

비태인이 산란계의 면역 반응에 미치는 영향

박재홍·류경선[†]

전북대학교 동물자원학과

Effect of Betaine on Immune Response in Laying Hens

J. H. Park and K. S. Ryu[†]

Department of Animal Resources and Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756 Korea

ABSTRACT This experiment was conducted to determine the effect of betaine on immune response in laying hens. A total of 72 ISA-brown laying hens were divided into four groups of 18 hens each and fed corn-soybean meal based diets with addition of 0, 300, 600 and 1,200 ppm betaine for four weeks. The effect of betaine on splenocyte proliferations with mitogens, concanavalin A(Con A) and pokeweed mitogen(PWM), were assayed after incubation using [3H] thymidine uptake. Proliferations of splenocyte were significantly increased by activation of mitogen, Con A or PWM. Mitogen effects of Con A were increased by Con A plus betaine injection(0.1 mM), whereas PWM effects did not affect in PWM plus betaine injection(0.1 mM) *in vitro*. Splenocyte of laying hens fed betaine tended to proliferate in the presence of PWM, but appeared to be slightly suppressed in the presence of Con A *in vivo*. Proliferation of splenocytes which were stimulated by Con A or Con A+betaine injection(0.1 mM) were increased in dietary 600 ppm betaine, but inhibited in dietary 1,200 ppm betaine supplementation. Spleen weights and sheep red blood cell(SRBC) titers of hens fed betaine tended to increase compared to those of control, but were not significantly different. These results suggested that betaine could increase splenocyte proliferation *in vitro*.

(Key words : betaine, laying hens, splenocyte, SRBC, mitogen)

서론

비태인은 동·식물에서 폭넓게 존재하는 아미노산 유도체이며, 체내에서는 간과 신장세포에서 콜린의 산화에 의해 생성된다. 비태인과 관련되어 지금까지의 가금에서 연구결과를 살펴보면, 비태인은 크게 세 가지의 주요기능을 가진다. 첫째로 고온으로 인한 환경 스트레스 조건에서 세포내 삼투압 조절에 관여하며, 메틸기를 공여하는 메틸기 공여체 그리고 지방 축적을 억제하는 등의 지질 대사에 영향을 미친다(Eklund et al., 2005). 그리고 몇몇 연구에서 비태인은 콕시듐중에 감염된 육계에서 효과적으로 면역반응에 관여한다고 알려져 있다. Augustine and Danforth(1999)는 *Eimeria acervulina*, *tenella*, *maxima*를 감염시킨 육계에서 salinomycin을 단독 급여하였을때보다 비태인 0.15%를 혼합·급여하였을 때 질병에 대한 보호효과를 증가시켰다고 하였다. 따라서 비태인 사료를 급여한 육계는 증체량과 사료효율이 개선되

고, 병변지수와 폐사율이 감소되었다. 이외에도 비태인은 대식세포의 일산화질소의 배출을 증가시키며, 백혈구의 식세포작용으로 콕시듐 감염의 정도를 개선하였다(Klasing et al., 2002). 한편, Tsiagbe et al.(1987a)에 의하면 옥수수-대두박 위주의 사료에 메티오닌을 첨가하면 sheep red blood cell(SRBC)에 대한 항체가를 증가시키고, phytohaemagglutinin-P(PHA-P)에 의하여 mitogen 자극이 증가되었다고 하였다. Swain and Johri(2000)도 육계 사료에 메티오닌과 콜린을 첨가하여 면역 반응을 조사하였을 때 메티오닌 6.5 g/kg과 콜린 1,300 mg/kg을 급여한 처리구에서 leucocyte migration inhibition(LMI)가 증가하여 세포성 면역 반응이 유의적으로 개선되었다고 하였으며, haemagglutination inhibition(HI) test와 ELISA 방법에 의해서 메티오닌 3.0 g/kg과 콜린 3,300 mg/kg을 급여한 병아리의 항체가가 증가하여 체액성 면역 반응이 증가되었다. 이 연구 결과에 의하면 더 좋은 육계의 건강과 생산성을 위해서는 메티오닌과 콜린의 수준은 Bureau of In-

