에서도 케이지사육군이 방사사육군보다 약 1.9배의 수준증가를 나타내었으나 유의적 차이는 없었다. 지금까지 많은 연구결과 스트레스 지표로서 혈중 corticosterone 수준은 가장 널리 알려진 바이오마커이다. 여러 가지 다양한 연구에서 corticosterone 농도를 측정하여 스트레스지표로서 분석하였으며, 또한 닭에게 스트레스를 유발시킬 경우 corticosterone 호르몬을 주입한다. 사육밀도 및 사육환경에 따라 여러 연구보고서에서 혈장의 corticosterone의 차이가 난다고 이미 널리 보고되고 있다 (Mashaly 등, 1984) 그러나 Turkyilmaz (2008)은 닭에서 사육면적당 (0.04 m<sup>2</sup>/수, 0.05 m<sup>2</sup>/수, 0.067 m<sup>2</sup>/수) 스트레스 반응을 조사한 결과 H:L 비율, corticosterone, Newcastle disease (ND) 항체반응에서 차이가 없었다고 보고하였다.

Table 2-20. Effect of housing system (cage vs floor) on plasma corticosterone level in White Leghorn aged 40 wks

Item	Treatment		P
	Cage	Floor	
Corticosterone	9.36 $\pm$ 3.37*	1.63 $\pm$ 0.39	0.038

Values (Mean $\pm$ SE).

Table 2-21. Effect of housing system (cage vs floor) on plasma corticosterone level in White Leghorn aged 60 wks

Item	Treatment		P
	Cage	Floor	
Corticosterone	11.58 ± 3.36	5.96 ± 1.79	0.166

Values (Mean±SE).

#### 4. 사육방식에 따른 면역유전자 발현양상 분석

##### 가. 재료 및 방법

##### (1) 공시동물 및 시험설계

본 시험에 공시된 공시계와 시험설계는 전술한 바와 같다.

##### (2) 분석 항목

(가) 면역 유전자(IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, iNOS, LITNF- $\alpha$ , TLRs4) mRNA 발현 분석

(나) 조직에서 RNA 분리

각 처리군 별로 선택한 공시동물의 조직으로부터 RNAsol™ kit (TEL-TEST, INC)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 조직을 RNAsol 용액에서 균질화한 후 chloroform을 혼합한 후 원심분리하고 2-propanol을 혼합하여 RNA를 침전시켜 분리하고 분리된 RNA를 이용하여 즉시 cDNA를 합성하였다.

Table 2-22. The primer sequence of genes

Item	Direction	Sequence(5' to 3')	Size(bp)	Accession No.
IL-1 $\beta$	Forward	GCT CTA CAT GTC GTG TGT GA	167	AJ245728
	Reverse	TGT CGA TGT CCC GCA TGA		
IL-4	Forward	AAC ATG CGT CAG CTC CTG AA	350	AJ621735
	Reverse	TCT GCT AGG AAC TTC TCC AT		
IL-6	Forward	GCT CGG AAC AAC CTC AAC CT	247	EU170468
	Reverse	CTG GGA TGA CCA CTT CAT CG		
IL-10	Forward	GCA GAC CAG CAC CAG TCA TC	185	XM425823
	Reverse	ACT CCC CCA TGG CTT TGT AG		
LITNF- $\alpha$	Forward	GAA CTA TCC TCA CCC CTA CC	223	AY765397
	Reverse	TGA CTC ATA GCA GAG ACG TG		
iNOS	Forward	GCA TCC AAA ATA TGA GTG GT	274	U34045
	Reverse	AAG CAC AGC CAC ATT TAT CT		
IFN- $\gamma$	Forward	TTC CTT CAT TTT CCT CTT GA	294	Y07922
	Reverse	ACT GGA AAA CAC AAG GTC AC		
TLRs4	Forward	AGT CTG AAA TTG CTG AGC TCA AAT	190	NM001030693
	Reverse	GCG ACG TTA AGC CAT GGA AG		
$\beta$ -actin	Forward	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA	540	NM001101
	Reverse	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GA		

(다) RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 조사

추출한 RNA를 이용하여 분광광도계에서 OD값을 측정하여 RNA를 10  $\mu$ g으로 정량한 후

oligo dT (Invitrogen) 1  $\mu\text{l}$ 와 dH<sub>2</sub>O를 넣어 최종 부피가 12  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하여 RT를 제조하였다. RT-product 2.5  $\mu\text{l}$ , MgCl<sub>2</sub> (Promega) 2.0  $\mu\text{l}$ , 2.5mM dNTP (Takara) 2.5  $\mu\text{l}$ , 10X PCR buffer (TaKaRa) 2.5 $\mu\text{l}$ , 10 pmol primer 2.5  $\mu\text{l}$ , Taq polymerase (TaKaRa) 0.2  $\mu\text{l}$ , DEPC H<sub>2</sub>O 10.3  $\mu\text{l}$ 을 넣어 최종부피를 25  $\mu\text{l}$ 로 맞춘다. PCR조건은 혈액에서 94°C에서 3분, [94°C에서 30초, 62°C~50°C에서 30초, 72°C에서 45초] × 32~35cycle, 72°C에서 10분, 4°C에서 ∞로 실시하였으며, 조직에서는 94°C에서 3분, [94°C에서 30초, 59°C에서 30초, 72°C에서 45초] × 40cycle, 72°C에서 10분, 4°C에서 ∞로 실시하였다. PCR산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 EasyDoc Gel documentation system (EasyDoc, Korea)을 이용하여 density를 측정하여  $\beta$ -actin 량에 대한 상대적 density를 계산하여 mRNA양을 확인하였다.

### (3) 통계처리

사육방식에 따른 시험분석 결과는 Proc-GLM (SAS, 1996)에 의해 분산분석을 실시하고 처리간 비교는 t-test 방법에 의해 P<0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 산란계에서 사육방식 (케이지 vs 방사)에 따른 면역 사이토카인 유전자 발현

40주령 및 60주령 산란계에서 사육방식 (케이지 vs 평사)에 따른 여러 면역 조직에서 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, LITNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , iNOS 및 TLRs4 등과 같은 사이토카인 발현에 대한 결과는 Table 2-23과 2-24에서 각각 제시된 바와 같다.

부화 육추 후 16주령부터 40주령까지 케이지 (Cage)에서 사육된 케이지군과 방사 (Floor)에서 사육된 산란계에서 간 조직에서 발현된 사이토카인 유전자 발현 양상을 살펴보면 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, iNOS, LITNF- $\alpha$ 의 발현은 두 군에서 차이가 없었지만, IL-10, IFN- $\gamma$  및 TLRs4 유전자 발현은 케이지군에서 현저히 (P<0.05) 증가되는 것으로 나타났다. 비장조직에서는 사육방식에 따라 조사한 대부분의 유전자 발현은 차이가 없었지만, IFN- $\gamma$ 는 케이지사육군에서 현저히 (P<0.05) 증가되었다. 흉선조직에서 IFN- $\gamma$  발현은 케이지군에서 증가되었고, TLRs4 유전자는 방사군에서 증가되는 (P<0.05) 것으로 나타났다. F-낭에서는 케이지사육군에서 IL-10과 iNOS 유전자의 발현이 증가되었으며 (P<0.05) 항염증사이토카인인 IL-4와 친염증사이토카인들인 L-1 $\beta$ , IL-6, LITNF- $\alpha$  및 TLRs4의 발현은 차이가 없었다.

60주령 산란계에서 사육방식에 따른 간 조직에서 발현된 사이토카인 유전자 발현 양상을 살펴보면, IL-6를 제외한 다른 IL 계열의 사이토카인은 차이가 없었지만, LITNF- $\alpha$ 와 iNOS 유전자는 방사군에서 증가되는 (P<0.05) 것으로 관찰되었다. 비장에서 사이토카인의 발현 양상을 살펴보면, IL-1 $\beta$ 은 케이지 사육시 현저히 증가되는 것으로 관찰되었으나, IL-4, IL-6, IL-10 및 TLRs4는 차이가 없었다. 그러나 간조직과 유사하게 LITNF- $\alpha$  및 iNOS 발현은 방사군에서 현저히 증가되는 (P<0.05) 것으로 나타났다. 흉선조직에서도 비장처럼 TNF- $\alpha$  및 iNOS 발현은 방사군에서 현저히 증가되는 (P<0.05) 것으로 나타났으며 친염증사이토카인인 IL-1 $\beta$ 발현이 케이지군에서 현저히 (P<0.05) 높았다.

동물체는 스트레스, 사육환경, 질병 등과 같은 외적환경과 체 조직에서 대사과정에서 발생하는 각종 내부환경에 대하여 체조직의 항상성을 유지하면서 질병을 방어한다. 질병방어에 중추적인 역할을 담당하는 면역계는 백혈구와 림프기관 (비장, 흉선 및 F-낭)에서 특이적·비특이

Table 2-23. Effect of housing system (cage vs floor) on the expression of cytokines in White Leghorn aged 40 wks

Item	Treatment		P
	Cage	Floor	
<b>Liver</b>			
IL-1 $\beta$	0.47 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.04	0.08
IL-4	0.43 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.04	0.51
IL-6	0.20 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.03	0.10
IL-10	0.34 $\pm$ 0.05*	0.18 $\pm$ 0.04	0.03
LITNF- $\alpha$	0.48 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.03	0.17
IFN- $\gamma$	0.55 $\pm$ 0.11*	0.17 $\pm$ 0.04	0.01
iNOS	0.45 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.03	0.86
TLRs4	0.38 $\pm$ 0.03*	0.23 $\pm$ 0.01	0.01
<b>Spleen</b>			
IL-1 $\beta$	0.34 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.03	0.14
IL-4	0.35 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.04	0.12
IL-6	0.27 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.04	0.48
IL-10	0.55 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.04	0.34
LITNF- $\alpha$	0.53 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.08	0.87
IFN- $\gamma$	0.84 $\pm$ 0.18*	0.18 $\pm$ 0.02	0.01
iNOS	0.44 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.05	0.34
TLRs4	0.65 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.09	0.06
<b>Thymus</b>			
IL-1 $\beta$	0.58 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.10	0.80
IL-4	0.57 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.07	0.81
IL-6	0.22 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.07	0.10
IL-10	0.52 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.11	0.11
LITNF- $\alpha$	0.67 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.06	0.24
IFN- $\gamma$	0.96 $\pm$ 0.18*	0.46 $\pm$ 0.16	0.05
iNOS	0.79 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.05	0.63
TLRs4	0.64 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.08*	0.01
<b>Bursa of Fabricius</b>			
IL-1 $\beta$	0.60 $\pm$ 0.09	0.72 $\pm$ 0.08	0.37
IL-4	0.75 $\pm$ 0.22	0.91 $\pm$ 0.08	0.46
IL-6	0.58 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.08	0.19
IL-10	0.72 $\pm$ 0.16*	0.17 $\pm$ 0.07	0.01
LITNF- $\alpha$	0.83 $\pm$ 0.10	0.58 $\pm$ 0.06	0.06
IFN- $\gamma$	0.65 $\pm$ 0.26	0.59 $\pm$ 0.09	0.83
iNOS	0.98 $\pm$ 0.10*	0.44 $\pm$ 0.05	0.01
TLRs4	0.69 $\pm$ 0.11	0.44 $\pm$ 0.04	0.06

(Mean  $\pm$  SE). The values were expressed as the intensity of genes relative to that of  $\beta$ -actin.

Table 2-24. Effect of housing system (cage vs floor) on the expression of cytokines in White Leghorn aged 60 wks

Item	Treatment		P
	Cage	Floor	
<b>Liver</b>			
IL-1 $\beta$	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03	0.77
IL-4	0.16 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.01	0.09
IL-6	0.13 $\pm$ 0.20*	0.07 $\pm$ 0.02	0.05
IL-10	0.49 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.21	0.43
LITNF- $\alpha$	0.16 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.03*	0.01
IFN- $\gamma$	0.09 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.04	0.16
TLRs4	0.32 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.04	0.25
iNOS	0.14 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.04*	0.01
<b>Spleen</b>			
IL-1 $\beta$	0.37 $\pm$ 0.03*	0.19 $\pm$ 0.03	0.01
IL-4	0.14 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.02	0.07
IL-6	0.08 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02	0.80
IL-10	0.23 $\pm$ 0.11	0.10 $\pm$ 0.04	0.30
LITNF- $\alpha$	0.07 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.06*	0.01
IFN- $\gamma$	0.16 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.03	0.77
TLRs4	0.43 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.10	0.49
iNOS	0.30 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.03*	0.03
<b>Thymus</b>			
IL-1 $\beta$	0.54 $\pm$ 0.04*	0.35 $\pm$ 0.04	0.01
IL-4	0.12 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.01	0.35
IL-6	0.15 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.05	0.32
IL-10	0.23 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.08	0.46
LITNF- $\alpha$	0.18 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.03*	0.02
IFN- $\gamma$	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.57
TLRs4	0.27 $\pm$ 0.02	0.69 $\pm$ 0.12*	0.01
iNOS	0.25 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.08*	0.01

(Mean  $\pm$  SE). The values were expressed as the intensity of genes relative to that of  $\beta$ -actin.

적 면역반응에 의하여 그 역할을 수행한다. 비특이적 면역 반응은 주로 염증반응이 발생되고 대식세포에 의해 식 작용이 발생되며 세포의 비특이적 면역반응은 항체와 T-세포 등의 적응성 반응을 유기시킨다. T-세포 역시 골수에서 생성되어 흉선에서 활성화되는 세포 매개성 면역으로 cytotoxic T-세포는 사이토카인을 생성하여 세포사 유발 및 대식세포를 유인하여 식 작용을 한다. CD4 또는 CD8로 알려진 Helper T-세포는 cytotoxic T-세포의 활성화를 작용하는데 CD4 세포는 Th1과 Th2 두개의 subclass로 분류된다. Th1은 대식세포를 활성화하여 병원체를 사멸



하고, 염증을 유발하며 항체를 생성하는데 주로 IL-2와 IFN- $\gamma$ 를 분비한다. Th-2은 IL-4, IL-10 등을 생성한다. 또한 친염증사이토카인 (pro-inflammatory cytokine) 유전자로서는 IL-6, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  등이 존재하며, 이들 유전자는 감염부위에 면역세포 작용을 활성화시킨다. 산화질소 (NO)는 세포조직의 신호 물질로서 역할을 하는 화학물질로서 적절한 수준은 면역계에 활성을 부여하는 특성을 지니고 있지만 감염이나 생체반응에 의해 과도하게 생성된 산화질소는 세포에서 세포 사멸을 유도한다. 따라서 NO의 이러한 특성에 따라 면역, 암발생에도 산화질소가 관여되는 것으로 알려져 있다. iNOS 효소는 산화질소를 생산하는 효소로서 iNOS가 억제되면 산화질소 생성이 차단된다. Toll-like receptors (TLRs) 유전자는 선천성 면역에서 중요한 역할을 수행하는 유전자로서 일반적으로 체내 병원성 미생물에 감염되었을때 발현이 증가된다.

