

육계에서 비타민 C 및 E의 첨가 급여가 성장 능력과 스트레스 반응에 미치는 영향

손시환[†] · 조은정 · 장인석 · 문양수

경남과학기술대학교 동물생명과학과

The Effects of Dietary Supplementation of Vitamin C and E on the Growth Performance and the Stress Response in Broiler Chickens

Sea Hwan Sohn[†], Eun Jung Cho, In Surk Jang, Yang Soo Moon

Department of Animal Science and Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT This study was performed to investigate the investigated effects of dietary supplementation of vitamin C and E on the growth performance and stress response in broiler chickens. Stress response was analyzed by 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 on tissues and blood. The telomere length and telomere shortening rates were analyzed by quantitative fluorescence *in situ* hybridization on the nuclei of lymphocytes and tissues. The DNA damage rate of lymphocytes was quantified by the comet assay. The expression levels of HSP70, HSP90s and HMGCR genes were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction in lymphocytes. In results, there was no significant difference among treatments in body weight, weight gain, feed intake and mortality. The telomere shortening rate of the lymphocytes was significantly lower in the vitamin E supplemented group than the control group. The DNA damage was also decreased supplemented with vitamin C and E, as compared to the control group. The vitamin E supplemented group had a significant positive effect on the expressions of HMGCR, HSP90- α and HSP90- β in lymphocytes, but had no significance on HSP70, as compared to the control group. We concluded that the dietary supplementation of vitamin E (100 mg/kg feed) had reduced the individual physiological stress response without stunt growth in broiler chickens.

(Key words : vitamin C, vitamin E, growth performance, stress, broiler)

서론

닭은 사육 기간 동안 사육 밀도, 온도, 이송 등과 같은 여러 외적 스트레스 요인뿐만 아니라 공포, 질병 등과 같은 많은 내적 스트레스 요인에 상시 노출되어 있다(Thaxton et al., 2006; Delezie et al., 2007; Keles et al., 2010). 일반적으로 동물이 스트레스에 노출되게 되면 체내 항상성 유지를 위하여 시상 하부-뇌하수체-부신피질 호르몬 축(hypothalamo-pituitary-adrenal axis)의 대사가 활성화 되고, 코티코스테론(corticosterone)의 방출이 증가한다고 알려져 있다(Harvey and Hall, 1990; Siegel, 1995). 따라서 생리적 스트레스는 대사 복합 체계의 질서를 혼란하게 하고, 항산화 방어 체계의

균형을 잃게 함으로써 건강 및 생산성의 저하를 초래하게 된다(Puvadolpirod and Thaxton, 2000; Poulsen et al., 2004).

가금에 있어 비타민 C 급여가 스트레스를 경감시킨다는 많은 연구 결과들이 보고되고 있다. 비타민 C는 항산화 체계에 주된 요소로서 스트레스에 기인된 영양소의 과도한 합성력이나 합성 손상을 조절하는 영양소적 조절작용을 하고, 더불어 부신에서 코티코스테로이드 합성 변화를 유기하여 면역 반응을 증강시키기도 한다(Pardue and Thaxton, 1984; Whitehead and Keller, 2003; Mahmoud et al., 2004; Gous and Morris, 2005; Maurice et al., 2007). 닭을 비롯한 가축들에 비타민 E 역시 코티코스테론을 적절히 억제하여 스트레스 경감에 매우 효과적인 물질로 알려져 있다(Watson and

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

Petro, 1982). 비타민 E는 비타민 C와 달리 닭의 경우 체내 합성이 불가능하여 반드시 사료로부터 섭취하여야 하는 것으로, 유리기에 의해 생성되는 지질 과산화 손상으로부터 세포와 조직을 보호하는 매우 효과적인 생물학적 항산화 제제이다(Halliwell and Gutteridge, 1989; Chan and Decker, 1994; Yu, 1994; Cherian et al., 1996; Hoehler and Marquardt, 1996). 닭에 있어 비타민 E의 항산화적 특성은 면역 반응을 촉진하는 역할로서 lymphocyte나 macrophage와 같은 면역세포들을 활성화 시키는 것이다(Gebremichael et al., 1984; Franchini et al., 1991; Kramer et al., 1991; Meydani and Blumberg, 1993).