[†] To whom correspondence should be addressed : seon@chonbuk.ac.kr

dian Standards (BIS)의 권장량보다 더 높은 수준을 첨가해야 한다고도 보고하였다. 척추 동물에서 비태인과 메티오닌 그리고 콜린의 상호 작용은 널리 보고되어왔다(Kidd et al., 1997). 따라서 비태인이 메티오닌과 콜린의 합성에 영향을 미친다면 면역력 향상이 가능할 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구는 산란계 사료에 비태인의 첨가가 면역 반응에 어떠한 영향을 미치는지 구명하고자 산란계 비장 세포를 이용하여 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시험 설계와 사양 관리

시험은 70주령 ISA Brown 산란계를 이용하였고, 처리구는 비태인 0, 300, 600, 1,200 ppm 수준으로 사료에 첨가 급여하였다. 처리구당 18수씩 총 72수를 공시하여 4주간 사양 시험을 실시하였다. 시험 사료는 옥수수-대두박을 기초로 하여 CP 16%, ME 2,800 kcal/kg 수준으로 제조하였고, 기타 영양소 함량은 NRC 사양 표준(1994)에 적합하도록 하였다. 시험 기간에 물과 사료는 무제한으로 급여하였으며, 점등 시간을 1일 16시간이 되도록 하였다.

2. 조사 항목

1) 비장 림프구(Splenocyte) 증식

시험 종료시 처리구당 각각 5수씩 비장을 적출하여 phosphate-buffered saline(PBS) 용액으로 세척한 뒤 주사기를 이용하여 세포 부유액을 만들고, Histopaque 1077(Sigma)을 가해 300×g에서 30분간 원심 분리한 다음 비장 림프구를 분리하였다. 분리한 비장 림프구는 10^5 cell/mL가 되도록 RPMI 1640 배지에 희석하였고, [3 H]-thymidine uptake assay를 이용하였다. 96-well plate에 Con A를 농도별로 단계 희석하고, 여기에 림프구를 넣은 후 40°C CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. Concanavalin A(Con A, 10 mg/mL)와 pokeweed mitogen (PWM, 10 mg/mL)에 대한 증식 반응을 측정하기 위하여 세포를 harvest하고, scintillation counter를 이용하여 DPM(disintegration per minute)을 측정하였다. 결과는 test/control ratio로써 stimulation index(SI)로 표기하였다. 또한 비태인 0.1 mM을 처리하여 *in vitro* 상에서 증식 반응에 미치는 영향을 측정하였다.

2) SRBC 항체가

체액성 면역 반응을 측정하기 위해 경정맥에 10% sheep red blood cell(SRBC) 0.1 mL를 주사하고 1주일 후 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 96-well plate에 50 μ L씩 가하여 PBS에 1/2부터 1/256까지 단계 희석하였으며 2% SRBC 50 μ L를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 응집역가를 측정하였다.

3) 비장의 무게

시험 종료시 각각의 처리구에서 10수씩 비장을 분리·채취한 후 무게를 측정하여 생체중에 대한 비율(%)로 계산하였다.

3. 통계 분석

수집된 자료는 SAS package(1996)의 GLM procedure로 분산 분석을 실시하였으며, 처리구간의 통계적인 차이는 Duncan's new multiple range test(Steel and Torrie, 1980)를 이용하였다.

결 과

1. *In Vitro* 상에서 비장 세포 증식 반응

시험관내에서 비태인(0.1 mM)을 처리했을 때 비장 세포의 증식 반응에 미치는 영향은 Fig. 1에 나타내었다. Fig 1에

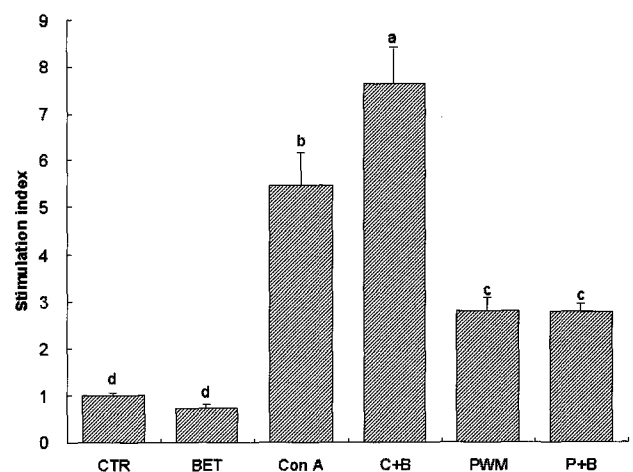


Fig. 1. Proliferation of splenocytes with Con A and PWM by betaine injection(0.1 mM) *in vitro*. CTR : negative control, BET : betaine, Con A : concanavalin A, C+B : concanavalin A + betaine, PWM : pokeweed mitogen, P+B : pokeweed mitogen + betaine.