본 연구에서는 산란계를 케이지 또는 방사 사육하여 사육방식이 체내 면역조직에서 발현되는 다양한 종류의 사이토카인 유전자 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 결과를 종합적으로 고찰하면 40주령의 산란계에서 케이지사육군 (Cage)은 방사사육군 (Floor)에 비해 간, 비장 등 여러 면역 조직에서 IL-10, IFN- $\gamma$  등과 같은 친염증계열의 사이토카인 발현이 전반적으로 증가되었다. 그러나 미생물 감염에 의해 주로 발현되는 TRLs4은 간 조직에서는 케이지사육군에서 흥선에서는 방사군에서 발현이 증가되어 장기 특이적 경향을 보이고 있어 이에 대해 연구의 재검토가 필요하다. 60주령의 산란계 역시 IL-6, IL-1 $\beta$ 의 유전자 발현이 케이지군에서 증가되어 40주령의 경우와 유사하다. 그러나 60주령 평사군의 간, 비장 및 흥선 등 대부분 장기에서 모두 LITNF- $\alpha$ 의 발현이 현저히 증가되고 흥선에서 TRLs4의 유전자 발현이 증가되는 것으로 관찰되었다. LPS에 의해 유도되는 LITNF- $\alpha$  및 미생물 감염에 따라 발현이 증가되는 TRLs4가 평사군에서 증가되는 사실로 미루어 보아 아마도 외부에서 장기간의 사육에 따른 감염에 의한 원인일 것으로 추론된다. 또한 60주령의 방사사육군에서 iNOS 및 TNF 계열의 유전자 발현이 증가된 것은 체내 지방대사와도 연관이 있는 듯하다. 실험동물을 이용한 연구에서 비만 및 당뇨유발 시 iNOS 및 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있어 60주령 방사군에서 혈중 중성지방 및 glucose 함량이 케이지군보다 월등히 증가된 것으로 이에 대한 상세한 연구도 필요하다. 그러나 현재 닭에서 사육형태에 따른 스트레스, 대사작용 및 감염 등에 따른 면역 및 스트레스 관련 유전자에 대한 연구는 아직 많이 보고되고 있지 않는 실정이다. 대부분의 연구는 실험용 쥐를 대상으로 이루어져 여러 가지 내외적 스트레스, 감염 및 대사작용 등이 사이토카인 및 다양한 유전자의 조절에 관여된다는 사실이 증명되고 있다 (Bhattacharya 등, 2006; Erf 등, 2009; Sforcin 등, 2009). 농장동물복지 연구를 위해 지금까지 알려진 환경 및 감염 스트레스 반응을 이용하여 다양한 바이오마커 탐색 및 응용 연구는 향후 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

#### 다. 결론

본 연구 결과를 종합하여 볼 때, 40주령 및 60주령 산란계에서 사육방식 (케이지 vs 방사)에 따라 닭의 체중 등과 같은 외형적인 지표와 함께 면역체계에 상당한 스트레스를 유발한 것으로 나타났다. 결과를 살펴보면 케이지 사육에 비해 방사 사육에서 체중이 유의적 ( $P < 0.05$ ) 높게 나타났으며, 간 및 흥선의 무게 역시 사육방식에 따라 차이가 나타났다. 혈액성상에서 케이지 사육군에서 ALT 및 corticosterone 수준이 증가되는 것으로 나타났다. 백혈구 감별계수 (%), Heterophil/lymphocyte 비율의 뚜렷한 차이가 없었다. 면역 장기에서 일부 사이토카인

(IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS) 등과 같은 유전자 발현이 사육형태에 따라 현저히 차이가 있는 것으로 나타났다. 케이지사육군 (Cage)은 방사사육군 (Floor)에 비해 간, 비장 등 여러 조직에서 IL-10, IFN- $\gamma$  등과 같은 친염증계열의 사이토카인 발현이 전반적으로 증가되었다. 그러나 방사사육군의 간, 비장 및 흉선 등 대부분 장기에서 모두 LITNF- $\alpha$ 의 발현이 현저히 증가되고 흉선에서 TRILs4의 유전자 발현이 증가되는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 시험은 스트레스 반응과 관련된 여러 가지 생리적 지표, 면역 사이토카인, 감염에 따른 유전자 발현을 이용하여 바이오마커를 탐색하여 사육방식이 스트레스 및 면역지표에도 영향을 미치는 것을 입증하였다. 결론적으로 본 시험결과 산란계의 사육방식에 따른 비교시험에서 방사사육이 동물복지에 스트레스를 감소시키고 면역 등을 활성화시키는 것으로 보인다. 그러나 방사 사육 역시 위생적인 환경조절 및 사육면적 등과 같은 다양한 요인이 관여되므로 향후 이에 대한 면밀한 연구가 요구된다. EU의 동물복지정책에 따라 2012년부터 산란계는 케이지 사육을 전면 금지키로 하고 국내에서도 2008년 동물보호법을 전면 개정하여 동물보호 및 복지시책을 강화하였으므로, 사육방법 및 형태가 동물복지와 관련된 스트레스와 면역작용에 미치는 연구결과는 가축생산성과 복지를 모두 충족시킬 수 있는 한국형 산란계 사육시스템에 대한 농가시행 기술 개발의 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

#### 5. 스트레스 관련 표지를 이용한 닭의 사육방식별 동물복지 체계 조사

1) 계사 사육 형태에 따른 개체의 스트레스 정도를 알아보기 위한 것으로 백색레그혼종 및 한국재래닭을 대상으로 케이지 사육 및 방사 사육으로 관리 후 이들의 생산 능력을 비교 분석하였다. 개체의 생산능력에 있어 생존율, 산란율, 산란지수, 난중 및 체중은 방사 사육 개체들이 케이지 사육 개체에 비해 유의하게 높은 성적을 보였고, 반면 초산일령 및 난질 경우 케이지 사육 개체가 양호한 결과를 나타내어 개체의 생리적 측면에서 방사 사육이 케이지 사육에 비해 보다 바람직한 사육형태로 사료된다.

2) 계사사육형태에 따른 닭의 스트레스 관련 유전자 및 단백질 발현분석에서 텔로미어 함량, DNA 손상을 및 HMGCRC의 발현량을 비교 분석하였다. 텔로미어 함량 분석에서 혈액 세포 및 신장, 비장 세포의 경우 케이지 사육구 개체들의 텔로미어 함량이 방사사육구에 비해 훨씬 높은 감소율을 보이고, 연령이 증가함에 따라 이의 차이는 더욱 커지는 것으로 나타났다. Comet assay에 의한 DNA 손상에 있어서도 케이지 사육 개체들이 방사 사육 개체들에 비해 월등히 높은 손상을 나타내었다. 반면 HMGCRC의 발현량에 있어서는 혈액의 경우 방사 개체의 발현값이 케이지 사육개체에 비해 높게 나타나 상반된 결과를 보였다. 따라서 HMGCRC를 제외한 텔로미어 함량 및 DNA 손상을 공히 유효한 개체의 스트레스 마커로 인정되며, 분석 결과 닭의 케이지 사육 형태가 개체들에게 생리적으로 매우 큰 스트레스 요인임을 시사한다.

3) 산란계 (White Leghorn)에서 사육방식 (케이지 vs 방사)에 따른 다양한 생리적 스트레스의 표지를 탐색하였다. 생리지표 탐색에서 40 및 60주령의 케이지 사육계의 체중이 낮았고, corticosterone 농도는 40주령의 케이지사육군에서 현저히 증가되는 것으로 보아 스트레스가 방사사육군에 비해 매우 높은 것으로 나타났다.

4) 면역관련 장기에서 일부 사이토카인 등과 같은 유전자의 발현이 사육방식에 따라 현저한 차이가 있는 것으로 나타났다. 케이지사육군 (Cage)은 방사사육군 (Floor)에 비해 간, 비장 등 여

러 조직에서 IL-10, IFN- $\gamma$  등과 같은 친염증계열의 사이토카인 발현이 전반적으로 증가되었다. 그러나 방사사육군의 간, 비장 및 흉선 등 대부분 장기에서 모두 LITNF- $\alpha$ 의 발현이 현저히 증가되고 흉선에서 TRTs4의 유전자발현이 증가되는 것으로 관찰되었다. 본 시험의 결과로 보아 동물복지 및 스트레스와 관련된 biomarker로서 각종 생리적 지표, 면역 사이토카인, 감염에 따른 특정 유전자 발현 등은 닭에서 전반적인 사육체계를 평가하는 기초 지표로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 3절 육계 사육밀도에 따른 스트레스 관련 표지 물질의 발현 양상과 생산성 비교 분석

#### 1. 육계의 사육밀도에 따른 면역 관련 유전자 발현 연구

##### 가. 재료 및 방법

##### (1) 육계 사양시험

##### (가) 공시동물 및 사양관리

본 시험은 1일령 육계(Ross 308)을 무감별로 184수를 (주)올품에서 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, 0.116m<sup>2</sup>/수), 중밀도구 6수/cage(10반복, 0.077m<sup>2</sup>/수) 및 고밀도구는 8수/cage(8반복, 0.0578m<sup>2</sup>/수)로서 완전임의 배치하였다. 7일령부터 35일령까지의 사육밀도에 따른 사양성적을 조사하기 위하여 시험에 사용한 사료는 상업용 육계사료를 이용하였으며 본 사양관리는 온도 및 광선조절을 갖춘 사육시설에서 본 대학의 육계 사육 관리 지침에 따라 일령별로 사육을 실시하였다. 점등은 24시간 실시하였으며 사육온도는 시험개시 34±1℃로 조절한 뒤 한 주마다 2℃씩 감소시켜 시험 종료시에 24℃를 유지하였다. 시험사료의 화학적 성분은 Table 3-1에 나타난바와 같다.

Table 3-1. Chemical composition of basal diets<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>calculated 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 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) 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% NaCl을 다시 넣은 뒤 200x g에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 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 상층액을 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 사용자 지침에 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  $\mu$ l, SYBR Green supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 10  $\mu$ l, 5 pmol의 primer 2  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l을 넣어 최종부피 20  $\mu$ l로 맞추는 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 sequence

는 Table 3-2에 나타난바와 같다.

Table 3-2. Sequences of primers used in real-time PCR

Item	Direction	Sequence(5' to 3')	Size(bp)
TNF- $\alpha$	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- $\gamma$	Forward	TTC CTT CAT TTT CCT CTT GA	223
	Reverse	ACT GGA AAA CAC AAG GTC AC	
IL-1 $\beta$	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	
$\beta$ -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 3-3과 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. 사료 섭취량은 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 사료 섭취량이 증가되는 것으로 보아 동물체로서는 사육밀도에 따른 스트레스 요인이 저밀도 사육에 의해 완화되고 있음을 의미하는 지표로 생각되어진다.

Table 3-3. 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 <sup>a</sup>	2941.88 ± 42.72 <sup>b</sup>	2993.35 ± 42.47 <sup>b</sup>
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 <sup>a</sup>	101.45 ± 1.47 <sup>b</sup>	103.22 ± 1.46 <sup>b</sup>
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: 0.116m<sup>2</sup>/bird, MSD : 0.077m<sup>2</sup>/bird, and HSD : 0.0578m<sup>2</sup>/bird.

<sup>a,b</sup> 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 3-4와 같다. 시험 결과 체중 100g 각 장기의 상대적 무게를 측정된 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 3-4. 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: 0.116m<sup>2</sup>/bird, MSD : 0.077m<sup>2</sup>/bird, and HSD : 0.0578m<sup>2</sup>/bird.

<sup>a,b</sup> 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 3-5와 같다. 먼저 혈액 생화학적 성분에서 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 3-5. 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/μl)	366.8 ± 13.5	316.0 ± 23.2	324.9 ± 7.99
ALT (IU/μl)	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: 0.116m<sup>2</sup>/bird, MSD : 0.077m<sup>2</sup>/bird, and HSD : 0.0578m<sup>2</sup>/bird.

<sup>a,b</sup> 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 3-6. 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- $\alpha$	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- $\gamma$	2.99 $\pm$ 0.49	5.03 $\pm$ 1.92	1.94 $\pm$ 0.34
IL-1 $\beta$	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 <sup>a</sup>	8.55 $\pm$ 2.92 <sup>ab</sup>	1.54 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
Fabricius			
TNF- $\alpha$	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- $\gamma$	2.47 $\pm$ 0.48	2.87 $\pm$ 0.94	1.83 $\pm$ 0.36
IL-1 $\beta$	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- $\alpha$	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- $\gamma$	6.63 $\pm$ 2.13	2.16 $\pm$ 0.72	6.84 $\pm$ 0.72
IL-1 $\beta$	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 <sup>b</sup>	18.16 $\pm$ 6.02 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
Spleen			
TNF- $\alpha$	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- $\gamma$	4.91 $\pm$ 1.05	6.01 $\pm$ 3.74	3.86 $\pm$ 0.66
IL-1 $\beta$	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 <sup>a</sup>	6.13 $\pm$ 1.95 <sup>b</sup>	1.75 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>
Thymus			
TNF- $\alpha$	18.77 $\pm$ 5.35 <sup>b</sup>	18.70 $\pm$ 8.06 <sup>b</sup>	71.79 $\pm$ 17.18 <sup>a</sup>
iNOS	11.39 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>	8.72 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup>	53.69 $\pm$ 8.47 <sup>a</sup>
IFN- $\gamma$	80.11 $\pm$ 24.28	49.69 $\pm$ 18.50	96.62 $\pm$ 25.30
IL-1 $\beta$	80.59 $\pm$ 4.66 <sup>b</sup>	110.07 $\pm$ 13.22 <sup>b</sup>	259.20 $\pm$ 72.08 <sup>a</sup>
IL-4	76.07 $\pm$ 49.01	66.45 $\pm$ 38.27	90.97 $\pm$ 24.11
IL-6	63.78 $\pm$ 21.91 <sup>b</sup>	69.53 $\pm$ 17.69 <sup>b</sup>	143.84 $\pm$ 24.02 <sup>a</sup>
IL-10	62.76 $\pm$ 23.14	108.26 $\pm$ 63.3	24.25 $\pm$ 8.89

Mean $\pm$ SE.

\* LSD: 0.116m<sup>2</sup>/bird, MSD : 0.077m<sup>2</sup>/bird, and HSD : 0.0578m<sup>2</sup>/bird.

<sup>a,b</sup> 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- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL-6, IL-12 $\beta$  등과 같은 친염증 유발인자(Pro-inflammatory)로 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- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 및 TNF- $\alpha$  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- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ , iNOS, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ 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/m<sup>2</sup>)가 42일령에서 육계의 생산성을 조사한 결과 가장 밀도가 높은 23.8 수/m<sup>2</sup> 가장 체중이 감소되었으며 14.3 수/m<sup>2</sup>에서 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/m<sup>2</sup>) 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 무게(g/100g)가 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.