한편, 동물의 스트레스 반응 정도를 분석하기 위한 다양한 생리적 표지들이 소개되고 있는데, 대표적으로 혈액 생화학적 지표와 혈장 코티코스테론(corticosterone) 농도가 스트레스 표지로 널리 알려져 있고(Mashaly et al., 1984; Thaxton et al., 2006; Turkyilmaz, 2008), interleukin-4(IL-4), IL-6, lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α 및 inducible nitric oxide synthase와 같은 사이토카인(cytokine)의 발현량 또한 면역 표지로서 스트레스 측정에 널리 이용되고 있다(Felten et al., 1998; Mashaly et al., 2004; Hangalapura et al., 2006; Kang et al., 2011). 그러나 이러한 표지들은 측정 조직이나 측정 시기 및 방법에 따라 심한 편차를 보여, 다소 신뢰성에 문제가 있는 것으로 제시되고 있다. 최근 세포 내 텔로미어(telomere)의 함량이나 DNA 손상율과 같은 DNA 관련 bio-marker들이 개체의 스트레스 정도를 가늠할 수 있는 새로운 표지로 대두되고 있다(Sohn et al., 2012). 염색체의 양 말단부를 지칭하는 텔로미어는 세포 분열이 거듭됨에 따라 길이가 짧아지는데, 이러한 텔로미어의 감축 양상이 노화의 지표뿐만 아니라 개체의 생리적 표지로 알려져 있다(Meeker and Coffey, 1997; Cottliar and 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(Von Zglinicki, 2002; Richter and Proctor, 2007). 한편, 살아있는 동물들에 있어 일정량의 DNA 소실과 손상은 정상적 생리 상태 하에서 극히 자연스러운 현상이나 이들에 스트레스 요인을 가하게 되면 세포사(apoptosis)가 촉진되어 DNA 파손(fragmentation) 정도가 급격히 증가된다(Chen et al., 2007). 따라서 개체의 DNA 손상율은 스트레스 반응 정도를 간접적으로 나타낼 수 있는 지표이다. 더불어 최근 heat shock protein(HSP) 계열의 유전자 및 hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase(HMGCR)의 유전자

발현율 또한 개체의 스트레스 반응 정도를 직접적으로 나타낼 수 있는 표지로 널리 알려지고 있다(Gornati et al., 2004; Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012).

따라서 본 연구에서는 실용 브로일러를 대상으로 항산화 및 생리 활성 물질로 알려진 비타민 C와 E의 첨가 급여가 개체별 성장 능력 및 스트레스 경감 정도에 미치는 영향을 살펴보고자 각 조직별 세포들에 대한 텔로미어 함량, DNA 손상율과 HSP 유전자 발현율을 분석하고 고찰하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 시험 설계

본 연구에 이용된 공시동물은 실용 브로일러(Ross종) 수컷 216수로서 구입 후 2일 간의 적응기간을 거친 후, 3일령부터 35일령까지 사양 시험을 실시하였다. 시험구는 각 처리구 당 6반복, 반복 당 9수씩 총 54수씩을 완전임의 배치하여 배합사료만을 급여한 대조구(Control), 사료 kg당 비타민 C(ascorbic acid, 99.8%) 200 mg 첨가구, 비타민 E(alphatocopherol acetate 50%) 100 mg 첨가구 및 비타민 C(200 mg/kg)+ E(100 mg/kg) 첨가구로 설정하였다. 본 시험에 사용한 기초 사료는 육계 전기(3~21일령) 및 후기(22~35일령) 상업용 사료로서 이들 사료에 상기 처리구별 비타민을 첨가하여 완전 혼합 후 급여하였다. 육계의 사양 관리는 경남과학기술대학교 부속 동물 사육장의 관리 지침에 준하여 35일간 군사용 케이지에서 사육하고, 자유 채식시켰다. 체중의 측정은 시험 개시, 21일령 및 35일령에 각각 실시하고, 동 기간에 사료 섭취량을 측정하여 사료 요구율을 계산하였다. 그 밖의 시험에 관련된 닭의 관리 및 취급은 본 대학 동물실험 윤리위원회(IACUC)의 규정을 준수하고 승인을 받았다.

2. 시료 채취 및 표본 제작

텔로미어의 함량 분석은 혈액, 간, 비장 및 정소 조직을 대상으로 하였으며, DNA 및 HSP 분석은 혈액으로부터 시료를 분리하여 이용하였다. 혈액은 3주령 및 5주령 때 처리별 무작위로 12수씩 추출하여 각 개체로부터 채취하였고, 각 조직들은 동일 개체들을 대상으로 시험 종료 때 도살 후 부위별 채집하였다. 채집된 조직들은 D-PBS(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA)용액으로 세척한 다음, RPMI 1640(Gibco) 배양액이 들어있는 시험관으로 옮겨 200×g에서 10분간 원심분리시켰다. 침전된 세포에 0.9% sodium citrate(Sigma Chem, St Louis, MO, USA) 용액을 첨가하여 15분간 저장 처리하고, 이후 고정액을 10방울 정도 첨

가하여 원심분리시켰다. 고정처리는 methanol과 acetic acid 가 3:1로 혼합된 고정액을 이용하고, 이를 3회 반복 처리한 후 세포액을 3~5방울 정도 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하였다. 한편, 백혈구 시료는 개체의 날개 정맥으로부터 약 5 mL의 혈액을 채취하여 Ficoll(Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)을 이용하여 백혈구만 순수 분리하고, D-PBS 용액으로 2~3회 수세 후 각 분석에 제공하였다.

