

젖소 유방염에 대한 주사용 β -carotene의 효과

남향미 · 문진산* · 주이석 · 박용호¹ · 한홍율¹

국립수의과학검역원, ¹서울대학교 수의과대학
(게재승인: 2006년 6월 14일)

Effects of injectable β -carotene on mastitis in dairy cows

Hyang-Mi Nam, Jin-San Moon*, Yi-Seok Joo, Yong-Ho Park¹, Hong-ryul Han¹

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Accepted: June 14, 2006)

Abstract : To determine the effects of β -carotene on the control of mastitis in dairy cows during the dry period, 38 dairy cows (18 mastitic cows and 20 healthy cows) were administered with 5 ml of β -carotene (30 mg/ml) intramuscularly twice (4 week intervals). Blood samples were taken from the cows before the injection and two weeks after the second injection, respectively, and were measured for the proportion of lymphocyte subpopulations and lymphocyte proliferation responses. With β -carotene injection, the proportion of cells expressing BoCD2, BoCD4 and B and N cells increased in healthy cows. In the presence of mitogens, lymphocytes from healthy cows showed significantly higher proliferation responses after β -carotene injection than before ($p < 0.05$). The somatic cell counts in β -carotene injected group decreased from 1,001,00 cells/ml at dry off to 647,000 cell/ml and 447 cells/ml at the stage of first and second weeks after calving, respectively ($p < 0.05$). This study indicated that β -carotene as a nonspecific immunostimulator could have a definite role for the prevention of intramammary infections in dairy cows at dry period.

Key words : cow, β -carotene, immunostimulator, mastitis

서 론

젖소 유방염은 사양관리가 양호한 우군에서도 흔히 발생하는 질병으로서 낙농산업에 있어서 가장 큰 경제적 손실을 초래하는 질병 중의 하나이다 [7]. 유방염은 젖소 주변에 상존하고 있는 수많은 병원균에 의하여 여러 가지 물리적, 생리적 요인에 의한 스트레스로 유선의 숙주 방어능 저하와 더불어 나타난다. 그러므로 유방염 피해를 줄이기 위해서는 현존하는 유선 감염의 제거를 위한 치료도 중요하지만 무엇보다도 유방염 발병과 관련되는 요인들을 체계적으로 관리하는 것이 더욱 중요하다 [29, 30].

젖소는 유선이 비유기에서 퇴축기로 그리고 퇴축기

에서 초유 생성기로 이행하는 생리적 변화에 의하여, 그리고 분만에 따른 호르몬 변화와 면역 저하에 따른 스트레스 요인에 의하여 건유 초기와 분만 전후기에 가장 높은 임상형 유방염 발생률을 나타낸다 [29, 30, 34, 37]. 이러한 건유기에 유방염 치료와 예방을 목적으로 모든 분방에 항생제가 함유된 연고제를 주입하는 것이 유방염 근절을 위해 권장되는 5대 프로그램 중의 하나로서 전 세계적으로 널리 이용되고 있다 [7, 8]. 그러나 건유기 유방 내 항생제 주입은 모든 병원체에 대해 동일한 효과를 갖는 것이 아니며, 새로 발생하는 유선 감염에 대한 감수성이 건유기 중 시기별로 변화하는 까닭에, 특히 분만 전후기 중에 유발되는 감염의 예방에는 한계가 있어서 1980년대 이후에는 건유기 및

*Corresponding author: Jin-San Moon
National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-1735, Fax: +82-31-467-1740, E-mail: moonjs@nvrqs.go.kr]

분만 전 후 유방염 예방효과를 증진시키기 위하여 건유기 동안의 외인성 면역자극 인자의 투여로 유선의 방어능을 강화시키는 연구가 다양하게 시도되었다 [15, 30, 36].

건강과 질병에 있어서 광물질과 비타민 등의 미량 영양소에 대한 지식이 급속히 진전됨으로서 비타민 A, E, selenium, β -carotene과 같은 항산화제가 세포와 조직의 구조를 온전하게 보호하는 역할을 수행함으로써 동물 면역계의 기능을 활성화시켜 질병의 저항성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 [3, 5, 9, 32]. 그 중 β -carotene은 소에서 비타민 A 전구물질로서의 역할 이외에도 독립적으로 항산화제로서의 역할을 수행함으로써 질병의 저항성과 면역기능에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 [9, 35]. 이러한 카로티노이드는 광합성 식물과 유기물에서 합성되는 색소이나 동물 체내에서는 합성되지 않으므로 젖소의 카로티노이드의 섭취는 주로 목초로부터 얻어지며 [32], 사일리지 또는 전분이 많이 함유된 곡물에는 β -carotene이 함유되어 있지 않고, 혈 중 카로티노이드의 농도는 사료 중 β -carotene을 포함하여 비타민 A와 지방의 첨가에 의해서 영향을 받는 것으로 알려져 있다 [22, 27].

한편, 젖소에 급여되는 사료 내의 카로티노이드 함량은 젖소의 유방 건강을 위해 요구되는 양보다 낮은 것으로 보고되었다 [9]. 특히, 분만 전 후기에는 송아지 분만에 의한 호르몬 변화와 초유 생산에 의하여 일일 평균 200 ng/ml로 높은 농도의 β -carotene이 빠져나감으로 분만 전 후의 혈 중 β -carotene 농도는 급격히 감소되며, 이것이 체내 면역저하의 요인으로 작용하여 유방염 발생을 증가시키는 한 가지 소인이 될 수 있다 [10, 13, 17, 24, 26]. 특히, 국내의 경우 몇몇 위주의 열악한 조사료 공급과 착유우들의 고능력화에 의하여 베타카로틴의 적정 급여가 더욱 어려운 실정이다. 현재까지 젖소에 대한 β -carotene의 일반적인 공급방법으로서 사료 내에 첨가하는 방법이 널리 이용되고 있지만 경구투여보다도 주사로 투여했을 때 보다 효과적으로 공급될 수 있을 것으로 판단된다. 실제적으로 돼지와 말에서 번식 문제 해결을 위하여 주사용 β -carotene을 야외실험에서 사용한 바 있다 [19].

