

과두유를 주입한 육계병아리에서 사료중 크릴밀 수준이 세포성 면역에 미치는 영향

임진택 · 박인경 · 고태승

건국대학교 동물생명과학대학 동물생명과학부

Effect of Dietary Krill Meal Levels on the Cell Mediated Immunity in Intra-muscularly Croton Oil Injected Broiler Chicks

J. T. Im, I. K. Park and T. S. Koh

Department of Animal Life Sciences, College of Animal Life Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT

Effect of dietary krill meal levels on the cellular immunity was studied in broiler chicks activated immune response. One day old male broiler chicks (Ross) were fed the experimental krill meal 0.0 (basal), 0.5, 1.0 and 2.0% diets for 3wks. Blood TNF- α activity, ovotransferrin level and Con A induced proliferation of PBMC and splenocytes after 24 hr (21 d age) of the croton oil 10 μ l injection intra-muscularly at the age of 20 days compared to the control olive oil. Krill meal diets did not affect growth performance of broiler chicks and plasma ovotransferrin levels but decreased significantly ($p < 0.0001$) TNF- α like activity and proliferation of PBMC relative to krill meal 0.0% diet. And the proliferation of splenocytes were significantly ($p < 0.05$) increased in birds fed krill meal 1.0% diet relative to krill meal 0.5 and 2.0% diets. The croton oil injection induced a significant ($p < 0.0001$) increases in the TNF- α activity or the PBMC proliferation and enhanced circulating ovotransferrin levels relative to the olive oil. In birds injected with the croton oil the proliferation of PBMC was reduced linearly with the increase of dietary krill meal levels, and the proliferation of splenocytes was decreased in the krill meal 1.0 and 2.0% diets relative to olive oil. These results indicated that dietary krill meal changed the innate and cellular immunity in broiler chicks activated by the injection of croton oil.

(Key words : Croton oil, Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Proliferation of PBMC and splenocytes, Krill meal, Broiler chicks)

I. 서 론

동물에서 세균등 외부 항원에 노출된 감염부위의 대식세포(macrophage)나 헤테로필(heterophyl) 등 면역세포들은 친 염증성 사이토카인(Cytokine)인 interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), 또는

tumor necrosis factor- α (TNF- α)들을 분비한다. 이 사이토카인들은 동물체에서 발열, 사료섭취 감소 및 간장의 급성기 단백질 합성 증가의 신호가 되고(Leshchinsky와 Klasing, 2001; Klasing, 1994), 동물은 이러한 선천 면역반응 활성화(급성기 염증 반응)에 대하여 생리적 및 대사적

Corresponding author : Koh, T. S. Department of Animal Life Sciences, Konkuk University, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea.
Tel : 82-02-450-3698, Fax : 82-02-455-1044, E-mail : tskoh@konkuk.ac.kr

항상성 조정으로 적응하고 생산성이 낮아진다 (Korver와 Klasing, 1997 Xie 등, 2002). 영양은 질병원에 대한 양적 및 질적 면역반응을 조정하고, 사료가 면역성에 미치는 영향이 가금을 이용한 연구에서 잘 설명되어 있다(Cook, 1991; Koutosos와 Klasing, 2001).

사료중 크릴 밀은 육계 병아리의 선천면역 반응과 세포성 면역 그리고 항산화계에 영향을 미쳤다. 복강내LPS 주입으로 급성염증(선천면역) 반응이 활성화한 육계병아리에서, 크릴 밀 0.5 및 1.0% 사료는 증체량을 감소시켰으나, 염증반응에서 회복중에는 생산성 감소를 완화시켰다(고 등, 2004). 또한 사료중 크릴 밀의 낮은 질소밸런스는 체단백질의 분해(노산배설량)에 기인하였고 크릴 밀사료의 높은 ME 값은 사료 에너지원의 흡수가 염증반응으로 많아지는데 기인하였다(임 등, 2003).

그리고 크릴 밀의 종류(박 등, 2004)에 따라 간 세포액의 CuZnSOD 활성이 달랐으며, 적혈구 세포액중의 MnSOD와 CuZnSOD 활성은 사료중 크릴 밀 수준(고 등, 2004)에 따라 높아졌다.

급성기 염증 반응에서 회복 또는 이러한 경험이 없는 육계병아리에서, 크릴 밀 사료는, 사료중 크릴 밀 수준(고 등, 2004)이나 종류(박 등, 2004)와 관계없이, PHA-p (phytohemagglutinin-p) 반응을 높이는 경향을 보였다. 그리고 LPS 주입 급성기 염증 반응중인 육계병아리에서, 임 등(2007)은 크릴 밀 사료는 사료중 크릴밀 함량과 관계없이 혈장 TNF- α 를 감소시키고, 크릴 밀 0.0%(기초) 사료에 비해, Con A 자극 PBMC와 비장세포의 증식도는 크릴 밀 0.5% 사료에서 유의하게 증가하나, 크릴 밀 1.0 및 2.0% 사료에서는 감소하는 것을 관찰하였다. 그러나 급성기 염증반응이 유도되지 않은 육계병아리에서는 크릴 밀 수준이 높아짐에 따라 Con A 자극 PBMC 와 비장세포의 증식도가 증가 하였다(임 등, 2007). 이러한 결과들은 사료중 크릴 밀의 농도에 따라 육계병아리의 타고난 면역과 세포성 면역에 미치는 크릴밀의 영향이 다르다는 것을 나타내고 있다.

인체 및 동물의약품 산업에서 독성이 있는

표준 배변자극제로 오랫동안 사용되어온 파두유(Croton oil)(Pettit, 1977)는 동물체에서 LPS 또는 테레빈유(turpentine oil)의 작용과 비슷하게 급성기염증(면역) 반응을 활성화하는데 사용된다(Heuertz 등, 1993; Tohjo 등, 1995). 가금에서 LPS 보다 가격이 저렴한 파두유의 근육내 주입은 급성기 염증 반응을 지속적으로 활성화 시키고 혈중 IL-6(interleukine-6) 분비를 높이고, 간장으로부터 혈중 오보트렌스웨린 분비를 증가시킨다(Xie 등, 2002).