3. 양적 형광접합보인법에 의한 Telomeric DNA 함량 분석

Chicken telomeric DNA probe를 이용하여 간기 핵 양적 형광접합보인법(quantitative fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei)을 Sohn et al.(2012)의 방법과 동일하게 수행하였다. 이를 간략히 소개하면, 슬라이드 표본을 RNase(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) 처리 후 건조시킨 다음 Hybridization 용액(13 uL formamide, 5 uL hybridization buffer, 200 ng chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨려 밀봉하고, 85°C에서 5분간 변성(denaturation)시킨 후, 38.5°C에서 12시간 이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2× SSC로서 72°C에서 5분간 처리하고, 실온의 PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로 세척하였다. 형광접합탐지를 위하여 anti-digoxigenin-fluorescein(Boehringer Mannheim)을 처리하고, 38.5°C에서 30분간 정지한 다음 PN buffer로 세척 후 건조시켰다. 배경 염색은 propidium iodide solution(Sigma Chem)을 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮고, 암소에서 건조시킨 후 검정하였다. 형광접합 발현 양상은 적녹 파장대의 필터(WIB filter)를 부착한 형광 현미경(Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 현미경으로 관찰한 상들 중 임의로 5개의 간기 핵을 한 프레임으로 하여 디지털카메라(Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하고, 이를 컴퓨터에 저장하였다. 저장된 상은 이미지 분석 프로그램(MetaMorph®, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 대비 telomeric DNA 분포량을 계산하였다.

4. Comet Assay에 의한 DNA 손상을 분석

표본 처리를 위해 사용하고자 하는 슬라이드 그라스를 1% agarose gel에 침지한 다음 수세하고 건조시켰다. 표본 혈액 10 uL를 75 uL 0.5% LMPA(low melting point agarose in Dulbecco's buffered saline)에 혼합하여 준비된 슬라이드 위에 떨어뜨리고, 냉장 상태로 굳힌 후 80 uL 1% LMPA를 도포하여 4°C lysis solution에 60분간 침지하였다. Lysis solution을 제거 후 전기영동장치에 거치하고 electrophoresis

buffer(pH>13)를 채웠다. 10분 정도 침지 후 25 V, 300 mA로 30분간 전기영동하고, 건조 후 중성 buffer에 5분간 정지하였다. 건조된 슬라이드는 80 uL propidium iodide(0.4 ug/ml)로 5분간 염색하고, 냉장 초자수로 수세 후 형광현미경(AX-70)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 Moment로 tail intensity×head까지의 상대적 거리/total comet intensity를 조사하였다.

5. HSP 및 HMGCRC 유전자 발현 분석

HSP 및 HMGCRC 유전자 발현 분석을 위하여 혈액은 익정맥으로부터 채혈하였고, 간은 도살 직후 조직을 소량 채취하였다. 혈액은 채혈 직후 Histopaque(Sigma Chem)를 이용하여 순수 백혈구를 분리하였고, 분리한 백혈구 세포와 간 조직은 QIAamp® RNA Blood Mini Kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR을 위한 primer 제작은 reference gene(Actin) 및 HSP70, 90- α , 90- β 및 HMGCRC를 표적 유전자(target gene)로 하여 primer-dimer가 형성되지 않는 200 bp 이하의 크기로 제작하였다(Table 1). Quantitative PCR은 real-time PCR machine(Model LC480, Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 cDNA 5 uL(10 ng/uL), primer(5 pmol/uL) 각각 0.5 uL, SYBR Green (Roche, GmbH, Mannheim, Germany) 10 uL, ddH₂O 5 uL를 넣어 최종 volume이 20 uL가 되도록 하고, 95°C에서 5분 처리하여 최초 변성시킨 후, 95°C 10초 변성, 60°C 30초 접합, 72°C 10초간 신장 반응을 40회 반복하면서 진행 중 실시간 형광 모니터링하였다. 이후 Tm 값 측정을 위한 melting curve analysis 과정을 수행하고, LightCycler® 480 software v1.5(Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 분석하였다. Reference gene을 이용한 각 표적 유전자의 상대적 정량값은 Livak과 Schmittgen(2001)이 제시한 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 분석하였다.

6. 통계분석

처리구 간 생산 능력, telomeric DNA 함량, DNA 손상을, HSP 및 HMGCRC 유전자 발현율의 비교 분석은 SAS 통계패키지(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA procedure로서 처리 평균 간의 유의성을 검정하고, 모든

Table 1. Primers used for the quantitative real-time polymerase chain reaction

Genes	Primer	Sequence(5'~3')	Size (bp)	Tm (°C)
HSP 70	For.	ATGCTAATGGTATCCTGAACG	145	60
	Rev.	TCCTCTGCTTTGTATTTCTCTG		
HSP 90- α	For.	CAGAAGATGAAGAGAAGAAGA	133	60
	Rev.	GGAGAAGTTACCAAGCGATT		
HSP 90- β	For.	TGTAGTAATGGCGAACCTAA	84	60
	Rev.	TCAGAGCGTAAGACCTAAC		
HM-GCR	For.	GAGGCAGAGCAAGATGAAG	113	60
	Rev.	GCAGGACAGTAGGTGAGT		
Actin	For.	CCACCGCAAATGCTTCTA	96	60
	Rev.	GCCAATCTCGTCTGTGTTTATG		

For. : Forward.

