육계의 에너지 제한 사양에 따른 지방 합성 및 근육 발달 관련 유전자의 발현 양상 비교 분석

문 양 수[†]

진주산업대학교 동물생명과학과

Analysis of Lipogenic and Myogenic Gene Expressions in Energy Restricted Broiler Chickens

Yang Soo Moon[†]

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

ABSTRACT The present study was conducted to determine the effect of energy restricted (ER) diet on the expressions of lipogenic genes in liver and myogenic genes in muscle tissue of broiler chickens. Energy restriction was accomplished by providing chicks with 70% (ER70) or 85% (ER85) energy level of control diet intake. Energy restricted groups of chickens were restricted for 7 days, starting at 8 days of age. *Ad libitum* feeding was resumed after the restriction period, and continued through the end of the experiment. The body weight of chickens in the restricted groups gained less during the energy restriction period ($P<0.05$). The body weight of the ER groups were similar to the control group during the re-alimentation period. However, the body weight of the ER70 group did not catch up with that of the control group by 35 days of age. The energy restrictions during early life of chicks decreased the contents of triglycerides and cholesterol in blood ($P<0.05$), but those were not different among treatments after re-alimentation. The genes of fatty acid synthase (FAS) and transcription factors including SREBP and PPAR γ were down regulated by restriction regimen only in ER70 ($P<0.05$). However, those genes were not completely recovered after re-alimentation in ER70 group. The RNA expression levels of Myo-D, Myf-5 and myogenin in all treatment groups were decreased by restriction regimen when compared with control group ($P<0.05$). Myogenin was highly expressed after re-alimentation, but the other genes were not different among groups. These results suggest that ER85 group shows the best growth performance by re-alimentation and the higher muscle differentiation by expressing myogenin.

(Key words : lipogenic genes, myogenic genes, gene expression, energy restriction, broiler)

서 론

동물의 성장 시기 특히 중요한 어린 발육기에는 적용되는 영양 체계에 따라 그 개체의 건강과 생산성에 지대한 영향을 미친다. 이러한 영양체계는 포유 동물뿐만 아니라 조류에 계도 적용될 수 있으며, 따라서 닭을 이용한 조기 영양적 조절이 장기적으로 그 개체의 체성장, 장기 발육, 소화, 번식, 면역, 대사성 질환 등에 어떤 영향을 미치는지 등에 관한 많은 연구가 진행되었다(Lee and Leeson, 2001; Pinheiro et al., 2004). 육계는 빠른 성장에 기초한 유전적 개량에 의해 다른 가축들보다 그 능력이 괄목할 만큼 개량되었다. 이와 같은 개량의 목적을 달성하기 위해서는 무제한 사료 급여가 수반

되고 이의 결과로 육계의 성장은 매우 빨라졌으나, 복강 지방의 급격한 증가, 대사성 질병에 의한 폐사율 급증 등이 초래되었다(Gonzales et al., 1998; Acar et al., 1995). 최근 동물성 지방의 과다한 섭취로 인해 성인병의 발생에 대한 우려 때문에 닭의 지방 축적을 감소시키려는 측면의 연구가 많이 시도되고 있을 뿐만 아니라, 생산성을 유지하면서 닭의 사육 환경도 개선하여 동물 복지와 생산성을 동시에 달성하기 위한 노력이 유럽과 북미 대륙을 중심으로 이루어지고 있다(Jones et al., 2004). 육계에 대한 제한 사양은 육계 생산에 가장 많은 비용을 차지하는 사료비의 절감과 시장 출하 일령에 체지방 축적을 감소시키기 위하여 Plavnik과 Hurwitz(1985)에 의하여 처음으로 시도되었다. 그러나 이후 연구 결과에

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

대한 상반된 결과 등에 의하여 제한 사양에 대한 명확한 기작은 확립되지 못한 편이다. 지금까지 발표된 내용을 종합하여 보면 육계의 생산 능력에 지장이 없으면서 체지방 축적 감소, 사료 효율 개선 및 생존율 향상 등의 효과를 얻기 위한 제한 사양은 대체로 부화 후 약 4~8일령부터 4~14일간 질적(에너지) 또는 양적 제한 사양을 실시하고 이후 시장 출하일까지 자유 급이를 시킴으로서 제한 사양에 의한 성장 억제에서 보상 성장으로 전환시키는 방법이 보고되고 있다 (Lippens et al., 2000; Gonzales et al., 1998; Acar et al., 1995). 기존에 보고된 대부분은 사양 시험에 의한 사료 효율, 체지방 축적, 체성장 그리고 성장 호르몬을 포함한 대사관련 호르몬 분석에 중점을 두었다. 따라서 본 연구는 기존의 사료 제한 방법에 의해 나타난 체지방 축적의 변화관련 유전자 (fatty acid synthase, SREBP, PPAR γ) 및 체 성장과 관련된 근육 관련 유전자(Myo-D, Myf-5, Myogenin)들이 제한 사양에 의해 어떻게 변화하는지를 비교 분석함으로써 최적의 육질 생산을 위한 분자생물학적 기초 자료를 확보하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 시험 설계

본 시험에 이용된 공시동물은 1일령 ROSS 308 수컷으로 (주)올품에서 구입하였다. 사양 시험은 본 대학교 종합 실험 농장 실험 계사에서 수행하였다. 시험 동물은 구입 후 스트레스로 인한 부작용을 최소화하기 위해 2일간 적응 기간을 거친 3일령(34.19±0.10 g)병아리를 완전 임의 배치법에 의해 3개 처리구에 처리당 5 반복, 반복당 4수씩 배치하였다.