따라서 본 연구에서는 β -carotene 주사제를 개발하여 혈 중 β -carotene 농도가 급격히 감소되는 건유기에 300 mg의 β -carotene을 총 2회에 걸쳐서 근육 주사한 후, 각 개체별로 면역기능의 지표가 되는 말초혈액에서의 림프구 아집단 분포율 변화와 mitogen-유도성 증식 반응을 이용한 림프구의 기능을 조사하고, 우유 중의 체세포수 및 세균검사를 수행함으로써 유방염에 대한 β -carotene의 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

대상동물 선발

옥수수 사일리지를 근간으로 하는 자가 TMR 방식을 실시하고 있는 경기도 내 착유두수 50두 이상의 대단위 6개 목장에서 무작위로 선발한 건유 직전 젖소로부터 유즙을 채취하였다. 채취된 4개 분방 유즙에 대한 Soma-count 300(Bentley, USA)기기를 이용하여 체세포수를 측정하였으며, 5% 면양혈액한천배지에 심고 37°C에서 24-48시간 배양 후 균 집락의 성장과 용혈성 및 그람염색 소견 등에 의해 1차적으로 균을 선별하였다. 분리된 균은 Cowan [12]의 방법에 준하여 유방염 원인균 동정을 실시하였다. 4개 중 1개 이상의 분방 유즙에서 m²/당 체세포 수가 20만개 이상이며, 균 분리되는 개체는 유방염 감염우로 판정하였다. 이를 근거로 하여 1차적으로 유방염 감염우 18두와 건강한 젖소 20마리를 선발하여 주사용 β -carotene 제제를 투여한 후 림프구아집단 분포율 및 림프구 증식반응에 미치는 영향과 유방염에 대한 효과를 조사하였다.

β -carotene 주사 및 시료 채취

β -carotene 주사제는 본제 100 mg 중 soy bean oil 76 g과 Benzyl alcohol 14 g을 혼합한 후 여기에 β -carotene (Sigma, USA) 10 g을 용해시켰다. 이 같은 방법으로 제조된 β -carotene(30 mg/ml) 주사제 5 ml를 건유초기와 분만전 1개월 된 건유우에게 4주 간격으로 2회 근육 주사하였다. β -carotene 투여에 따른 면역반응 효과와 β -carotene 농도를 측정하기 위하여 주사 전과 주사 후 2주째에 미정맥으로부터 15 ml의 혈액을 채취하였으며, 유방염에 대한 효과를 조사하기 위하여 β -carotene 주사 전인 건유직전과 분만 후 1주와 2주째에 유즙을 채취하였다.

Carotenoid 측정

혈중 Carotenoid 측정은 Jones [24]의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉 혈장 1 ml를 시험관에 취하고 95% ethanol 1 ml 및 petroleum ether 2.5 ml를 취하여 10분간 추출하였다. 이를 2000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 Carotenoid의 황색색소가 추출된 petroleum ether 층 2.0 ml를 취하여 파장 440 nm에서 흡광도를 측정함으로써 Carotenoid의 함량을 구하였다. Carotenoid의 측정을 위한 표준품으로는 β -carotene(Sigma, USA)을 사용하였다.

혈액 중 백혈구 수 및 백혈구 감별계수 조사

말초혈액의 총 백혈구 수를 blood cell counter(system-

9018; Serono, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 백혈구 감별계수는 혈액을 slide glass에 도말하여 methanol로 5분간 고정한 뒤, 30분간 Giemsa 염색하고 현미경으로 관찰한 수를 백분율로 검사하였다.

혈액중 림프구 분리

말초혈액 백혈구의 분리는 Davis 등 [14]의 방법으로 실시하였다. 즉, 채혈한 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD; sodium citrate 22.0 g, citric acid 7.3 g, dextrose 24.5 g, D.W. 1,000 ml) 용액을 3:1의 비율로 혼합하여 잘 섞은 다음, 1,500 rpm에서 30분간 원심분리하였다. Buffy coat 층을 채취한 후 37°C로 가온한 0.87% tris-buffered ammonium chloride(tris-NH₄Cl; 0.01M tris, pH 7.2) 용액과 혼합하여 37°C 항온수조에 넣어 약 5분간 적혈구를 용혈시켰다. 다시 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버린 후, pellet을 phosphate buffered saline(PBS; 137 mM Sodium chloride, 10 mM Phosphate buffer, 2.7 mM Potassium Chloride, pH 7.2)과 ACD 용액을 9:1로 혼합한 PBS-ACD buffer로 2회 정도 원심 세척을 하였다. 마지막 원심 후 pellet을 RPMI 1640(Sigma, USA) 배지에 부유시켜 histopaque(Sigma, USA, 비중 1.083)에 중층 시킨 후, 700×g에서 20분간 원심 분리한 다음 histopaque와 혈장과의 경계면에서 림프구를 채취하였다. 분리된 림프구는 PBS로 3회 세척하여 다시 PBS에 부유시킨 다음, trypan blue 염색을 하여 생존 세포 수를 측정 후 최종 농도를 1×10⁷ cell/ml 정도로 조정하여 실험에 이용하였다.