Rev. : Reverse.

처리 간의 쌍체 비교(all pair-wise comparison)는 Tukey's HSD 방법을 이용하여 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 비타민 첨가 급여가 성장 능력 및 생존율에 미치는 영향

비타민 C 및 비타민 E를 배합사료 kg당 각각 200 mg 및 100 mg을 35일간 첨가 급여한 후 조사한 처리구별 사양 성적은 Table 2와 같다. 시험 결과 사육 전기(3~21일) 때, 비타민을 첨가한 모든 급여 처리구가 대조구에 비해 체중과 증체량에서 낮은 결과를 보이고 있고, 비타민 처리 간에는 성장 능력의 차이는 없는 것으로 나타났다. 또한 사료 섭취량에서도 비타민 C+E 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의하게 낮게 나타났으나, 사료 요구율은 모든 처리구 간에 차이가 없었다. 그리고 사육 후기(22~35일)에서는 비타민 C, E, C+E 첨가 급여구 및 대조구 간에 체중, 증체량, 사료 섭취량, 사료 요구율 등 성장 능력의 차이는 없는 것으로 나타

Table 2. The effects of vitamin C and vitamin E supplementation on the growth performance and mortality in broiler chickens

Items	Treatments			
	Control	Vitamin C	Vitamin E	Vitamin C+E
Body weight (3d) (g)	43.89±0.46	44.07±0.45	43.89±0.50	44.07±0.45
3~21 days				
BW (g)	823.33±25.90 ^a	785.19±16.73 ^b	785.19±20.69 ^b	783.33±15.32 ^b
Gain (g)	779.44±22.80 ^a	741.11±16.76 ^b	741.30±20.87 ^b	739.26±15.08 ^b
Feed intake	1,071.80±33.78 ^a	1,047.74±46.96 ^{ab}	1,036.74±18.52 ^{ab}	1,030.19±14.43 ^b
Feed conversion ratio	1.30±0.03	1.33±0.05	1.32±0.04	1.32±0.03
22~35 days				
BW (g)	1,692.73±141.24	1,578.03±134.62	1,618.90±138.45	1,602.35±116.63
Gain (g)	869.39±134.10	792.85±136.94	833.72±148.71	819.02±112.86
Feed intake	1,902.44±135.50	1,809.59±172.49	1,818.59±106.36	1,810.52±153.94
Feed conversion ratio	2.22±0.22	2.33±0.35	2.22±0.30	2.23±0.19
3~35 days				
Total gain (g)	1,648.84±141.24	1,533.96±134.42	1,575.02±138.07	1,558.28±116.23
Feed intake	2,950.56±116.94	2,857.33±213.86	2,855.33±105.62	2,840.70±165.33
Feed conversion ratio	1.79±0.13	1.87±0.13	1.82±0.11	1.83±0.08
Mortality (%)	1.43±4.52	2.86±6.40	2.86±6.40	5.55±13.59

Values are Mean±S.D. (n=6 replication means).

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

났다. 더불어 35일령까지 전 사육 기간 동안 분석한 결과에서도 모든 처리구 간에 성장 능력의 차이는 없는 것으로 나타났다. 사육 전기에서 비타민 첨가구가 대조구에 비해 체중과 증체량이 낮은 결과는 사료 섭취량이 낮는데 기인하는 것으로 비타민 첨가에 따른 기호성의 저하가 원인으로 사료된다. 그러나 후기에서 이러한 양상이 점차적으로 완화되면서 성장 능력의 차이도 없는 것으로 보여진다. 한편, 사양 시험 동안 항산화 비타민 급여에 따른 폐사율에 있어서도 처리구 간에 유의적 차이가 없는 것으로 관찰되었다. 비타민 C의 첨가 급여가 육계의 생산 능력에 미치는 영향에 대해 이전 많은 연구들이 수행되었고, 대부분의 연구에서 이의 첨가가 체중 및 사료 섭취량에 영향이 없는 것으로 보고하고 있다(Brown and Southern, 1985; Pardue et al., 1985; Orban et al., 1993; McKee and Harrison, 1995). 그러나 산란계의 경우 비타민 C의 첨가 급여가 칼슘 대사에 영향을 미쳐 뼈나 난각의 미네랄화에 개선 효과가 있음을 제시하였고, 특히 육용종계의 경우, 산란율, 부화율, 수정율, 생존율 및 배아 사망율에 비타민 C의 첨가가 현저한 개선 효과를 보인다고 하였다(Peebles and Brake, 1985; Orban et al., 1993). 비타민 E의 첨가 급여 역시 육계의 성장 능력에는 별다른 영향이 없는 것으로 보고하고 있으나, 열 스트레스 사육 환경에서 면역 반응의 개선과 산란계의 경우 산란능력 및 난질의 개선 효과가 있는 것으로 보고하고 있다(Puthpong-siriporn et al., 2001; Niu et al., 2009; Gao et al., 2010). 이러한 내용들은 본 연구 결과와 거의 일치되는 양상으로 결론적으로 항산화 비타민의 첨가(C와 E) 급여가 육계의 성장 능력 및 폐사율에 유의적 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