2. 시험 사료와 사양 관리

시험 동물의 사양 관리는 온도 및 명암 조절(조명: 07:00~19:00)을 갖춘 사육 시설에서 본 대학의 육계 사육 관리 지침에 따라 실시하였다. 모든 시험 동물은 상업용 육계 전기 사료(3~21일령)와 육계 후기 사료(22~35일령)를 제한 사양 기간을 제외한 기간에 급여하였다. 사료 섭취량과 체중은 3, 7, 14, 21, 35일령에 각각 측정하였다. 제한 사양은 8일령부터 14일령까지 실시하였으며, 제한 사양은 대조구 기준 85% 에너지 수준(ER85%)과 70% 수준(ER70)으로 구분하여 급여하였다(Table 1). 제한 사양 후에는 대조구와 사료 제한 처리구 모두 사료를 자유 채식할 수 있게 하였다.

Table 1. Formula of experimental diets manipulated by feed restriction procedure to decrease energy during the period of early feed restriction (8 to 14d)

Items	Energy restriction level		
	100% (Control)	85% (ER85)	70% (ER70)
Ingredients (%)			
Yellow corn	55.78	49.00	36.54
Beef tallow	3.50		—
Wheat bran	—	21.00	46.50
Corn gluten meal	5.00	2.00	—
Soybean meal	30.40	22.00	11.50
Salt	0.32	0.37	0.33
Limestone	0.80	1.20	1.30
Dicalcium phosphate	1.70	1.20	0.90
Vitamin + mineral premix ^a	2.50	3.23	2.93
Total	100	100	100
Calculated analysis			
ME (kcal/kg)	3,120	2,655	2,190
Crude protein (%)	21.13	18.02	14.80
Ca (%)	0.85	0.85	0.85
P (%)	0.65	0.65	0.65

^a Contained per kg : Vit. A, 5,500,000 IU; Vit D₃, 1,500,000 IU; Vit E, 15,000 mg; Vit K, 800 mg; thiamin, 1,000 mg; Riboflavin, 4,000 mg; Niacin, 25,000 mg; Biotin, 30 mg; Folic acid, 500 mg; Pantothenic acid, 5,000 mg; Pyridoxine, 1,500 mg; Vitamin B₁₂, 15 mg; kg: Cu, 12,000 mg; Fe, 35,000 mg; Zn, 25,000 mg; Co, 150 mg; I, 500 mg; Co, 150 mg; Se, 120 mg; and Mn, 38,000 mg.

3. 시료 채취 및 RNA 추출

육계는 제한 사양 시작 전 7일령, 제한 사양 종료 직후 14일령, 그리고 사양 시험이 종료되는 35일령에 체중 측정과 사료 섭취량을 각각 조사하고, 시험 동물로부터 간과 근육을 채취한 후 즉시 밀봉하고 액체 질소에 급속 동결하여 분석 전까지 -70℃에 보관하였다. 근육 및 간으로부터 total RNA 분리는 Trizol reagent(Invitrogen, USA)를 이용하여 추출하였다. 조직을 Trizol reagent 용액에서 homogenization한 후 실온에서 5분간 배양시켜 chloroform을 혼합하고 15초간 교반시켜 실온에 2~3분간 배양시켜 원심 분리하였다. Aqueous phase 층을 새 튜브에 옮겨 isopropanol을 혼합하고 실온에서 10분

간 배양시킨 후 원심 분리하여 상층을 제거하였다. RNA pellet을 DEPC alcohol 75%로 2회 수세한 후 자연 건조시켜 RNase-Free water(DEPC)에 녹이고 60 °C에서 10분간 배양한 후 분리된 total RNA는 -70 °C에 보관하였다.

4. RT-PCR에 의한 mRNA 발현 양상 분석

RT-PCR 방법은 조직에서 추출한 RNA를 cDNA 합성 과정을 거쳐 주어진 유전자의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였으며, internal control은 actin을 이용하였다. PCR용 primer를 위한 대상 유전자로는 근육 관련 유전자(Myo-D, Myf-5, Myogenin) 및 지방 관련 유전자(FAS, SREBP, PPAR γ)들의 유전자를 이용하였다. 이들 유전자의 정보는 NCBI GenBank로부터 확보하여 이용하였으며, primer 서열과 GenBank access number는 Table 2와 같다. PCR의 반응 조건은 일반적인 PCR 방법을 따라 실시하였다.