따라서 본 연구는 육계병아리에서 사료중 크릴 밀 농도가 세포성 면역에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실시 되었다. 크로톤 오일 주입에 의한 급성기 염증 반응이 활성화한 육계 병아리에서 혈액중 TNF- α 활성과 오보트스페린 수준 및 PBMC 와 비장세포의 증식도를 조사 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물, 실험설계 및 실험사육

갓 부화된 육계 병아리(Ross) 수컷 120수를 1 일령부터 기초사료(Table 1)와 기초사료 중 대두박대신 0.5, 1.0 및 2.0%의 크릴 밀이 대치된 네 종류의 실험사료를 급여하여 3주간 사육하였다. 육계 병아리는 경기도에 소재한 부화장에서 부화 즉시 수거하여 자용 감별후 사용하였으며 어떤 백신도 접종되지 않았다. 육계병아리는 한 사료당 각각 6개 우리를 할당하고 우리당 5마리씩 24개 우리로 나누어 온도가 조절되는 사육실에서 사육하였다. 물과 사료는 자유로 섭취하게 하였다. 각 시험구의 절반인 3개 우리의 20일 령 병아리의 정강이 근육에 1수당 100 μ l(파두유 10 μ g/수)씩 파두유를 주입하였다(Xie 등, 2002). 면역원인 파두유(10%)는 올리브오일(Sigma, USA)과 파두유(Sigma, USA) 9:1 비의 혼합액이다. 대조는 각 사료당 나머지 절반인 3개 우리에 올리브유를 1수당 100 μ l씩 정강이 근육에 주입한 것이다. 사육 실험중, 병아리 무게는 7일, 14일 및 21일령에 측정하였고, 사료섭취량은 24시간 간격으로 매일

Table 1. Composition (g/kg) of basal diet and experimental diet (NRC, 1994)

Ingredients	Basal
Ground yellow corn (8.8% Protein)	596
Soybean meal (48.5% Protein)	355
DL-Methionine	2.5
Soybean oil	5.0
Choline HCl (50%)	1.5
(Iodized) Salt	5.0
CaCO ₃	10.0
CaHPO ₄ 2H ₂ O	20.0
Vitamin mix ¹⁾	2.5
Mineral mix ²⁾	2.5
Krill meal	—
Total	1,000 g

¹⁾ Vitamin mix provided the following per kg diet vitamin K 0.55 mg, antioxidant 125 mg, vitamin E 10 IU, vitamin D₃ 400 IU, vitamin A 1,500 IU, biotin 0.15 mg, folic acid 0.55 mg, pyridoxine HCl 3 mg, niacin 25 mg, Calcium panthothenate 10 mg, Riboflavin 3.6 mg, Thiamin HCl 1.8 mg.

²⁾ Mineral mix provided the following per kg diet MnSO₄ H₂O 170 mg, ZnSO₄ H₂O 110 mg, Ferric citrate 500 mg, CuSO₄ 5H₂O 16 mg, Na₂SeO₃ 0.2 mg.

정해진 시각에 사료 급여와 잔량 기록으로 계산하였다.

2. 혈장과 PBMC 분리, 간장과 비장 무게 및 비장세포 분리

과두유 주입 24시간 (21일령) 뒤에 각 우리에서 임의 선별한 육계병아리의 무게를 측정 후 심장천자로 3 ml의 혈액을 취하고, 경추골 분리로 희석시켰다. 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심하여 상등액인 혈장은 0.22 μm 필터로 여과 멸균하고 혈중 TNF-α 활성과 오보트렌스웨린 분석에 이용할 때까지 -80℃에 보관하였다. 채혈 후 육계 병아리의 복부를 절개하여 적출한

간장과 비장은 사료 급여구 별로 0.9% 염용액으로 3회 세척하고 무게를 측정하였다.

육계병아리 (21일령)의 혈액을 15 ml 튜브에서 멸균 PBS (pH 7.4)로 2배 희석하고 동량의 비중액 (Histopaque, Density = 1.077 g/ml, Sigma Co., USA)을 넣어 2,000 rpm(800×g)에서 15분간 원심하였다. 비중액과 PBS-혈장 혼합액의 중간에 형성된 buffy coat층을 취하여 FBS 5% RPMI-1640 배양액 (배양액)에 현탁하였다. 현탁액은 같은 방법으로 2회 세척한 뒤에 1,200 rpm에서 10분간 원심하여 얻은 펠렛층은, 배양액으로 현탁하여 현미경과 Hemacytometer로 세포수를 세고, 배양액으로 ml 당 PBMC 2.0 × 10⁶ 개 세포로 조정된 현탁액을 얻었다.

페트리접시에 넣은 비장위에 직경 200 μm 나일론 망을 얹은 후 배양액 3 ml를 넣어 주사기 피스톤의 앞부분으로 비장을 으깨었다. 흘러나온 비장세포 현탁액을 주사기로 흡입 후 나일론 망위에 세게 분사하여 결합조직으로부터 비장세포를 분리하였다. 비장세포 현탁액은 15 ml 튜브에서 동량의 비중액 (Histopaque, Sigma Co., USA)을 넣고, 2,000 rpm (800×g)에서 15분간 원심하였다. 원심 후 비중액과 배양액 사이의 buffy coat층 함유 배양액을 배양액에 현탁하였다. 비장세포 현탁액을 1,200 rpm에서 10분간 원심하여 얻은 비장세포 펠렛층은 배양액 3 ml에 현탁하여 세포수를 세고 ml 당 2.0 × 10⁶ 개 비장세포로 조정하였다.

3. 혈중 TNF-α 활성

혈장과 혼합 배양한 L929 세포주의 괴사정도를 rh TNF-α (Sigma Co., USA)의 그것과 비교하여 TNF-α 활성을 평가하였다 (Flick과 Gifford, 1984). 96웰 플레이트의 웰당 2.5 × 10⁴ L929 세포 (100 μl)를 접종하고 37℃ 와 CO₂ 5%에서 24시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 각 웰에 TNF-α (Sigma Co., USA) 표준용액 (5 ng/100 μl) 또는 5배 희석 혈장 100 μl를 넣었다. TNF-α 표준용액은 TNF-α 양이 웰당 2.44 pg이 될 때까지 연속 희석하였다. 모든 웰에 Actinomycin D (Sigma Co., USA) 10 μl(0.2 μg)를 넣고 37℃

와 CO₂ 5%에서 20시간 배양한 다음 웰당 10 uL(10%)의 alamar blue (Serotec, USA)를 넣고 4시간 더 배양하였다. 혈장내 TNF- α 활성은 ELISA 리더 (Biotek, USA)로 570 nm에서 600 nm의 광학밀도 값을 뺀 값을 rh TNF- α 에서 얻은 표준곡선 값에 대입하여 계산하였다.