림프구 아집단 분포율 조사

림프구 아집단 분포율 조사는 미국 워싱턴 주립대학교 수의과대학의 단클론항체 센터로부터 분양 받은 백혈구 anti-T cell, anti-B cell, anti-N-cell 등 단클론항체 총 7종을 사용하여(Table 1) Davis 등의 [14]의 방법에 준해서 flow cytometry를 이용하여 실시하였다. 즉, conical bottom microplate의 well당 각 단클론항체 50 ml (15 µg/ml)를 넣고 혈액에서 분리한 1×10⁷ cell/ml의 백혈구 100 ml/씩을 첨가한 후 4°C에서 30분간 감작시켰다. 이어서 4°C의 first washing buffer(PBS 450 ml, ACD 50 ml, 20% NaN₃; 5 ml, gamma globulin free horse serum 10 ml, 250 mM EDTA 20 ml, 0.5% phenol red 1ml)로 3회 원심분리(2,000 rpm, 3분, 4°C) 세척한 후, 상층액을 버리고 침전된 백혈구 세포덩어리를 plate shaker 또는 voltex mixer로 흔들어 균질화 시켰다. 균질화 된 백혈구를 secondary antibody를 이용하여 단일 염색을 하였다. Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM antibody(Caltag Lab, USA)를 200배 희

Table 1. A panel of monoclonal antibodies specifically react to bovine leukocyte differentiation antigens used in this study

Specificity*	MAb designation**	Cell type***
MHC Class I	H58A	All nucleated cell
MHC Class II	H42A (DP)	antigen presenting cell
BoCD2	BAQ95A	T cell
BoCD4	CACT138A	T helper/inducer cell
BoCD8	CACT80C	T cytotoxic/suppressor cell
Surface IgM	PIG45A	B cell
NonT/NonB	CACT61A	Non T/B cell

* Bovine leukocyte differentiation molecules.

** Monoclonal antibodies which specifically react with leukocyte differentiation antigen.

*** Cells expressing molecules.

석한 후 각 well에 100 ml/씩 첨가하였다. 이를 다시 4°C에서 30분간 감작시킨 다음, 4°C의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한 것)로 3회 원심 세척하였다. 다음 2% PBS-formalin(38% formalin 20 ml, PBS 980 ml) 용액을 200 ml/well 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 분석할 때까지 모두 냉암소(4°C)에 보관하였다. 염색이 완료된 시료는 flow cytometry(Becton Dickinson, USA)로 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포 수를 측정하였다.

림프구의 mitogen 유도성 증식반응 검사

림프구의 mitogen 유도성 증식반응 검사는 Barta 등 [4]의 방법에 준해서 혈액에서 분리한 림프구를 15% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640(Sigma, USA) 배지가 들어 있는 조직배양용 플라스틱 사레에 5ml/씩 분주한 다음, 37°C CO₂ 항온기에서 2시간 배양하였다. 그 후 부유 세포만을 선택하여 trypan blue 염색과 hematocytometer를 이용하여 현미경 하에서 계산한 뒤, RPMI 배지에 총 세포를 10⁴ cell/well로 조절하여 96 well U-bottom microtiter plate에 분주한 다음 적정 농도의 Con A(10 ml/ml; Sigma, UAS), PHA(50 ml/ml; Sigma, USA), 및 PWM (10 ml/ml; Sigma, USA) 3종의 mitogen을 100 ml/씩 가하여 실험실 내에서 반응시켰다. 48시간 후 ³H-thymidine (ICN Radio Chemicals, USA)을 well 당 1µCi씩 첨가하여 다시 18시간 배양 후, cell harvester에 의해 glass fiber paper (Fisher, USA)에 흡착시켜 실온에서 건조시킨 다음 scintillation tube에 filter disc를 넣어 4 ml의 scintillation

Table 2. Comparison of total counts and differential cell counts of blood leukocytes before and after injection of β -carotene to healthy and mastitic cows at dry period

Items	Healthy cows (n = 20)*		Mastitic cows (n = 18)	
	before	after**	before	after**
Total WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)	8.07 \pm 2.0	7.72 \pm 1.8	20.6 \pm 5.3	8.55 \pm 3.0
Neutrophil (%)	49.9 \pm 12.1	40.7 \pm 9.8	52.3 \pm 13.3	50.7 \pm 8.9
-band cells	1.5 \pm 0.2	2.3 \pm 0.4	6.0 \pm 3.1	4.0 \pm 4.3
-segment cells	48.4 \pm 13.2	38.4 \pm 14.2	46.3 \pm 5.1	46.7 \pm 7.0
Lymphocyte (%)***	37.3 \pm 8.3	43.6 \pm 12.3	38.3 \pm 8.2	31.5 \pm 5.2
Eosinophil (%)	12.9 \pm 2.8	14.8 \pm 3.2	9.25 \pm 2.9	17.7 \pm 3.8
Basophil (%)	0.03 \pm 0.01	0.13 \pm 0.03	0.08 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01

* Data were expressed as mean \pm SD.

** Two weeks after secondary injection of β -carotene.

*** Included lymphocytes and monocytes.

**** Difference of groups and after of β -carotene injection were not significant.

Table 3. Proportion of blood lymphocyte subpopulations before and after injection of β -carotene to healthy and mastitic cows at dry period

Specificity of lymphocyte subpopulation	Proportion of lymphocyte subpopulations (%)*			
	Healthy cows (n = 20)		Mastitic cows (n = 18)***	
	before	after****	before	after****
MHC class I	82.6 \pm 7.7**	85.5 \pm 5.9**	90.9 \pm 3.7**	92.1 \pm 2.9**
MHC class II	32.6 \pm 12.9	34.8 \pm 6.4	31.6 \pm 7.1	30.5 \pm 9.8
BoCD2	41.3 \pm 13.7**	47.6 \pm 7.1**	26.1 \pm 3.4**	39.5 \pm 8.4**
BoCD4	20.3 \pm 6.3**	24.4 \pm 5.4**	14.9 \pm 5.3**	19.5 \pm 6.3**
BoCD8	25.8 \pm 9.3**	20.1 \pm 6.9**	13.0 \pm 3.0**	21.5 \pm 7.5**
SigM (B)	32.4 \pm 9.0	46.8 \pm 7.4	21.8 \pm 5.7	7.5 \pm 2.5
NonT/NonB	37.0 \pm 10.9	36.3 \pm 6.2	10.6 \pm 3.3	21.5 \pm 7.6

* Data were expressed as mean \pm SD.

