

비타민 C 및 E의 첨가 급여가 육계의 소포체 스트레스와 지방 및 포도당 대사 연관 유전자의 발현에 미치는 영향

박정근 · 안영숙 · 손시환 · 장인석 · 문양수[†]

경남과학기술대학교 동물생명과학과

The Effects of Dietary Supplementation of Vitamin C or E on the Expressions of Endoplasmic Reticulum Stress, Lipid and Glucose Metabolism Associated Genes in Broiler Chickens

Jeong Geun Park, Young Sook An, Sea Hwan Sohn, In Surk Jang and Yang Soo Moon[†]

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

ABSTRACT This study was conducted to evaluate the effects of dietary supplementation of vitamin C or E on the expressions of endoplasmic reticulum (ER) stress, lipid and glucose metabolism associated genes in broiler chickens. A total of 216 one-day-old male broilers was randomly allotted to 4 treatments with 6 replicate pens per treatment and 9 broilers per pen for 35 days. The dietary treatments were control, vitamin C (control diet + ascorbic acid 200 mg/kg diet), vitamin E (control diet + α -tocopherol 100 mg/kg diet), vitamin C + E (control diet + vitamin C 200 mg/kg + vitamin E 100 mg/kg), respectively. To evaluate gene expressions by quantitative real-time polymerase chain reaction, total RNA was extracted from the liver of the chicken at 35 days of age. Dietary supplementation of vitamins was significantly down-regulated the expression of stress marker genes including HSP70, HSP90, and HMGCR, as compared to the control ($p < 0.05$). The expressions of ER stress associated genes also inhibited by supplementation of vitamins as well ($p < 0.05$). Vitamin C supplementation suppressed the expression of lipid associated genes such as FASN, FATP1 and ACSL1. Vitamin supplementation did not affect the glucose transporters, GLUT2 and GLUT8, in the liver. The results of the present study indicated that dietary supplementation of vitamin C or E could be beneficial for the alleviating physiological stress in broiler chickens.

(Key words : vitamin C, vitamin E, endoplasmic reticulum, stress, broiler)

서 론

가축에게 주어지는 생리적 또는 환경적 스트레스는 건강한 가축의 사양, 생산뿐만 아니라, 가축의 복지 측면에서도 소비자 및 생산자 모두에게 큰 관심의 대상이 되고 있다. 닭의 경우, 사양과정 중에 환경적 요인으로 발생하는 주된 스트레스 인자는 사육온도 및 사육밀도 등이며, 이에 대한 연구도 비교적 많이 축적되어 있다. 사육온도는 주로 고온에 의한 스트레스가 닭의 생육 및 생산성에 가장 큰 영향을 미쳐, 사료 섭취량 감소, 음수량 증가뿐만 아니라 체내 영양소 대사에도 영향을 미치게 된다(Imik et al., 2012). 고온 스트레스는 또한 free radical 생성에 의한 산화적 스트레스를 유발하

며, 이는 단백질, 탄수화물, 지방뿐만 아니라 세포의 구조와 기능을 파괴한다(Fellenberg and Speisky, 2006). 닭에서 열 스트레스에는 사료 중 단백질 함량 증가(Temim et al., 2000; de Faria Filho et al., 2007) 또는 항산화적 활성을 가지고 있는 비타민 E의 사료 내 첨가(Imik et al., 2012) 등으로 스트레스에 대한 완화효과가 있는 것으로 보고되었다. 고밀도 사양에 의한 스트레스의 경우 또한 증체량, 사료섭취량, 사료효율, 치사율 등에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다(Puron et al., 1995; Dawkins et al., 2004; Kang et al., 2011; Sohn et al., 2012). 닭의 고밀도 사양은 adrenal gland의 비대를 유발하고, 이는 plasma corticosterone의 수준을 증가시킨다(Siegel, 1960; Craig et al., 1986). 또한 고밀도 사양에 의한 corticosterone의

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

혈중 증가는 단백질의 분해에 의한 중간대사 산물로 포도당 신합성을 유도함으로써 단백질과 탄수화물의 대사에 영향을 미친다(Davison et al., 1985). 단백질과 탄수화물뿐만 아니라 corticosterone은 스트레스를 받은 닭에서 단백질 분해와 포도당 신합성 등에 의한 에너지 수준의 증가는 체지방의 증가를 유도한다(Siegel and Van Kampen, 1984). 이와 같이 닭의 사양기간 동안 여러 형태로 노출되는 스트레스는 닭의 생산성에도 영향을 미치지만, 스트레스에 의한 영양소의 대사에도 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 그러나 일반적 사육형태 중의 하나인 케이지 사양 또한 닭에게는 스트레스 요인으로 작용할 것으로 사료되지만, 이들이 받는 스트레스와 스트레스로 야기된 세포내 현상을 분자생물학적으로 분석한 결과는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 국내에서 사육되고 있는 실용 육계를 대상으로 비타민 C와 E의 사료 내 첨가 급여가 소포체(endoplasmic reticulum: ER) 스트레스, 지방 및 포도당 대사 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향을 real-time PCR을 이용하여 분석 및 고찰을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 시험설계