5. 통계 분석

육계의 사료 급여 조건과 생체 내 지방 및 근육 관련 유전자들의 발현 양상 비교 분석을 위하여 SAS 통계 패키지(SAS,

2002)를 이용하였다. 먼저 GLM(General Linear Model)으로 분산 분석하여 유의한 차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple test에 의해 $P<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 육계의 조기 제한 급여와 보상 성장

육계를 8일령부터 1주일간 에너지를 제한 사육한 후 35일령 시장 출하일령까지 상업용 육계 사료로 자유 급여를 실시하여 육계의 성장을 조사하였다(Table 3). 무제한 급여를 실시한 대조구는 예상대로 14일령에 가장 높은 체성장을 나타내었다($P<0.05$). ER85와 ER70 처리구는 대조구에 비해 각각 11.0%와 30.8%의 체중 감소를 나타내었다. 육계에서 에너지를 대조구의 70% 수준으로 공급하는 것은 제한 급여 동안 과도한 체중 감소를 초래하였다. 이는 제한 사육 후 자유 급여에 의한 보상 성장 기간에도 대조구의 체성장보다 약 7.3% 낮은 성장률로 나타났다. 즉, 시장 출하일령까지 충분하게 보상 성장이 일어나지 않음을 알 수 있었다. 그러나 ER85 처리

Table 2. Primer sequences and conditions for RT-PCR

Gene	Forward primer sequences (5' - 3')	Reverse primer sequences (5' - 3')	Product size (bp)	Gene bank access number	Tm (°C)
FAS	CAATGGTTGACACAGAAATGC	GCTTGTGTTGATCAGCTCTTCC	182	J03860	57
SREBP	TGCAGAAGAGCAAGTCCCTCA	CTTCACCTTGCCATGGTGCA	220	AY029224	67
PPAR γ	CAATGGTTGACACAGAAATGC	GCTTGTGTTGATCAGCTCTTCC	180	AF163811	53
Myo-D	ACTCCGACGTTCCAGTCGCC	GGTGCTCCTCGGGCTTCAGCA	390	L34006	54
Myogenin	ATGGAGCTCTTTGAGACCAAC	GTCAGATCCTTCTCCTCCAAA	300	D90157	54
Myf-5	ATGGAGGTGATGGACAGCTGC	GGACTCCTTCTCCTTGTCAG	390	NM001030363	60
Actin	CAAAGCGCTCGATTTCATCGC	CAGCACTTTCAGATGCGGTT	180	NM205518	55

Table 3. Growth measurement of broiler chickens during restriction and re-alimentation

Items	Energy restriction level		
	100% (Control)	85% (ER85)	70% (ER70)
Initial weight (g)	34.18 $\pm$ 0.09	34.15 $\pm$ 0.09	34.25 $\pm$ 0.10
d7 weight (g)	167.7 $\pm$ 5.18	168.15 $\pm$ 3.19	167.95 $\pm$ 4.41
d14 weight (g)	404.73 $\pm$ 15.70 ^a	360.16 $\pm$ 9.88 ^b	280.08 $\pm$ 6.15 ^c
d35 weight (g)	1,979.06 $\pm$ 54.96 ^{ab}	2,029.13 $\pm$ 62.87 ^a	1,834 $\pm$ 28.41 ^b

^{a,b}Means (means $\pm$ SE) with different superscripts within a row differ ($P<0.05$) ($n=5$).

구는 자유 급이 3주후 보상 성장이 완전하게 이루어졌으며, 통계적 유의성은 없었으나 대조구에 비하여 높은 경향의 체중(1,979.06 g VS 2,029.13 g)을 나타내었다.

제한 사양의 주요 목적은 사료 효율 향상, 복수증(Tottori et al., 1997), 급사증(Blair et al., 1993), 골격 이상(Lee and Lee-son, 2001) 등 각종 질환 억제 등을 들 수 있다. 육계에 대한 제한 사양에 대한 연구는 제한 사양의 시작점, 제한 사양 기간, 제한 사양의 강도 등 다양한 측면에서 보고되고 있으나 그 결과들은 일관된 것들이 아니며 이러한 결과들의 차이는 제한 사양 기간, 종, 성별 및 제한 사양 강도 등에 의한 차이로 분석하였다(Yu and Robinson, 1992). 육계의 성장은 부화 후 4주령까지의 사양 관리가 성장에 큰 영향을 미치는데, 그 중에서 첫 1주가 가장 큰 영향을 미친다고 한다(Marks, 1979). 제한 사양에 대한 적용 시기는 부화 후 3일령부터 11일령 사이에 실시하여야 보상 성장에 대한 효과를 얻을 수 있으며, 암컷의 경우 5일령 이전 실시하는 것이 효과적이라고 하였다(Plavnik and Hurwitz, 1988). 그리고 McMurtry et al.(1988)과 Plavnik와 Hurwitz(1991)에 의하면 제한 급이 시기는 1주령부터 실시하며, 제한 사양 기간은 수컷은 7일, 암컷은 5일을 넘지 않도록 해야 보상 성장에 의한 체성장 효과를 얻을 수 있다고 보고하였다. 한 연구에 의하면 육계를 8일령부터 14일령까지 30~40% 제한 사양을 실시한 결과, 시장 출하 체중에 이르지 못하였다고 한다(Gonzales, 1992). 또한 육계를 4일령부터 사료 섭취량을 80% 수준으로 4일 또는 8일간 제한하였을 때 42일령에 시장 출하 체중에 도달하지 못하였으나, 제한 사양 90% 수준에서 4일간 제한 사양을 실시한 경우 시장 출하 체중에 성공적으로 도달하였다고 한다(Lippens et