** $p < 0.05$.

*** Cows with more than 2×10^5 cell/ml somatic cell counts in milks from more than one mammary gland and bacteria culture positive.

**** Two weeks after secondary injection of β -carotene.

cocktail (Fisher, USA)로 용해시켰다. 모든 작업이 완료된 후 β -liquid scintillation counter(Model 1,600 TCR; Packard, USA)로 방사능 활성능을 측정하였으며 모든 실험은 3개 well의 평균치를 구하였다.

통계분석

건유기 젖소에서의 β -carotene 투여에 따른 말초혈액 백혈구 수의 비교는 t-test로, 림프구 아집단 분포율과 림프구 증식성 결과, 유방염 감염우의 β -carotene 접종유무에 따른 혈 중 베타카로틴 농도에 대한 통계분석은 쌍체비교(Paired t-test)를 통한 t-검정을 실시하였다. β -carotene 접종전후 감염분방수 비율 비교는 Chi-square와 fisher exact test로 분석하였다.

결 과

β -carotene 주사 전 후의 말초혈액 백혈구 소견

건유기 중에 있는 유방염 감염우와 비감염우 38마리에 대한 β -carotene 주사 전과 주사 후 2주째의 말초혈액 내 백혈구 소견은 Table 2와 같다. 비감염우(n=20)에서의 평균 백혈구 수는 주사 전과 후에 별다른 차이를 나타내지 않았으나 유방염 감염우(n=18)에서는 백혈구 수가 건강우와 비슷한 수치를 보였다. 전체 백혈구 중 호중구의 비율은 정상우와 유방염 감염우에서 β -carotene 주사 전 후 큰 차이가 없었다. 림프구의 경우, 비록 통계학적으로 유의하지는 않았지만, 전반적으로 건강한 소에서는 주사 전보다 주사 후에 증가되었지만

유방염우에서는 오히려 주사 전보다 주사 후에 감소하였다.

β -carotene 주사 전 후의 유방염 감염 및 비감염우에서의 혈액 중 림프구아집단 분포율

β -carotene을 주사했던 소에서 특이적 면역반응에 관여하는 림프구의 총 수가 증가되어 이를 좀더 세분화하여 림프구 아집단 분포율을 조사하였다(Table 3). 그 결과 T 림프구를 나타내는 BoCD2 양성 발현 세포와 T-helper cell을 나타내는 BoCD4 양성 세포는 감염우와 비감염우에서 공히 주사 전에 비하여 β -carotene 주사 후에 유의성 있게 증가하였다($p < 0.05$). T-cytotoxic/suppressor cell을 나타내는 BoCD8 양성발현 세포의 경우 유방염 감염우에서는 주사 전에 비하여 주사 후에 증가된 소견을 보였던 반면, 비감염우에서는 주사 전보다도 감소됨으로써 BoCD4/BoCD8 ratio가 감염우의 경우에 저하되었지만 비감염우에서는 주사 전에 비하여 증가되었다($p < 0.05$). 성숙 B세포가 발현하는 surface IgM에 대해서도 감염우에서는 주사 전에 비하여 감소된 반면, 건강한 소에서는 주사 전에 비하여 크게 증가됨으로써 감염우, 비감염우 간에 상반된 소견을 보였다. N(non T/non B) 세포의 경우는 감염우가 주사 전에 비하여 크게 증

가되었던 반면, 비감염우에서는 주사 전과 주사 후에 큰 변화를 보이지 않았다. 항원인식에 있어 helper T 림프구의 특성을 나타내는 BoCD4와 작용하여 항원전달세포(antigen presenting cell)의 발현 항원으로 나타나는 MHC class II molecule 발현 세포는 유방염 감염우와 비감염우에서 주사 전 후에 큰 변화가 없었으나 MHC Class I molecule 발현 세포는 감염우, 비감염우 모두 주사 전에 비해 주사 후에 약간 증가하는 공통적인 경향을 보였다($p < 0.05$).

β -carotene 주사 전 후의 유방염 감염 및 비감염우에서의 혈 중 림프구 mitogen-유도성 증식반응

건유기 중에 있는 유방염 감염우와 비감염우 각각 6두에 대하여 β -carotene 주사 전과 2회 주사 후 2주째의 말초혈액으로부터 분리한 림프구를 T세포와 B세포의 증식을 유도하는 Con A, PWM 및 PHA 3종의 mitogen과 함께 배양함으로써 림프구 증식반응을 조사하였다. 건강한 유선으로부터 분리된 림프구의 각 mitogen 자극에 대한 증식반응을 자극지수(SI)로 비교한 결과, Table 4에서와 같이 주사 전에 비해 주사 후에 세 가지 mitogen에 대한 말초혈액 림프구의 증식반응이 더 높게 나타났다($p < 0.05$). 이와 대조적으로 유방염 우군에서 분리된

Table 4. Mitogen stimulated lymphoproliferative responses of peripheral blood lymphocytes before and after injection of β -carotene to healthy cows at dry period

Mitogen	Before (n = 6)		After (n = 6)	
	cpm*	SI***	cpm*	SI***
Control	15,166 ± 4,821		19,215 ± 3,364	
Con A	17,085 ± 4,808**	1.12	39,494 ± 8,495**	2.05
PHA	9,575.2,578**	0.63	16,679 ± 5,331**	0.86
PWM	5,515 ± 2,768**	0.36	24,855 ± 7,350**	1.29

* Data were expressed as mean counts per minute (cpm) ± SD.

** $p < 0.05$.

*** Stimulation index (SI) = average cpm in experimental cultures/average cpm in control cultures.

Table 5. Mitogen stimulated lymphoproliferative responses of peripheral blood lymphocyte before and after injection of β -carotene to Mastitic cows at dry period

Mitogen	Before (n = 6)		After (n = 6)	
	cpm*	SI***	cpm*	SI***
Control	12,431 ± 4,634		20,612 ± 5,815	
Con A	8,799 ± 3,272**	0.70	10,963 ± 3,668**	0.53
PHA	6,024 ± 2,636**	0.48	3,373 ± 1,501**	0.16
PWM	2,394 ± 1,195**	0.19	2,473 ± 1,368**	0.11

* Data were expressed as mean counts per minute (cpm) ± SD.