본 시험은 실용브로일러(Ross종) 수컷 216수를 공시하여, 2일 간의 적응기간을 거친 후 3일령부터 35일령까지 시험을 실시하였다. 시험구는 모두 4처리구로서 각 처리구 당 6반복, 반복 당 9수씩 총 54수씩을 완전임의 배치하였다. 시험은 배합사료만을 급여한 대조구(Control), 비타민 C(ascorbic acid, 99.8%; 200 mg/kg사료) 첨가구, 비타민 E(alpha-tocopherol acetate 50%; 100 mg/kg사료) 첨가구 및 비타민 C(200 mg/kg사료) + E(100 mg/kg사료) 첨가구로 설정하였다. 본 시험에 사용한 기초사료는 육계 전기(3~21일령) 및 후기(22~35일령) 상업용 사료를 구입하여 대조구에 급여하였다(Table 1). 처리구들은 기초사료에 위에 기술한 처리구별 비타민을 첨가하여 완전 혼합 후 급여하였다. 육계의 사양관리는 본 대학교 부속 동물사육장의 관리 지침에 준하여 35일간 케이지에서 사육을 실시하였으며, 온도는 첫 주에는 35℃를 유지하고, 이후 1주일에 3℃씩 낮추어 최종적으로 20℃ 내외가 되도록 하였으며, 물과 사료는 자유 급여하였다. 체중은 시험개시, 21일령 및 35일령에 각각 측정하고, 같은 기간에 사료섭취량을 측정하여 사료요구율을 계산하였다. 시험에 관련된 닭의 관리 및 취급은 본 대학 동물실험윤리위원회(IA-CUC)의 규정을 준수하였다.

2. 시료 채취 및 real-time PCR

유전자 발현 분석을 위하여 시험 종료 35일령에 공시동물

Table 1. Formula and chemical composition of experimental diets fed to broiler chickens

| Items | Diets | |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------|
| | Starter ¹ | Finisher ² |
| Ingredients (%) | | |
| 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 ³ | 6 | 8 |
| Animal fat | 3 | 3.5 |
| Salts | 0.15 | 0.125 |
| Limestone | 1.35 | 1.4 |
| MDCP ⁴ | 0.775 | 0.45 |
| Lysine-50% | 0.65 | 0.65 |
| Methionine-100% | 0.2 | 0.225 |
| Threonine-100% | 0.075 | 0.125 |
| HCl-choline-50% | 0.08 | 0.08 |
| Vitamin premix ⁵ | 0.15 | 0.15 |
| Mineral premix ⁶ | 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 ⁷ | 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 |

Table 1.

¹Formula of starter diet (3~21 d of age).
²Formula of finisher diet (22~35 d of age).
³Dried distillers grains with solubles.
⁴Mono di-calciumphosphate.
⁵Contained per kg of diet: vit A, 10,000 IU; vit D₃, 2,000 IU; vit E, 421 IU; vit K 5 mg; riboflavin, 2,400 mg; vit B₂, 9.2 mg; vit B₆, 2.45 mg; vit B₁₂, 40 ug; niacin, 49 mg; pantothenic acid, 27 mg, biotin, 0.05 mg.
⁶Contained the mg per kg of diet: Cu 140 mg, Fe 145 mg, Zn 179 mg, Mn 12.5 mg, I 0.5 mg, Co 0.25 mg, Se 0.4 mg.
⁷Calculated values.

을 도살한 후, 간 조직을 각각 취하여 액체질소에 급속냉동을 실시한 후 분석 시 까지 -70℃에서 보관하였다. 분리한 간 조직은 RNeasy kit(Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 분리한 RNA는 1 µg/µL의 농도로 정량하고, Improm-II Reverse transcription system(Promega, Fitchburg, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 MyiQ(Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 다음과 같이 시행하였다. PCR 반응물은 cDNA(10 ng) 5 µL, primer(5 pmole)는 각각 0.5 µL, SYBR Green(Bio-Rad) 10 µL, ddH₂O 4 µL를 넣어 총 20 µL가 되도록 혼합하고, 95℃에서 3분간 최초 변성을 시킨 다음 95℃ 15초간 변성, 60℃에서 15초간 접합, 72℃ 40초간 확장과정을 40회 반복하였다. 그리고 94℃ 1분간 재 접합 과정을 거친 후 55℃에서 1분간 재 확장 과정을 실시하였다. 마지막으로 55℃에서 0.5℃씩 상승시켜 형광 접합물질인 SYBR Green이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다. 유전자 발현의 상대적 발현은 2^{-△△Ct} 방법을 이용하여 분석하였다(Livak and Schmittgen, 2001). 본 시험에 이용된 primer들의 정보는 Table 2에 제시된 바와 같다.