나타난 바와 같이 mitogen을 처리하지 않은 상태에서 비태인 처리구의 SI는 1이하(=0.73)의 값을 나타내었으나, mitogen의 존재하에서는 그 증식 수치가 유의하게 높았음을 알 수 있다. 세포성 면역과 관련이 있는 T 림프구를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 Con A를 10 mg/mL의 농도로 처리하여 비장세포의 분열 증식능을 측정한 결과, mitogen을 처리하지 않은 대조구와 비태인 처리구에 비하여 Con A 처리구의 증식능이 현저하게 증가하였으며(SI=5.46), Con A+BET 혼합 처리구(SI=7.63)에서는 Con A 처리구의 증식능과 비교하여 또한 유의하게 증가하였다. 한편 PWM mitogen을 처리한 경우에서 SI는 2.80으로 대조구와 비태인 처리구에 비하여 유의하게 증가하였으나 PWM+BET 혼합 처리구의 경우 비태인의 효과는 적은 것으로 나타났다.

2. In Vivo 상에서 Splenocyte의 증식 반응

사료에 비태인을 첨가·급여하였을 때 산란계의 비장 림프구 증식 반응에 미치는 영향은 Fig. 2a~d에서 보는 바와 같이 처리구 상호간 통계적인 차이는 존재하지 않았다. Con A의 자극에 대한 비장 림프구 증식 반응은 비태인 600 ppm 처리구에서 비장 세포 분열 증식을 촉진하였고, 그 이상의 농도에서는 억제되는 경향을 보였다. PWM의 자극에 대한 반응에서도 Con A를 처리하였을 때와 비슷한 경향을 보여 비태인 600 ppm 처리구가 가장 높은 증식을 나타내었다. Con A+BET 그리고 PWM+BET을 혼합 처리 경우에서도 앞선 mi-

togen 처리의 결과와 유사하였다.

3. 비장의 무게

Fig. 3에서는 비태인을 급여한 산란계의 비장 무게를 생체 중에 대한 비율로 나타내었다. 시험 결과, 비태인 300 ppm 첨

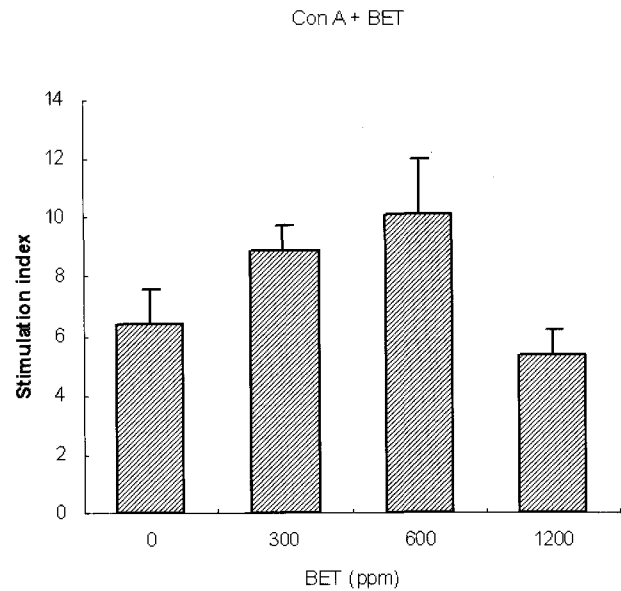


Fig. 2b. Splenocyte proliferation with Con A+BET of laying hens fed diets containing different concentration of betaine. BET : betaine, Con A+BET : concanavalin A+betaine.