al., 2000). 위의 시험들은 사료의 전체적인 섭취량을 제한하거나 사료중 에너지 함량을 제한한 경우가 대부분으로 본 시험에서는 사료중 에너지를 15% 또는 30% 수준으로 제한하여 급여하였다. 따라서 본 시험의 결과와 타 연구자들의 결과를 직접적으로 비교할 수는 없지만 보상 성장에 의한 효과를 고려할 때 제한 사양을 위한 적합한 에너지의 수준은 85%으로 1주일간 유지하였을 때 좋은 결과를 나타낼 수 있다고 사료된다.

2 제한 사양 및 보상 성장이 혈중 지방 성분에 미치는 영향

육계를 7일간 제한 사양과 시장 출하 일령까지 자유 급이 한 후의 혈중 콜레스테롤, 중성지방 및 포도당의 농도를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 제한 사양 후 콜레스테롤의 함량은 대조구에 비하여 40.6%(ER85)와 38.1%(ER70) 감소하였으나($P<0.05$), 처리구간에는 유의적 차이를 나타내지 않았다. 중성지방 또한 대조구와 비교하여 64.5%(ER85), 49.5%(ER70) 각각 감소하였다. 혈중 포도당은 지방 성분들과 같은 경향으로 대조구에 비하여 34.5%(ER85), 27.7%(ER70) 각각 낮은 수준을 보였다.

1주일간의 제한 급이 종료 후 3주간의 자유 급이로 인한 보상 성장의 결과, 혈중 콜레스테롤의 함량은 대조구와 처리구간에 차이가 없었다. 혈중 중성지방은 대조구와 비교하여 처리구에서 102.3%(ER85)와 72.1%(ER70)의 높은 함량을 보여주어 제한 사양 직후와 상반된 결과를 보여 주었다. 혈중 포도당의 경우 ER70 처리구에서 비교적 높은 혈중 함량을 보였으며, 대조구와 ER85 그리고 처리구 간에는 유의적 차이

Table 4. Serum biochemical profiles in broiler chickens fed the diets manipulated by energy restriction

Items	Energy restriction level		
	100% (Control)	85% (ER85)	70% (ER70)
At 14 days			
Cholesterol (mg/dL)	212.00 ± 30.97 ^a	126.00 ± 9.96 ^b	131.20 ± 13.69 ^b
Triglyceride (mg/dL)	40.00 ± 7.74 ^a	14.20 ± 2.04 ^b	20.20 ± 5.85 ^b
Glucose (mg/dL)	316.40 ± 42.73 ^a	204.00 ± 17.61 ^b	228.60 ± 18.82 ^b
At 35 days			
Cholesterol (mg/dL)	124.40 ± 9.16	128.20 ± 12.20	146.80 ± 9.82
Triglyceride (mg/dL)	8.6 ± 1.02 ^b	17.40 ± 2.71 ^a	14.80 ± 1.42 ^a
Glucose (mg/dL)	216.60 ± 9.69 ^b	252.00 ± 13.53 ^{ab}	255.40 ± 8.72 ^a

^{a,b}Means(means ± SE) with different superscripts within a row differ($P<0.05$) ($n=5$).

를 보이지 않았다. 육계를 이용한 제한 사양과 보상 성장에 대한 보고들은 사료 효율 개선과 더불어 체지방과 복부지방의 감소가 나타났으며, 시장 출하 체중이 부분적으로 감소한 경우도 있었다(Mollison et al., 1984; Calvert et al., 1987; Pinchasov and Jensen, 1989). 그러나 사료 효율의 개선은 있었지만 육계의 복부 지방은 오히려 증가했다는 보고도 있다(Beane and Zachmanoglou, 1979). 그리고 사료 효율의 개선에 대한 효과는 있었지만 처리구와 대조구간에 체조성에는 차이가 없었다는 보고도 있다(Poknial and Comejo, 1982). Plavnik et al.(1985, 1986)이 연구한 것을 종합하여 보면 사료 효율 개선, 체지방 및 복부 지방 감소, 보상 성장 후 시장 출하 연령 시 체중 감소 현상이 없었다고 한다. 이와 같이 연구자별로 결과에 대한 차이가 있지만 사료 효율 개선에 대한 결과는 일관되게 보고되고 있으며, 체지방에 대한 감소에 대한 보고도 비교적 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서는 직접적으로 체지방에 대한 분석을 실시하지 않았으나 35일령 혈중 콜레스테롤의 함량에는 큰 차이는 없었지만 중성지방의 함량은 대조구에 비하여 더 높은 수준을 보였다. Beane과 Zachmanoglou(1979)의 보고와 유사하나 시료를 취하는 시기(시장 출하 일령, 42~49일)가 많은 차이가 있고, 처리한 제한 사양 방법에 의한 차이 등에 의하여 직접적으로 비교하기는 어려운 점이 있다. 또한 육계의 체조성은 사료내 단백질 함량에 의해 크게 영향을 받게 되는데 에너지와 단백질의 비율이 증가하면 지방의 축적이 많아지며, 반대로 에너지와 단백질의 비율이 낮아지면 육계의 지방 함량이 감소한다고 한다(Sum-