4. 혈장 오보트렌스헤린

급성기 반응중인 육계병아리 (21일령)의 혈장을 10배 희석 혈장내 단백질들은 SDS가 함유되지 않은 비환원 시료완충액에서 acrylamide 10% 젤에 전기영동 (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis)하여 전개시켰다. 쿠마시블루용액으로 염색한 후 젤상에 나타난 단백질 밴드들 중에서 분자량 65 kDa 단백질의 농도를 영상분석장치 (image analyzer, Vilber lourmat, France)의 농도계법으로 측정하였다 (임 등 2007). SDS-PAGE 젤상의 혈장단백질을 NC막 (nitrocellulose membrane)에 이전시킨 뒤 TBST(tris buffered saline with tween 20)로 1,000배 희석한 항-가금 ovotransferrin 항체 (anti-chicken ovotransferrin antibody from rabbit serum, Acurate chemical, AIA8240)와 결합시켰다. NC막의 혈장 단백질들은 다시 secondary antibody 용액 (monoclonal anti-rabbit IgG γ -chain specific peroxidase conjugated, Sigma Co., A-1949)과 결합시켰다. 암실에서 Hyper film (Amersham, HP7 9NA)을 이용하여 ECL 용액으로 발광하는 항체 특이적으로 반응한 분획 (65kDa)이 ovotransferrin이므로 앞서 영상분석장치로 정량한 그 밴드를 ovotransferrin 농도로 하였다 (Xie 등, 2002).

5. PBMC 와 비장세포증식도

PBMC 와 비장세포의 증식도는 알라마 블루 (alamar blue) 색소의 환원량 (임 등, 2007)으로 평가하였다. 혈액에서 분리한 PBMC 현탁액 50 μ L(10⁵개)를 96웰 플레이트의 각 웰에 접종하여 37 $^{\circ}$ C 와 CO₂ 5%에서 배양하였다. 배양 4시간

째 웰당 Concanavalin A용액 (Con A, 10 μ g/ml) 40 μ L씩을 넣고, 20시간째에 10 μ L(10%)의 alamar blue를 첨가하여 4시간 더 배양하였다.

비장세포 현탁액은 96웰 플레이트에 웰당 50 μ L(10⁶개)씩 넣고 37 $^{\circ}$ C 와 CO₂ 5%에서 배양하였다. 배양 12시간째에 모든 웰에 Con A용액 (10 μ g/ml) 40 μ L를 넣고, 배양 24시간째 alamar blue(10%) 10 μ L를 첨가하여 24시간 더 배양하였다. PBMC 또는 비장세포의 증식도는 광학밀도(OD) 570 nm에서 600 nm를 뺀 값이다.

6. 통계처리

실험데이터는 파두유 주입과 크릴 밀 사료 수준의 2원배치 분산분석을 SAS 프로그램의 GLM법으로 주효과 및 상호관계를 조사하였다. 주효과가 유의하면(p<0.05), 평균값 사이의 유의차는 Duncan의 다중검정과 Student's t 값으로 검정하였고, p<0.10 값은 경향을 나타내는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. 생산성과 장기 무게

크릴 밀 0.5, 1.0 및 2.0% 사료가 육계 병아리의 생산성과 파두유의 근육내 주입이 간장과 비장 무게에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. 육계병아리를 21일간 사육했을 때 일당 증체에 미치는 사료중 크릴 밀 수준의 유의한 영향은 없었다. 그러나 크릴 밀 2.0% 사료를 급여한 육계병아리에서 크릴 밀 0.5 및 1.0% 사료에 비해 사료섭취량은 유의하게 높고 (p<0.05) 사료효율은 낮아지는 경향이 있었다.

육계병아리에 파두유 주입은 사료중 크릴 밀 수준과 관계없이 파두유 주입 24시간 (21일령) 뒤 체중에 대한 간장과 비장의 무게 비율을 올리브유 주입 대조구에 비해 높이는 경향을 보였다. 그러나 사료중 크릴 밀 수준이 간장과 비장무게에 미치는 영향은 측정수가 적어서 통계적인 평가는 이루어지지 않았다.

Table 2. Effect of dietary krill meal on growth performance of broiler chicks during 21 days of experimental feeding period and relative weights of liver and spleen after 24 hour by croton oil injection *i.m.*

Dietary Krill Levels(%)	Growth performance			Liver ³⁾		Spleen ³⁾	
	Gain	FI ¹⁾	FE ²⁾	Olive	Croton	Olive	Croton
	g/bird/day	Gain / FI %	 %			
0.0	21.1±0.6	37.1±0.4 ^b	56.9±1.7	2.34	2.82	0.065	0.071
0.5	20.5±1.4	37.6±0.8 ^b	54.7±2.3	2.16	2.70	0.061	0.059
1.0	20.3±0.4	36.9±0.4 ^b	55.0±1.2	1.92	2.83	0.066	0.074
2.0	19.7±1.1	40.7±1.6 ^a	48.4±0.7	2.78	3.10	0.047	0.067
Average	—	—	—	2.3±0.3	2.86±0.1	0.06±0.01	0.068±0.01
SEM	0.4	0.6	1.4	—	—	—	—
LSD	3.1	2.9	8.7	—	—	—	—
<i>p</i> values	0.78	0.06	0.14	—	—	—	—

Values of gain, FI, and FE are mean ± SE of six pens (5 birds/pen).

¹⁾ FI = feed intake, ²⁾ FE = feed efficiency ³⁾ Pooled values(3 birds (pen) on a diet)

^{a~b}: Means with different superscript in a same column differ significantly at *p*<0.05.

2. 혈중 TNF-α 활성

육계 병아리에서 파두유의 근육내 주입에 의한 급성기 반응 중 혈중 TNF-α 활성에 미치는

사료중 크릴 밀의 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 크릴 밀 사료는 파두유 및 올리브유 주입에 관계없이 육계병아리의 혈중 TNF-α 활성을 기초 사료에 비해 유의하게 (*p*<0.05) 상승시킨다. 그러