## 2. 육계의 사육 밀도에 따른 telomere 함량 및 스트레스 관련 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 경남과학기술대학교 종합농장 내 무창 계사에서 본 대학의 육계 사육 관리 지침에 따라 사육하였다. 점등은 종야 점등을 실시하였으며, 사육온도는 시험개시 34±1℃로 조절한 뒤 한 주마다 2℃씩 감소시켜 시험 종료시에 24℃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× 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 원심분리시켰다. 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)<sub>7</sub>으로 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 다음과 같다. 슬라이드 표본을 RNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 에탄올로 탈수 건조시켰다. 이후 Hybridization 용액 (13 $\mu$ l formamide, 5 $\mu$ l hybridization buffer, 2 $\mu$ l(100ng/ $\mu$ l) chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨린 후 밀봉하고 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성 (denaturation)시킨 후 38.5 $^{\circ}$ C에서 12시간이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2 $\times$ SSC로서 72 $^{\circ}$ 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 커버글라스로 덮은 후 38.5 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 PN buffer로 세척하고 암소에서 건조시켰다. 배경 염색은 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) RT에 의한 cDNA합성 및 real-time PCR

reverse transcription system(promega)을 이용하였으며 primer는 oligo(dT)를 이용하였다. 반응조성은 RNA 1.5 $\mu$ g, buffer 4 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub>(25mM) 3 $\mu$ l, dNTP(2.5mM) 1 $\mu$ l, reverse transcriptase 1 $\mu$ l, primer 0.5 $\mu$ l이며 total volume은 DEPC로 20 $\mu$ l로 맞추었다. 이들 반응물은 25 $^{\circ}$ C에서 5분간 접합과정과 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 확장과정을 통하여 cDNA를 합성하였으며 이후 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 열처리를 하여 역전사 효소를 불활성화 시켰다. 생성된 cDNA는 다음 단계의 실험을 위하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. HSP 유전자 발현분석을 위하여 primer (Table 3-7)를 제작 후 real-time PCR을 수행하였다. PCR의 condition은 cDNA 1 $\mu$ l, primer(5pmole)는 각각 0.5 $\mu$ l, SYBR Green 10 $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 8 $\mu$ l 반응물을 94 $^{\circ}$ C 5분간 최초의 변성을 시키고, 94 $^{\circ}$ C 15

초간 두 번째 변성, 각각 유전자에 맞는 접합온도를 30초간 접합과 확장과정을 72℃ 30초간 실시하였다. 그리고 94℃ 1분간 재 접합 과정을 거친 후 55℃에서 1분간 재 확장 과정을 실시하였다. 마지막으로 유전자간 설정한 접합온도에서 94℃까지 0.5℃씩 상승하면서 94℃에 이를 때까지의 형광접합물질인 SYBR이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다.

(5) 통계분석

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

Table 3-7. Primers used for semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	size	Tm(℃)
HSP70	Forward	AATCTATCATCATGTCTGGCAAAGGGCCGG	220bp	55
	Reverse	GCGGCCGATGAGACGCTTGGCATCAAAGAT		
HSP90	Forward	ATGCCGGAAGCTGTGCAAACACAGGACCAA	242bp	55
	Reverse	GGAATCAGGTTAATTTTCAGGTCTTTTCCA		
HMGR	Forward	ATGCATGGCCTTTTTGTGGCTCTCATCCA	270bp	55
	Reverse	CTTGAGAAGATTGTGAGGAGACCAGCAATA		
HSP25	Forward	ATGCTTTGCCGGATGCACCTCGCTCATTTT	220bp	65.5
	Reverse	CGAAGTTCTTCACATCCTGGCAGACGGAGA		
Bcl-X	Forward	ATGTCCAGCAGTAACCGGGAGTTAGTGATT	200bp	68
	Reverse	AGCGCCTGCCTCACGTCGGATGCTCGAACA		
Bcl-2	Forward	CGCTGCTTCCCCTCGGAAACCATGGCTCAC	200bp	67.5
	Reverse	GCCGGGGGCACCACTCTAGCAGCAGCCGAG		

나. 결과 및 고찰

(1) 육계 사육밀도에 따른 telomeric DNA 함량 분석

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<sup>®</sup>)을 이용하여 각 조직별 세포내 텔로미어 함량을 분석하였다. 우선 사육 밀도별 사육 후 텔로미어의 감축 양상을 비교 분석하기 위하여 시험 개시시 기본 값을 얻고 자 7일령 개체들의 혈액 내 백혈구 세포의 텔로미어 함유율을 분석한

바 이의 평균값은 2.43%였다(Table 3-8).

Table 3-8. The relative amount of telomeric DNA of the intephase 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

Table 3-9. The amount of telomeric DNA of intephase nuclei of tissues in 35d broiler chickens raised different stocking 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 <sup>a</sup> (n=160)	2.273±0.511 <sup>ab</sup> (n=160)	2.151±0.479 <sup>b</sup> (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)

<sup>a,b</sup>Values (Means±SE) with different superscripts differ significantly among treatments. (p<0.05)

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 3-9). 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 3-9 및 Fig. 3-1에서는 백혈구를 포함한 간, 폐, 심장, 정소 세포들에 대한 사육밀도 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. 3-2는 본 분석 방법으로 획득한 대표적 텔로미어의 접합 간기상들로서 각 genome당 텔로미어의 상대적 함유율이 2.16, 2.27 및 2.29%로 분석된 세포양상이다.

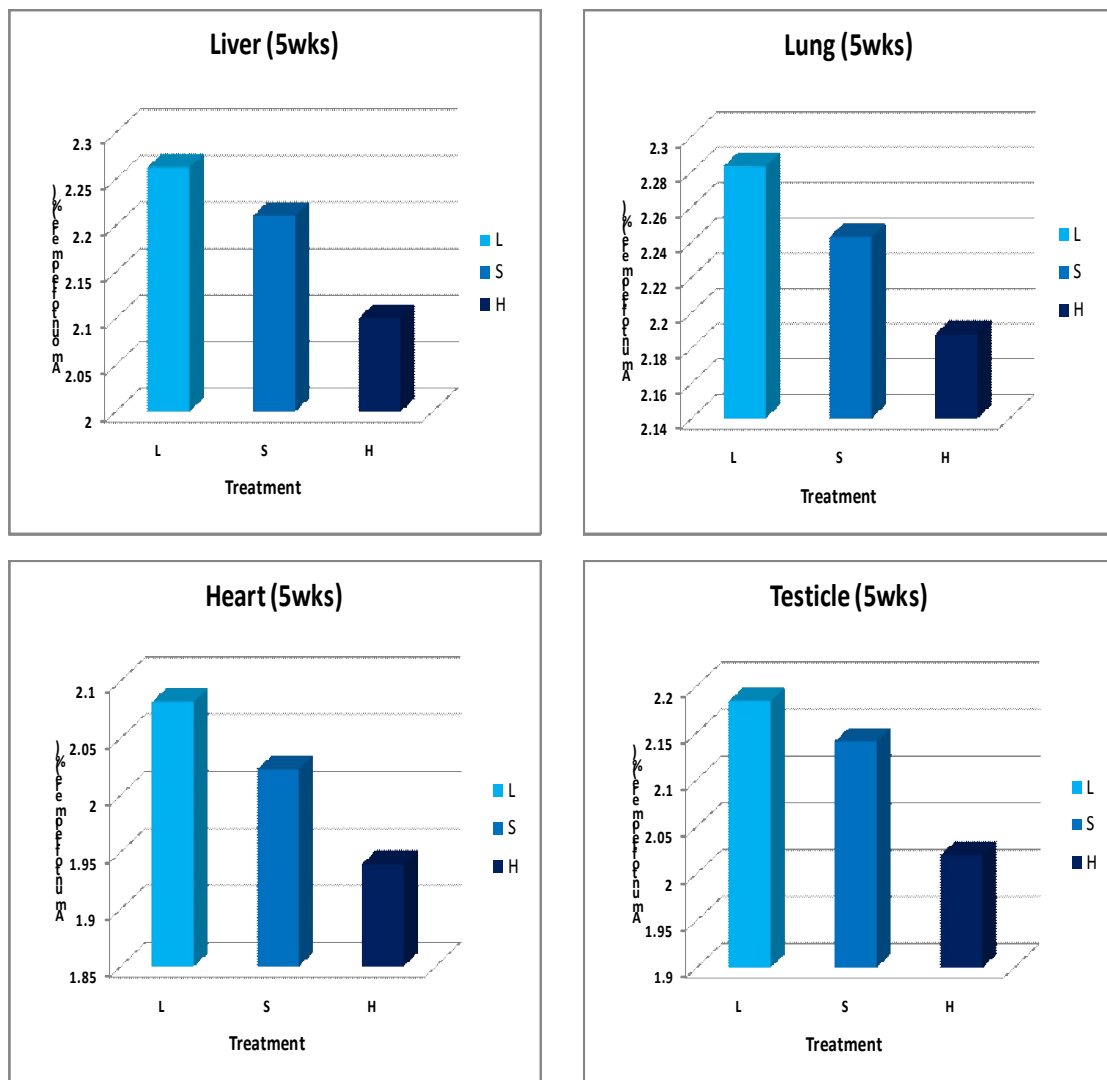


Fig. 3-1. The histogram of telomere quantities of liver, lung, heart, and testis cells of 35d-broiler chickens raising at high density(575 sq.cm/bird), standard density(770 sq.cm/bird) and low density(1150 sq.cm/bird)

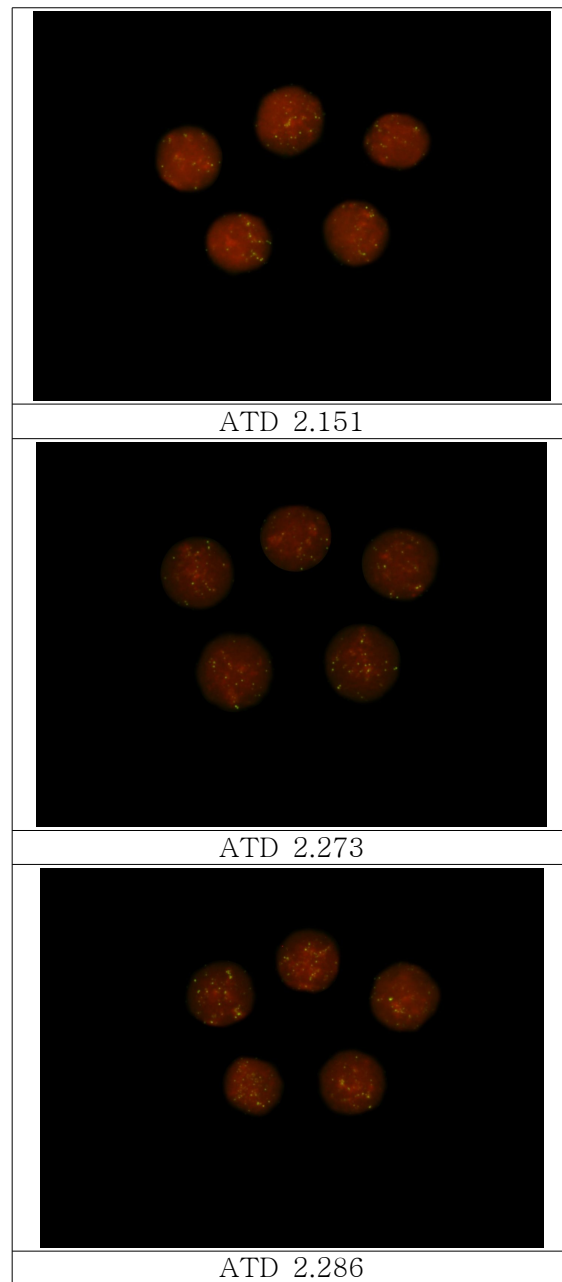


Fig. 3-2. The representative telomere distribution patterns of lymphocytes interphase nuclei in broiler by FISH using telomeric DNA probe; ATD(Amount of Telomeric DNA)

(2) 육계의 사육 밀도에 따른 스트레스 관련 유전자 발현 양상

육계의 사육밀도는 체중, 사료섭취량, 사료효율 등 생산성 지표분만 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-glutayl 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. 3-3, 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 2 배를 나타내었다. Heat shock protein들은 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.

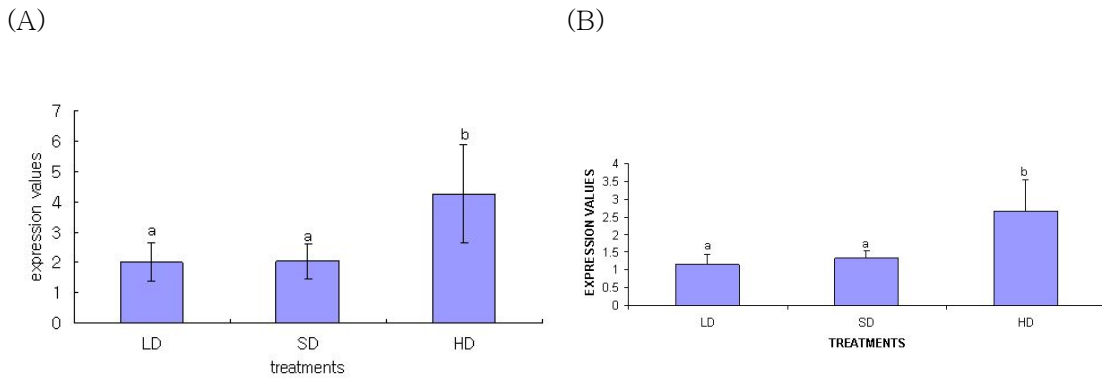


Fig. 3-3. The mRNA expression levels of HSP70 in Blood(A) and Liver(B) of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD). Data were normalized using beta-actin mRNA levels and expressed as arbitrary units on y-axis. The graphical data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

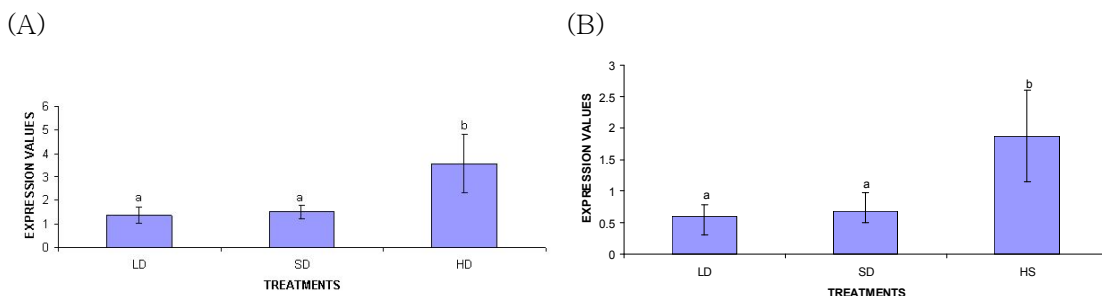


Fig. 3-4. The mRNA expression levels of HMGCR in blood(A) and liver(B) of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD).

본 시험에서는 HSP90유전자 또한 위와 같은 방법으로 조사 분석하였다. HSP90유전자의 발현 또한 고밀도 사육시에 저밀도 및 표준밀도보다 높게 나타났으나 유의성은 없었다 (Fig. 3-5). 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 HMGCRC의 발현에 영향을 미쳤으나 HSP90에는 영향을 하지 못한 것과 유사한 결과임을 알 수 있다. HSP25유전자를 간에서 조사 분석한 결과 처리에 차이가 없었다 (Fig. 3-6). HSP family에 속한 유전자들이라도 사육밀도에 따른 발현 양상은 다르게 나타남을 볼 수 있었다. HSP 및 HMGCRC의 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 HMGCRC를 스트레스관련 biomarker로서 활용할 수 있음을 보여준다. 스트레스와 세포의 사멸(apoptosis)과의 연관성을 확인하기 위하여 Bcl-x와 Bcl-2유전자의 발현을 간에서 조사 분석 하였다 (Fig. 3-7). 포유동물이 스트레스를 받게 되면 세포사멸관련 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.