2. 비타민 첨가 급여가 Telomeric DNA 함량에 미치는 영향

비타민 첨가 급여가 육계의 각 조직별 세포들의 텔로미어

함량 변화에 미치는 영향을 살펴보았다. Table 3은 처리구별 개체들의 백혈구 세포의 텔로미어 함유율을 분석 제시한 값으로 3주령에는 처리구 간 차이가 없었으나, 5주령 시험 종료 시 비타민 E 및 C+E 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의하게 높은 telomeric DNA 함량을 나타내었다. 또한 동 기간의 개체별 텔로미어 감축율에 있어서도 비타민 E 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 감축율을 보였다. 본 결과에서 나타난 바와 같이 초기 비타민의 첨가 급여가 단 시간에 개체의 백혈구 세포의 생리활성도에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되나, 35일령 시험 종료 시 점진적 효과가 누적되면서 비타민 첨가 급여에 따른 항산화적 생리활성도가 세포에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 텔로미어 감축은 연령이 증가함에 따라 당연히 감축되는 양상을 보이나, 감축율의 정도는 많은 환경적 요인에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이들 중 항산화물질의 급여가 텔로미어의 감축 정도를 유의적으로 완화시킨다는 여러 보고들이 있다. 특히 비타민 C나 E와 같은 생리활성보조제의 경우 상당히 효과적으로 텔로미어 감축 속도를 늦추는 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(Shen et al., 2009; Xu et al., 2009; Wolkowitz et al., 2011). 본 시험에서도 육계의 경우 비타민 E의 첨가 급여는 무첨가구에 비해 텔로미어 감축 속도가 2배 이상 완화되는 결과를 보였다. 한편, 텔로미어 함량에 있어 비타민 C와 E를 함께 급여하는데 따른 상호작용은 거의 없는 것으로 보이고, 비타민 C의 효과보다는 E의 효과가 우수한 것으로 사료된다.

시험 종료 시 비타민의 첨가 급여가 각종 조직의 텔로미어 함량에 미치는 영향을 분석한 바 Table 4와 같은 결과를 나타내었다. 간을 제외한 비장, 정소의 경우 비타민 첨가 급여에 따른 텔로미어 함량의 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 간 조직의 경우 혈액에서와 같이 비타민 E 및 C+E 첨가구가 대조구에 비해 유의적 높은 텔로미어 함유율을 나

Table 3. The effect of vitamin supplements on the amount of telomeric DNA of lymphocytes in broiler chickens

Items \ Treatments	Con	Vit C	Vit E	Vit C+E	P-value
ATD at 3 wks	2.84±0.27	2.87±0.39	2.98±0.54	3.10±0.38	0.4022
ATD at 5 wks	2.47±0.21 ^b	2.72±0.21 ^{ab}	2.83±0.38 ^a	2.85±0.24 ^a	0.0050
TSR	0.37±0.22 ^a	0.28±0.13 ^{ab}	0.14±0.22 ^b	0.16±0.14 ^{ab}	0.0172

Con(control), Vit C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), Vit E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), Vit C+E(vitamin C 200 mg/kg and E 100 mg/kg feed supplement), ATD(amount of telomeric DNA) and TSR(telomere shortening rate; TSR calculated from the amount of telomeric DNA of 5 wks and that of 3 wks).

^{ab} Values (Means±S.D.) with different superscripts within row significantly differ ($P<0.05$).

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

Tissues \ Treatments	Con	Vit C	Vit E	Vit C+E	P-value
Liver	2.39±0.17 ^b	2.55±0.21 ^{ab}	2.61±0.26 ^a	2.68±0.25 ^a	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), Vit C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), Vit E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), Vit C+E(vitamin C 200 mg/kg and E 100 mg/kg feed supplement).

^{a,b} Values (Means±S.D.) with different superscripts within row significantly differ ($P<0.05$).

타내었다. 이러한 결과는 비타민 E가 면역관련 생리 활성 물질이므로 백혈구뿐만 아니라, 간의 생리활성도에도 긍정적으로 영향을 미치기 때문인 것으로 사료된다.