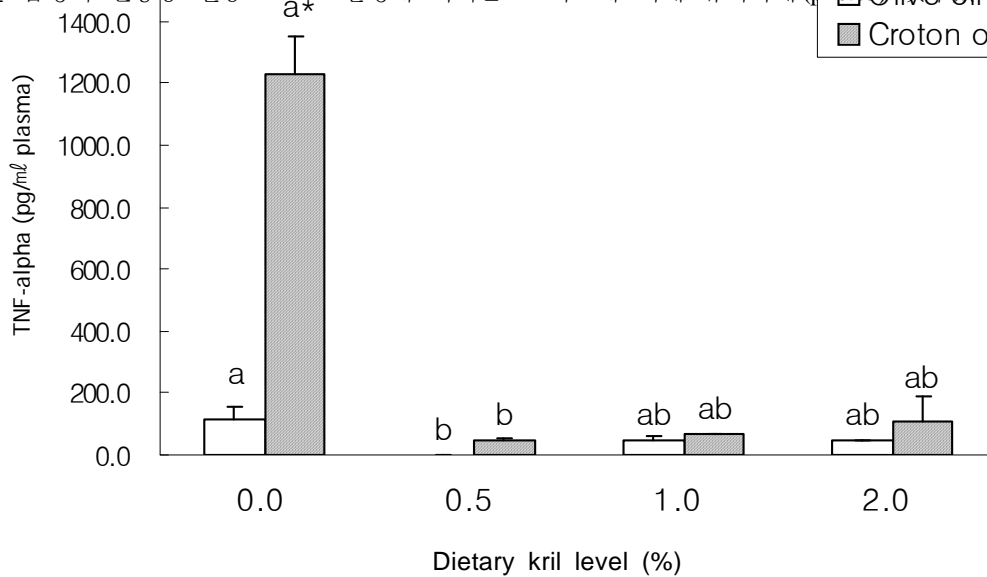


Fig. 1. Effect of dietary krill meal levels on TNF-α like activity in plasma of male broiler chicks after 24 h of croton oil injection *i.m.*. Values are mean ± SE of 3 birds. ^{a~b}: Means with different superscript among krill levels in same treatment, and *: means between olive oil and croton oil in a same diet differ significantly at *p*<0.05, respectively.

나 TNF- α 활성은 사료중 크릴 밀 수준 사이에 유의한 차이가 없었다. 크릴 밀 0.0% 사료를 섭취한 육계병아리에서 과두유 주입은 혈중 TNF- α 의 활성을 올리브유 주입구에 비해 유의하게 증가시켰다($p < 0.05$). 그러나 크릴 밀 사료를 급여한 육계병아리에서는 TNF- α 활성이 과두유 주입과 올리브유 주입 사이에 유의한 차이가 없었다.

3. 혈중 오보트렌스페린 수준

육계병아리의 혈액 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 쿠마시블루로 염색한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 단백질 65 kDa 밴드가 항-가금 오보트렌스페린 항체와 결합하여 이것이 오보트렌스페린으로 확인되었다. 영상분석장치로 65

kDa 오보트렌스페린 분획의 수준을 측정된 결과를 Fig. 2(B)에 함께 나타내었다. 과두유 주입은 혈중 오보트렌스페린 수준을 사료의 종류에 관계없이 증가시켰다. 크릴 밀 0.0% 사료 급여시 과두유 주입은 올리브유 주입 대조구에 비해 오보트렌스페린 수준을 약 60% 증가시키나, 크릴 밀 사료 급여시에는 사료중 크릴 밀 수준에 관계없이 20~30% 증가하였다. 한편 올리브유 주입 대조구에서는 사료중 크릴 밀 수준에 따라 혈중 오보트렌스페린 수준이 높아지는 경향을 보였다.

4. PBMC와 비장세포 증식도

Table 3에는 PBMC 와 비장세포 증식도에 미치는 사료, 과두유 주입 및 사료와 과두유 주

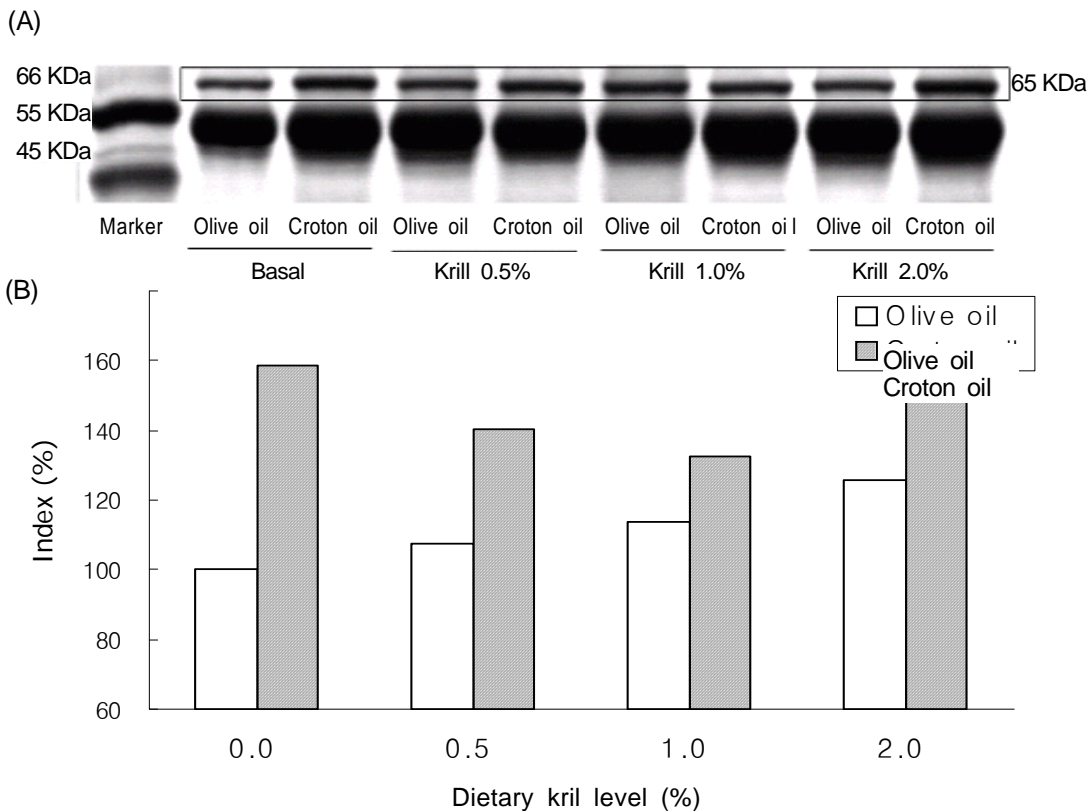


Fig. 2. Effect of dietary krill meal on plasma protein profile and ovotransferrin level in plasma of male broiler chicks after 24 h of croton oil injection *i.m.*. (A) : Plasma protein profile, (B) Ovotransferrin (65 kDa) level. Values are index to the level in blood of normal chicks fed basal diet.