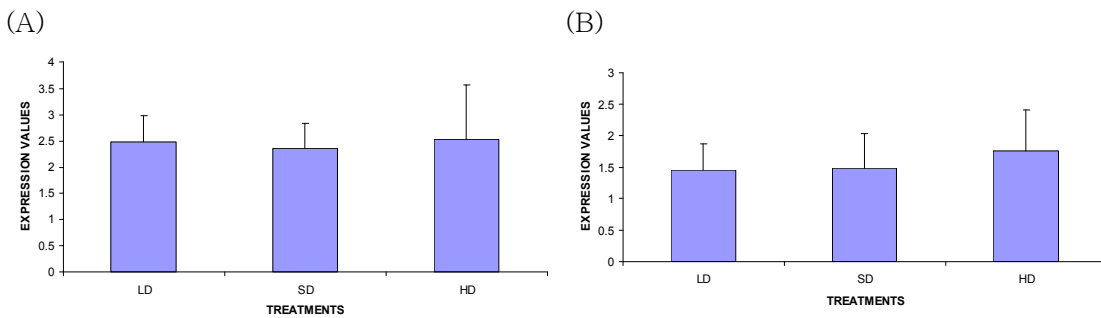


Figure 3-5. The mRNA expression levels of HSP90 in blood(A) and liver(B) of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD).

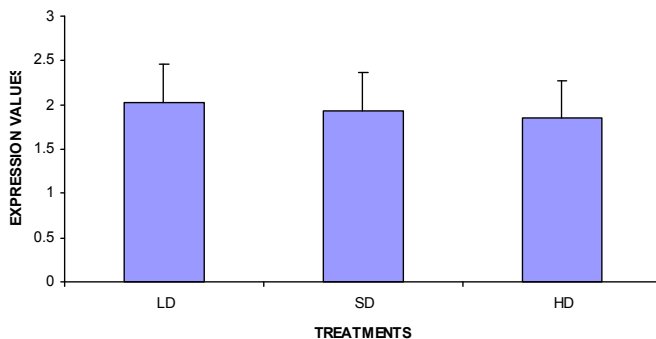
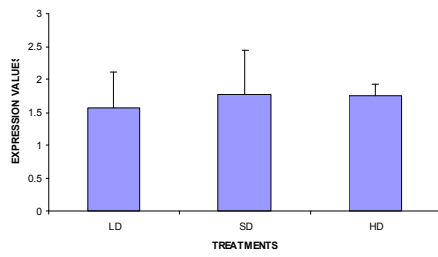


Fig. 3-6. The mRNA expression levels of HSP25 in liver of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD).

(A)



(B)

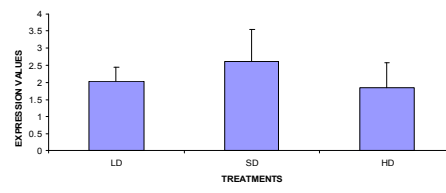


Fig. 3-7. The mRNA expression levels of Bcl-2(A) and Bcl-X(B) in liver of broiler chickens subjected to low stocking density (LD), standard stocking density(SD) and high stocking density(HD).

## 4절 육계에 있어 항산화 물질 첨가 급여에 따른 스트레스 반응과 산성 분석

1. 육계에 비타민 C 및 E의 첨가 급여가 면역 관련 유전자 발현 및 스트레스 감소에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

(1) 시험동물 및 시험설계

시험에 공시된 동물은 육계 수컷 1일령 Ross종 162 수를 올품(주)에서 구입하여 2일간의 적응기간을 거쳐 3일령 (개시체중,  $44.21 \pm 0.48g$ )에 본 시험에 공시하였다. 시험구는 각 처리구당 6반복, 반복당 9수 (처리구당 54 수)를 완전임의 배치하여 대조구 (CON, control)와 비타민 C (Ascorbic acid, 99.8%, VC) 200mg/kg 및 비타민 E (Alpha-tocopherol acetate 50%, VE) 분말을 100mg/kg 수준으로 첨가한 3 처리군으로 설정하여 35일령까지 사양시험을 실시하였다. 감염스트레스에 따른 스트레스 지표 및 생리활성물질이 스트레스 완화작용에 미치는 영향을 조사하기 위해 사양시험이 완료 된 후 대조구 (12수)와 vitamin C 군(12수)에서 평균체중에 가까운 24수를 선발하여 각 구에서 6수씩 lipopolysaccharides (LPS, Sigma L2630)를 체중당 5mg/BW를 투여하여 2 X 2 시험설계로서 비타민 C 및 LPS 처리에 따른 스트레스 지표를 분석하였다.

(2) 사료 준비 및 사양관리

본 실험에 사용한 기초사료는 옥수수, 밀, 대두박 등을 위주로 배합하고, 대사에너지, 조단백질 및 기타 영양소 수준은 한국사양표준에 근거하여 제조한 육계전기 (3~21일령) 및 후기 (22~35일령) 상업용 사료를 구입하여 사용하였다 (Table 4-1). 시험에 사용한 비타민은 상업용 회사에서 구입하여 각각 비타민 C (200mg/kg) 및 E (100mg/kg)를 상업용 기초사료에 첨가하여 완전히 혼합하였다. 시험 사료는 매일 일정량 무게를 측정하여 동물이 충분히 먹을 수 있도록 자유 급여하고 물은 자동급수기로서 급여하였다. 사양관리는 경남과학기술대학교 부속 동물사육장의 관행에 준하여 35일간 케이지에서 사육을 실시하였다. 짐등은 전 사양기간 동안 24시간 종일 전등을 실시하였고, 계사온도는 일령별로 32℃에서 22℃ 까지 사육실 온도 관리 프로그램에 따라 조절하였다. 체중은 시험개시, 21일령 및 35일령에 각각 측정하여 증체량을 측정하고 21일령 및 35일령에 사료섭취량을 측정하여 사료요구율을 계산하였다.

(3) 시료 채취 및 보관

항산화 생리활성물질이 스트레스 지표에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사양시험 종료 후 35일령 육계를 대조구 (12수)와 vitamin C 군(12수)에서 평균체중에 가까운 24수를 선발하여 일반사료(Non-vitamin C diet) 및 비타민 C 급여구 (Vitamin C added diet)로 구분하고 각각 6수씩 선별하여 LPS (lipopolysaccharides, Sigma L2630)를 체중 kg당 당 5mg을 익정맥으로 주입하였다. 주입 3시간 후에 도살하고 경정맥을 통하여 채혈을 하여 혈장을 분리하였다. 이어서 복강을 절개하고 간, 흉선, 비장 및 F-낭 등의 면역 기관을 채취하고 채취한 모든 샘플은 액체질소에 냉동 후, 분석 시까지 -70℃에서 보관하였다.

Table 4-1. Diet composition

Composition	Starter	Finisher
Corn	32.42	27.72
Wheat	32	35
Wheat meal	-	3
animal fats	2.1	3
Corn gluten	2	-
Soybean meal	8.25	11.875
Dehulled soybean	8	-
Rapeseed meal	2	4
DDGS	6	8
Animal fat	3	3.5
Salts	0.15	0.125
Limestone	1.35	1.4
MDCP	0.775	0.45
Lysine-50%	0.65	0.65
Methionine-100%	0.2	0.225
Thereonine-100%	0.075	0.125
HCl-choline-50%	0.08	0.08
Vitamin Premix	0.15	0.15
Mineral Premix	0.15	0.15
Enzymes	0.05	0.05
Functional Feed additives	0.45	0.4
Probiotics	0.1	
Salinomycin	0.05	0.1
Chemical composition	100	100
Protein	19.62	18.22
Fat	4.54	5.51
Fiber	3.01	3.31
Ash	5.91	5.68
Ca	0.96	0.94
P	0.64	0.60

(4) 분석 항목 및 방법

(가) 체중, 사료섭취량, 사료요구율, 폐사율 및 면역장기 무게

사료섭취량, 체중 및 사료요구율은 시험 개시와 21일령, 종료 (35일령)시에 측정하였다. 사료요구율은 실험기간 중 평균섭취량을 평균체중 증가량으로 나누어 계산하였다. 실험기간 동안 발생한 폐사율을 조사하였다. 간, 췌장, 비장 및 흉선 등과 같은 장기의 무게는 체중 100 g당 상대적 장기무게로 환산하였다.

(나) 혈액 생화학적 성분 및 항산화도 분석

혈액 내 생화학적 성분 중 혈장 AST, ALT, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose HDL (high-density lipoprotein cholesterol) 및 LDLC (low-density lipoprotein cholesterol) 등은 자동 혈액분석기(HI System, Technicon, USA)를 사용하여 분석하였다. 혈장내 total antioxidant status (TAS)는 Randox kit (NX 2332)를 이용하여 사용자 방법에 따라 ELISA reader에 적용하여 600 nm에서 측정하였다.

(다) 혈액 스트레스 호르몬 (corticosterone) 분석

혈장에서 스트레스호르몬인 corticosterone 수준은 corticosterone EIA kit (Catalog No ADI-901-097, Enzo Life Science, USA)을 이용하여 사용자 지침에 따라 ELISA reader 로서 405nm에서 분석하였다.

(라) Real-Time PCR (Real-time Polymerase Chain Reaction)을 이용한 mRNA 발현

① Total RNA 추출

Total RNA 추출을 위해 -70°C에 보관되어 있는 면역 조직 (liver, spleen, thymus) 100 mg 과 RNazol 2 ml (TRIzol Reagent, Invitrogen)를 centrifuge tube에 넣은 다음, homogenizer를 이용하여 조직이 완전히 갈릴 때까지 얼음위에서 분쇄 하였다. 분쇄된 조직은 미리 준비해둔 eppendorf-tube에 나누어 담은 다음, 각각의 tube에 100  $\mu$ l의 chloroform을 넣고 흔들여 준 뒤 얼음에 5 분간 방치하였다. 원심분리기로 15,000 rpm (4°C)에서 15분간 원심분리 시킨 다음, 새로운 eppendorf-tube에 상층액 400  $\mu$ l를 옮긴다. 상층액과 동량의 isopropanol을 넣고 혼합시킨 다음 얼음에 15분간 방치하였다. 다시 원심분리기로 15,000 rpm (4°C)에서 15분간 원심분리 시킨 다음, 상층액을 제거하고 Clean bench에서 분리된 pellet을 건조시켰다. 0.1% DEPC-treated H<sub>2</sub>O (Diethylpyrocarbonate, Amresco) 50  $\mu$ l를 넣은 후 RNA pellet이 녹을 때까지 얼음에 방치하였다. 획득한 total RNA로서 곧바로 RT mixture를 제조하였으며 남은 RNA는 -70°C에 보관하였다.

② Reverse Transcription

추출한 total RNA를 이용하여 spectrophotometer에서 OS값을 측정하여 RNA를 5  $\mu$ g으로 정량한 다음 oligo ddt (Invitrogen) 1  $\mu$ l와 0.1% DEPC를 넣어 12  $\mu$ l로 맞춘 다음 RT mix를 제조하였다. RT 조건은 70°C에서 10분, 4°C에서 5분으로 잡아 반응시켜 RT-mixture를 획득하였다. 다시 RT-mixture에 5X 1st strand buffer (Invitrogen) 4  $\mu$ l, 2.5mM dNTP (TaKaRa) 4  $\mu$ l, 0.1M DTT(Invitrogen) 2  $\mu$ l, super script III (Invitrogen) 1  $\mu$ l, RT-mixture 9  $\mu$ l을 넣어 최종 부피를 20  $\mu$ l로 맞춘 다음 실온에서 10분간 방치 후, 다음 조건에 따라 RT 작업을 실시하였다. PCR 조건 42°C에서 50분, 90°C에서 10분, 4°C에서  $\infty$ 로 맞추어 반응시킨 후, 얼음에서 10분간 방치한다. RNase H (Invitrogen) 0.5  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켜 cDNA (RT-product)를 획득하였다.

Table 4-2. Real-time PCR primer used in the experiment

Item	Direction	Sequence(5' to 3')	Size(bp)	Accession No.
TLR4	Forward	CTG TGG TTG TCT GTA GCA	86	NM_001030693
	Reverse	CGT TCA TCC TCA TAT CTC TTC A		
IFN- $\gamma$	Forward	ACA GGC AAA CAA TGG AAG T	96	NM_205149
	Reverse	CAG GTC AAC AAA CAT ACA ACA G		
IL-1 $\beta$	Forward	TTC ATT ACC GTC CCG TTG	121	NM_204524
	Reverse	GCT TTT ATT TCT CCA GTC ACA		
IL-6	Forward	GGT GAT AAA TCC CGA TGA AGT	140	NM_204628
	Reverse	TCT CCA TAA ACG AAG TAA AGT CTC		
IL-18	Forward	AGC GTC CAG GTA GAA GAT AA	122	NM_204608
	Reverse	AAT ATG ATG TTA CTT TCA CCA GGA		
RPL27	Forward	CAG CAA TGG GCA AGA AGA	81	NM_205337
	Reverse	GCA TCA GGT GGT TGT AGT T		

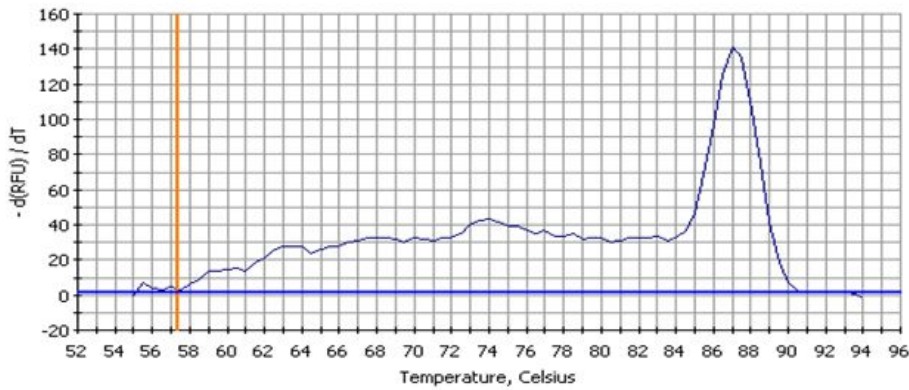


Fig 4-1. Real-time PCR expression pattern

### ③ Real-time PCR

Template (cDNA)  $5\mu\text{l}$ , SYBR green supermix (Bio-Rad)  $10\mu\text{l}$ , 10 pmol forward primer  $0.5\mu\text{l}$ , 10 pmol reverse primer  $0.5\mu\text{l}$ ,  $\text{dH}_2\text{O}$   $4\mu\text{l}$ 를 각 각 넣어 최종 부피  $20\mu\text{l}$ 로 맞춰 준 다음  $94^\circ\text{C}$ 에서 5분, ( $94^\circ\text{C}$ 에서 15초,  $62^\circ\text{C}$ 에서 30초,  $72^\circ\text{C}$ 에서 30초) x 40cycle,  $94^\circ\text{C}$ 에서 1분,  $55^\circ\text{C}$ 에서  $94^\circ\text{C}$ 까지  $0.5^\circ\text{C}$ 씩 온도를 서서히 올려 각 온도마다 10초씩 반응,  $4^\circ\text{C}$ 에서  $\infty$ 의 조건으로 맞추어 Real-time PCR(Bio-Rad)을 수행하였다. 실시간으로 변화하는 형광의 양상을 관찰하여 Ct 값을 구하였으며, 이 Ct값으로  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  결과를 나타내었다 (Livak and Schmittgen, 2001).