** $p < 0.05$.

*** Stimulation index (SI) = average cpm in experimental cultures/average cpm in control cultures.

Table 6. Comparison of plasma β -carotene concentrations in mastitic dairy cows at dry period before and after the second intramuscular injection of β -carotene

Groups	No. of test (n = 40)	β -carotene concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) [*]	
		before	after ^{***}
Injected	20	0.62 \pm 0.23 ^{**}	1.26 \pm 0.47 ^{**}
Control	20	0.77 \pm 0.39	0.73 \pm 0.27

^{*} Data were expressed as mean \pm SD.

^{**} $p < 0.05$.

^{***} Two weeks after secondary injection of β -carotene.

PHA 자극에 대한 증식반응의 자극지수가 주사 전에 비교하여 주사 후에 저하되었다($p < 0.05$).

β -carotene 주사 전 후의 혈중 Carotenoid 농도 변화 및 유방염 효과

β -carotene 투여 후 주사군에서의 혈 중 Carotenoid 농도는 1.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 주사 전의 0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 비해 2배 정도 상승($p < 0.05$)하였던 반면 대조군에서는 혈 중 농도에 변화가 없었다(Table 6). 건유기에 β -carotene 주사군과 대조군에서 주사 전과 분만 1주 및 2주째의 분방유즙에 대한 세균학적 검사와 체세포수 검사를 실시하였다. 그 결과 주사군에서 β -carotene 투여 전에 채취한 분방 유즙 58개 중 유방염에 감염된 것으로 확인된 분방수는 29개(50.0%)였다. 이들 분방으로부터 분리된 원인체로는 주로 환경성 유방염 원인균인 coliform, coagulase negative staphylococci, enterococcus sp., streptococcus sp., 이었다. β -carotene 투여 후인 분만 후 1주와 2주 째에는 각각 18개(31.0%) 분방과 16개(27.6%) 분방으로 감염 분방의 수가 감소됨으로서 대조군보다 높은 감소율을 보였다(Table 7). 유방염 원인체별 치료효과의 차이에 있어서는 β -carotene 투여 후 coagulase negative staphylococci 균이 다른 원인체에 비하여 상대적으로 약간 높은 성적을 보였지만 전반적으로 유방염 원인체의 변화에

Table 7. Effect of β -carotene injection on mastitis control in dairy cows at dry period

Groups	No. of quarters	No. of infected quarter (%) [*]		
		before (dry-off)	1 weeks after parturition	2 weeks after parturition
Injected	58	29 (50.0)	18 (31.0)	16 (27.6)
Control	63	32 (50.8)	25 (39.7)	28 (44.4)

^{*} Milk samples of a cow were collected from each quarter before and after injection of β -carotene at the first and second week after parturition.

^{**} Difference of groups were not significant.

있어서는 특이한 양상을 보이지 않았다. 이 때의 체세포수를 비교한 결과 Table 8에서와 같이 주사군에서는 투여 전 평균 체세포수가 $1,001 \times 10^3 \text{ cell}/\text{mL}$ 이었으며, 투여 후 1주와 2주째에는 각각 $647 \times 10^3 \text{ cell}/\text{mL}$, $447 \times 10^3 \text{ cell}/\text{mL}$ 로 감소됨으로서 대조군보다 높은 체세포수 감소율을 보였다($p < 0.05$).

고 찰

본 연구에서는 건초 위주의 사료 급여와 송아지 분만에 따른 생리적 변화로 인하여 혈중 β -carotene 농도가 급격히 감소된다는 사실 [1, 17, 22, 26]에 기초하여 건유기 젖소에 유방염 예방대책의 하나로써 젖소의 생체면역기능을 개선시키기 위하여 β -carotene 주사제의 투여를 통한 영양적 접근을 시도하였다.

유방염 감염우와 비감염우에 대하여 주사 전과 β -carotene 2회 주사 후 2주째의 혈액으로부터 림프구 아집단 분포율과 mitogen 유도성 증식반응을 비교한 결과, 전체적으로 유방염 우군은 투여 전이나 투여 후에 면역반응의 조절과 표출에 있어서 중요한 역할을 하는 T-helper 세포의 비율 뿐만 아니라 전체 T세포나 B세포의 비율도 정상 우군에 비해 낮게 나타났는데 이는 명백히 유방염 우군의 저하된 면역상태를 시사하는 것으

Table 8. Effect of β -carotene injection on somatic cell counts of quarter milks in mastitic dairy cows at dry period

Groups	No. of tested (n = 31)	Mean Parturition	Somatic cell counts (mean \pm SD $\times 10^3/\text{mL}$) [*]		
			before (dry-off)	1wks after parturition	2wks after parturition
Injected	15	2.1	1,001 \pm 332 ^{**}	647 \pm 264 ^{**}	447 \pm 166 ^{**}
Control	16	2.0	1,102 \pm 311	793 \pm 275	867 \pm 296

^{*} Milk samples of a cow were collected from each quarter before and after injection of β -carotene injection at the first and second week after parturition.

^{**} $p < 0.05$.

로 해석된다. 그러나 양 그룹에서 모두 β -carotene을 투여한 후에는 투여 전에 비해 T 림프구나 T-helper 세포의 비율이 증가되었으나 B 림프구의 비율은 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Alenxander 등 [2]이 매일 180 mg의 β -carotene을 2주 동안 섭취했던 사람에게서 CD4+ 와 CD3+ (all T cells)의 수가 증가되었다는 보고와 유사하지만 Santos 등 [33]이 건강하고 나이 많은 사람에게 β -carotene을 단기간 또는 장기간 급여했을 때 CD3+, CD4+, CD8+ 및 CD19+ (B cell)의 수에 영향을 주지 않았다는 보고와는 상반된 결과를 나타내었다.