Table 3. *p* values for factorial analysis in effect of dietary krill meal levels on TNF- α like activity and proliferation of PBMC and splenocyte

	TNF- α	PBMC	Splenocyte
Diet	<.0001	<.0001	0.03
Croton oil	<.0001	<.0001	0.01
Diet \times Croton oil	<.0001	<.0001	0.0007

입의 상호작용에 관한 요인 분석결과를 나타내었으며, 이들 요인들의 영향이 모두 유의하였다. 과두유 주입 24시간 (21일령) 뒤에 육계병아리에서 Con A (10 μ g/ml)로 자극한 PBMC 증식도에 미치는 크릴 밀 사료의 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 과두유 주입은 대조보다 크릴 밀 0.5, 1.0 및 2.0% 사료를 급여하면 PBMC 증식도를 유의하게 ($p < 0.05$) 높였다. 크릴 밀 0.0% (기초) 사료를 급여하면 과두유와 올리브유 사이에 유의차가 없었다. 과두유 주입 육계병아리에서 크릴 밀 사료는 기초사료보다 PBMC 증식도를 유의하게 ($p < 0.05$) 높였다. 한편 사료 중 크릴 밀 수준이 0.5, 1.0 및 2.0%로 높아짐

은 점차 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다. 그러나 올리브유 주입 육계병아리에서 PBMC 증식도는 크릴 밀 0.5% 사료에 비해 크릴 밀 1.0 및 2.0% 사료에서 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다.

과두유 주입 육계병아리에서 Con A (10 μ g/ml) 자극 비장세포 증식도에 미치는 사료 중 크릴 밀 수준의 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 비장세포증식도는 과두유 주입으로 올리브유 주입보다 크릴 밀 0.0% 사료에서 유의하게 높았고, 0.5% 사료에서 유의차가 없었으며, 1.0 및 2.0% 사료에서는 유의하게 ($p < 0.05$) 낮았다. 과두유 주입 육계병아리에서 크릴 밀 0.0 및 0.5% 사료는 1.0 및 2.0% 사료보다 비장세포 증식도를 유의하게 ($p < 0.05$) 높였다. 올리브유

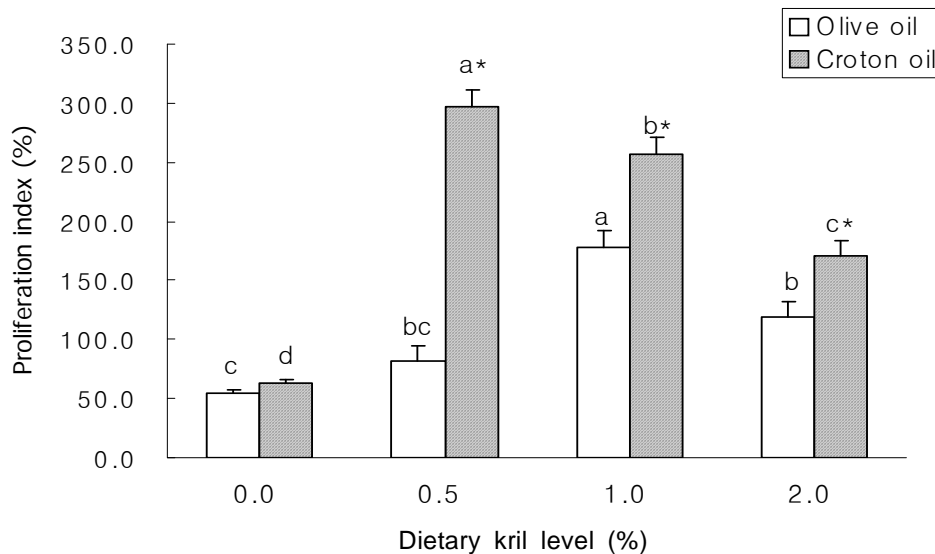


Fig. 3. Effect of dietary krill meal on the proliferation of PBMC of male broiler chicks after 24 h of croton oil injection *i.m.*. Values are mean \pm SE of 3 birds. Values are indices of Con A treatment as differences between 570 and 600 nm optical density to without Con A treatment incubation during incubation of PBMC of birds fed basal diet. ^{a~b} : Means with different superscript among krill levels in same treatment, and * : means between olive oil and croton oil in a same diet differ significantly at $p < 0.05$, respectively.

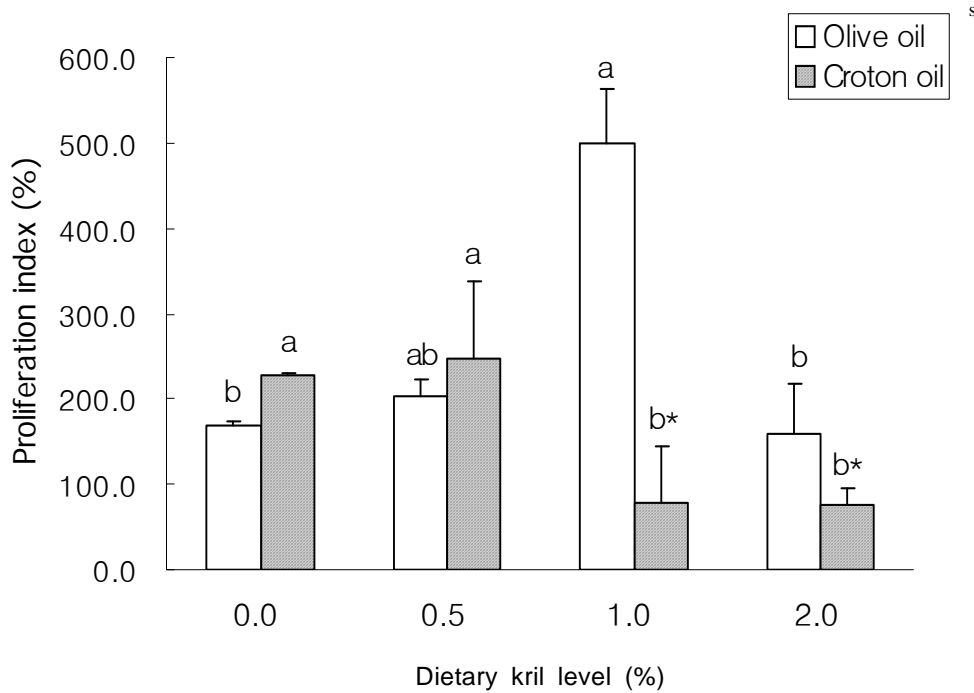


Fig. 4. Effect of dietary krill meal on the proliferation of splenocyte of male broiler chicks after 24 h of croton oil injection *i.m.*. Values are mean \pm SE of 3 birds. Values are indices of Con A treatment as differences between 570 and 600 nm of optical density to without con A treatment during incubation of splenocyte of birds fed basal diet. ^{a~b} : Means with different superscript among krill levels in same treatment, and * : means between olive oil and croton oil in a same diet differ significantly at $p < 0.05$, respectively.