#### (5) 통계처리

항산화 생리활성 물질 비타민 C 및 E 급여에 따른 사육성적은 Proc-GLM(SAS, 1996)에 의해 분산분석을 실시하고 처리 간 비교는 Tukey 방법에 따른 다중검정을 실시하였다. LPS 투여에 따른 분산분석은 two-way 분산분석방법으로 통계 처리하여 비타민 C, LPS 및 상호작용에 따른 유의성 검정을 실시하였다. 유의성 검정수준은  $P < 0.05$  수준에서 실시하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 사양성적 및 장기무게

육계사료에 비타민 C 및 비타민 E를 각각  $200\text{ mg/kg}$  및  $100\text{ mg/kg}$  수준으로 첨가하여 35일령까지 급여 후 조사한 사양 성적은 Table 4-3과 같다. 사양전기 (3~21일령)의 시험결과를 살펴보면 비타민 C (VC) 및 비타민 E (VE) 첨가에 따른 체중, 증체량은 대조구와 비교 시 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 감소되는 것으로 나타났다. 특히 사료섭취량에서도 비타민 E 급여구에서 다른 두 구에 비해 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 감소하였다. 그러나 사료요구율에서는 차이가 없었다. 사양후기 (22~35일령)의 시험결과를 살펴보면 비타민 C (VC) 및 비타민 E (VE) 첨가는 체중, 일당 증체량과 사료요구율에서 대조구와 비교 시 유의적인 차이가 없이 모두 비슷한 성적을 보였다. 35일령까지의 전체 사양기간 동안에서는 비타민 E 첨가구에서 약간 낮은 체중을 보였지만 모든 처리구에서 통계적 차이 없이 모두 비슷한 사양성적을 보였다. 비타민 C (VC) 및 비타민 E (VE) 첨가 급여 후, 도체에서 획득한 간, 비장, 흉선 및 F-낭 등과 같은 면역장기의 상대적 무게 (Table 4-4) 역시 처리구에 상관없이 모두 비슷하였으나 흉선의 상대적 무게는 항산화비타민 (C 및 E) 첨가구에서 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 증가된 것으로 관찰되었다. 사양시험 동안

항산화 비타민 급여에 따른 폐사율 역시 유의적 영향이 없는 것으로 관찰되었다.

따라서 본 시험결과로 보아 항산화 비타민 첨가(C 및 E)는 육계의 생산성 및 폐사율에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 흥선의 무게는 현저히 증가되는 것으로 나타났다.

Table 4-3. The effects of vitamin C and vitamin E supplementation on the growth performance and mortality in broiler chicks

Item	Treatment		
	Control	Vitamin C	Vitamin E
Initial body weight, g	44.36 ± 0.41	44.00 ± 0.46	44.28 ± 0.58
3-21 days			
BW, g	840.74 ± 28.69 <sup>a</sup>	782.22 ± 16.85 <sup>b</sup>	780.00 ± 18.26 <sup>b</sup>
Gain, g	796.85 ± 28.69 <sup>a</sup>	738.22 ± 16.98 <sup>b</sup>	736.00 ± 18.28 <sup>b</sup>
Feed intake	1087.11 ± 19.71 <sup>a</sup>	1054.31 ± 49.36 <sup>ab</sup>	1036.53 ± 23.7 <sup>b</sup>
Feed conversion ratio	1.37 ± 0.06	1.43 ± 0.05	1.41 ± 0.04
22-35 days			
BW, g	1690.55 ± 89.11	1687.56 ± 129.05	1617.33 ± 90.77
Gain, g	849.81 ± 68.62	905.33 ± 130.44	776.67 ± 125.35
Feed intake	1444.52 ± 128.79	1391.87 ± 178.42	1372.49 ± 171.21
Feed conversion ratio	1.70 ± 0.11	1.56 ± 0.33	1.82 ± 0.48
3-35 days			
Total gain, g	1646.67 ± 89.10	1643.55 ± 129.26	1573.33 ± 90.59
Total feed intake	2531.63 ± 137.33	2446.18 ± 221.04	2402.58 ± 184.03
Total feed conversion ratio	1.54 ± 0.05	1.50 ± 0.19	1.60 ± 0.22
Mortality (%)	3.7%	3.7%	3.7%

Values (Mean±SD, n=6)

\*Values With different superscripts differ significantly (p<0.05) among dietary groups.

Table 4-4. The effects of vitamin C and vitamin E supplementation on the relative weight of immune organs in broiler chicks

Item	Treatment		
	Control	Vitamin C	Vitamin E
Liver, g/100g BW	2.32 ± 0.28	2.22 ± 0.43	2.11 ± 0.17
Spleen, g/100g BW	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.10 ± 0.03
Thymus, g/100g BW	0.13 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.23 ± 0.07 <sup>a</sup>
Fabricius, g/100g BW	0.09 ± 0.03	0.12 ± 0.08	0.13 ± 0.07

Values (Mean±SD, n=6)

\*Values With different superscripts differ significantly (p<0.05) among dietary groups.

(2) 혈액 생화학성분, 스트레스 호르몬 및 항산화 지표 분석

항산화제 첨가 사양시험이 종료된 후 대조구 (Non-vitamin C diet) 및 비타민 C 급여구



(Vitamin C added diet) 에서 각각 6수씩 모두 12수를 선별하여 LPS를 처리하고 얻은 혈장에서 생화학 성분을 조사하였다 (Table 4-5). ALP, albumin, triglyceride 및 HDL-cholesterol 등은 vitamin C 급여에 따라 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 변화되는 것으로 나타났다. 한편 LPS 처리는 AST, ALT, BUN, glucose, total protein, calcium, 무기태인, triglyceride, uric acid,  $\gamma$ -GTP, HDL-cholesterol 등과 같은 성분을 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 변화시키는 것으로 나타났다. 대조구 (Non-vitamin C diet) 및 비타민 C 급여구 (Vitamin C added diet) 에서 LPS 처리 후 얻은 혈장에서의 corticosterone 및 total antioxidant status (TAS)를 조사하였다 (Table 4-6). 시험 결과 vitamin C 및 LPS 처리에 따라 corticosterone 및 total antioxidant status가 유의적 ( $P<0.05$ )인 변화를 보이는 것으로 나타났다.

Table 4-5. The effects of vitamin C supplementation and LPS challenges on blood biochemical profiles in broiler chicks

Item*	Treatment							
	Non-vitamin C diet		Vitamin C added diet		Pooled SE	Significance (P-value)		
	Non-LPS	LPS	Non-LPS	LPS		Vitamin C	LPS	Interaction
ALP (U/L)	6963.25	6240.25	9685.75	10240.00	755.9	0.006	0.74	0.57
AST (U/L)	210.75	1083.75	308.13	657.33	67.93	0.16	0.001	0.02
ALT (U/L)	1.88	6.13	1.88	4.33	0.32	0.10	0.0001	0.07
BUN (mg/dℓ)	0.36	1.36	0.44	1.00	0.11	0.43	0.0001	0.18
GLU (mg/dℓ)	220.88	153.13	220.63	180.83	9.30	0.36	0.0004	0.32
TP (mg/dℓ)	3.35	2.61	2.98	2.73	0.16	0.53	0.039	0.29
ALB (mg/dℓ)	0.86	0.96	1.01	1.15	0.04	0.02	0.12	0.78
CA (mg/dℓ)	10.53	13.93	10.43	14.77	0.16	0.18	0.0001	0.06
CHO (mg/dℓ)	99.88	84.75	108.25	103.83	4.78	0.07	0.12	0.45
IP (mg/dℓ)	6.85	15.65	6.76	14.58	1.41	0.80	0.0004	0.82
TG (g/dℓ)	43.88	57.38	31.88	41.17	3.16	0.006	0.01	0.66
$\gamma$ GTP (mg/dℓ)	18.50	26.38	19.50	21.00	1.01	0.2	0.002	0.04
CK (mg/dℓ)	5115.71	9236.63	10523.50	9496.17	778.0	0.35	0.17	0.31
CRE (mg/dℓ)	0.29	0.30	0.29	0.35	0.02	0.78	0.80	0.77
UA (mg/dℓ)	4.53	20.55	4.98	17.58	0.95	0.42	0.0001	0.23
HDLC (mg/dℓ)	64.38	45.88	72.63	68.00	4.33	0.03	0.05	0.29
LDLC (mg/dℓ)	29.00	19.75	22.75	21.00	2.09	0.37	0.08	0.23

Values (Mean $\pm$ SD, n=6).

\*ALP(Alkaline Phosphatase), AST(Aspartic acid transaminase), ALT(Alanine Aminotransferase), BUN(Blood urea nitrogen), GLU(Glucose), TP(Total Protein), ALB(Albumin), CA(Calcium), CHO(Cholesterol), IP(Inorganic Phosphorus), TG(Triglyceride),  $\gamma$ GTP( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase), CK(Creatine Kinase), CRE(Creatine), UA(Uric acid), HDLC(High-density lipoprotein cholesterol), LDLC(Low-density lipoprotein cholesterol).

스트레스반응에서 시상하부-뇌하수체-부신피질 축 (hypothalamus-pituitary-adrenal gland; HPA axis)이 활성화되어 신체 스트레스 반응이 유기되는 것으로 알려져 있다. HPA 축은 스트레스 반응 시 체내 항상성 유지를 위해 신경, 내분비, 면역작용을 총괄적으로 조절하는 것으로 시상하부에서 부신피질자극 호르몬 방출 인자 (corticotropin releasing factor; CRF)를 분비하여 뇌하수체 전엽으로부터 부신피질자극호르몬 (adrenocorticotrophic hormone; ACTH)이 방출되고 (Majzoub, 2006) 이는 다시 혈류를 타고 이동하여 부신피질에서 corticosterone을 분비한다. 본 시험에서는 육계에서 감염스트레스로서 LPS 처리에 따라 corticosterone의 분비가 현저히 ( $P<0.05$ ) 증가되었으며, LPS처리 후 비타민 C를 급여할 경우 corticosterone 농도가 현저하게 ( $P<0.05$ ) 감소되는 것으로 보아 비타민 C가 혈액내 전체 항산화력 (TAS)을 증가시켜 감염 스트레스를 완화하는 효과가 있는 것으로 기대된다. 따라서 본 시험의 LPS 감염 스트레스에서 스트레스호르몬 및 체내 항산화력 지표가 스트레스 지표로서 중요한 요인이 될 수 있음이 증명되었다.

Table 4-6. The effects of vitamin C supplementation and LPS challenges on blood corticosterone and total status of antioxidant in broiler chicks

Item *	Treatment				Pooled SE	Significance (P-value)		
	Non-vitamin C diet		Vitamin C added diet			Vitamin C	LPS	Interaction
	Non-LPS	LPS	Non-LPS	LPS				
Corticosterone (mg/dℓ)	1.40	6.91	1.16	3.66	0.54	0.05	0.001	0.07
Total antioxidant status(mM/ ℓ)	0.33	0.27	0.39	0.31	0.01	0.01	0.01	0.10

Values (Mean±SD, n=6).

### (3) 육계에서 생리활성 소재를 이용한 면역 관련 유전자 mRNA 발현 조절 연구

육계에 비타민 C 첨가 및 LPS 처리 후 채취한 면역조직 (간, 비장 및 흉선)에서 조사한 면역관련 친염증사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)의 발현은 Table 4-7과 같다. 먼저 간 조직에서 비타민 C 급여는 따른 친염증사이토카인중에서 IL-1beta, IL-6 및 IL-18 과 같은 유전자의 발현을 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 감소시키는 것으로 나타났다. LPS 처리 역시 TLR4, IFN-gamma, IL-18의 유전자 발현에 유의적인 ( $P<0.05$ ) 영향을 미쳐 이들 유전자가 현저하게 발현이 증가되는 것으로 나타났다.

비장 조직에서 조사한 친염증 사이토카인 mRNA 발현을 살펴보면, 비타민 C 급여에 따라 대부분의 친염증 사이토카인 유전자의 mRNA 발현에는 현저한 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 그러나 LPS 감염처리 후 조사한 모든 친염증사이토카인 (TLR4, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18) 등이 유의적으로 ( $p<0.05$ ) 감소되는 것으로 나타났다. 흉선 조직에서는 비타민 C 또는 LPS처리가 이들 친염증사이토카인의 발현에는 어떠한 영향을 미치지 않는 것으로 나타난다.

본 연구에서도 질병방어에 중추적인 역할을 담당하는 면역기관 (간, 비장 및 흉선)에서 감염스트레스(LPS)와 항산화물질(비타민 C) 급여에 따른 면역반응을 조사하였다. 감염 등과 같은 반응에서 면역작용을 개시하는 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 IL-2와 IFN- $\gamma$ 를 분비한다. Th-2은 IL-4, IL-10 등을 생성한다. 또한 친염증 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine) 유전자로서는 IL-1beta, IL-6, IFN- $\gamma$  및 IL-18 등이 존재하며, 이들 유전자는 감염부위의 면역세포 작용을 활성화시킨다. Toll-like receptors (TLRs) 유전자는 선천성 면역에서 중요한 역할을 수행하는 유전자로서 일반적으로 미생물 감염 시 발현이 현저히 증가된다. 친염증사이토카인 유전자 발현이 항산화 물질 비타민 급여시 증가되는 것은 Zhao 등 (2010)이 비타민 E를 닭에게 급여하였을 때 오히려 친염증 사이토카인인 IL-1 유전자의 발현을 증가시키고 Newcastle disease virus (NDV) 항체가 증가되는 것으로 보고하였다. 또한 Puthpongiriporn 등 (2001)은 비타민 C (1,000 mg/kg)와 E(65 IU)를 산란계에 급여한 결과 ConA 및 LPS 림프구의 증식이 항산화 비타민 급여시에 현저히 증가되는 것으로 보고하였다. 그러나 또 다른 연구에서는 육계에서 비타민 E 급여가 LPS 투여에 따른 친염증 사이토카인의 유전자 (IFN-gamma, IL-1beta, IL-6) 및 항염증사이토카인 (IL-4) 모두를 감소시킨다고 보고하였다.