mers et al., 1990; Bartov, 1987). 본 시험은 에너지와 단백질을 같은 비율로 감소시켰기 때문에 기존의 연구들과 직접적으로 비교하기는 어려우나 처리구의 중성 지방 함량뿐만 아니라 간에서 지방 합성에 쓰이는 포도당 또한 같이 증가하는 것으로 보아 ER85구의 35일령 체중 증가는 체지방 함량의 증가도 함께 이루어진 것으로 사료된다.

3. 제한 사양과 보상 성장이 지방 합성 유전자 FAS와 SREBP 및 PPAR γ 의 발현에 미치는 영향

지방합성효소(FAS) 유전자의 발현은 이 유전자의 promoter 전사 조절 부위에 SREBP, PPAR γ 등 전사 인자가 작용하여 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 FAS mRNA 발현율은 전사인자의 발현 정도에 따라서 영향을 받을 것으로 예상되기 때문에 FAS와 SREBP 및 PPAR γ 의 발현 양상을 같이 분석하였다. 7일간의 제한 사양 직후 FAS, SREBP 및 PPAR γ 의 발현 양상은 ER70구에서 FAS와 SREBP의 발현이 감소하였을 뿐 대조구와 ER85구에서는 서로간의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 1A). 제한 사양 후 자유 급이를 3주간 실시한 후 시장 출하 일령에 앞의 유전자들의 발현을 조사한 결과 ER85구에서 FAS의 발현이 가장 높게 나타났으며, 대조구와 ER70구는 서로간에 차이가 없었다(Fig. 1B). SREBP와 PPAR γ 의 발현은 ER70구에서 가장 낮게 나타났으며, 대조구와 ER85구에서는 차이를 나타내지 않았다. Rosebrough et al.(1988) 등은 육계에서 낮은 에너지 섭취량은 포도당 생성을 감소시키며, 단백질 섭취량의 증가는 지방 합성 감소와 포도당 생성 증

Fig. 1. The gene expressions of FAS, SREBP and PPAR γ in liver tissues at 14 (A) and 35-d old (B) broiler chicks fed a control diet or subjected to a feed restriction (8 to 14-d of age) and re-alimentation (15 to 35-d of age) nutrition regimen. Relative mRNA is expressed as an arbitrary unit as the value of signal intensity for genes relative to that for β -actin. Values are means per group ($n=5$) with standard errors shown by vertical bars.

^{ab}Means without the same letter differ significantly ($P<0.05$).

가를 유도한다고 하였다. 또한 육계를 6일령부터 12일령까지 6일간 제한 사양 후 27일령까지 자유 급이한 경우 27일령에 지방합성효소들(FAS와 malic enzyme)의 활성이 모두 감소하였으며(Rosebrough et al. 1986), 재급이 2일 후(14일령) 지방 합성이 급격히 증가함을 보였으나 시간이 지난 27일령에 이들 효소들의 활성은 오히려 대조구보다 낮은 수준을 보였다고 한다. 본 시험에서는 지방합성 효소의 활성을 측정하지 않았지만 FAS의 mRNA를 분석한 결과, ER70의 경우 낮은 발현량을 보여 Rosebrough et al.(1988)의 결과와 유사하였으나, 제한 사양을 약하게 한 ER85구에서는 대조구와 차이를 보이지 않았다. Rosebrough et al.(1988)의 결과를 보면 에너지의 섭취량 감소는 체내 지방합성효소의 활성과 포도당 생성을 감소시킨 결과와 같이 본 연구에서도 절식 후 14일령의 육계에서도 포도당과 혈중 지방 성분이 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 현상은 지방합성효소(FAS)와 이를 조절하는 전사 인자인 SREBP, PPAR α 등의 유전자 발현에서도 같은 경향을 뒷받침하여 준다. 그러나 이보다 낮은 수준의 제한 사양인 ER85 처리구의 유전자 발현에서는 대조구와 차이를 보이지 않았으나, 혈중 지방 함량과 포도당에는 크게 영향을 미치는 것으로 나타나 유전자 발현과 실제 지방 함량에는 차이가 있음을 볼 수 있었다. 제한 사양 후 3주일간 자유 급이는 지방합성효소(FAS) 유전자의 발현이 활발해져 ER85에서는 대조구에 비하여 오히려 높은 발현 수준을 보였으며, ER70 또한 대조구와 같은 수준의 발현을 보여 주었다. 그러나 ER70의 전사 인자들은 여전히 대조구의 발현량보다는 낮