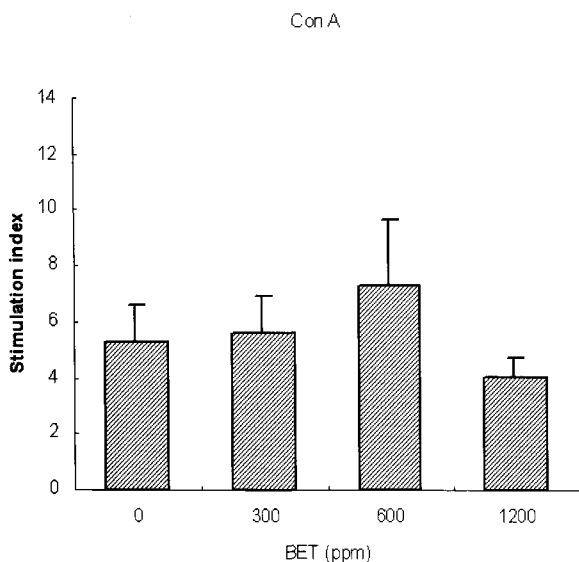


Fig. 2a. Splenocyte proliferation with Con A of laying hens fed diets containing different concentration of betaine. BET : betaine, Con A : concanavalin A.

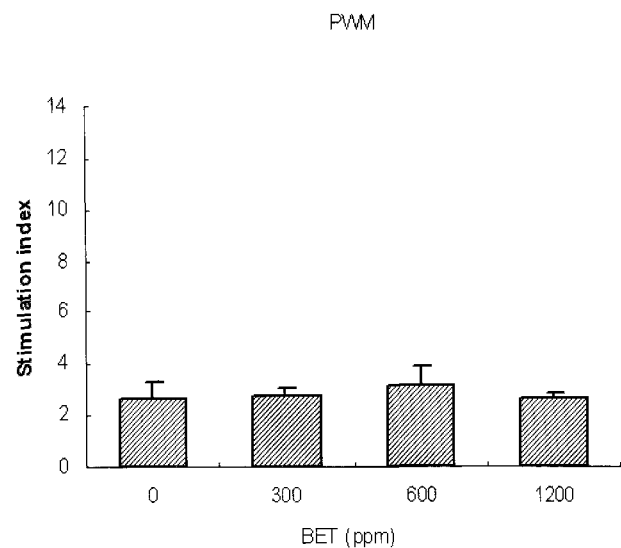


Fig. 2c. Splenocyte proliferation with PWM of laying hens fed diets containing different concentration of betaine. BET : betaine, PWM : pokeweed mitogen.

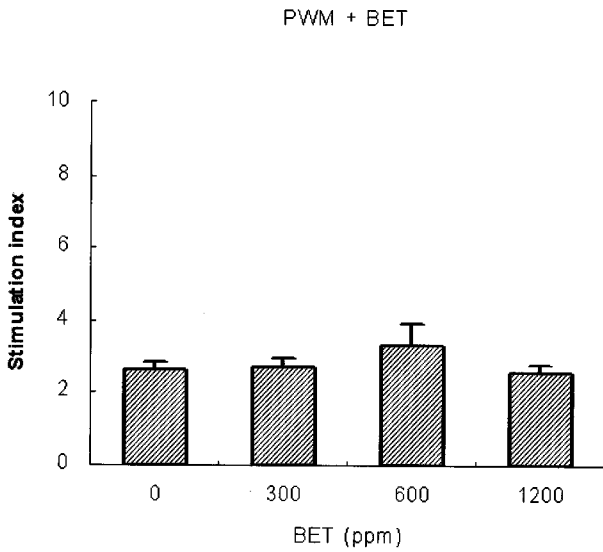


Fig. 2d. Splenocyte proliferation with Con A+PWM of laying hens fed diets containing different concentration of betaine. BET : betaine, PWM : pokeweed mitogen, P+B : pokeweed mitogen + betaine.

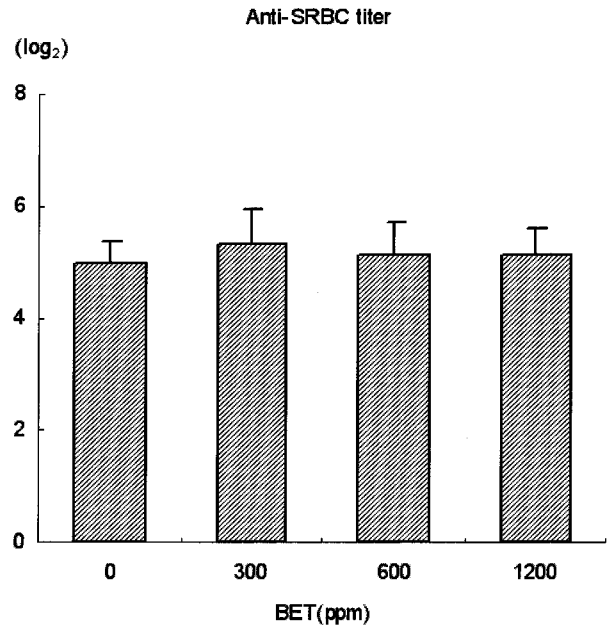


Fig. 4. Anti-SRBC titers of laying hens fed diets containing different concentration of betaine.