3. 통계분석

비타민 C, E 및 비타민 혼합 처리구간 육계의 사양성적 및 유전자 발현율의 비교 분석은 SAS 통계패키지(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA/Tukey 법으로 처리구별 평균값에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 비타민 첨가 급여와 육계의 성장능력 및 폐사율에 미치는 영향

비타민 첨가 급여가 육계의 성장 능력 및 폐사율에 미치는 영향을 조사하였다(Table 3). 대조구를 포함한 모든 처리구

Table 2. Primers used to analyze gene expression by real-time RT-PCR and size of product.

| Genes | Primer sequence (5' to 3') | Size of product (bp) | Accession number (GenBank) |
|----------------|--|----------------------|----------------------------|
| HSP70 | Forward: tcctctgctttgtatttctctg Reverse: atgctaattggtatcctgaacg | 145 | J02579 |
| HSP90α | Forward: ggagaagtaccgaagcgatt Reverse: cagaagatgaagaagagaagaaga | 133 | NM001109785 |
| HSP90β | Forward: gcaggacagtaggtgagt Reverse: gaggcagagcaagatgaag | 113 | NM204289 |
| HMGCR | Forward: tcagagcgttaaacctaac Reverse: tgtagtaattggcgaacctaa | 84 | NM204890 |
| ATF6 | Forward: cagccaccacataacaa Reverse: atcatcacctctgtagctct | 106 | XM422208 |
| ATF4 | Forward: agtggatgttctggaaggt Reverse: ctctttctctgacttggtgat | 76 | AB013138 |
| XBPI | Forward: tctgctggatgctgtag Reverse: aggtatggtcagtgctcaaga | 89 | NM001006192 |
| SREBP1 | Forward: gatggtcgcagtggtgctgt Reverse: ggctccccgtagacaaga | 97 | AY029224 |
| SREBP2 | Forward: atgctggacctgaagatagat Reverse: cctggctctgaatcaatgg | 115 | AJ310769 |
| PPAR α | Forward: gattagcacaactcacacaag Reverse: tctctgttacagaactctatca | 111 | AB045597 |
| C/EBP α | Forward: atggagcaagccaacttc Reverse: gcctctctgtagccgtag | 110 | NM001031459 |
| FASN | Forward: ttctgttaccgcctcag Reverse: ttcccactgcctcttag | 91 | NM205155 |
| FABP4 | Forward: atggcaaagagactgttcaaa Reverse: tgaagacggcttctcat | 118 | NM204290 |
| FATP1 | Forward: ggggtttgtttgtgctcat Reverse: aggcgtcgttaaggtgaaga | 102 | NM001039602 |
| ACSL1 | Forward: ctaagattgtgtgattgtaatgc Reverse: gctctaacagttgacttggga | 93 | NM001012578 |
| GLUT2 | Forward: gctgcctcttctgctaa Reverse: gtcccctccaacccaaac | 116 | NM207178 |
| GLUT8 | Forward: gaggaggaggactaaagc Reverse: catcagaatcacaccaataagaag | 78 | AB083371 |
| SIRT1 | Forward: ccagttccagcatctct Reverse: gcaacctgttccaatgtgt | 105 | NM_001004767 |
| SIRT5 | Forward: gtgctctgaaacctgctc Reverse: ggcgatatgcttctgtttg | 110 | NM_001276364 |
| RPL27 | Forward: cagcaatgggcaagaaga Reverse: gcatcaggtggtttagtft | 81 | NM205337 |

Table 3. The effects of vitamin supplementation on the growth performance and mortality in broiler chickens*

| Item | Treatment | | | |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Control | vt. C | vt.E | vt. C+E |
| Initial body weight (3d), (g) | 43.89 ± 0.46 | 44.07 ± 0.45 | 43.89 ± 0.50 | 44.07 ± 0.45 |
| 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 | 2.86 | 2.86 | 5.55 |

1. vt. C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), vt. E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), vt. C+E (vitamin C 200 mg/kg + vitamin E 100 mg/kg).

2. Values are Mean±S.D. (n=6 replication means). Lows with no common superscript indicates non-significant difference among the values ($p<0.05$).

* The data of growth performance and mortality were extracted from our previous published article (Sohn et al., 2013).