주입 육계병아리에서, 크릴 밀 1.0% 사료의 비장세포 증식도는 0.5% 사료 사이에 차이가 없었으나 기초사료와 크릴 밀 2.0% 사료급여에 비하여는 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).

IV. 고찰

파두유(巴豆油: croton oil)는 주로 스테아린산, 팔미친산, 미리스친산, 라우린산의 글리세롤 ester (glycerides)로 구성되며, 휘발성 산인 formic, acetic, 및 isobutyric acid의 glycerin ether를 함유한다. 그리고 파두유의 활성성분은 알콜에 잘 녹는 크로톤산(crotonic acid)로 여겨지고 있다 (Fig. 5).

파두유에서 발견되는 크로톤산은 단쇄불포화 carboxylic acid의 하나로 계통명은 IUPAC계로 trans-2-butenoic acid이고, acrylic acid계로는 3-methyl acrylic acid이다. 백색에서 미백색결정으로 물에 잘 녹고, 수용액은 약산성이며, 용점

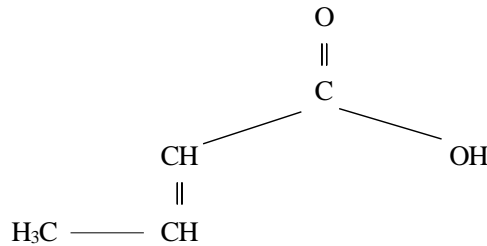


Fig. 5. Structure of crotonic acid.

은 71°C이고 185°C에서 끓으며, 염기, 산화제 및 환원성 제제와 강렬하게 반응한다. 파두유는 약리학적으로 인체 및 동물의약품 산업에서 독성이 있는 표준 배변자극제로 오랫동안 사용되어 왔다 (Pettit, 1977). 파두유는 LPS 또는 테레빈유 (turpentine oil)와 같이 동물체의 선천 면역 (급성기) 반응의 유도에 사용된다 (Heuertz 등, 1993; Tohjo 등, 1995). 파두유는 LPS에 비해 가격이 저렴하며 급성기 염증 반응을 지속적으로 유도한다고 알려져 있다 (Xie 등, 2002).

1. 생산성 및 간장과 비장무게

사료중 크릴 밀 수준이 육계병아리에서 21일 간의 일당 증체에는 큰 영향을 미치지 않았으나 육계병아리는 크릴 밀 2.0% 사료를 유의하게 많이 섭취하였고, 이 때 사료효율은 감소되는 경향을 보였다. 임 등 (2003, 2007b)과 박 등 (2004)도 크릴 밀 2.0% 사료의 섭취량이 크릴 밀 0.0% (기초) 사료보다 높고 사료효율이 낮아지는 것을 관찰하였다. 본 연구에 사용한 각 실험사료의 조에너지 함량 및 일반성분은 차이가 없었다(고 등, 2004). 크릴 밀 2.0% 사료의 섭취량 증가와 성장을 감소가 사료의 에너지 함량이나 영양소 양 또는 종류의 차이에 의한 영향인지 분명히 알 수가 없었다.

본 연구에서 통계적인 평가는 하지 않았으나 파두유 주입은 사료중 크릴 밀 수준에 관계 없이 간장과 비장 무게를 높이는 경향이 있었다. LPS 주입으로 면역반응을 활성화한 육계병아리에서 크릴 밀 사료의 급여는 간장과 비장 무게를 증가시켰다(고 등, 2004; 박 등, 2004; 임 등 2007). 본 연구의 파두유 근육내 주입이 육계병아리의 간장과 비장의 무게를 높이는 것은 LPS의 복강내 주입시와 동일하게 면역반응 활성화가 원인인 것 같다. 파두유 주입은 혈장의 오보트렌스웨린 농도를 높였으므로 간장에서 오보트렌스웨린 등의 급성기 단백질 합성 등의 방어반응의 활성화 그리고 비장내 면역세포 증식의 자극이 간장과 비장 무게를 증가시키는 원인이라 생각된다.

2. 혈중 TNF- α 활성과 오보트렌스웨린 수준

본 연구에서 크릴 밀 사료는 파두유 주입에 관계없이 육계병아리의 혈장 TNF- α 활성을 크릴 밀 0.0% (기초)사료에 비해 유의하게 ($p < 0.05$) 감소시켰다. LPS 급성기 반응 육계병아리에서도 기초사료에 비해 크릴 밀 사료는 혈중 TNF- α 활성을 감소시켜(임 등, 2007b) 본 연구의 파두유 주입시와 같았다. 크릴 밀은 어유와 비슷한 n-3 PUFA를 함유한다(고 등, 2004). 본 연구의 크릴 밀 사료 급여로 병아리 혈중 TNF-

α 활성 감소는 포유류에서 n-3 PUFA 급여로 친염증성 사이토카인 분비가 감소하는 결과(Fernandes 등, 1994, Jaya와 Chu, 1999 Calder, 1996 Endres 등, 1989)와 유사한 것 같다.

가금에서 파두유 주입은 혈중 IL-6과 급성기 단백질인 오보트렌스웨린의 분비를 증가시킨다(Xie 등, 2002). 본 연구에서 오보트렌스웨린의 혈중 수준은 혈액 단백질중에서 항-가금 오보트렌스웨린 항체와 반응하는 단백질 65 kDa 분획으로 확인되었다(Xie 등 2000, 2002 임 등, 2007). 크릴 밀 0.0%, 1.0% 및 2.0% 사료를 급여한 육계 병아리에서는, LPS주입 급성기 염증 반응중에 오보트렌스웨린의 혈중 농도가 대조 병아리보다 증가하여(임 등, 2007). 급성기반응이 오보트렌스웨린 농도에 미치는 크로톤오일과 LPS의 영향은 동일하였다. 그러나 크릴 밀 0.5% 사료를 급여한 병아리에서는, 혈액의 오보트렌스웨린 농도가 대조에 비해서 LPS 주입 시는 낮았으나(임 등, 2007) 크로톤오일 주입 시에는 높아지는 것이 달랐다. 이와 같이 혈중 오보트렌스 웨린 수준에 미치는 크로톤 오일과 LPS 급성기 반응(임 등, 2007)의 영향은 사료중 크릴 밀 함량에 따라 달랐다.