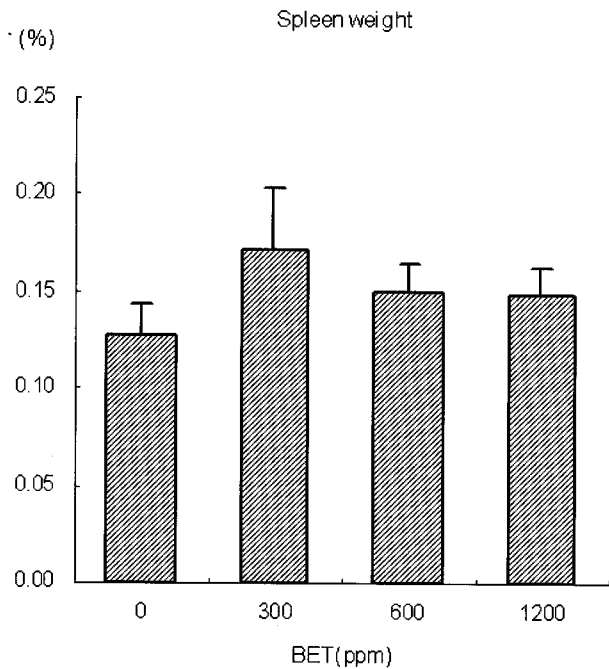


Fig. 3. Spleen weights of laying hens fed diets containing different concentration of betaine.

가구에서 가장 높은 경향을 보였고, 비태인 첨가구가 대조구에 비하여 전체적으로 증가하는 경향을 보였으나 처리구간 통계적인 차이는 없었다.

4. SRBC에 대한 항체가

Fig. 4는 SRBC에 대한 산란계의 면역 반응을 나타내었다. 시험 결과, 체액성 면역을 나타내는 항원-항체 반응으로 SRBC 항체가 비태인 첨가구에서 대조구에 비하여 높은 경향을 보였지만, 통계적인 차이는 없었다.

고 찰

생체내에서 콜린의 산화에 의해서 생성되는 비태인(N,N, N-trimethyl glycine)은 글라이신의 질소 원자를 중심으로 세 개의 활성화된 메틸기가 결합되어 있는 양극성 화합물이며 (Simon, 1999), 메틸기를 공여하면 결국 아미노산인 글리신이 된다. 비태인은 척추 동물에서 삼투압 조절, 메틸기 공여 및 지방축적 억제 등에 역할을 가지고 있으며(Saunderson and Mackinlay, 1990), 현재까지 다양한 영양, 생리 및 약리학적인 대사에 영향을 미치는 인자로 보고되어 왔다. 그러나 산란계에서 비태인의 급여에 따른 면역 시스템에 대한 연구가 미약하여 본 연구자는 이를 체계화 시키고, 그 변화를 관찰하기 위하여 본 연구를 실시하였다. 비장 세포는 말초 혈액 세포나 면역 세포를 훈련시키고, 자가 면역 질환의 기본적인 병리 형태를 좌우한다. 따라서 본 연구는 *in vitro* 상에서 비태인이 면역 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 mito-

gen assay를 수행하여 기초적인 면역 조절 기능을 예측하고자 하였다. 분리한 림프구는 그대로 배양하면 거의 분열하지 않지만, 적당한 분열 촉진 인자(mitogen)의 존재하에서 배양하면 DNA 합성과 세포 증식을 일으킨다.