에서 전 사육기간 (3~35일) 체중, 증체량, 섭취량, 사료요구를 등 성장 능력에 대한 차이가 없었다. 사양시험동안 폐사를 또한 처리구 간에 유의적 차이가 없었다. 고온과 같은 환경적 스트레스나 감염 등에 노출된 산란계의 경우, 비타민 E의 첨가가 산란능력과 난질의 개선 효과(Niu et al., 2009; Gao et al., 2010)를 보이며, 육용종계의 산란율 및 번식성적 개선에 대한 비타민 C의 첨가 효과(Orban et al., 1993)등이 보고되었지만, 육계에서 항산화 목적의 비타민 C의 첨가 급여는 대부분의 경우 체중 및 사료섭취량 등과 같은 사양성적에 영향이 없는 것으로 보고되었다(Pardue et al., 1985; McKee and Harrison, 1995). 본 연구에서도 비타민 C와 E를 단독 혹은 혼

합 첨가 급여하여도 육계의 사양성적에는 영향을 미치지 않았다.

2. 비타민 첨가 급여와 육계 간의 스트레스 마커 유전자 발현에 미치는 영향

육계에서 비타민의 첨가 급여가 스트레스 지표 유전자인 heat shock protein(HSP)70, HSP90- α , HSP90- β 및 HMG-CoA reductase(HMGCR) 유전자 발현에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위하여 시험 종료 후 각 공시동물의 간에서 total RNA를 추출하여 real-time PCR 분석을 실시하였다(Table 4). 비타민 C 첨가 급여는 대조구와 비교하여 스트레스 마커 유

Table 4. The effect of vitamin supplementation on the expression of stress-associated genes in the liver of broiler chicken

| Genes | Treatment | | | | | | | | p-value |
|----------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|---------|
| | Control | | vt. C | | vt. E | | vt. C+E | | |
| | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | |
| HSP70 | 5.13±0.57 ^c | 1.00 | 8.76±1.20 ^a | 0.08 | 6.72±0.44 ^b | 0.33 | 5.5±0.95 ^c | 0.78 | 0.0031 |
| HSP90 α | 11.02±1.06 ^c | 1.00 | 12.52±1.60 ^b | 0.36 | 13.11±0.78 ^b | 0.24 | 14.51±1.14 ^a | 0.09 | 0.0319 |
| HSP90 β | 0.05±0.88 ^{bc} | 1.00 | 1.57±0.18 ^a | 0.35 | 1.21±0.65 ^{ab} | 0.45 | -0.14±0.62 ^c | 1.14 | 0.0263 |
| HMGCR | 2.19±0.24 ^c | 1.00 | 7.21±0.49 ^a | 0.03 | 4.09±0.34 ^b | 0.27 | 3.95±0.92 ^b | 0.30 | 0.0001 |

1. vt. C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), vt. E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), vt. C+E (vitamin C 200 mg/kg + vitamin E 100 mg/kg).

2. ^{a-c} Values (means±S.D., n=6) with different superscripts within row significantly differ ($p<0.05$).

3. The values (means±S.D.) are ΔCt , which is represented as the Ct of each target gene corrected by Ct of the control gene (RPL27).

4. The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

전자들(HSP70, HSP90- β 및 HMGCR)이 유의적으로 감소함을 볼 수 있었다($P<0.05$). 비타민 E의 경우도 비타민 C와 유사한 결과를 나타내었다. 비타민 C와 E를 혼합 급여한 처리구에서는 HMGCR과 HSP90- α 에서 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 발현량을 보였다($P<0.05$). 박테리아에서부터 식물과 동물에 이르기까지 고온 또는 화학적, 생리적 스트레스를 받게 되면 HSP의 생성이 증가하게 되며, 생성된 HSP는 스트레스로 인해 유발된 단백질의 손상을 회복시키거나 손상을 방어하는 기능을 한다(Wu, 1995). HSP 단백질은 다양한 스트레스(예, 제한사료 급여, 사회적 격리, 수송 등)에 반응하여 신속하게 생성되는 단백질이며(Al-Aqil and Zulkifli, 2009; Soleimani et al., 2012), 스트레스 반응에 대한 HSP의 발현은 세포 내 개체를 스트레스 요인으로부터 보호하려는 작용을 한다(Kregel, 2002). 이러한 작용 때문에 많은 연구자들이 HSP를 스트레스 마커 유전자로서 분석에 이용하고 있다(Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012; Al-Aqil et al., 2013). HMGCR은 콜레스테롤과 cortisol의 생합성에 가장 주요한 조절효소로서 일반적 스트레스 마커인자로 인식되어 있다(Gornati et al., 2004). 닭에 있어서 고밀도 사양이나 사료제한 사양 등에 대한 스트레스는 HMGCR의 발현을 증가시킨 보고(Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012)와 같이 가금에서도 효과적으로 활용할 수 있음을 알 수 있다. 본 연구 결과는 비타민의 첨가 급여가 스트레스 관련 HSP 및 HMGCR 유전자들의 발현을 억제하는 것으로 보아, 비타민 C, E의 사료 내 첨가 급여가 닭의 환경 스트레스를 감소시킬 수 있음을 스트레스 표지 유전자들의 발현 비교분석으로 보여 주었다.