3. 비타민 첨가 급여가 DNA 손상율에 미치는 영향

육계에서 비타민 C 및 E의 첨가 급여가 개체의 스트레스 완화 정도에 미치는 영향을 살펴보고자 혈액 세포내 DNA 손상율을 comet assay법으로 분석하고, 대조구와의 차이를 검토하였다. 세포들에 스트레스를 가하게 되면 apoptosis가 촉진되어 DNA 손상이 급격히 증가된다(Chen et al., 2007; Sohn et al., 2012). 따라서 세포의 DNA 손상율은 스트레스 반응 정도를 간접적으로 나타낼 수 있는 지표로서 comet assay는 DNA fragmentation의 정도를 나타내는 것이다. Comet 분석값은 전체 대비 tail intensity의 비율을 나타내는 % DNA in tail, tail내 DNA 생성률을 제시하는 Tail Moment 및 tail intensity×head까지의 상대적 거리/total comet intensity로 계산되는 Olive Moment가 있다. 분석 결과, 모든 항목에서 비타민 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Table 5). 이는 항산화 제제로 알려진 비타민 C 및 비타민 E의 첨가 급여가 DNA 손상율에 유의한 완화 효과가 있는 것을 의미한다. 한편, 비타민 C와 비타민 E 급여구 간의 DNA 손상율의 차이는 없는 것으로 보여지

며, 이들 간의 상호작용이 존재함에 따라 두 가지를 함께 급여하더라도 이에 따른 상승효과는 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과들은 비타민 C 및 비타민 E의 첨가 급여가 세포의 항산화 효과와 생리활성도를 진작시켜 세포의 apoptosis를 현저히 개선시킨다는 것을 의미하는 것으로 비타민 C와 E가 개체들에게 중요한 스트레스 경감 또는 완화제임을 시사한다.

4. 비타민 첨가 급여가 HSP 및 HMGCR 유전자 발현량에 미치는 영향

브로일러에서 비타민 C 및 E의 첨가급여가 스트레스 관련 유전자인 HSP70, HSP90- α , HSP90- β 및 HMGCR 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 급여 처리 후 5주령 개체의 혈액 세포로부터 이들의 발현량을 분석하였다. Table 6에 제시된 바와 같이 비타민 첨가 급여에 따른 HSP70, HSP90- α , HSP90- β 및 HMGCR의 유전자 발현량은 HSP70의 발현을 제외하고는 모든 처리구 간에 유의한 차이를 나타내었다. 유전자에 따라 HMGCR의 경우 비타민 C+E 첨가구가 대조구 등 다른 처리구에 비해 유의하게 낮은 발현 양상을 보이고, HSP90- α 및 - β 의 경우 공히 비타민 E 첨가구가 유의하게 낮은 발현 양상을 나타내었다. 일반적으로 동물의 경우, 열 스트레스 사육 환경에서 대부분의 단백질 합성이

Table 5. The effect of vitamin supplements on the rates of DNA fragmentation of lymphocytes in broiler chickens at 5 weeks

Items \ Treatments	Con	Vit C	Vit E	Vit C+E	P-value
% in tail	38.55±5.08 ^a	27.19±3.78 ^b	26.19±3.16 ^b	27.18±6.18 ^b	<0001
Tail moment	59.99±9.47 ^a	51.04±10.04 ^{ab}	40.58±10.72 ^b	41.70±18.90 ^b	0.0034
Olive moment	41.42±5.06 ^a	30.41±5.64 ^b	23.61±6.65 ^b	28.19±10.31 ^b	<0001

Con(control), Vit C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), Vit E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), Vit C+E(vitamin C 200 mg/kg and E 100 mg/kg feed supplement).

^{a,b} Values (Means±S.D.) with different superscripts within row significantly differ ($P<0.01$).

Table 6. The effect of vitamin supplements on mRNA expression levels of HMGR, HSP70 and HSP90s of lymphocytes in broiler chickens at 5 weeks

Genes	Con		Vit C		Vit E		Vit C+E		P-value
	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
HMGR	7.97±0.98 ^b	1	8.63±0.45 ^b	0.63	8.78±0.83 ^b	0.57	10.73±0.55 ^a	0.15	<0.0001
HSP90- α	6.50±1.10 ^b	1	7.88±0.88 ^{ab}	0.38	8.26±0.86 ^a	0.30	7.18±0.62 ^{ab}	0.62	0.0127
HSP90- β	5.14±0.97 ^c	1	6.40±0.66 ^{bc}	0.42	7.83±0.53 ^a	0.15	6.84±0.99 ^{ab}	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), Vit C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), Vit E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), Vit C+E(vitamin C 200 mg/kg and E 100 mg/kg feed supplement), HMGR(hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase), HSP(heat shock protein).

^{a,b}Values (Means±S.D.) with different superscripts within row significantly differ ($P<0.05$).

ΔCt is equal to the difference in threshold cycles for target and internal control gene (β actin); $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indicates the fold change in gene expression relative to the control.