은 수준을 보였다. Rosebrough et al. (1986)에 의하면 지방합성효소들의 활성은 제한 사양 기간 동안 감소되었다가 자유 급이 시작 1주일 후에 그 활성이 최고에 도달하고 이후 점진적으로 감소한다고 보고하였다. 육계에 있어 사료 제한 처리는 2주령에서 3주령에 걸쳐 가장 많이 적용되는데, 이 시기에 지방 조직 성장의 주요 요인인 지방세포의 과성장을 억제할 수 있기 때문이라고 Pfaff(1977), Pinchasov and Jensen(1989), Calvert et al.(1987) 등은 보고하였다. 그러나 급이를 재개한 후 2주일의 지나면 FAS와 malic enzyme 효소들의 활동이 자유 급이한 처리구에 비하여 수준이 낮아진다고 보고하였다. 지방합성효소의 활동이 왕성하다 다시 줄어드는 이유에 대해서는 좀 더 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

4. 제한 사양과 보상 성장이 근육 관련 유전자의 발현에 미치는 영향

육계의 초기 제한과 보상 성장 사양 체계가 근육 관련 유전자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 에너지 제한과 보상 성장 후 Myo-D, Myf-5 및 Myogenin의 발현량을 조사하였다. 1주일간의 제한 사양 후 14일령에 근육 관련 유전자의 발현 양상은 대조구에 비해 모든 처리구에서 발현율이 낮게 나타났다(Fig. 2A). 그러나 ER85와 ER70과의 비교에서는 차이를 나타내지 않았다. 본 시험은 육계의 근육 발달이 가장 왕성하게 일어나는 1주일령까지는 정상적인 사양을 한 후 8일령부터 1주일간 대조구에 비하여 에너지가 15%(ER85)와 30%(ER70)가 낮은 제한 사양을 실시하였다. 1주일간의 제한 사

Fig. 2. The gene expressions of Myo-D, Myf-5 and Myogenin in muscle tissues at 14 (A) and 35-d old (B) broiler chicks fed a control diet or subjected to a feed restriction (8 to 14-d of age) and re-alimentation (15 to 35-d of age) nutrition regimen. Relative mRNA is expressed as an arbitrary unit as the value of signal intensity for genes relative to that for β -actin. Values are means per group (n=5) with standard errors shown by vertical bars.

^{a,b}Means without the same letter differ significantly ($P < 0.05$).

양은 ER85와 ER70 처리군에서 Myo-D, Myf-5 및 Myogenin 모두 대조구에 비하여 ER85처리군에서 16%, 8%, 15%, 그리고 ER70 처리군에서는 26%, 19%, 27% 각각 감소하였다. 그러나 두 처리군간에는 이들 유전자들의 발현량 차이를 볼 수 없었다. 이는 Yu와 Robinson(1992)과 Acar et al.(1995)등의 보고에서 육계를 7일령부터 14일령까지 제한 사양한 직후 근육량을 측정된 결과, 대조구에 비하여 가슴 근육량이 감소한 결과를 볼 때, 이들 근육 발달 관련 유전자들의 발현 감소는 생리적 예상과 일치하는 것으로 사료된다. 부화 후 무제한 급이에 의한 대조구의 경우 satellite cell의 증식에 다른 Myo-D, Myf-5 유전자의 높은 발현과 Myogenin에 의한 근육세포의 분화가 정상적으로 일어난 것에 비하여 제한 사양 처리구는 7일간의 제한 사양 기간 동안 Myo-D와 Myf-5의 발현량 감소에서 보듯 satellite cell의 증식뿐만 아니라 증식된 세포의 분화에도 영향을 미쳐 근육 발달이 대조구에 비하여 낮게 나타난 것으로 보인다. 이는 제한 사양 처리구가 대조구에 비해 7일간의 제한 사양에 의하여 11%(ER85)~30.8%(ER70)의 체중 감소(Table 3)를 나타낸 결과가 이들 유전자들의 발현 양상을 뒷받침해 준다. Halevy et al.(2004)에 의하면 닭의 근섬유 크기의 증가가 부화 후 초기 즉 3~6일령 사이에 크게 증가함을 보여 주는데, 이는 근육세포의 분화가 부화 후 1주일 이내에 최고조에 달한다는 것과, 육계의 경우 근육 형성은 일차적으로 배아기 10일 이후에 급격히 일어나고, 부화 후 1주일 이내에 이차적으로 일어난다(Saito et al., 1993)는 보고를 고려함과 동시에 본 시험의 근육 발달 관련 인자의 발현 양상을 종합하여 보면 분자생물학적 측면에서도 1주일령 이후에 제한 사양을 시도하는 것이 적절하리라 사료된다. 그러나 연구자에 따라서는 부화후 3일령(수컷)과 5일령(암컷)부터 실시해도 좋다는 보고도 있다(Plavnik and Hurwitz, 1988). 육계를 제한 사양 이후 3주간의 무제한 급이 실시한 다음 근육 조직으로부터 근육 발달 관련 유전자들의 발현 양상을 조사한 결과 Myo-D, Myf-5의 경우 대조구와 두 처리구 사이에 차이를 보이지 않았다. 그러나 Myogenin의 경우 ER85에서 대조구와 ER70에 비하여 높은 발현을 보였다. 이는 ER85의 35일령 체중에서도 나타난 바(Table 2)와 같이 3주간의 보상 성장이 근육의 발달과 함께 이루어졌음을 보여준다. ER85 처리구의 35일령 육계에서의 Myogenin의 높은 발현은 satellite cell의 증식보다는 근섬유 조직의 상호 융합에 의한 분화가 상대적으로 높게 이루어지고 있음을 보여준다. Myogenin의 발현이 부화 후 3일경에 최고를 나타내며 이후 감소하여 일정 수준을 유지하는 것(Halevy et al., 2004)으로 알려졌으나, 본 연구와 같이 제한 사양 후 보상 성