본 시험에서는 간, 비장 및 흉선조직에서 이들 친염증 사이토카인 유전자는 조직 특이적으로 반응하는 것으로 관찰되었다. 간 조직에서는 LPS처리에 따라 이들 유전자의 발현이 증가되고 비타민 C 급여에 따라 친염증 사이토카인의 발현을 감소시키므로 비타민 C가 감염스트레스를 완화시키는 것으로 사료된다. 그러나 비장조직에서는 고수준의 LPS 처리에 따라 오히려 이들 친염증 사이토카인 유전자 발현이 완전히 감소되고 비타민 C의 효과는 없는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 아마도 본 시험에서 사용된 고농도의 LPS (5mg/kg)가 육계에서 후천성 면역세포가 다량 생성되는 비장세포를 사멸하는 수준으로 면역 유전자를 파괴하는 심각한 독성을 유발하였기 때문으로 추정된다. 한편 흉선에서는 LPS 및 비타민 C 처리에 따른 차이가 없어 감염 및 항산화물질이 크게 작용하지 않는 것으로 보인다. 특히 닭에서 중요한 면역기관인 비장에서 LPS 처리에 따른 친염증 사이토카인 유전자는 일반적으로 친염증 사이토카인 mRNA 발현을 증가시켜 질병을 방어하고자 하는 항상성기전이 발생하는 것으로 알려져 있으나, 본 시험에서는 반대의 결과가 초래되어 향후 LPS dose-dependent에 따른 이들 스트레스 지표의 발현에 대한 연구도 중요할 것으로 생각된다. 비타민 C 및 LPS 투여에 따른 결과, data는 제시하지 않았지만, 본 연구에서 예비시험으로 LPS를 주입하는 농도설정 과정에서 vitamin C 급여구에서는 1마리도 폐사되지 않았지만, 일반사료급여구에서는 대량으로 많은 폐사가 발생되어 실제 비타민 C급여가 LPS 투여에 따른 폐사를 감소시킬 수 있다는 흥미로운 가능성이 제시되었다.

결론적으로 감염스트레스에 따른 스트레스 지표로서 면역조직에서 친염증 사이토카인의 발현 및 특정 혈액지표 (corticosterone, TAS, uric acid 등)은 매우 중요한 지표로서 이용될 수 있으며 스트레스 연구에서 다양한 내외적 스트레스, 감염 수준 정도, 면역 조직별, 동물 품종 (유전), 항산화 물질과 같은 기능성 물질 등이 이 체내 항상성조절에 미치는 영향은 매우 다양하여 이에 대한 지속적인 연구가 요구된다. 또한 닭에서 감염 스트레스와 감염스트레스를 완화할 수 있는 기능성 물질 등에 대한 연구는 질병예방 및 치료와 더불어 가축사양에서 스트레스 방지를 위한 중요한 분야이므로 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다.

다. 결론

동물체는 질병감염, 사육환경 등과 같은 스트레스와 체 조직에서 대사과정에서 발생하는 각종 대사산물 등과 같은 내·외부환경에 대하여 신체 반응을 유기하여 체조직의 항상성을 유지한다. 스트레스 유발 시 체 조직은 감염에 따라 연쇄적 반응으로 항상성을 유지하는데, 먼저 HPA (hypothalamus-pituitary axis)축을 활성화 시켜서 교감신경계가 짧은 동안 활성화가 되게 되면 우리 몸의 면역계를 강화시켜 몸을 보호하는데 도움을 주게 된다. 즉 뇌의 시상하부 및 뇌하수체에서 방출되는 ACTH와 같은 특히 corticosterone 수준을 증가시켜 면역작용에 필수적인 체내 에너지(혈당) 대사를 증가시켜 스트레스를 방어한다. 또한 스트레스 반응에 따라 생성된 분비계 (스트레스호르몬)는 면역계(사이토카인)와 상호작용을 통해서 면역반응증가로 항상성을 유지한다. 3차년도 연구에서는 스트레스 저감물질로서 항산화 비타민(C 및 E)을 투여하여 사양시험을 실시하고 사양성적이 우수한 비타민 C 급여 육계에서 LPS 감염 스트레스를 실시하여 항산화물질 투여에 따른 생리 및 면역반응을 조사하여 스트레스 정도를 조사하였다. 본 연구 결과에서 육계사양시험 결과 비타민 C 및 E 급여는 닭의 체중, 사료효율, 폐사율 등과 같은 생산성에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 흥선의 상대적 무게는 항산화비타민 (C 및 E) 첨가구에서 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 증가된 것으로 나타났다. 혈액에서 ALP, albumin, cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol 등은 vitamin C 급여에 따라 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 변화되고 LPS 처리에 따라 AST, ALT, BUN, glucose, Ca, P, uric acid,  $\gamma$ -GTP, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 등과 같은 성분은 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 변화되었다. 육계에서 감염스트레스로서 LPS 처리에 따라 corticosterone의 분비가 현저히 ( $P<0.05$ ) 증가되었으며, LPS처리 후 비타민 C를 급여할 경우 corticosterone 농도가 현저하게 ( $P<0.05$ ) 감소되는 것으로 보아 비타민 C가 감염스트레스를 완화하는 효과가 있는 것으로 기대된다. 면역기관인 비장에서는 고수준의 LPS 처리가 모든 친염증사이토카인 발현을 오히려 감소시키고 비타민 C 처리는 친염증사이토카인 mRNA 발현에는 어떠한 영향을 미치지 않았다. 한편 간 조직에서는 항산화 비타민 C의 친염증 유전자 완화작용이 뚜렷한 것으로 보아 간 조직에서 LPS의 감염독성을 완화시킬 수 있다는 것으로 해석된다. 따라서 닭에서 감염스트레스가 혈액에서 각종 대사산물 및 스트레스 호르몬 및 간의 친염증사이토카인 반응에 영향을 미쳐 엄청난 스트레스를 야기하는 것으로 보이며, 비타민 C와 같은 항산화비타민 급여는 일부 스트레스지표를 완화하는 것으로 나타나 감염스트레스 저감물질로서 가능성이 높다.

결론적으로 감염스트레스에 따른 스트레스 지표로서 면역조직에서 친염증 사이토카인의 발현과 혈액의 특정 지표 (corticosterone, TAS, uric acid 등)는 매우 중요한 지표로서 이용될 수 있으며 지금까지 사육밀도, 사료절식 스트레스 및 감염스트레스 연구에서 닭의 각종 스트레스에서 사이토카인발현은 강력한 스트레스 지표로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 농장동물 복지 연구를 위해 지금까지 실시한 환경(사육밀도), 에너지 섭취량 및 감염 스트레스 반응은 동물의 품종, 면역조직 및 영양 요인 등에 따라 많은 영향을 받으므로 스트레스 바이오마커 및 응용 연구는 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 4-7. The effects of vitamin C supplementation and LPS challenges on mRNA expression of pro-inflammatory cytokines using Real-time PCR in broiler chicks

Item	Treatment								Pooled SE	Significance (P-value)		
	Non-vitamin C diet				Vitamin C diet					Vitamin C	LPS	Interaction
	Non-LPS		LPS		Non-LPS		LPS					
	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
Liver												
TLR4	14.58 <sup>#</sup>	1	14.35	1.17	15.75	0.44	13.91	1.59	0.35	0.46	0.05	0.11
IFN- $\gamma$	9.70	1	7.64	4.15	13.02	0.10	6.71	7.95	0.36	0.10	0.0001	0.0006
IL-1 $\beta$	7.58	1	6.55	2.04	9.00	0.37	9.05	0.36	0.42	0.001	0.19	0.32
IL-6	10.89	1	10.36	1.45	14.42	0.09	12.71	0.28	0.61	0.003	0.21	0.50
IL-18	7.89	1	4.35	11.62	8.60	0.61	5.62	4.80	0.24	0.001	0.0001	0.20
Spleen												
TLR4	9.06	1	11.74	0.16	6.73	5.03	11.79	0.15	0.55	0.10	0.004	0.01
IFN- $\gamma$	4.09	1	5.41	0.40	1.55	5.79	9.43	0.02	0.66	0.59	0.0028	0.002
IL-1 $\beta$	3.70	1	6.54	0.14	2.11	2.99	6.17	0.18	0.62	0.20	0.003	0.36
IL-6	6.47	1	8.87	0.19	4.47	4.00	10.17	0.08	0.75	0.36	0.002	0.09
IL-18	3.76	1	5.07	0.40	2.01	3.37	5.62	0.28	0.39	0.22	0.001	0.006
Thymus												
TLR4	9.96	1	9.53	1.35	8.92	2.06	10.68	0.61	0.34	0.91	0.18	0.03
IFN- $\gamma$	6.71	1	5.93	1.72	5.53	2.27	6.77	0.96	0.32	0.71	0.63	0.04
IL-1 $\beta$	4.77	1	4.67	1.07	4.06	1.63	5.87	0.47	0.35	0.62	0.10	0.07
IL-6	6.17	1	5.94	1.18	6.65	0.72	7.91	0.30	0.48	0.09	0.45	0.28
IL-18	5.05	1	4.79	1.19	4.22	1.19	6.28	0.43	0.40	0.57	0.13	0.06

<sup>#</sup>The values are  $\Delta Ct$ , which is represented as the Ct of each target gene corrected by Ct of the control gene (RPL27). Values (Mean $\pm$ SD, n=6). The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

2. 육계에 비타민 C 및 E의 첨가 급여가 telomere 함량 및 스트레스 연관 DNA 유전자 발현에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

(1) 공시계 및 시험구

본 연구에 이용된 공시계는 실용브로일러(로스종) 216수를 대상으로 하였고, 처리구당 54수씩 완전임의 배치하여 대조구(CON, control)와 비타민 C(Ascorbic acid, 99.8%, VC) 200mg/kg, 비타민 E(Alpha-tocopherol acetate 50%, VE) 100mg/kg 및 비타민 C(200mg/kg)+E(100mg/kg)(VC+VE) 4처리군으로 설정하여 35일령까지 사양시험을 실시하였다.

(2) 조직 표본 제작

텔로미어의 함량 분석은 혈액, 간, 비장 및 정소조직을 대상으로 하였으며, 3주령 및 5주령에 채혈하고 시험종료시 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. 혈액세포 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) 양적형광접합법에 의한 telomeric DNA 함량 분석

Chicken telomeric DNA probe를 이용하여 다음과 같이 간기 핵 양적형광접합법 (quantitative fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei ; IQ-FISH)을 수행하였다. 슬라이드 표본을 RNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 에탄올로 탈수 건조시켰다. 이후 Hybridization 용액 (13 $\mu$ l formamide, 5  $\mu$ l hybridization buffer, 2 $\mu$ l(100ng/ $\mu$ l) chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨린 후 밀봉하고 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성(denaturation)시킨 후 38.5 $^{\circ}$ C에서 12시간이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2× SSC로서 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 적녹 파장대의 필터 (WIB filter)를 부착한 형광 현미경 (Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 처리된 슬라이드를 형광현미경으로 관찰한 후 평균 5개의 간기

핵을 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) Comet assay

1% agarose gel에 슬라이드를 담군 후 이를 제거하고 건조시켰다. 10 $\mu$ l 혈액을 75 $\mu$ l 0.5%LMPA(low melting point agarose made in Dulbecco's buffered saline)에 혼합하여 슬라이드 위에 떨어뜨리고 커버슬라이드로 덮은 후 냉장 상태로 굳혔다. 굳은 상태에서 커버슬라이드를 제거하고 80 $\mu$ l 1%LMPA를 도포하여 굳힌 후 4 $^{\circ}$ C lysis solution에 60분간 침지하였다. Lysis solution을 제거 후 조심스럽게 전기영동장치에 거치 후 electrophoresis buffer(pH>13)를 채웠다. 10분정도 침지후 25V, 300mA로 30분간 전기영동하고 건조 후 중성 buffer에 5분간 정착한다. 건조된 슬라이드는 80 $\mu$ l propidium iodide(0.4 $\mu$ g/ml)로 5분간 염색하고 냉장 초자수로 수세후 형광현미경(AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 관측된 상은 디지털카메라로 촬영하고 Comet Score software v1.5(TriTek Corp. Sumerduck, VA, USA)로 분석하였다. 분석항목으로는 1) % DNA in tail로 전체 Comet intensity 대비 tail intensity의 비율, 2) Tail Moment로서 tail내 DNA생성률(%) 및 3) Olive Moment (tail intensity $\times$ head까지의 상대적거리/total Comet intensity)를 조사하였다.

#### (4) HSP 유전자 발현 분석

HSP 유전자 발현 분석을 위하여 RNA를 분리 정제 후 cDNA를 합성하고 HSP70, 90- $\alpha$ , 90- $\beta$  및 HMGR primer를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다(Table 4-8). PCR의 condition은 cDNA 1 $\mu$ l, primer(5pmole)는 각각 0.5 $\mu$ l, SYBR Green 10 $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 8 $\mu$ 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 SYBR이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다.

#### (4) 통계분석

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

### 나. 결과 및 고찰

#### (1) 비타민 첨가 급여에 따른 Telomeric DNA 함량 분석

실용 브로일러를 대상으로 항산화 및 생리활성물질 첨가 급여가 개체별 스트레스 정도에 미치는 영향을 살펴보고자 각 조직별 세포들에 대한 텔로미어 함량을 분석하였다. 처리별 비타민 첨가 급여는 3일령에서부터 35일령까지 실시하고 3주령에 각 처리별 12수씩 혈액을 채취하여 분석하고 동일 개체를 대상으로 35일령 시험종료 때 도살하여 혈액, 간, 비장 및 정소 조직 세포의 텔로미어의 함유율을 분석하였다. 각 조직들의 텔로미어 함량은 Q-FISH 분석 방법으로 개체별 최소 150개 이상의 세포에 대해 분석하였다.

Table 4-8. Primers used for the quantitative real-time polymerase chain reaction

Genes	Primer	Sequence(5'-3')	Size	Tm(°C)
HSP70	Forward	ATGCTAATGGTATCCTGAACG	145bp	60
	Reverse	TCCTCTGCTTTGTATTTCTCTG		
HSP90 $\alpha$	Forward	CAGAAGATGAAGAGAAGAAGA	133bp	60
	Reverse	GGAGAAGTTACCAAGCGATT		
HSP90 $\beta$	Forward	TGTAGTAATGGCGAACCTAA	84bp	60
	Reverse	TCAGAGCGTAAGACCTAAC		
HMGR	Forward	GAGGCAGAGCAAGATGAAG	113bp	60
	Reverse	GCAGGACAGTAGGTGAGT		
Actin	Forward	CCACCGCAAATGCTTCTA	96bp	60
	Reverse	GCCAATCTCGTCTTGTTTTATG		

Table 4-9는 처리구별 개체들의 혈액내 백혈구 세포의 텔로미어 함유율을 분석 제시한 값으로 3주령 때는 처리구별 차이가 없었으나 5주령 시험 종료시 비타민 첨가급여구가 대조구에 비해 유의하게 높은 telomeric DNA 함량을 나타내었다. 또한 동 기간의 개체별 텔로미어 감축율에 있어서도 대조구가 비타민 첨가 급여구에 비해 월등히 높은 감축율을 보였다. 본 결과에서 나타난 바와 같이 초기 비타민의 첨가 급여가 단 시간에 개체의 백혈구 세포에 생리활성도에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되나 35일령 시험 종료시 점진적 효과가 누적되면서 비타민 첨가급여에 따른 항산화적 생리활성도가 세포에 영향을 미치는 것으로 나타난다. 텔로미어 감축은 연령이 증가함에 따라 당연히 감축되는 양상을 보이거나 감축율의 정도는 많은 환경적 요인에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이들 중 항산화물질의 급여가 텔로미어의 감축 정도를 유의적으로 완화시킨다는 많은 보고들이 있다. 특히 비타민 C나 E와 같은 생리활성보조제의 경우 상당히 효과적으로 텔로미어 감축 속도를 늦추는 효과가 있는 것으로 알려지고 있다 (Shen 등, 2009; Xu 등, 2009; Wolkowitz 등 2011). 본 시험에서도 육계의 경우 비타민 E의 첨가 급여는 무첨가 급여구에 비해 텔로미어 감축 속도가 2배 이상 완화되는 결과를 보였다. 한편 텔로미어 함량에 있어 비타민 C와 E를 함께 급여하는데 따른 상호작용이 존재하는 것으로 보이고 비타민 C의 효과보다는 E의 효과가 우수한 것으로 나타났다.