본 연구 결과에서와 같이 *in vitro* 상에서 산란계의 비장 림프구 증식은 Con A로 증식을 유도한 Con A+비타민(0.1 mM) 혼합처리구가 유의하게 높은 증식을 보였다. 단백질, DNA/RNA, 핵산과 같은 생체내 중요한 화합물의 합성에는 반드시 메틸기가 필요하지만 비타민의 메틸기 공여 효과에 대한 논쟁은 지금까지 논란의 대상이다. 그러나 본 저자는 이전의 연구에서 비타민이 부족한 단백질과 메티오닌을 급여한 산란계의 간조직내 아미노산 합성을 증가시키고(박재홍 등, 2005), 호르몬 분비 증가(박재홍 등, 2006)에 관여함을 알 수 있었다. 이는 비타민이 비록 생산성 개선에 효과적이진 못할 지라도 메틸기 공여체로서의 기능은 가지는 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구에서 비타민의 메틸기가 *in vitro* 상에서 비장 림프구의 성장과 분화를 유도하였을 것으로 생각된다. 이후 본 저자는 산란계에 비타민을 수준별로 급여한 2차 시험을 시행하였다. 그러나 산란계사료에 비타민을 수준별로 급여하여 비장 림프구의 증식을 조사한 *in vivo* 시험에서는 *in vitro* 상에서의 시험과는 달리 처리구 상호간에 통계적인 차이는 발견할 수 없었다. Con A와 PWM으로 증식을 유도한 후 비타민을 첨가하여 비장 림프구의 증식 차이를 알아본 결과, 비타민 600 ppm 처리구가 가장 높은 증식능을 보였으며, 비타민 300 ppm과 600 ppm 수준에서 증가하는 경향을 나타내었다. 비타민과 관련되어 세포성 면역 반응을 측정하는 시험이 많지 않기 때문에 직접적으로 비교하기는 어렵지만 Swain and Johri(2000)는 육계 사료에 메티오닌과 콜린을 각각 6.5 g/kg, 1,300 mg/kg을 추가로 급여한 처리구에서 leucocyte migration inhibition(LMI)을 증가시켜 세포성 면역 반응을 유의적으로 개선하였다고 보고하였다. 비타민과 마찬가지로 메티오닌과 콜린도 메틸기 공여체로 이와 같은 LMI 증식에 관여하여 결과적으로 면역력 증가에 영향을 미친다. 본 연구에서는 비록 *in vivo* 시험에서 비타민의 현저한 효과를 얻을 수 없었으나 *in vitro* 시험의 결과를 근거로 하여 좀 더 세밀한 추후 시험이 요구된다.

비장은 면역 세포들이 림프절에서 만들어지고, 소멸되기를 반복하는 곳으로 면역 기능을 담당하는 기관이다. 따라서 면역기능이 향상되면, 그 기관도 잘 발달할 수 있다는 것을 의미한다. *In vivo* 시험에서 비장 림프구의 증식 결과와 비슷하게 비타민 급여구의 비장 무게는 대조구에 비하여 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적인 차이는 없었다. 또한 체액

성 면역의 지표로 이용될 수 있는 SRBC 항체가를 조사한 결과에서도 처리구 상호간에 유의적인 차이는 발견할 수 없었다. Swain and Johri(2000)에 의하면 육계 사료에 메티오닌과 콜린을 첨가하여 면역 반응을 조사한 결과, 메티오닌 3.0 g/kg과 콜린 3,300 mg/kg을 추가로 급여한 병아리에서 항체가 증가함으로써 체액성 면역 반응에 영향을 미친 것으로 조사되었다. 또한, 옥수수-대두박 위주의 사료에 메티오닌 추가로 첨가하였을 때 SRBC에 대한 항체가를 증가시켰고, phytohaemagglutinin-P(PHA-P)에 의하여 mitogen 자극이 증가한 것으로 나타났다(Tsiagbe et al., 1987 a, b). 이처럼 메티오닌이나 콜린이 체액성 면역에 관여하는 것으로 보고되고 있으나, 본 시험의 결과, 비타민이 SRBC 항체가에 미치는 영향은 적은 것으로 나타났다.