3. 비타민 첨가 급여와 세포 내 ER stress연관 유전자들의 발현

육계에서 비타민 C 및 E의 첨가 급여가 세포질의 ER stress 관련 유전자들의 발현에 어떤 영향을 미치는지 살펴보고자 비타민 첨가 급여 후 5주령 닭의 간을 취하여 유전자들의 발현을 분석하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 비타민 C 및 E 첨가 급여는 세포 내 대표적 ER stress 마커 유전자들인 activating transcription factor(ATF) 및 XBP1의 발현이 대조구에 비하여 낮은 양상을 보였다($P<0.05$). SREBPs의 경우, 비타민 C에 의한 억제효과는 크지 않으나, 비타민 E에 의해 억제가 뚜렷하게 나타나고, 비타민 C와 E를 같이 첨가 급여한 경우에도 이 유전자들의 뚜렷한 발현의 억제 효과를 보였다($P<0.01$). ER은 세포질에서 단백질의 접힘, 조립 및 분리를 담당하는 주요한 세포소기관이다. ER stress는 ER의 단백질 접힘(folding) 관련 항상성이 파괴되어 소포체 내에 잘못 접힌 단백질 또는 접히지 못한 단백질이 축적되는 현상을 말한다(Basseri and Austin, 2012). 최근 ER stress는 지방대사와 항상성에 주요한 기능을 하는 것으로 보고되었다(Lee et al., 2008; Basseri and Austin, 2012). ER stress는 unfolded protein response(UPR)이 활성화를 유도하고, 이는 지방합성 관련 전사인자들을 조절함으로써 지방대사에 관여한다고 한다(Shen et al., 2004). 따라서 ER stress와 지방대사는 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었지만, 대부분 설치류와 사람에 대한 것이며, 조류에 대한 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서 대표적 ER stress 마커 유전자들의 발현 양상을 육계에서 분석하였다. ATF은 UPR과 관련한 잘 알려진 전사인자

Table 5. The effect of vitamin supplementation on the expression of ER stress associated genes in the liver of broiler chicken

| Genes | Treatment | | | | | | | | p-value |
|--------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|---------|
| | Control | | vt. C | | vt. E | | vt. C+E | | |
| | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | |
| ATF6 | 7.20±0.51 ^b | 1.00 | 7.26±0.56 ^b | 0.96 | 9.29±0.29 ^a | 0.24 | 8.56±1.20 ^{ab} | 0.39 | 0.0185 |
| ATF4 | 2.52±0.32 ^b | 1.00 | 4.48±1.57 ^a | 0.26 | 2.60±0.16 ^b | 0.95 | 2.11±0.57 ^b | 1.33 | 0.0379 |
| XBP1 | 3.55±0.66 ^b | 1.00 | 6.20±0.90 ^a | 0.16 | 3.52±0.61 ^b | 1.02 | 4.05±1.47 ^b | 0.71 | 0.0284 |
| SREBP1 | 10.64±0.20 ^b | 1.00 | 10.99±0.40 ^b | 0.79 | 12.59±0.61 ^a | 0.26 | 13.08±0.26 ^a | 0.18 | 0.0003 |
| SREBP2 | 10.03±0.38 ^b | 1.00 | 10.57±0.68 ^b | 0.69 | 12.45±0.29 ^a | 0.19 | 12.66±0.21 ^a | 0.16 | 0.0001 |

1. vt. C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), vt. E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), vt. C + E (vitamin C 200 mg/kg + vitamin E 100 mg/kg).

2. ^{a,b} Values (means±S.D., n=6) with different superscripts within row significantly differ ($p<0.05$).

3. The values (means±S.D.) are ΔCt , which is represented as the Ct of each target gene corrected by Ct of the control gene (RPL27).

4. The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

이다. ATF4는 CHOP, ATF3 등과 같은 스트레스 연관 전사인자들의 활성화 시킨다(Zha and Zhou, 2012). 활성화 된 CHOP는 지방세포의 분화를 억제하여 결국에는 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(Batchvarova et al., 1995). 본 연구에서는 비타민 C의 첨가 급여가 ATF4를 유의적으로 감소시켰지만($p < 0.05$), 비타민 E의 급여나 혼합첨가에서는 그 효과를 발견하지 못하였다. ER stress에서는 지방합성의 전사인자인 SREBPs의 활성화가 유도되어 지방산의 합성과 지방 형성과 콜레스테롤의 합성을 증가시킨다(Zha and Zhou, 2012). 그리고 ATF6는 XBP1과 heterodimer를 형성하여 CHOP, XBP1등의 발현을 증가시킨다. XBP1의 발현 증가는 C/EBP α 등과 같은 지방합성 관련 유전자들의 발현을 촉진시켜 간의 지방 축적을 증가시킨다. 본 연구에서 비타민 E의 첨가 급여는 강력한 ATF6의 발현 억제 효과를 보인 것으로 판단할 때 ER stress의 감소를 유도한 것으로 사료되며, 이의 결과로 SREBP의 발현도 감소함을 볼 수 있었다. 이상의 연구 결과는 비타민 C 또는 E의 첨가 급여는 세포 내 소포체 스트레스를 완화시킴으로써 닭의 스트레스를 완화시켜 주는 데 도움을 줄 수 있는 것으로 사료된다.