3. PBMC와 비장세포 증식도

포유류에서는 PBMC 와 비장세포의 T 임파구가 세포성 면역의 연구에 이용된다. 포유류의 PBMC는 70~80%의 T 임파구, 15~20%의 B 임파구 및 10%의 단구세포(monocyte)와 NK 세포(natural killer cell)로 구성된다(Cochet 등, 1998). 그러나 가금의 PBMC를 구성하는 면역세포의 비율은 잘 알려져 있지 않다. Bohls 등 (2006)은 flow cytometer를 이용한 분석에서 가금의 PBMC는 T 임파구, B 임파구, NK세포 및 단구세포들로 구성되며 가금의 세포성 면역도 포유동물과 마찬가지로 T 임파구에 의해 작동된다고 하였다. 본 연구실에서는 크릴 밀 사료를 급여한 육계 병아리의 발가락 사이 피부의 PHA-p 반응으로 세포성 면역을 조사하였다(고 등, 2004 박 등, 2004). 그러나 PHA-p 주입 후 부은 정도 측정을 위한 캘리퍼스 측정값의

정밀도가 연구자의 숙련 정도에 따라 달라서 유의한 측정값을 얻기 위해서는 측정예수가 비교적 많아야 하였다. 따라서 본 연구실에서는 알라마 블루(alar blue) 색소의 환원을 이용한 비장세포와 PBMC 증식도 측정으로 세포성 면역을 평가하였다(임 등, 2007a).

PBMC 증식도는 급성기 염증 반응중인 육계 병아리에서 근육내 파두유 주입과 복강내 LPS 주입시(임 등, 2007b)에 기초사료에 비해 크릴 밀 0.5% 사료에서 유의하게 ($p < 0.05$) 높았고, 크릴 밀 수준이 1.0 및 2.0%로 높아짐에 따라 유의하게 낮아졌다. 이와 같이 급성기 염증 반응중인 육계 병아리의 PBMC 증식도에 미치는 크릴 밀 수준의 영향은 파두유 주입과 LPS 주입의 영향이 비슷하였다.

비장세포 증식도는 본 연구의 파두유 주입 급성기 반응중에는 크릴 밀 1.0 및 2.0% 사료에서 기초 및 크릴 밀 0.5% 사료에 비해 유의하게 낮았다. LPS 주입 급성기 염증 반응중(임 등, 2007b)에도 크릴 밀 1.0 및 2.0% 사료는 크릴 밀 0.5% 사료보다 비장세포의 증식도를 낮추었다. 크릴 밀 1.0과 2.0% 사료급여시에는 비장세포 증식도가 LPS 주입과 파두유 주입 급성기 염증 반응 양쪽에서 공통적으로 낮아졌다. 그러나, LPS 주입시(임 등, 2007b)에 크릴 밀 0.5% 사료는 비장세포 증식도를 기초사료보다 높였으나, 크로톤 오일 주입시에는 크릴 밀 0.5% 와 기초사료 사이에 차이가 없었다. 이와 같이 사료중 크릴 밀이 비장 세포 증식도에 미치는 영향은 파두유 주입과 LPS 주입 급성기 염증 반응사이에 달랐다.

Peterson 등(1998)는 사료중 낮은 수준(4.4g EPA+DHA /100g total fatty acids: n-6/n3 =7)의 n-3 PUFA 급여는 마이토젠에 대한 T 와 B 임파구의 증식효과를 높이나, 높은 수준(6.6g EPA+ DHA /100g total fatty acids: n-6 / n3 =7)의 n-3 PUFA를 급여하면 임파구들의 증식이 감소하는 것을 관찰 하였다. Calder(1996)는 마우스에 n-3 PUFA 급여시 Con A 및 PHA에 대한 임파구의 증식이 감소한다고 하였다. Schmidt 등(1991)도 사람의 여유 섭취는 T 임파구의 증식을 감소시킨다고 하였다. 본 연구

는 크릴 밀 0.5% 사료급여시 PBMC중의 T 임파구의 증식이 다른 사료들에 비해 유의하게 증가하며, 크릴 밀 1.0 및 2.0% 사료의 급여는 비장세포와 PBMC 모두에서 크릴 밀 0.5% 사료에 비해 유의하게 감소한다는 것을 나타낸다. 이것은 PBMC와 비장세포에서 육계병아리가 섭취한 실험사료 중 n-3 PUFA 양의 증가에 따른 n-3 PUFA와 n-6 PUFA 비율의 변화에 의한 것이라 추정된다. 본 연구에서 파두유 근육내 주입에 의한 급성기 염증 반응중 PBMC와 비장세포 증식도가 크릴 밀 0.5% 사료급여로 증가하나 크릴 밀 1.0 및 2.0% 사료 급여시 감소하는 것은 크릴 밀중 함유된 n-3 지방산의 영향이라는 것을 시사한다.

본 연구는 파두유 주입에 의한 급성기 반응중인 육계병아리에서 사료중 크릴 밀은 혈중 TNF- α 활성을 감소시켜서 급성기 반응의 부정적 영향을 완화한다는 것을 나타낸다. 그러나, 파두유 주입시 면역반응에 미치는 크릴 밀의 영향은 오보트렌스웨린과 비장세포 증식도에서 LPS 주입시와는 달랐다.

이상과 같이 파두유 주입 육계병아리에서 크릴 밀 사료는 혈중 TNF- α 활성을 감소시키나, 오보트렌스웨린 수준은 크릴 밀 수준과 관계없이 높았다. 크릴 밀 사료는 파두유 주입시 PBMC와 비장세포의 증식도를 변화시켰다. 혈중 오보트렌스웨린 수준과 비장세포 증식도에 미치는 크릴 밀 사료의 영향은 LPS 주입시와 달랐으나, 본 연구는 사료중 크릴밀이 파두유 주입에 의해서 발생한 선천 면역과 세포성 면역을 변화시킨다는 것을 나타내었다.