따라서 비타민은 *in vitro* 상에서는 산란계 비장 림프구의 증식에 영향을 미쳤으나 *in vivo* 시험에서는 비장 림프구 증식, 비장의 무게 및 SRBC 항체가에 미치는 영향은 적은 것으로 나타났다. 앞으로 산란계에서 비타민 급여 시험은 비장 림프구 증식 및 기타 면역 반응에 관련되어 좀 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

비타민이 산란계의 면역 반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 *in vitro*와 *in vivo* 시험을 시행하였다. 처리구당 18수씩 총 72수를 공시하였고, 비타민 0, 300, 600, 1,200 ppm 수준으로 산란계 사료에 첨가·급여하였다. 시험 결과, *in vitro* 시험에서 비장 림프구 증식은 비타민 만을 처리하였을 때에는 증식 반응은 일어나지 않았으나 Con A와 PWM을 처리하였을 때 증식 반응은 현저하게 증가하였다. 또한 Con A만을 처리했을 때보다 Con A와 비타민을 동시에 처리했을 때 반응성이 현저하게 증가하였다. 그러나 PWM과 비타민을 동시에 처리했을 때는 PWM만을 처리했을 때와 비교해서 차이를 보이지 않았다. 사료에 비타민을 첨가·급여한 *in vivo* 시험에서 Con A의 자극에 대한 비장 림프구 증식반응은 비타민의 첨가 수준에 따라 증가하는 경향을 보였으나 1,200 ppm 급여구에서는 대조구에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 이러한 경향은 Con A와 함께 비타민(0.1 mM)을 처리했을 때도 동일하게 나타났다. PWM의 자극에 대한 반응은 Con A에 비하여 약하게 나타났으며 비타민 급여 수준에 따른 차이도 적게 나타났다. 비타민을 급여한 산란계 비장의 무게에서 처리구간에 통계적인 차이는 없었다. 비타민 첨가구는 대조구에 비하여 전체적으로 증가하는 경향을

보였고, 비태인 300 ppm 첨가구가 가장 높은 수치를 나타내었다. 비태인을 수준별로 급여하여 SRBC 항체를 조사한 결과에서도 처리구간 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 따라서 본 시험의 결과, 비태인의 처리는 *in vitro* 상에서 Con A로 비장 림프구의 증식을 유도한 경우 유의하게 비장 림프구의 증식을 증가시켰다.

(색인어 : 비태인, 산란계, 비장 림프구, 면양 적혈구, 분열 촉진 인자)

인용문헌

- Augustine PC, Danforth HD 1999 Influence of betaine and salinomycin on intestinal absorption of methionine and glucose and on the ultrastructure of intestinal cells and parasite development stages in chicks infected with *Eimeria acervulina*. Avian Dis 43:89-97.
- Eklund M, Bauer E, Wamatu J, Mosenthin R 2005 Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. Nutrition Research Reviews 18:31-41.
- Kidd MT, Ferket PR, Garlich JD 1997 Nutritional and osmoregulatory functions of betaine. World Poult Sci 53:125-139.
- Klasing KC, Adler KL, Remus JC, Calvert CC 2002 Dietary betaine increases intraepithelial lymphocytes in the duodenum of coccidia-infected chicks and increases functional properties of phagocytes. J Nutr 132:2274-2282.
- NRC 1994 Nutrient requirements of poultry. 9th Rev Ed National Academy Press, Washington DC.
- SAS Institute 1996. SAS/STAT[®] Guide Version 6.12. SAS, Institute Inc, Cary NC.
- Saunderson CL, MacKinlay J 1990 Changes in body-weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. Br J Nutr 63:339-349.
- Simon J 1999 Choline, betaine and methionine interactions in chickens, pigs and fish including crustaceans. World's Poult Sci 55:353-374.
- Steel RGD, Torrie JH 1980 Principles and procedure of statistics. McGraw Hill New York.
- Swain BK, Johri TS 2000 Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. Br Poult Sci 41:83-88.
- Tsiagbe VK, Cook ME, Harper AE, Sunde ML 1987a Efficacy of cystine in replacing methionine in the immune response of broiler chicks. Poult Sci 66:1138-1146.
- Tsiagbe VK, Cook ME, Harper AE, Sunde ML 1987b Enhanced immune responses in broiler chicks fed methionine-supplemented diets. Poult Sci 66:1147-1154.
- 박재홍 강창원 류경선 2006 산란계에 비태인의 급여가 생산 능력과 혈중 호르몬에 미치는 영향. 한국가금학회지 33: 323-328.
- 박재홍 박수영 류경선 2005 사료내 비태인과 단백질 수준이 산란계의 생산 능력, 혈액의 조성, 부강지방 및 간의 아미노산 함량에 미치는 영향. 한국가금학회지 32:157-163.