4. 비타민 급여 첨가와 지방대사 및 포도당 대사 연관 유전자들의 발현

육계에서 비타민 C 및 E의 첨가 급여가 지방대사 관련 유전자들의 발현에 어떤 영향을 미치는지 살펴보고자 비타민 첨가 급여 후 5주령 닭의 간을 취하여 유전자들의 발현을 분

석하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 비타민 C의 첨가 급여는 육계의 지방합성 연관 유전자들의 발현을 억제하는 것으로 나타났으나, 비타민 E와 혼합급여의 경우는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다. 간의 경우, 지방대사의 항상성을 유지하는 주요 기간이며, 특히 조류의 경우 대부분의 지방합성이 간에서 이루어지기 때문에, 닭의 간에서 지방대사의 중요성은 매우 크다고 할 수 있다. 포유류의 지방세포 또한 지방합성과 대사에 중요한 기능을 하며, ER stress는 SREBP 단백질의 증가와 지방합성효소 및 콜레스테롤의 증가를 유도한다고 한다(Zha and Zhou, 2012). 앞서서도 언급한 바와 같이 포유동물에서 ER stress는 XBP1, SREBP1의 증가에 의한 지방합성 및 콜레스테롤의 증가를 유도하는 것으로 보고된 바 있지만(Kammoun et al., 2009; Zheng et al., 2010), 닭의 경우 이와 연관된 연구 보고가 없는 실정이다. 본 연구에 의하면 ER stress는 지방대사에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 특히 비타민 C의 경우 사료 내 첨가 급여에 의해 지방합성을 감소시킬 수 있음을 보여 주었다.

본 연구에서는 지방대사 외에 에너지 대사와 연관된 관점에서 탄수화물의 세포내 이동과 이용에 관심을 두고, 포도당 운송 단백질(GLUT)과 간의 에너지 대사에 주요 기능을 하는 단백질(SIRT)의 유전자 발현을 조사 분석하였다. Table 7에서 보는 바와 같이 GLUT2와 GLUT8의 발현은 비타민 첨가 급여 유무와 관계없이 처리에 대한 변화가 없었다. SIRT1은 비타민의 단독 처리에 대한 변화가 없었으며, 비타민을 공동 첨가 급여한 경우 발현의 증가가 관찰되었다. SIRT5의

Table 6. The effect of vitamin supplementation on the expression of lipid metabolism associated genes in the liver of broiler chicken

| Genes | Treatment | | | | | | | | p-value |
|----------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|---------|
| | Control | | vt. C | | vt. E | | vt. C+E | | |
| | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | |
| PPAR α | 8.99±0.83 ^a | 1.00 | 8.95±0.32 ^a | 1.03 | 9.05±0.25 ^a | 0.96 | 9.26±0.33 ^a | 0.83 | 0.8738 |
| C/EBP α | 11.71±0.61 ^{ab} | 1.00 | 11.42±0.58 ^b | 1.22 | 11.69±0.81 ^{ab} | 1.01 | 12.82±0.27 ^a | 0.46 | 0.0825 |
| FASN | 3.24±0.64 ^b | 1.00 | 7.32±1.47 ^a | 0.06 | 4.05±0.94 ^b | 0.57 | 3.55±0.69 ^b | 0.81 | 0.0034 |
| FATP1 | 7.77±0.38 ^b | 1.00 | 10.07±1.17 ^a | 0.20 | 7.82±0.45 ^b | 0.97 | 8.34±0.17 ^b | 0.68 | 0.0084 |
| FABP4 | 9.21±1.37 ^a | 1.00 | 9.30±0.94 ^a | 0.94 | 8.12±0.70 ^a | 2.13 | 9.80±0.56 ^a | 0.66 | 0.2445 |
| ACSL1 | 2.98±0.48 ^b | 1.00 | 4.47±0.37 ^a | 0.36 | 2.54±0.64 ^b | 1.36 | 2.26±0.58 ^b | 1.65 | 0.0038 |