장이 진행되는 경우 제한 사양 강도에 따라 Myogenin의 발현에 영향을 주어 근육 조직의 발달에 영향을 줄 수 있음을 보여 주었다.

적 요

본 연구는 육계에서 사료의 제한 급이 조건과 생체 내 지방 합성 및 근육 발달 관련 유전자들의 발현 양상을 비교 분석하기 위하여 실시하였다. 본 시험은 육계 Ross 종을 3처리 5반복 반복당 4수씩 완전 임의 배치하였으며, 7일령에 에너지제한 15%(ER85)와 30%(ER70)으로 하여 1주일간 제한 사양을 실시하였다. 제한 급이 이후 시험 종료까지(35일령)는 자유 급이를 실시하였다. 대조구는 전 사양 기간 동안 자유 급이를 실시하였다. 에너지를 8일령부터 1주일간 제한 급이 한 결과 대조구에 비하여 11.0%(ER85)와 30.8%(ER70) 각각 체성장이 낮게 나타났다. 제한 사양 후 3주간의 자유 급이 결과 ER85는 대조구와 같이 체성장을 이루어 보상 성장이 유도되었으나, ER70의 경우 대조구의 체성장보다 약 7.3% 낮게 나타나 보상 성장이 충분히 이루어지지 않았다.

제한 사양 후 콜레스테롤의 함량은 대조구에 비하여 40.6%(ER85)와 38.1%(ER70) 감소하였으나($P<0.05$), 처리구간에는 유의적 차이를 나타내지 않았다. 중성지방 또한 대조구와 비교하여 64.5%(ER85), 49.5%(ER70) 각각 감소하였다. 혈중 포도당은 지방 성분들과 같은 경향으로 대조구에 비하여 34.5%(ER85), 27.7%(ER70) 각각 낮은 수준을 보였다. 보상 성장의 결과 혈중 콜레스테롤의 함량은 제한 사양 직후 대조구보다 낮은 수준에서 대조구와 같은 수준을 보였다. 혈중 중성지방은 대조구와 비교하여 처리구에서 102.3%(ER85)와 72.1%(ER70)의 높은 함량을 보여주어 제한 사양 직후와 상반된 결과를 보여 주었다. 혈중 포도당의 경우 ER70 처리구에서 비교적 높은 혈중 함량을 보였으며, 대조구와 ER85 그리고 처리구 간에는 유의적 차이를 보이지 않았다.

제한 사양 직후 FAS와 SREBP와 PPAR α 의 발현 양상은 ER70구에서 이들 유전자들의 발현이 감소하였을 뿐 대조구와 ER85구에서는 서로간의 차이를 볼 수 없었다. 제한 사양 후 14일령에 근육관련 유전자의 발현 양상은 대조구에 비해 모든 처리구에서 발현율이 낮게 나타났다. 보상 성장 후 ER85 처리군에서 Myogenin은 대조구와 ER70에 비하여 높은 발현을 보였다.

이상의 결과로부터 육계에서 보상 성장 및 근육 발달 관련 유전자들의 발현 양상을 고려할 때, 에너지 제한 15%

(ER85) 수준이 적절한 제한 급이 방법으로 사료된다.

(색인어: 지방 합성 관련 유전자, 근육 발달 관련 유전자, 유전자 발현, 에너지 제한, 브로일러)

사 사

본 논문은 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호 106118-3)의 지원에 의해 수행되었습니다. 본 연구의 시료분석과 자료정리에 도움을 준 채은진, 강혜경 연구원에게 감사드립니다.