V. 요 약

근육내 파두유를 주입한 육계병아리에서 사료 중 크릴 밀 수준이 세포성 면역반응에 미치는 영향을 조사하였다. 갓 부화한 육계병아리(Ross) 수컷에 크릴 밀 0.0(기초사료), 0.5, 1.0 및 2.0% 사료를 급여하고 3주간 사육하였다. 20일령에 10 μ l의 파두유를 정강이 근육내에 주입하였고, 24시간 뒤(21일령)에 혈중 TNF- α 활성과 오보트렌스웨린 수준 및 PBMC와 비장

세포의 증식도를 올리브유를 주입한 대조구와 비교하였다. 크릴 밀 사료는 육계병아리의 생산성과 혈장 오보트랜스헤린 수준에 유의한 영향을 미치지 않았으나, 크릴 밀 0.0% 사료에 비해서 유의하게 ($p < 0.0001$) 혈장 TNF- α 활성을 감소시키고 PBMC 증식도를 높였다. 비장 세포 증식도는 크릴 밀 1.0% 사료에서 유의하게 ($p = 0.01$) 높았다. 파두유 주입은 혈중 TNF- α 활성 ($p < 0.0001$), 오보트랜스헤린 수준 및 PBMC 증식도 ($p < 0.0001$)를 높였다. 파두유 주입 시에 PBMC 증식도는 사료중 크릴 밀 수준에 따라 점차 감소 ($p < 0.05$) 하였고 비장세포 증식도는 크릴 밀 1.0 및 2.0% 사료에서 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다. 본 연구는 사료중 크릴밀이 파두유 주입으로 활성화한 선천 면역과 세포성 면역을 변화시킨다는 것을 나타내었다.

(색인 : 파두유 (croton oil), tumor necrosis factor - α (TNF- α), PBMC와 비장세포의 증식, 크릴 밀, 육계 병아리)

VI. 인용 문헌

- Bohls, R. L., Smith, R., Ferro, P. J., Silvy, N. J., Li, Z. and Collisson, E. W. 2006. The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes, *Develop. and Compera. Immun.* 30:843-850.
- Calder, P. C. 1996. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc. Nutr. Soc.* 55:737-774.
- Cochet, O., Teillaud, J. L. and Sautes, C. 1998. *Immunological techniques made easy.* Wiley co, UK, pp.: 7.
- Cook, M. E. 1991. Nutrition and the immune response of the domestic fowl. *Crit. Rev. Poultry Biol.* 3:167-189.
- Edelman, A. S., Sanchez, P. L., Robinson, M. E., Hochwald, G. M. and Thorbecke, G. J. 1985. Primary and secondary wattle swelling response to phytohemagglutinin as a measure of immunocompetence in chickens. *Avian Dis.* 30:105-111.
- Endres, S., Ghorbani, R. and Kelley, E. V. 1989. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *New Eng. J. Med.* 320: 265-271.
- Fernandes, G., Bysami, C., Venkatraman, J. T., Tomar, V. and Zhao, W. 1994. Increased TGF β and decreased oncogene expression by ω 3 lipids in the spleen delays autoimmune disease in B/W mice. *J. Immunol.* 152:5979-5987.
- Heuertz, R., Piquette, C. A. and Webster, R. O. 1993. Rabbits with elevated serum C-reactive protein exhibit diminished neutrophil infiltration and vascular permeability in C5a-induced alveolitis. *Am. J. Pathol.*, 142: 319-328.
- Jaya, T. V. and Wei-chia Chu. 1999. Effects of dietary ω 3 and ω 6 lipids and vitamin E on proliferative response, lymphoid cell subsets, production of cytokines by spleen cells, and splenic protein levels for cytokines and oncogenes in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J. Nutr. Biochem.* 10: 582-597.
- Klasing, K. C. 1994. Avian leukocytic cytokines. *Poult. Sci.* 73:1035-1043.
- Korver, D. R. and Klasing, K. C. 1997. Dietary fish oil alters specific and inflammatory immune response. *J. Nutr.* 2039-2046.
- Koutsos, E. A. and Klasing, K. C. 2001. Interactions between the immune system, nutrition, and productivity of animals. Pages 173-190 in: *Recent Advances in Animal Nutrition, 2001*, P.C. Garnsworthy and J. Wiseman, eds. Nottingham University Press, Nottingham.
- Leshchinsky, T. V. and Klasing, K. C. 2001. Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Develop. and Comp. Immunol.* 25:629-638.
- Peterson, L. D., Thies, F., Sanderson, P., Newsholme, E. A. and Calder, P. C. 1998. Low levels of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids mimic the effects of fish oil upon rat lymphocytes. *Life Sciences* 62(24):2209-2217.

15. Pettit, G. R. 1977. Biosynthetic products for cancer chemotherapy. voll. Plenum press, New York, USA.
 16. SAS Institute Inc. 1988. SAS user's Guide, statistics version 5 ed. SAS Institute Inc., NC, USA.
 17. Schmidt, F. B., Pedersen, J. O., Varming, K., Ernst, E., Jersild, C., Grunnet, N. and Dyerberg, J. 1991. n-3 fatty acids and leukocyte chemotaxis. Effects in hyperlipidemia and dose-response studies in healthy men. *Arteriosclerosis Thrombosis*, 11:429-435.
 18. Tohjo, H., Miyoshi, F., Uchida, E. and Nijyama, M. 1995. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of chicken serum in acute inflammation induced by intramuscular injection of turpentine, *Poult. Sci.*, 74:648-655.
 19. Xie, H., Rath, N. C., Huff, G. R., Balog, J. M. and Huff, W. E. 2000. Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poult. Sci.* 79:33-40.
 20. Xie H., Newberry, L., Clark, F. D., Huff, W. E., Huff, G. R., Balog, J. M. and Rath, N. C. 2002. Change in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and disease. *Avian disease*, 46:122-131.
 21. 고태송, 임진택, 박인경, 김재환. 2004. 급성기 반응중인 육계병아리의 생산성에 미치는 사료중 크릴 밀의 영향. *동물자원과학회지* 46:173-182.
 22. 박인경, 김재환, 임진택, 고태송. 2004. 사료중 크릴 밀을 급여한 육계의 생산성과 SOD 활성에 미치는 급성기 반응의 영향. *동물자원과학회지*, 46:183-192.
 23. 임진택, 김재환, 박인경, 고태송. 2003. 살모넬라 LPS를 주입한 육계병아리의 생산성과 질소밸런스 및 대사에너지 이용성에 미치는 사료중 크릴 밀의 영향, *동물자원과학회지*. 45:957-966.
 24. 임진택, 박인경, 고태송. 2007a. Alamar blue 색소의 환원량 평가에 의한 급성기 반응중 육계병아리의 비장세포와 PBMC 증식도 측정. *동물자원과학회지* 49(2):213-224.
 25. 임진택, 박인경, 고태송, 2007b. 살모넬라 LPS를 주입한 육계병아리에 있어서 생산성과 면역반응에 미치는 사료중 크릴 밀 수준의 영향. *동물자원과학회지* 49(2):225-238.
- (접수일자 : 2007. 5. 1. / 채택일자 : 2007. 9. 27.)