1. vt. C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), vt. E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), vt. C+E (vitamin C 200 mg/kg + vitamin E 100 mg/kg)
2. ^{ab} Values (means±S.D., n=6) with different superscripts within row significantly differ ($p < 0.05$).
3. The values (means±S.D.) are ΔCt , which is represented as the Ct of each target gene corrected by Ct of the control gene (RPL27).
4. The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Table 7. The effect of vitamin supplementation on the expression of glucose metabolism-associated genes in the liver of broiler chicken

| Genes | Treatment | | | | | | | | p-value |
|-------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|---------|
| | Control | | vt. C | | vt. E | | vt. C+E | | |
| | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | ΔCt | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | |
| GLUT2 | 10.03±0.14 ^a | 1.00 | 11.04±0.92 ^a | 0.50 | 11.18±1.69 ^a | 0.45 | 10.74±0.76 ^a | 0.61 | 0.5602 |
| GLUT8 | 9.44±1.22 ^a | 1.00 | 9.54±0.31 ^a | 0.93 | 10.91±0.49 ^a | 0.36 | 9.42±1.27 ^a | 1.01 | 0.2186 |
| SIRT1 | 8.09±0.55 ^{ab} | 1.00 | 7.65±0.93 ^b | 1.35 | 9.28±0.40 ^a | 0.44 | 7.25±0.85 ^b | 1.79 | 0.0392 |
| SIRT5 | 13.58±0.31 ^b | 1.00 | 11.49±0.71 ^d | 4.27 | 14.82±0.32 ^a | 0.43 | 12.42±0.29 ^c | 2.24 | 0.0001 |

1. vt. C(vitamin C supplement, 200 mg/kg feed), vt. E(vitamin E supplement, 100 mg/kg feed), vt. C+E (vitamin C 200 mg/kg + vitamin E 100 mg/kg)
2. ^{a-c} Values (means±S.D., n=6) with different superscripts within row significantly differ ($p<0.05$).
3. The values (means±S.D.) are ΔCt , which is represented as the Ct of each target gene corrected by Ct of the control gene (RPL27).
4. The fold difference in the relative expression of the target gene was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

발현은 비타민 C에 의한 발현 증가가 있었으며, 공동급여에 의한 효과도 관찰되었다. GLUT2와 GLUT8은 닭의 간에서 다량 발현되는 세포의 포도당 운송을 담당하고 있는 운반체이다(Kono et al., 2005). SIRT1의 경우, 간에서 에너지대사에 관여하는 것으로 세포의 대사감지자이며, 간의 포도당과 지방대사의 조절자로서 중요한 기능을 하는 것으로 최근에 보고된 바 있다(Li, 2013). 포유동물에서 SIRT1은 SREBP1의 억제함으로써 이 전사인자에 의한 지방합성 관련 유전자발현에 영향을 미쳐 지방합성을 억제하는 것으로 알려져 있으나(Walker et al., 2010), 조류에서 이 유전자의 기능은 아직 알려진 바가 없다. 포유동물에서 SIRT5 또한 스트레스에 반응하여 이 유전자가 발현이 증가하게 되면 개체의 스트레스 저항성을 높여준다고 한다(Gert and Steegborn, 2010). SIRT1과 5의 발현이 비타민 C와 E에 각각 상반된 결과를 나타내었는데, 조류에서 이에 대한 의미 있는 연구 및 분석이 필요하다고 사료된다.

적 요

본 연구는 육계에서 비타민 C와 E의 첨가 급여가 소포체(ER) 스트레스 및 지방 및 포도당대사 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다. 육계에 비타민 첨가 급여 후 5주령에 닭의 간을 취하여 유전자들의 발현을 real-time PCR로 비교 분석하였다. 육계의 비타민 C 및 E 첨가 급여는 HSP70, HSP90 및 HMGCR 스트레스 마커 유전자들의 발현을 감소시켰다. ER 스트레스 관련 유전자들 또한 스트레스 마커 유전자들과 마찬가지로 비타민 처리에 의하

여 대조구에 비하여 낮은 발현 양상을 보여줌으로서, 대표적 스트레스 마커 유전자들과 더불어 세포 내 ER stress도 영향을 받을 수 있음을 보여 주었다. 육계의 비타민 첨가 급여는 대조구에 비하여 지방대사 연관 유전자들의 발현이 비타민 첨가구에서 감소함에 따라 지방대사에도 영향을 미치고 있음을 보여주었다. 비타민의 첨가 유무와 관계없이 간세포 내부로 포도당을 운반하는 운반체인 GLUT 단백질들의 발현에는 큰 영향을 주지 못하였다. 본 연구의 결과는 육계에 사료 내 비타민 C 또는 E의 첨가급여가 닭의 스트레스 정도를 완화시킬 수 있으며, 또한 지방합성 대사에도 영향을 미칠 수 있음을 세포 수준의 관련 유전자들의 분석을 이용하여 검증할 수 있음을 보여 주었다.