인용문헌

- Acar N, Sizemore FG, Leach GR, Wideman RF, Jr, Owen RL, Barbato GF 1995 Growth of broiler chickens in response to feed restriction regimens to reduce ascites. *Poult Sci* 74(5): 833-843.
- Bartov I 1987 Effect of early nutrition on fattening and growth of broiler chicks at 7 weeks of age. *Br Poult Sci* 28(3): 507-518.
- Beane AL, Zachmanoglou MA 1979 Health and career awareness. A potpourri of activities. *J Sch Health* 49(8):473-474.
- Blair SN, Shaten J, Brownell K, Collins G, Lissner L 1993 Body weight change, all-cause mortality, and cause-specific mortality in the multiple risk factor intervention trial. *Ann Intern Med* 119(7 Pt 2):749-757.
- Calvert CC, McMurtry JP, Rosebrough RW, Campbell RG 1987 Effect of energy level on the compensatory growth response of broilers following early feed restriction. *Poultry Science* 66(Suppl. 2):75(abstract).
- Gonzales E 1992 Estudo da síndrome da morte súbita em frangos de corte. PhD. Thesis Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, p 122.
- Gonzales E, Buyse J, Loddi MM, Takita TS, Buys N, Decuyper E 1998 Performance, incidence of metabolic disturbances and endocrine variables of food-restricted male broiler chickens. *Br Poult Sci* 39(5):671-678.
- Halevy O, Piastun Y, Allouh MZ, Rosser BW, Rinkevich Y, Reshef R, Rozenboim I, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z. 2004. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev Dyn* 231(3):489-502.
- Jones EK, Zaczek V, MacLeod M, Hockin, PM 2004 Genotype, dietary manipulation and food allocation affect indices of welfare in broiler breeders. *Br Poult Sci* 45(6):725-737.
- Lee KH, Leeson S 2001 Performance of broilers fed limited quantities of feed or nutrients during seven to fourteen days of age. *Poult Sci* 80(4):446-454.
- Lippens M, Room G, De Groote G, Decuyper E 2000. Early and temporary quantitative food restriction of broiler chickens. 1. Effects on performance characteristics, mortality and meat quality. *Br Poult Sci* 41(3):343-354.
- Marks HL 1979 Growth rate and feed intake of selected and nonselected broilers. *Growth* 43(2):80-90.
- McMurtry JP, Plavnik I, Rosebrough RW, Steele NC, Proudman JA 1988 Effect of early feed restriction in male broiler chicks on plasma metabolic hormones during feed restriction and accelerated growth. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 91(1):67-70.
- Mollison B, Guenter W, Boycott BR 1984 Abdominal fat deposition and sudden death syndrome in broilers: the effect of restricted intake, early life caloric (fat) restriction, and caloric: protein ratio. *Poultry Science* 63:1190-1200.
- Pfaff FE, Jr, Benson JD, Austic RE 1977 Influence of diet on adiposal lipoprotein lipase and hepatic triacylglyceride synthetase activities in the developing pullet (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol B* 58(4):345-348.
- Pinchasov Y, Jensen IS 1989 Comparison of physical and chemical means of feed restriction in broiler chicken. *Poultry Science* 68:61-69.
- Pinheiro DF, Cruz VC, Sartori JR, Vicentini Paulino ML 2004 Effect of early feed restriction and enzyme supplementation on digestive enzyme activities in broilers. *Poult Sci* 83(9): 1544-1550.
- Plavnik I, Hurwitz S 1985 The performance of broiler chicks during and following a severe feed restriction at an early age. *Poultry Science* 64:348-355.
- Plavnik I, Hurwitz S 1988 Early feed restriction in chicks: effect of age, duration, and sex. *Poult Sci* 67(3):384-390.
- Plavnik I, Hurwitz S 1991 Response of broiler chickens and turkey poults to food restriction of varied severity during early life. *British Poultry Science* 32:343-352.

- Plavnik I, Mcmurtry JP, Rosebrough RW 1986 Effects of early feed restriction in broilers growth performance and carcass composition. *Growth*. 50:68-76.
- Poknial I, Cornejo SB 1982 Effect of energy and protein under nutrition on productive performance and carcass, liver, and digestive tract composition of broiler males. *Nutr Rep Int* 26:319-327.
- Rosebrough RW, McMurtry JP, Mitchell AD, Steele NC 1988 Chicken hepatic metabolism *in vitro*. Protein and energy relations in the broiler chicken-VI. Effect of dietary protein and energy restrictions on *in vitro* carbohydrate and lipid metabolism and metabolic hormone profiles. *Comp Biochem Physiol B* 90(2):311-316.
- Rosebrouh RW, Steele NC, Mcmurtry JP, Plavnik I 1986 Effect of early feed restriction in broilers II. Lipid metabolism *Growth* 50:217-227.
- Saitoh O, Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Periasamy M. 1993. Expression of myogenic factors in denervated chicken breast muscle: isolation of the chicken Myf5 gene. *Nucleic Acids Res* 21(10):2503-2509.
- SAS 2002 SAS user's guide. Statistics, Version 8.e., SAS Institute, Inc. Cary, N.C.
- Summers JD, Spratt D, Bedford M 1990 Factors influencing the response of broiler chickens to calcium supplementation of canola meal *Poult Sci* 69(4):615-622.
- Tottori J, Yamaguchi R, Murakawa Y, Sato M, Uchida K, Tateyama S 1997 The use of feed restriction for mortality control of chickens in broiler farms. *Avian Dis* 41(2):433-437.
- Yu ME, Robinsin FE 1992 The application of short-term feed restriction to broiler chicken production: a review. *Journal of Applied Poultry Research*. 1:147-153.

(접수: 2009. 11. 25, 수정: 2009. 12. 15, 채택: 2009. 12. 15)