본 연구에서 T-cytotoxic/suppressor 세포를 나타내는 BoCD8 양성 발현 세포는 건강한 유선을 가진 정상우에서는 투여 전 25.8%에서 투여 후 20.1%로 감소된 반면, 유방염 감염우에서는 오히려 13%에서 21.5%로 증가되었다. 항원 인식에 있어 helper T 림프구의 특성을 나타내는 CD4를 제한하는 MHC class II molecules의 표출 증가는 항원 자극에 대한 개체의 면역반응 정도를 상승시킨다고 알려져 있는데 [16], 이 MHC Class II 양성 분자도 정상우군에서는 β -carotene 투여 후에 약간 증가하였던 반면에 유방염 우군에서는 약간 감소된 소견을 나타내어, 정상우에서는 림프구 아집단에 대해서 전반적으로 면역능을 증강시키는 분명한 효과를 발휘하지만 유방염 우군에서는 그렇지 못한 것으로 보인다. 이러한 결과는 정상우에서와 달리 유방염 감염우에서는 여러 가지 생리학적 요인들이 β -carotene의 작용에 영향을 주었기 때문일 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 이러한 차이를 규명하기 위하여 스트레스, 약물, 호르몬 등의 면역반응 기전을 분석하는 지표 [38]로서 널리 활용되고 있는 mitogen-유도성 림프구 증식반응을 이용하였다. 유방염 비감염우와 감염우 각각 6두에 대하여 β -carotene 투여 전 후에 Con A, PWM 및 PHA 3종의 mitogen으로 T세포와 B세포의 증식반응을 조사한 바, 유방염 비감염우에서는 T세포뿐만 아니라 B세포도 자극되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는, 600 mg의 β -carotene을 첨가 급여한 소에서 대조군보다 더 높은 농도의 혈 중 β -carotene 농도를 나타냈으며, Con A, PWM 및 PHA에 반응하는 혈액 림프구 증식반응도 β -carotene을 보충 급여했던 소에서 대조군 보다 더 높았다는 Michal 등 [28]의 보고 및 비타민 A와 β -carotene을 돼지에 주사시 PWM과 PHA 림프구 증식성이 증가되었지만 PMN의 살균능력은 감소되었다는 Hoskinson 등 [19]의 보고와 일치하였다. 그러나 β -carotene을 주사했던 이유 자체가 PHA와 Con A에만 반응하여 T 림프구의 활성을 증가시켰다는 Hoskinson 등 [20]의 보고와는 약간의 차이가 있었으며, 유방염 감염

우에서는 T세포 및 B세포에 아무런 자극효과를 발휘하지 못하였던 본 연구의 결과와도 차이가 있었다. 이러한 결과는 연령이 어린 개가 상대적으로 노령의 개에 비하여 CD4+ 세포의 숫자가 감소가 감소되고 T와 B 림프구의 증식반응이 감소되는 등 면역반응이 저하되고, β -carotene을 2개월 동안 급여하였을 경우 투여한 지 24-48시간 후부터 어린 개에서는 T와 B세포의 증식반응이 개선되었으나 상대적으로 노령의 개에서는 이러한 면역반응이 감소되었다는 보고 [27]와 관상동맥 질환이 있는 환자의 혈 중 β -carotene 농도는 건강한 사람에 비하여 낮았으며, 혈 중 β -carotene 농도와 면역상태와 밀접한 관련이 있다는 보고 [23]에 비추어 볼 때, 실험동물의 연령 및 건강상태, 혈 중 β -carotene 농도상태 등의 차이와 유선에 감염된 원인체나 유선감염에 의한 여러 가지 생리적 변화들이 β -carotene의 면역자극 효과를 발휘하기 어려워지는 것이 아닌가 추정된다. 향후 이와 관련된 기전을 규명하기 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

β -carotene을 투여한 후의 유방염 예방효과를 조사하기 위해 주사군 20마리에서 투여 전의 건유 직전 및 분만 1주와 2주째에 분방유를 채취하여 세균학적 검사와 체세포수 검사를 실시한 바, 전체 58개 분방 중 주사 전 유방염에 감염된 것으로 확인된 분방 수는 29개(50.0%)였으며 주사 후인 분만 후 1주와 2주째에는 각각 18개(31.0%) 분방과 16개(27.6%) 분방으로 감염됨으로써 건유전에 비하여 유방염 감염 비율이 대조군에서 보다도 크게 감소되는 효과를 나타내었다. 평균 체세포 수의 경우에도 주사전 건유기에는 $1,001 \times 10^3$ cell/ml이었는데 주사 후인 분만 후 1주와 2주째에는 각각 647×10^3 cell/ml, 447×10^3 cell/ml로 감소되었다. 이와 같은 효과는 Chew와 Johnston [11]이 분만 전 30일부터 분만 후 10주 동안 지속적으로 비타민 A와 β -carotene을 홀스타인 60마리에 첨가 급여함으로써 차기 비유시기 중에 우유 내 체세포 수가 감소되었다는 보고와 Dahlquist와 Chew [13]가 첨가제로 비타민 A와 β -carotene을 혼합해서 급여했던 젖소는 비타민 A만을 급여했던 젖소와 비교했을 때 건유초기 중 새로운 유선감염의 발생율이 더 낮았고 비유기 중에는 유즙 내 체세포 수를 감소시켰다고 보고한 바와 일치한다. 그러나 Oldham 등 [31]은 착유 30-90일에 β -carotene을 첨가 급여하거나 건유전 2주, 건유기 및 분만 후 첫 6주 동안 β -carotene 300 mg을 첨가 급여했어도 체세포 수 감소효과가 없었다고 보고하였는데 이러한 차이는 목장별 급여사료 형태에 따른 우군의 β -carotene 기초농도 조사 차이, 감염성 또는 감염 이외의 생리학적 기전 등 체세포 수 증가 요인, 감염정도나 원인체의 종류, β -carotene 급여량이나 급여방법 등 여러

가지 실험조건에 있어서의 차이에 기인할 것으로 사료된다 [10, 21, 25].