시험 종료시 비타민의 첨가 급여가 각종 조직의 텔로미어 함량에 미치는 영향을 분석한 바 Table 4-10과 같은 결과를 나타내었다. 간을 제외한 비장, 정소의 경우 비타민 첨가 급여에 따른 텔로미어 함량의 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 간 조직의 경우 비타민 E 첨가가 텔로미어 함량을 유의적으로 높게하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 비타민 E가 면역관련 생리활성물질이므로 간의 생리활성도에 긍정적으로 영향하기 때문인 것으로 사료된다. 본 연구는 가시오갈피나 두충과 같은 천연 생리활성물질의 첨가가 텔로미어 감축을 완화한다는 이전 보고와도 잘 일치되는 결과이다 (손 등, 2008).



Table 4-9. The effect of vitamin supplements on the amount of telomeric DNA of lymphocytes in broiler chickens

Treatments	Con	T1	T2	T3	p-value
No. of chicks	12	11	12	13	
ATD at 3wks	2.84±0.27	2.87±0.39	2.98±0.54	3.10±0.38	0.4022
ATD at 5wks	2.47±0.21 <sup>b</sup>	2.72±0.21 <sup>ab</sup>	2.83±0.38 <sup>a</sup>	2.85±0.24 <sup>a</sup>	0.0050
TSR	0.37±0.22 <sup>a</sup>	0.28±0.13 <sup>ab</sup>	0.14±0.22 <sup>b</sup>	0.16±0.14 <sup>ab</sup>	0.0172

Con(control), T1(Vitamin C supplement, 200mg/kg feed), T2(Vitamin E supplement, 100mg/kg feed) and T3(Vitamin C+E supplement), ATD(amount of telomeric DNA) and TSR(telomere shortening rate from 3wks to 5wks).

<sup>a,b</sup>Values (Means±SD) with different superscripts within row significantly differ (p<0.05).

Table 4-10. The effect of vitamin supplements on the amount of telomeric DNA of tissues in 5wks broiler chickens

Treatments	Con	T1	T2	T3	p-value
No. of chicks	12	9	10	11	
Liver	2.39±0.17 <sup>b</sup>	2.55±0.21 <sup>ab</sup>	2.61±0.26 <sup>a</sup>	2.68±0.25 <sup>a</sup>	0.0211
Spleen	2.47±0.30	2.68±0.20	2.63±0.34	2.65±0.29	0.3280
Testis	2.71±0.19	2.87±0.08	2.91±0.16	2.83±0.13	0.1242

Con(control), T1(Vitamin C supplement, 200mg/kg feed), T2(Vitamin E supplement, 100mg/kg feed) and T3(Vitamin C+E supplement)

<sup>a,b</sup>Values (Means±SD) with different superscripts within row significantly differ (p<0.05)

## (2) 비타민 첨가 급여에 따른 DNA 손상을 분석

본 연구에서는 실험브로일러를 대상으로 비타민 C 및 E 첨가 급여에 따른 세포내 DNA 손상을 comet assay 방법으로 분석하고, 대조구와의 차이를 검토하여 비타민의 첨가 급여가 개체의 스트레스 완화 작용이 있는가를 살펴보았다.

Comet assay는 DNA fragmentation의 정도를 나타내는 것으로 comet score는 전체 대비 tail intensity의 비율(% DNA in tail), tail내 DNA생성률(Tail Moment) 및 tail intensity×head까지의 상대적거리/total comet intensity(Olive Moment)로 분석하였다. 분석 결과 모든 항목에서 대조구가 비타민의 첨가 급여구에 분석 값이 높은 것으로 나타나 비타민의 첨가 급여가 DNA 손상에 유의한 완화효과가 있는 것으로 생각된다 (Table 4-11). 한편 비타민 C와 비타민 E 급여구간의 DNA 손상을 차이는 없는 것으로 보여지며, 이들 간의 상호작용이 존재함에 따라 두 가지를 함께 급여하더라도 이에 따른 상승 효과는 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과들은 비타민의 첨가 급여가 세포의 항산화 효과 및 생리활성도를 진작시켜 세포의 apoptosis를

현저히 개선시킨다는 것을 의미하는 것으로 비타민이 개체들에게 중요한 스트레스 경감 또는 완화제재임을 시사한다.

Table 4-11. The rates of DNA fragmentation of lymphocytes at 5 weeks broiler with vitamin supplements

Treatment	No. of chickens	% in tail	tail moment	olive moment
C	12	38.55±5.08 <sup>a</sup>	59.99±9.47 <sup>a</sup>	41.42±5.06 <sup>a</sup>
T1	8	27.19±3.78 <sup>b</sup>	51.04±10.04 <sup>ab</sup>	30.41±5.64 <sup>b</sup>
T2	10	26.19±3.16 <sup>b</sup>	40.58±10.72 <sup>b</sup>	23.61±6.65 <sup>b</sup>
T3	11	27.18±6.18 <sup>b</sup>	41.70±18.90 <sup>b</sup>	28.19±10.31 <sup>b</sup>
p-value		<.0001	0.0034	<.0001

Con(control), T1(Vitamin C supplement, 200mg/kg feed), T2(Vitamin E supplement, 100mg/kg feed) and T3(Vitamin C+E supplement)

<sup>a,b</sup>Values (Means±SD) with different superscripts within column significantly differ (p<0.05).

### (3) 비타민 첨가급여에 따른 HSP 및 HMGCR 유전자 발현량 분석

본 연구에서는 실용 브로일러에 있어 비타민 C 및 E의 첨가급여가 스트레스 관련 유전자인 HSP70, HSP90- $\alpha$ , HSP90- $\beta$  및 HMGCR 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하고자 처리 후 5주령 개체의 혈액으로 분석하였다. Table 4-12에 제시된 바와 같이 대조군과 비타민 첨가 급여군에 대한 HSP70, HSP90- $\alpha$ , HSP90- $\beta$  및 HMGCR의 유전자 발현량은 HSP70의 발현을 제외하고는 모든 급여처리구가 대조구에 비해 유의하게 낮은 수준을 나타내었다.

Table 4-12. The mRNA expression levels of HMGCR, HSP70 and HSP90 in blood of broilers feeding with vitamin supplement

Gene	C		T1		T2		T3		p-value
	$\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta}$ <sub>Ct</sub>	$\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta}$ <sub>Ct</sub>	$\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta}$ <sub>Ct</sub>	$\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta}$ <sub>Ct</sub>	
HMGCR	7.97±0.98 <sup>b</sup>	1	8.63±0.45 <sup>b</sup>	0.63	8.78±0.83 <sup>b</sup>	0.57	10.73±0.55 <sup>a</sup>	0.15	<0.0001
HSP90- $\alpha$	6.50±1.10 <sup>b</sup>	1	7.88±0.88 <sup>ab</sup>	0.38	8.26±0.86 <sup>a</sup>	0.30	7.18±0.62 <sup>ab</sup>	0.62	0.0127
HSP90- $\beta$	5.14±0.97 <sup>c</sup>	1	6.40±0.66 <sup>bc</sup>	0.42	7.83±0.53 <sup>a</sup>	0.15	6.84±0.99 <sup>ab</sup>	0.31	0.0004
HSP70	5.36±0.90	1	5.66±1.43	0.81	6.50±1.74	0.45	7.13±0.50	0.29	0.0841

Con(control), T1(Vitamin C supplement, 200mg/kg feed), T2(Vitamin E supplement, 100mg/kg feed) and T3(Vitamin C+E supplement)

<sup>a,b</sup>Values (Means±SD) with different superscripts within row significantly differ (p<0.05)

$\Delta$ Ct is equal to the difference in threshold cycles for target and internal control gene ( $\beta$  actin);  $2^{-\Delta\Delta}$ t indicates the fold change in gene expression relative to the control. HMGCR (hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase). HSP(heat shock protein).

그러나 HSP70의 경우 첨가 급여에 따른 발현율의 차이를 볼 수 없음에 따라 닭의 스트레스 예측 표지 유전자로서의 가능성이 낮아 보인다. Heat shock protein들은 환경적 스트레스에 의해 합성되어지는 잘 보존된 단백질 계(family)로서 환경변화에 대처할 수 있도록 관련 기작들을 유도하고, HMGCR은 cortisol의 생합성을 조절하는 것으로 스트레스 사육에 따른 HMGCR의 발현 증가는 간접적으로 혈액과 간에서 cortisol의 증가를 뒷받침하여 준다고 할 수 있다. HSP 발현율과 스트레스간의 상호관계는 가금류에서 많은 조사 보고는 없으나 Beloor 등(2010)이 사육 밀도가 증가됨에 따라 HSP70 및 HMGCR의 발현량이 증가하고 HSP90은 유의적 차이가 없는 것으로 분석하였다. 이는 본 결과와는 다소 차이가 있는 것으로 이들이 사용한 HSP90 유전자와 본 분석에 이용된 HSP90- $\alpha$  및 HSP90- $\beta$ 는 다른 종류의 것으로 판명되었다. 통상 인간에서 많이 이용되는 HSP90은 닭에서는 잘 발현이 일어나지 않는 것으로 알려져 있다. 이상의 분석 결과 비타민 C 및 E의 첨가 급여는 스트레스 관련 유전자들의 발현에 유의적 영향을 미치는 것으로 나타남으로 이의 첨가 급여가 개체의 스트레스 완화에 많은 도움이 되는 것으로 사료된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절 목표 달성도

#### 1. 닭의 스트레스 관련 표지 물질 개발 (1차년도)

연구 개발 목표	평가 착안점 및 연구개발 내용	달성도(%)
1. 닭 사육 방식에 따른 스트레스 실증 시험 및 생산성 비교 분석	세포 노화 지표로 알려진 telomeric DNA 함량 분석	100
	스트레스 관련 유전자 및 단백질 발현 양상 분석	100
	COMET assay에 의한 DNA 손상을 분석	100
2. 닭의 면역 및 스트레스 표지 물질 개발 및 실용화 연구	스트레스 유발에 따른 닭의 혈액학적 면역 및 스트레스 성장 조사	100
	스트레스에 따른 면역 관련 유전자 발굴 및 발현 양상 분석	100
	닭 스트레스 관련 표지 물질의 선정	100

#### 2. 산란계 사육 형태에 따른 스트레스 정도 및 생산성 분석 (2차년도)

목표	연구개발 수행 내용	달성도(%)
닭 사육 방식에 따른 스트레스 실증 시험 및 생산성 비교 분석	산란계의 계사사육형태에 따른 스트레스 실증 시험	100
	계사사육형태에 따른 생산능력 비교분석	100
	계사사육형태에 따른 스트레스 관련 유전자 및 단백질 발현분석	100
닭의 면역 및 스트레스 표지물질을 이용한 실증 연구	산란계의 사육방식 (케이지 및 방사에) 따른 체중 및 장기무게 조사	100
	산란계의 사육방식에 따른 혈액의 스트레스 지표분석	100
	산란계의 사육방식에 따른 면역조직의 사이토카인 발현 분석	100

3. 육계의 사육밀도 및 생리활성 물질 첨가 급여에 따른 스트레스 관련 표지 물질의 발현 양상과 생산성 비교 분석 (3차년도)

목표	연구개발 수행 내용	달성도(%)
육계 사육밀도 및 생리활성 물질 첨가 급여에 따른 스트레스 정도와 생산성 분석	육계 사육 실증 시험	100
	사육 밀도에 따른 스트레스 영향 분석	100
	생리활성물질 첨가 급여에 따른 스트레스 완화 및 생산성 비교 분석	100
육계에서 생리활성 소재를 이용한 스트레스 감소 및 생산성 비교 연구	육계에서 생리활성 소재 탐색 및 생산성 연구	100
	육계에서 생리활성 소재를 이용한 스트레스 및 면역 관련 유전자 발현 조절 연구	100

## 2절 관련 분야 기여도

### 1. 기술적 측면

- 1) 닭의 환경스트레스와 유전자 발현양상의 상호관계를 규명하여 관련 유전자를 stress-marker 로 제시
- 2) 사육 방식 및 사육밀도와 관련하여 스트레스 정도 분석
- 3) 육계의 스트레스 저감 항산화 소재 발굴

### 2. 경제, 산업적 측면

- 1) 환경스트레스에 의한 동물 반응을 조절하는 유전자들을 분석함으로써 닭의 생산성 및 복지를 고려한 사육 환경 제안
- 2) 항산화 사료 첨가제 발굴로서 육계의 스트레스 저감 효과 제시
- 3) 스트레스 관련 적정 사육밀도 분석으로 복지개념의 사육환경 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	교신저자	공동저자				
2009. 12	닭의 모체 연령에 따른 생산 배아의 염색체 이상 빈도 및 텔로미어 함량 분석	이수희	손시환	Subramani, VK	한국가금학회지	36(4):293-300	국내등재지	
2010. 3	산란계에 천연 항산화원으로 가시오갈피 및 두충급여가 체내 항산화 작용에 미치는 영향	강선영	장인석	손시환	한국가금학회지	37(1):15-21.	학진등재지	
2010. 4	The Effect of Stocking Density on Stress Related Genes and Telomeric Length in Broiler Chickens	J. Beloor	문양수	손시환 장인석	Asian-Aust. J. Anim. Sci.	Vol 23(4):437-443	국외	SCI
2010. 9	한국 재래닭 염색체의 텔로미어 분포 양상	손시환	손시환	조은정	한국가금학회지	37(3):247-253	학진등재지	
2010. 10	혈액세포의 텔로미어 함량을 이용한 소의 연령예측	최나은	손시환	김현섭 최장용 전광주	한국동물자원과학회지	52(5):367-374	학진등재지	
2011. 3	Effects of the Combined Stress Induced by Stocking Density and Feed Restriction on Immunological Parameters as Stress Indicators in Laying Hens.	강선영	장인석	손시환	Asian-Aust. J. Anim. Sci.	Vol 24(3-4)	국외	SCI
2011. 3	Age Prediction in the Chickens Using Telomere Quantity by Quantitative Fluorescence In situ Hybridization Technique	Y. J. Kim	S. H. Sohn	V. K. Subramani	Asian-Aust. J. Anim. Sci.	24(5):603-609	국외	SCI
2011. 12	계사 사육 형태가 산란계의 생산성과 스트레스 반응에 미치는 영향	손시환	손시환	장인석, 손보람	한국가금학회지	38(4):305-313	학진등재지	
2012. 4	Telomeric DNA quantity, DNA damage and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens	S. H. Sohn	S. H. Sohn	V. K. Subramani, Y. S. Moon, and I. S. Jang	Poultry Science	91(4):829-836	국외	SCI