(색인어 : 비타민 C, 비타민 E, 소포체, 스트레스, 육계)

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21 사업(과제 번호: PJ0079812011) 지원에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- Al-Aqil A, Zulkifli I 2009 Changes in heat shock protein 70 expression and blood characteristics in transported broiler chickens as affected by housing and early age feed restriction. Poultry Sci 88:1358-1364.
- Al-Aqil A, Zulkifli I, Hair Bejo M, Sazili AQ, Rajion MA, Somchit MN 2013 Changes in heat shock protein 70, blood

- parameters, and fear-related behavior in broiler chickens as affected by pleasant and unpleasant human contact. *Poultry Sci* 92:33-40.
- Basseri S, Austin RC 2012 Endoplasmic Reticulum Stress and Lipid Metabolism: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biochemistry Research International* volume 2012 article ID 841362.
- Batchvarova N, Wang XZ, Ron D 1995 Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP(Gadd153). *EMBO J* 14(19):4654-4661.
- 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.
- Craig JV, Craig JA, Vargas JV 1986 Corticosterone and other indicators of hens' well-being in four laying-house environments. *Poultry Sci* 65:856-863.
- Davison TF, Freeman BM, Rea J 1985 Effects of continuous treatment with synthetic ACTH1-24 or corticosterone on immature *Gallus domesticus*. *Gen Comp Endocrinol* 59(3):416-423.
- Dawkins MS, Donnelly CA, Jones TA 2004 Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. *Nature* 427:342-344.
- De Faria Filho DE, Campos DMB, Alfoxso Torres KA, Vieira BS, Rosa PS, Vaz AM, Macari M, Furlax RL 2007 Protein levels for heat-exposed broilers: performance, nutrients digestibility, and energy and protein metabolism. *Int J Poult Sci* 6:187-194.
- Fellenberg MA, Speisky H 2006 Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat. *World's Poult Sci J* 62:53-70.
- 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(2):318-327.
- Gertz M, Steegborn C 2010 Function and regulation of the mitochondrial Sirtuin isoform Sirt5 in mammalia. *Biochim Biophys Acta* 1804(8):1658-1665.
- 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.
- Imik H, Aydemir Atasever M, Urcar S, Ozlu H, Gumus R, Atasever M 2012 Meat quality of heat stress exposed broilers and effect of protein and vitamin E. *Br Poult Sci* 53:689-698.
- Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferré P, Foufelle F 2009 GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 119(5):1201-1215.
- 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(3):414-420.
- Kono T, Nishida M, Nishiki Y, Seki Y, Sato K, Akiba Y 2005 Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *Br Poult Sci* 46(4):510-515.
- Kregel KC 2002 Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92:2177-2186.
- Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH 2008 Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320:1492-1496.
- Li X 2013 SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin* 45:51-60.
- 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(4):402-408.
- McKee JS, Harrison PC 1995 Effects of supplemental ascorbic acid on the performance of broiler chickens exposed to multiple concurrent stressors. *Poultry Sci* 74(11):1772-1785.
- 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(10):2101-2107.
- 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(4):691-700.
- Pardue SL, Thaxton JP, Brake J 1985 Influence of supplemental ascorbic acid on broiler performance following exposure to

- high environmental temperature. *Poultry Sci* 64(7):1334-1338.
- Puron D, Santamaria R, Segavra JC, Alamilla JL 1995 Broiler performance at different stocking densities. *J Appl Poult Res* 4:55-60.
- Shen X, Zhang K, Kaufman RJ 2004 The unfolded protein response-a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat* 28:79-92.
- Siegel HS 1960 Effects of population density on the pituitary-adrenal cortical axis of cockerels. *Poult Sci* 39:500-510.
- Siegel HS 1995 Stress, strains and resistance. *Br Poultry Sci* 36:3-22.
- Siegel HS, Van Kampen M 1984 Energy relationships in growing chickens given daily injections of corticosterone. *Br Poult Sci* 25:471-485.
- Sohn SH, Cho EJ, Jang IS, Moon YS. 2013 The effects of dietary supplementation of vitamin C and E on the growth performance and the stress response in broiler chickens. *Korean J Poult Sci* 40(1):31-40.
- 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(4):829-836.
- Soleimani AF, Zulkifli I, Hair-Bejo M, Omar AR, Raha AR 2012 The role of heat shock protein 70 in resistance to *Salmonella enteritidis* in broiler chickens subjected to neonatal feed restriction and thermal stress. *Poultry Sci* 91(2): 340-345.
- Temim S, Chagxeac AM, Peresson R, Tesseracq S 2000 Chronic heat exposure alters protein turnover of three different skeletal muscles in finishing broiler chickens fed 20 or 25% protein diets. *J Nutr* 130:813-819.
- Walker AK, Yang F, Jiang K, Ji JY, Watts JL, Purushotham A, Boss O, et al 2010 Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. *Genes Dev* 24:1403-1417.
- Wu C 1995 Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:441-469.
- Zha BS, Zhou H 2012 ER Stress and lipid metabolism in adipocytes. *Biochem Res Int* 2012:312943.
- Zheng Z, Zhang C, Zhang K 2010 Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World J Hepatol* 2(6):203-207.
- (접수: 2013. 6. 12, 수정: 2013. 6. 13, 채택: 2013. 6. 13)