한편, 본 연구에서 β -carotene을 투여하기 전의 주사군과 대조군의 혈 중 농도는 각각 $0.62 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.77 \mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타내었는데, 이러한 결과는 본 연구자들이 이미 보고한 바 있는 비유기 감염 우군의 농도($1.12 \mu\text{g}/\text{mL}$)와 건유기 우군의 농도($1.29 \mu\text{g}/\text{mL}$) [1]와 비교해 볼 때 거의 절반 정도의 수준밖에 되지 않는 수치이다. 이러한 차이는 본 연구에서 측정된 혈액시료들이 건유기 중에 있으면서 한계 분방이라도 유방염에 감염되어 있는 젖소들을 대상으로 채취된 것이기 때문일 것으로 보인다. 본 연구에서 총 300 mg의 β -carotene을 2회로 나누어 4주 간격으로 근육내 주사하고 그로부터 2주가 지난 후에 β -carotene 농도를 측정할 결과 2배 정도 상승($p < 0.05$)하였던 반면 대조군에서는 혈 중 농도에 변화가 없는 수준이었던 것을 비교해 보면 근육 내 β -carotene 투여가 주사군에서 혈중 농도를 상승시키는 직접적인 요인으로 작용했을 것으로 추정된다. 착유우에서의 유방염 예방과 번식효율 개선을 위한 적정 β -carotene의 권장 급여량에 대한 자료가 충분하지 않지만, 미국의 Herdt와 Stowe [18]가 제시한 $3.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 과 유선의 방어 작용에 있어 적절한 수치를 $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이라고 보고했던 Chew 등 [10]의 성적에 비추어 보면 이 실험에서 나타난 β -carotene 투여 후의 상승효과는 유선을 방어할 수 있는 적정한 수준에는 못 미치는 것으로 보인다. 또한 Blood 등 [6]이 미국의 젖소, LeBlance 등 [26]이 캐나다 젖소의 혈 중 β -carotene 농도를 각각 1.5 , $1.32 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이라고 보고한 성적보다는 훨씬 낮았고, Katamoto 등 [25]이 일본의 Black breeding cattle에서의 보고한 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 보다는 높은 수준을 나타내었다. 이러한 결과는 아마도 실험의 지속기간이 비교적 짧았고 따라서 한꺼번에 너무 많은 양이 투여되지 않도록 일정량을 공급했기 때문일 수도 있을 것이라 생각되며, 따라서, β -carotene의 투여를 통한 유방염 예방효과를 얻기 위해서는 장기적으로 적정 용량의 β -carotene을 보충해 주는 등 계절이나 비유단계에 상관없이 연 중 지속적으로 유효 농도를 유지할 수 있도록 적정하게 투여해 주는 것이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구결과를 토대로 추정했을 때 현재 벗짚위주의 건유기 사양관리를 인하여 젖소의 건유기 혈 중 β -carotene 농도는 별도의 공급이 없는 한 전반적으로 매우 저조한 상태일 것으로 예상된다. 따라서 이 시기 중에 면역조절 작용을 통하여 젖소의 유방염 감염을 방제하는데 효과가 있는 것으로 나타난 β -carotene과 같은 항산화제를 보충 급여해 줌으로써 건유기 및 분만 전 후의 높은 유방염 발생을 예방하는데 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

젖소 유방염 감염 비율이 상대적으로 높은 분만전후기의 면역증진을 개선하기 위하여 건유기 젖소에 총 300 mg의 β -carotene 주사제를 개발하여 2회에 걸쳐서 근육주사한 후 각 개체별 면역기능의 지표로 활용되는 말초혈액의 림프구 아집단 분포를 변화와 mitogen-유도성 증식반응을 이용한 림프구의 기능을 조사하고, 우유 중의 체세포수 및 세균 검사를 수행함으로써 유방염에 대한 β -carotene의 효과를 조사하였다. 그 결과, 건유기 중에 있는 유방염 감염우와 비감염우 양자에서 β -carotene을 주사한 후 T세포와 T-helper 세포의 비율이 증가하였으며($p < 0.05$), Con A, PWM 및 PHA으로 유도한 림프구 증식반응 결과도, 특히 유방염에 이환되지 않은 정상우군에서, 주사 전보다 더욱 높게 나타났다($p < 0.05$). 또한 β -carotene 투여 후 주사군에서의 혈 중 Carotenoid 농도는 $1.26 \mu\text{g}/\text{mL}$ 으로서 주사 전의 $0.62 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에 비해 2배 정도 상승($p < 0.05$)하였던 반면, 대조군에서는 혈 중 농도에 변화가 없었으며, 분방별 유방염 감염율과 체세포수에 있어서도 주사군에서 투여 전보다 투여 후에 대조군보다 더 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 따라서, 젖소의 혈 중 β -carotene 농도가 특히 저하되는 건유기에 고농도의 β -carotene을 주사함으로써 젖소의 면역세포 기능을 개선함으로써 유방염을 예방하는데 크게 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 남향미, 문진산, 주이석, 오태호, 박용호, 한홍을. 젖소의 혈장 베타카로틴 농도조사. 대한수의학회지 1999, 39, 1021-1027.
2. Alenxander M, Newmark H, Miller RG. Oral β -carotene can increase the number of LKT4+ cells in human blood. Immunol lett 1985, 9, 221-224.
3. Baker KR, Meydani M. β -carotene as an antioxidant in immunity and cancer. J Optimal Nut 1994, 3, 39-50.
4. Barta O, Barta V. Lymphocytes transformation test. In: Barta O (ed.). Monographs in Animal Immunology (Vol. 2) Veterinary Clinical Immunology Laboratory. pp. B4 1-17 BAR-LAB, Blacksburg, 1993.
5. Bendich A. Physiological role of antioxidants in the immune system. J Dairy Sci 1993, 76, 2789-2794.
6. Blood DC, Henderson JA, Radostits OH. Disease caused by nutritional deficiencies. In: Veterinary Medicine: A Text Book of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, and Horses. pp. 921, Lea & Febiger, Philadelphia, 1979.