나. 학술 발표

- 1) 최나은, 김영주, 이수희, Vinod, 정경욱, 손보람, 손시환. 2009. 한우의 텔로미어 함량분석을 이용한 연령예측함수 개발. 2009 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceedings Vol. II:64. 순천대학교, 순천(2009. 6. 26)
- 2) VK Subramani, YJ Kim, SH Lee, NE Choi, BR Son, KW Jung, SH Sohn. 2009. Telomere amount and DNA damage as physiological stress marker in chicken. 2009 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceedings Vol. II:67. 순천대학교, 순천(2009. 6. 26)
- 3) 이수희, Vinod K. Subramani, 손시환. 2009. 닭의 산란 연령에 따른 초기 배자의 염색체 이상빈도 및 telomere 함량 분석. 한국가금학회 제26차 학술발표회 Proceedings:59-61. 진주산업대학교, 진주 (2009. 11. 13)
- 4) Vinod K. Subramani, Soo Hee Lee, Na Eun Choi, Sea Hwan Sohn. 2009. Genetic and epigenetic factors affecting chicken telomere amount. 한국가금학회 제26차 학술발표회 Proceedings:69-71. 진주산업대학교, 진주 (2009. 11. 13)
- 5) 박진식, 조병욱, 손시환. 2010. 제주재래마의 핵형분석. 한국동물자원과학회 제11차 정기총회 및 춘계학술대회 학술발표회 Proceedings:118. 서울경마공원, 서울(2010. 2. 26)
- 6) Cho EJ, Subramani VK, Son BR, Lee BJ, Shin HL, Park DB, Kang DK, Sohn SH. 2010. Factors affecting chicken telomere dynamics. 2010 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceedings Vol. II:57. 진주산업대학교, 진주(2010. 6. 24)
- 7) Sohn SH, Subramani VK, Cho EJ. 2010. The amount of telomeres and rate of DNA damage between floor and cage raised chicken. 2010 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceedings Vol. II:57. 진주산업대학교, 진주(2010. 6. 24)
- 8) 손시환, 조은정. 2010. 닭 염색체의 telomeric DNA 분포 양상. 한국가금학회 제27차 학술발표회 Proceedings:140-142. 충남대학교, 대전 (2010. 11. 12)
- 9) Vinod K. Subramani, 조은정, 손보람, 손시환. 2010. 닭의 텔로미어 함량에 영향을 미치는 유전적, 환경적, 후생적 요인 분석. 한국가금학회 제27차 학술발표회 Proceedings:143-145. 충남대학교, 대전 (2010. 11. 12)
- 10) Sea H. Sohn, Vinod K. Subramani, Eun J. Cho, and Bo R. Son. 2011. Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Affecting Chicken Telomere Length. 9th Asia Pacific Poultry Conference. Book of Abstract pp339, Taipei, Taiwan (2011. 3.20-23)
- 11) Sohn SH, Subramani VK, Cho EJ, Moon YS. 2011. Identification of chicken stress markers using telomere length, DNA damage and HMGCR level. 2011 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceedings Vol. II:52. 부산대학교, 밀양(2011. 6. 23)
- 12) 이정엽, 손보람, 박단비, 조은정, 송혜란, 손시환. 2011. 동물별 염색체 분석을 위한 최적 혈액배양 조건에 관한 연구. 2011 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceedings Vol. II:53. 부산대학교, 밀양(2011. 6. 23)
- 13) 손보람, 조은정, 김황동, 김상엽, 손시환. 2011. 계사사육 형태에 따른 닭의 생산성 및 스트레스 관련 표지 비교. 2011 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceedings Vol. II:54. 부산대학교, 밀양(2011. 6. 23)
- 14) Sea H. Sohn, Vinod K. Subramani and Eun J. Cho. 2011. Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Affecting Chicken Telomere Length. Korea-Japan Joint Symposium



on Avian Biology. Seoul National University, Seoul. (2011. 7.11)

- 15) 박단비, 조은정, 손보람, 장인석, 문양수, 손시환. 2011. 닭의 생리적 스트레스 표지 탐색을 위한 텔로미어 함량, DNA 손상을 및 HSP 유전자 발현을 분석. 한국가금학회 제28차 학술 발표회 Proceedings:67-69. 천안연암대학, 천안 (2011. 11. 4)
- 16) 손시환, 조은정, 손보람, 장인석. 2011. 케이지 및 평사 사육 형태가 산란계의 생산성과 스트레스 반응에 미치는 영향. 한국가금학회 제28차 학술발표회 Proceedings:94-96. 천안연암 대학, 천안 (2011. 11. 4)

## 2. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명(상표출원)	출원인	출원국	출원번호
2010. 7.	텔로미어 함량을 이용한 닭의 나이 예측 방법	진주산업대학교 산학 협력단(손시환)	한국	10-2010-0071265
2010. 7.	텔로미어 함량을 이용한 소의 나이 예측 방법	진주산업대학교 산학 협력단(손시환)	한국	10-2010-0071262

## 3. 인력활용/양성 성과

### 가. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
31	2	8	8	13	15	16			31

### 나. 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
농업마이스터대학	가축개량교육	농림수산식품부	15	45	1,350명 (30명x45회)
농업마이스터대학	가축영양 생리교육	농림수산식품부	15	45	1,350명 (30명x45회)
농업마이스터대학	가축사료자원 학 교육	농림수산식품부	7	21	630명 (30명x21회)
실험동물기술사 양성교육	동물실험을 위한 영양 및 사료관리	한국실험동물 학회	1	3	200명

4. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
15			15			

## 2절 성과활용 계획

### 1. 학술적 측면

- 1) 가금에서의 스트레스 반응을 조절하는 유전자들의 작용기전을 밝히는데 기초 자료를 제공
- 2) HSP(HSP90, HMGCR) 유전자 발현량, telomere 함유율, 혈액세포의 DNA 손상을 및 iNOS 등 일부 cytokine 유전자 발현량을 가금의 스트레스 측정 표지로 개발 활용
- 3) 육계에서 항산화 및 생리활성물질 첨가 급여에 대한 생리적 효과를 분자생물학적으로 분석하여 그 기작에 대한 기초 자료를 제공

### 2. 산업적 측면

- 1) 닭의 스트레스 정도 및 생산성을 고려한 사육 방식 및 사육 밀도 제시
- 2) 육계에서 비타민 C, E의 첨가 급여가 스트레스 완화에 효과가 있는 것으로 나타남에 따라 이를 스트레스 저감제로 개발 활용
- 3) 산란계의 기존 사육방식인 케이지사 사육 등이 동물복지를 고려한 사육체계로 바람직하지 않음을 과학적으로 입증함에 따라 개선된 사육 방식 필요성 시사
- 4) 육계에 있어 동물복지를 고려한 적정 사육 밀도 설정과 사육 방식에 대한 참고 자료 제시

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

## 제 7 장 참고문헌

- Albentosa MJ, Cooper JJ. 2004. Effects of cage light and stocking on the frequency of comfort behaviors performed by laying hens in furnished cages. *Anim Welfare* 13:419-424.
- Basu N, Todgham AE et al. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295(2):173-83.
- Baxter MR. 1994. The welfare problems of laying hens in battery cages. *Vet Rec* 134:614-619.
- Beloor J, Kang HK, Kim YJ, Subramani VK, Jang IS, Sohn SH, Moon YS. 2010. The effect of stocking density on stress related genes and telomeric broiler chickens. *Asian-Aust J Anim Sci* 23:437-443.
- 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.
- Butterworth A. 2009. EU FP6 Welfare Quality® poultry assesment systems. *Korean J Poult Sci* 36:239-246.
- Caroprese M, Annicchiarico G, Schena L, Muscio A, Migliore R, Sevi A. 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.
- Chen JH, Hales CN, Ozanne SE. 2007. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res* 35:7417-7428.
- Cottliar AS, Slavutsky IR. 2001. Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61:335-342.
- 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.
- Delezie, E, Swennen Q, Buyse J, Decuypere E. 2007. The effect of feed withdrawal and crating density in transit on metabolism and meat quality of broilers at slaughter weight. *Polut. Sci.* 86:1414-1423.
- Feddes JJ, Emmanuel EJ, Zuidhofs MJ. 2002. Broiler performance, body weight variance, feed and water intake, and carcass quality at different stocking densities. *Poult Sci.* 81(6):774-9
- Felten SY, Madden KS, Bellinger DL, Kruszewska B, Moynihan JA, Felten DL. 1998. The role of the sympathetic nervous system in the modulation of immune responses. *Adv Pharmacol* 42:583-587.
- Freire R, Wilkins LJ, Short F, Nicol CJ. 2003. Behaviour and welfare of individual laying hens in a non-cage system. *Br Poult Sci* 44:22-29.
- Gornati R, Papis E, Simona R, Genciana T, Marco S, Giovanni B. 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* 341:111-118.
- Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation - Review. *J. Physiol. Pharmacol.* 54(4):469-487.
- Hangalapura BN, Nieuwland MG, De Vries Reilingh G, Buyse J, Van Den Brand H, Kemp B,

- Parmentier HK. 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.
- 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.
- Kang SH, Ko YH, Moon YS, Sohn SH, Jang IS. 2011. Effects of the combined stress induced by stocking density and feed restriction on hematological and cytokine parameters as stress indicators in laying hens. *Asian-Aust J Anim Sci* 24:414-420.
- Keles H, Fidan AF, Cigerci IH, Kucukkurt I, Karadas E, Dundar Y. 2010. Increased DNA damage and oxidative stress in chickens with natural Marek's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133(1):51-58.
- Langhout DJ. 2005. Development of European poultry industry in a global market. *Proceedings of 2005 KSPS International Symposium*:25-39.
- Lay DC Jr, Fulton RM, Hester PY, Karcher DM, Kjaer JB, Mench JA, Mullens BA, Newberry RC, Nicol CJ, O'Sullivan NP, Porter RE. 2011. Hen welfare in different housing systems. *Poult Sci* 90:278-94.
- Mashaly MM, Hendricks GL 3rd, Kalama MA, Gehad AE, Abbas AO, Patterson PH. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult Sci* 83:889-894.
- Mashaly MM, Webb ML, Youtz SL, Roush WB, Graves HB. 1984. Changes in serum corticosterone concentration of laying hens as a response to increased population density. *Poult Sci* 63:2271-2274.
- Meeker AK, Coffey DS. 1997. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. *Biochemistry* 62:1323-1331.
- 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.
- 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.
- Pohle K, Cheng HW. 2009. Comparative effects of furnished and battery cages on egg production and physiological parameters in White Leghorn hens. *Poult Sci* 88:2042-2051.
- Puvadolpirod S, Thaxton JP. 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poult. Sci.* 79(3):363-369.
- Richter T, Proctor C. 2007. The role of intracellular peroxide levels on the development and maintenance of telomere-dependent senescence. *Exp Gerontol*42:1043-1052.
- Rodenburg TB, Tuytens FA, Sonck B, De Reu K, Herman L, Zoons J. 2005. Welfare, health, and hygiene of laying hens housed in furnished cages and in alternative housing systems. *J Appl Anim Welf Sci* 8(3):211-226.
- Schlesinger JM. 1986. Heat shock proteins. *Journal of cell Biology* 103: 321-325.
- Shen J, Gammon MD, Terry MB, Wang Q, Bradshaw P, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santella RM.

2009. Telomere length, oxidative damage, antioxidants and breast cancer risk. *Int J Cancer* 124(7):1637-1643.
- Sherwin CM, Richards GJ, Nicol C. 2010. Comparison of the welfare of layer hens in 4 housing systems in the UK. *Br Poult Sci* 51:488-499.
- Singh R, Cheng KM, Silversides FG. 2009. Production performance and egg quality of four strains of laying hens kept in conventional cages and floor pens. *Poult Sci* 88:256-264.
- Sohn SH, Subramani VK, Moon YS, Jang IS. 2012. Telomeric DNA quantity, DNA damage and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens. *Poultry Science* 91(4):829 - 836
- Tactacan GB, Guenter W, Lewis NJ, Rodriguez-Lecompte JC, House JD. 2009. Performance and welfare of laying hens in conventional and enriched cages. *Poult Sci* 88:698-707.
- Thaxton JP, Dozier WA 3rd, Branton SL, Morgan GW, Miles DW, Roush WB, Lott BD, Vizzier-Thaxton Y. 2006. Stocking density and physiological adaptive response of broilers. *Poult Sci* 85:819-824.
- Turkyilmaz MK. 2008. Effect of stocking density on stress reaction in broiler chickens during summer. *Turk J Vet Anim Sci* 32(1):31-36.
- Tuytens FA, Sonck B, Staes M, Van Gansbeke S, Van den Bogaert T, Ampe B. 2011. Survey of egg producers on the introduction of alternative housing systems for laying hens in Flanders, Belgium. *Poult Sci* 90(4):941-950.
- Ulaner GA, Giudice LC. 1997. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol. Hum. Reprod.* 3(9):769-773.
- Vits A, Weitzenbürger D, Distl O. 2005. Comparison of different housing systems for laying hens in respect to economic, health and welfare parameters with special regard to organized cages. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 112:332-342.
- Von Zglinicki T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27:339-344.
- Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, Reus VI, Rosser R, Burke HM, Kupferman E, Compagnone M, Nelson JC, Blackburn EH. 2011. Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress-preliminary findings. *PLoS One* 6(3):e17837.
- Xu Q, Parks CG, DeRoo LA, Cawthon RM, Sandler DP, Chen H. 2009. Multivitamin use and telomere length in women. *Am J Clin Nutr.* 89(6):1857-1863.
- Zimmerman PH, Lindberg AC, Pope SJ, Glen E, Bolhuis JE, Nicol CJ. 2006. The effect of stocking density, flock size and modified management on laying hen behavior and welfare in a non-cage system. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 101:111-124.
- Zulkifli I, Che Norma MT, Israf DA, Omar AR. 2002. The effect of early-age food restriction on heat shock protein 70 response in heat-stressed female broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 43(1):141-145.
- 강선영, 이민희, 고영현, 손시환, 문양수, 장인석. 2010. 산란계에 천연 항산화원으로서 가시오갈피 및 두충 급여가 체내 항산화 작용에 미치는 영향. *한국가금학회지* 37(1):15-21
- 손시환, 류은경. 1999. Ficoll을 이용한 닭 염색체 분리 기법에 관한 연구. *진주산업대 농업기술*

연구소보 12:131-140

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, 장인석, 손보람. 2011. 계사 사육 형태가 산란계의 생산성과 스트레스 반응에 미치는 영향. 한국가금학회지 38(4):305-313

조은정, 최철환, 손시환. 2005. 닭의 발생 단계별 세포내 telomere의 양적 분포양상과 telomerase 활성도 분석. 한국동물자원과학회지 47(2):187-194



## 주 의

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