정체된 형태를 보이거나, heat shock protein(HSP)들은 환경적 스트레스에 반응하여 활발히 합성되어지는 잘 보존된 단백질 계이고(Schlesinger, 1986; Zulkifli et al., 2002), hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase(HMGR)은 cortisol의 생합성을 조절하는 인자이므로 스트레스 사육에 따른 HMGR의 발현 증가는 간접적으로 혈액과 간에서 cortisol의 증가를 뒷받침하여 준다고 할 수 있다(Gornati et al., 2004). 따라서 HSP 및 HMGR의 발현을 증대는 상대적으로 개체의 스트레스 정도가 높아진 상태를 간접적으로 시사한다 하겠다(Gornati et al., 2004; Beloor et al., 2010). 본 연구 결과는 비타민 E의 첨가 급여가 육계의 경우 개체의 스트레스 정도를 상대적으로 완화시킨다는 것을 나타내고 있다. HSP 발현율과 스트레스 간의 상호관계에 있어 가금류 대한 연구 보고들은 그리 많지 않으나, Beloor et al.(2010)이 육계에서 사육 밀도가 증가됨에 따라 HSP70 및 HMGR의 발현량이 증가하고 HSP90은 유의적 차이가 없는 것으로 분석하였다. 이는 본 결과와는 다소 차이가 있는 것으로 이들이 사용한 HSP90 유전자와 본 분석에 이용된 HSP90- α 및 HSP90- β 는 다른 종류의 것으로 판명되었다. 통상 인간에서 많이 이용되는 HSP90은 닭에서는 잘 발현이 일어나지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 Sohn et al.(2012)은 레그혼을 이용하여 절식 및 고밀도 스트레스 하에서 본 연구에서와 동일한 HMGR 및 HSP 유전자를 표적으로 한 바 HMGR 및 HSP90- α 의 발현율이 유의적 증가하고, HSP70 및 HSP90- β 의 발현율 차이는 없는 것으로 나타나, 본 연구 결과와 거의 일치되는 결과를 보였다. 이상의 분석 결과, 비타민 E의 첨가 급여는 스트레스 관련 유전자들의 발현에 유의적 영향을 미치는 것으로 나타남으로 이의

첨가 급여가 개체의 스트레스 완화에 많은 도움이 되는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 브로일러에서 비타민 C와 E의 첨가 급여가 성장 능력 및 개체별 스트레스 경감 정도에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 스트레스 반응 정도는 혈액과 각 조직별 세포들에 대한 텔로미어 함량, DNA 손상을 및 열손상단백질 유전자(HSP, HMGR) 발현율을 분석하고 고찰하였다. 텔로미어 함량 및 감축율은 양적 형광점합보인법(Q-FISH)으로 분석하였고, DNA 손상을 comet assay로 분석하였다. 열손상단백질 유전자 발현율은 HSP70, HSP90- α , HSP90- β 및 HMGR을 표적으로 하여 real-time PCR로 분석하였다. 시험 결과, 급여 처리구 간에 체중, 증체량, 사료 섭취량, 사료 요구율 및 생존율 등 생산 능력의 차이는 없는 것으로 나타났다. 텔로미어 감축율에 있어서는 비타민 E 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의하게 낮은 감축율을 보여 스트레스 경감의 효과를 나타내었다. DNA 손상을 또한 모든 비타민 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의하게 낮은 양상을 보였다. HMGR, HSP90- α 및 HSP90- β 의 유전자 발현율에 있어서도 비타민 E 첨가 급여구가 대조구에 비해 유의하게 낮은 발현율을 나타내어 스트레스 경감 효과를 나타내었다. 이상의 결과에 따라 브로일러에 사료 내 비타민 E의 첨가 급여(100 mg/kg feed)는 성장 능력의 저하 없이 개체의 생리적 스트레스 정도를 경감시키는 바람직한 항산화 제재로 사료된다.

(색인어 : 비타민 C, 비타민 E, 성장 능력, 스트레스, 브로일러)

사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업(과제 번호: PJ0079812011) 및 2012년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- 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.
- Brown DR, Southern LL 1985 Effect of citric and ascorbic acids on performance and intestinal pH of chicks. *Poultry Sci* 64:1399-1401
- Chan KM, Decker EA 1994 Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 34:403-426.
- Chen JH, Hales CN, Ozanne SE 2007 DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res* 35:7417-7428.
- Cherian G, Wolfe FW, Sim JS 1996 Dietary oils with added tocopherol: Effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poultry Sci* 75:423-431.
- Cottliar AS, Slavutsky IR 2001 Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61:335-342.
- 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. *Poultry Sci* 86:1414-1423.
- 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.
- Franchini A, Canti M, Manfreda G, Bertuzzi S, Asdrubali G, Franciosi C 1991 Vitamin E as adjuvant in emulsified vaccine for chicks. *Poultry Sci* 70:1709-1715.
- Gao J, Lin H, Wang XJ, Song ZG, Jiao HC 2010 Vitamin E supplementation alleviates the oxidative stress induced by dexamethasone treatment and improves meat quality in broiler chickens. *Poultry Sci* 89:318-327.
- Gebremichael A, Levy EM, Corwin LM 1984 Adherent cell requirement for the effect of vitamin E on *in vitro* antibody synthesis. *J Nutr* 114:1297-1305.
- 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.
- Gous RM, Morris TR 2005 Nutritional interventions in alleviating the effects of high temperatures in broiler production. *Worlds Poultry Science* 61:463-475.
- Halliwell B, Gutteridge JMC 1989 Lipid peroxidation: A radical chain reaction. Pages 188-218 *in*: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. Oxford University Press, New York, NY.
- Hangalapura BN, Kaiser MG, Poel JJ, Parmentier HK, Lamont SJ 2006 Cold stress equally enhances *in vivo* proinflammatory cytokine gene expression in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Dev Comp Immunol* 30:503-511.
- Harvey S, Hall TR 1990 Hormones and stress in birds: activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Progress in Clinical and Biological Research* 342:453-460.
- Hoehler D, Marquardt RR 1996 Influence of vitamin E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks. *Poultry Sci* 75:1508-1515.
- 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* 133:51-58.
- Kramer TR, Schoene N, Douglass LW, Judd JT, Ballard-Barbash R, Taylor PR, Bhagavan HN, Nair PP 1991 Increased vitamin E intake restores fish-oil induced suppressed blastogenesis of mitogen-stimulated T-lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 54:896-902.

- Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- 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.
- Mahmoud KZ, Edens FW, Eisen EJ, Havenstein GB 2004 Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 137:35-42.
- 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. *Poultry 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. *Poultry Sci* 63:2271-2274.
- Maurice D, Lightsey SF, Toler JE, Cauty S 2007 Effect of chronic oxidative/corticosterone-induced stress on ascorbic acid metabolism and total antioxidant capacity in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 91:355-360.
- McKee JS, Harrison PC 1995 Effects of supplemental ascorbic acid on the performance of broiler chickens exposed to multiple concurrent stressors. *Poultry Sci* 74: 1772-1785.
- Meeker AK, Coffey DS 1997 Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. *Biochemistry* 62:1323-1331.
- Meydani SN, Blumberg JB 1993 Vitamin E and the immune response. Pages 223-238 In: *Nutrient Modulation of the Immune Response*. S Cunningham-Rundles ed. Marcel Dekker, NY.
- Niu ZY, Liu FZ, Yan QL, Li WC 2009 Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poultry Sci* 88:2101-2017.
- Orban JI, Roland DA Sr, Cummins K, Lovell RT. 1993 Influence of large doses of ascorbic acid on performance, plasma calcium, bone characteristics, and eggshell quality in broilers and Leghorn hens. *Poultry Sci* 72:691-700.
- Pardue SL, Thaxton JP 1984 Evidence for amelioration of steroid-mediated immunosuppression by ascorbic acid. *Poultry Sci* 63:1262-1268.
- Pardue SL, Thaxton JP, Brake J 1985 Influence of supplemental ascorbic acid on broiler performance following exposure to high environmental temperature. *Poultry Sci* 64:1334-1338.
- Peebles ED, Brake J 1985 Relationship of dietary ascorbic acid to broiler breeder performance. *Poultry Sci* 64: 2041-2048.
- Poulsen HE, Møller P, Lykkesfeldt J, Weimann A, Loft S 2004 Vitamin C and oxidative damage to DNA. In: *Vitamin C: Functions and Biochemistry in Animals and Plants*. pages 189-202. BIOS Scientific Publishers, NY.
- Puthongsiriporn U, Scheideler SE, Sell JL, Beck MM 2001 Effects of vitamin E and C supplementation on performance, *in vitro* lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. *Poultry Sci* 80 :1190-1200.
- Puvadolpirod S, Thaxton JP 2000 Model of physiological stress in chickens 4. Digestion and metabolism. *Poultry Sci* 79:383-390.
- 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.
- Schlesinger JM 1986 Heat shock proteins. *J Cell Biol* 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* 124:1637-1643.
- Siegel HS 1995 Stress, strains and resistance. *Br Poultry Sci* 36:3-22.
- 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 Sci* 91:829-836.
- Thaxton JP, Dozier WA 3rd, Branton SL, Morgan GW, Miles DW, Roush WB, Lott BD, Vizzier-Thaxton Y 2006 Sto-

- cking density and physiological adaptive response of broilers. *Poultry Sci* 85:819-824.
- Turkyilmaz MK 2008 Effect of stocking density on stress reaction in broiler chickens during summer. *Turk J Vet Anim Sci* 32:31-36.
- Von Zglinicki, T 2002 Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27:339-344.
- Watson RR, Petro TM 1982 Cellular immune response, corticosteroid levels and resistance to *Listeria monocytogenes* and murine leukemia in mice fed a high vitamin E diet. *Ann NY Acad Sci* 393:205-210.
- Whitehead CC, Keller T 2003 An update on ascorbic acid in poultry. *Worlds Poultry Science* 59:161-184.
- 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: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* 89:1857-1863.
- Yu BP 1994 Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.
- Zulkifli I, Norma MTC, 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* 43:141-145.

(접수: 2013. 2. 12, 수정: 2013. 3. 14, 채택: 2013. 3. 15)