7. **Booth J.** Progress in controlling mastitis in England and Wales. *Vet Rec* 1988, **122**, 299-301.
8. **Bradley AJ, Green MJ.** The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Vet Clin North Am Food Pract* 2004, **20**, 547-568.
9. **Chew BP.** Effects of supplemental β -carotene and vitamin on reproduction in swine. *J Anim Sci* 1993, **71**, 247-252.
10. **Chew BP, Hollen LL, Hillers JK, Herlugson L.** Relationship between vitamin A and β -carotene in blood plasma and milk and mastitis in Holsteins. *J Dairy Sci* 1982, **65**, 2111-2118.
11. **Chew BP, Johnston LA.** Effects of supplemental vitamin A and β -carotene on mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci* 1985, **68**, 191-198.
12. **Cowan ST.** Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. pp. 45-50, Cambridge University Press, London, 1974.
13. **Dahlquist SP, Chew BP.** Effects of vitamin A and β -carotene on mastitis in dairy cows during the early dry period. *J Dairy Sci* 1985, **69**, 119-125.
14. **Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, Larsen RA, Wyatt CR, Okada K.** Ruminant leukocyte differentiation molecules. In: Barta O (ed.). Monographs in Animal Immunology (Vol. 1). MHC, Differentiation antigen, and Cytokines in Animal and Birds. pp. 47-70. BAR-LAB, Blacksburg, 1990.
15. **Dingwell RT, Kelton DF, Leslie KF.** Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. *Vet Clin North Am Food Pract* 2003, **19**, 235-265.
16. **Franklin ST, Young JW.** Proliferation and phenotype of bovine mononuclear leukocytes in cultures stimulated by pokeweed mitogen. *J Dairy Sci* 1994, **77**, 3592-3600.
17. **Goff J, Kimura K, Horst RL.** Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamin A, E, β -carotene status at parturition. *J Dairy Sci* 2002, **85**, 1427-1436.
18. **Herdt TH, Stowe HD.** Fat-soluble vitamin nutrition for dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1991, **7**, 391-415.
19. **Hoskinson CD, Chew BP, Wong TS.** Effects of injectable beta-carotene and vitamin A on lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in piglets. *Biol Neonate* 1992, **62**, 325-336.
20. **Hoskinson CD, Chew BP, Wong TS.** Effects of β -carotene and vitamin A on mitogen-induced lymphocyte proliferation in the pig *in vivo*. *Fed Am Soc Exp Biol J* 1989, **3**, 663-671.
21. **Jensen SK, Johannsen AK, Hermansen JF.** Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, beta-carotene and alpha-tocopherol into cows's milk. *J Dairy Res* 1999, **66**, 511-522.
22. **Johnston LA, Chew BP.** Peripartum changes of plasma and milk vitamin A and β -carotene among dairy cows with or without mastitis. *J Dairy Sci* 1984, **67**, 1832-1840.
23. **Jonasson L, Wikby A, Olsson AG.** Low serum beta-carotene reflects immune activation in patients with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2003, **13**, 120-125.
24. **Jones JH.** Vitamin A and carotene in blood. Vitamin method. II pp. 279, Academic Press, New York. 1961.
25. **Katamoto H, Yamada Y, Nishizaki S, Hashimoto T.** Seasonal changes in serum Vitamin A, Vitamin E and β -carotene concentrations in Japanese black breeding cattle Hyogo Prefecture. *J. Vet Med Sci* 2003, **65**, 1001-1002.
26. **LeBlance SJ, Herdt TH, Seymour WM, Duffield TF, Leslie KE.** Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *J Dairy Sci* 2004, **87**, 609-619.
27. **Massimino S, Kearns RJ, Loos KM, Burr J, Park JS, Chew B, Adams S, Hayek MG.** Effects of age and dietary beta-carotene on immunological variables in dogs. *J. Vet Intern Med* 2003, **17**, 835-842.
28. **Michal JJ, Chew BP, Wong TS, Chew BP, Frigg M, Volker L.** Modulatory effects of dietary β -carotene on blood and mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 1994, **77**, 1408-1421.
29. **Neave FK, Dodd FH, Henriques E.** Udder infection in dry period. *J Dairy Sci* 1989, **72**, 1647-1664.
30. **Nickerson SC.** Immunological aspects of mammary involution. *J Dairy Sci* 1989, **72**, 1665-1678.
31. **Oldham ER, Eberhart RJ, Muller LD.** Effects of supplemental vitamin A or beta-carotene during the dry period and early lactation on udder health. *J Dairy Sci* 1991, **74**, 3775-3781.
32. **Rock CL.** Carotenoids : biology and treatment. *Pharmacol Ther* 1997, **75**, 185-197.
33. **Santos MS, Leka LS, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, Meydani M, Hennekens CH, Gaziano JM, Meydani SN.** Short-and long-term beta-carotene supp-

- mentation do not influence T cell-mediated immunity in healthy elderly persons. *Am J Clin Nutr* 1997, **66**, 917-924.
34. **Sordillo LM, Streicher KL.** Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002, **7**, 135-146.
35. **Spears JW.** Micronutrients and immune function in cattle. *Proc Nutr Soc* 2000, **59**, 587-594.
36. **Targowski SP.** Role of immune factors in protection of mammary gland. *J Dairy Sci* 1983, **66**, 1781-1789.
37. **Vangroenweghe F, Lamote I, Burvenich C.** Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domest Anim Endocrinol* 2005, **29**, 283-293.
38. **Yoshihito K, Yoshimitsu M, Shigeo N.** Transformation of bovine peripheral blood lymphocytes in the perinatal period. *Jpn J Vet Sci* 1985, **47**, 337-339.