

젖소에 있어서 Lipopolysaccharide의 처리가 번식 성적에 미치는 영향

백광수[†] · 박수봉 · 박성재 · 김현섭 · 이왕식 · 정경용 · 이현준 · 허태영 · 전병순 · 안병석 · 아주말 칸
농촌진흥청 축산연구소

Effect of Treatment of Lipopolysaccharides on Reproductive Performance in Lactating Dairy Cows

K. S. Baek[†], S. B. Park, S. J. Park, H. S. Kim, W. S. Lee, G. Y. Jeong, H. J. Lee,
T. Y. Hur, B. S. Jeon, B. S. Ahn and M. Ajumal Khan

National Livestock Research Institute, R. D. A.

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of intra-uterine infusion of lipopolysaccharide (LPS) on reproductive performance in lactating dairy cows. Conception rate at first service was higher (56.0%) in dairy cows treated with LPS compared to non-treated cows (20.0%). Cumulative conception rate by overall services (more than 2 services) after LPS treatment was also higher (64.0%) in dairy cows treated with LPS compared to non-treated cows (40.0%). Services per conception was significantly higher in control (2.0±0.1) compared with LPS (1.2±0.4) treated group ($p<0.05$).

(Key words : Holstein, lipopolysaccharide, service per conception, conception rate)

서 론

분만후 1~2주 동안은 *E. coli*와 같은 Gram-negative 통성 혐기성 균이 자궁내에 존재하고 분만후 2주부터는 *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacteroids*, *Fusobacterium*과 같은 Gram-negative 혐기성 균들이 존재하게 된다(Dohmen 등, 1996; Ahlers와 Grunert, 1993). 특히 후산정체와 난산은 분만후 번식 능력에 악영향을 미치고 자궁 감염을 용이하게 한다(Laven과 Peters, 1996; Kaneene 등, 1995; Mellado와 Reyes, 1994; Corea 등, 1993). 그러나 정상적인 자궁은 분만후 박테리아 침입에 대한 방어기구를 가지고 있는데(Jainudeen 등, 1993), polymorphonuclear inflammatory cells(PMNs)이 질이나 자궁강

으로 유입되어 자궁내를 감염시키는 미생물들을 탐식함으로써 방어적인 기능을 한다고 알려져 있다(Dhaliwal 등, 2001; Hussain과 Daniel, 1992; Hill 등, 1976).

분만후 경산우나 미경산우가 정상적인 발정 주기를 가지고 있고 표면적인 임상 조사에서 정상적 임에도 불구하고 3회 이상 종부를 시켜도 임신이 되지 않은 경우가 흔히 있는데 이에 대한 요인으로서는 영양, 대사성 질병, 호르몬 장애, 자궁 감염, 조기배 사멸, 축사 수용 시설, 발정 발견의 효율성, 수정 과정, 환경 등과의 관련성을 지적하고 있다(Lafi와 Kaneene, 1992; Lafi와 Kaneene, 1988). 특히 세균성으로 인한 자궁 감염은 저수태우의 주된 원인이 되는데(Jagir Singh 등, 2000), Semambo 등

[†] Correspondence : E-mail : bks@rda.go.kr

(1992)은 *Actinomyces pyogenes*를 접종후 4시간만에 자궁으로부터 수정란이 분리되어 배사멸이 일어나는 것을 확인하였고 Peter와 Ball(1997)도 *Campylobacter fetus venerealis*가 번식 장애 및 배사멸의 원인이 된다고 보고하였다. 분만후 자궁내에 병원성 및 비병원성 박테리아가 존재하면 자궁 수복이 35일 이상으로 소요되기도 하고(Ahmad 등, 1985; Khan 등, 1985), 어떤 미생물들은 자궁의 방어기구를 무력화시킴으로써 자궁 내막염을 일으키고 이 미생물들의 활동 과정에서 생성되는 대사성 산물 및 염증성 분비물로 인하여 자궁내 환경이 변화됨으로써 수태를 방해하게 된다(Akhtar와 Singh, 1979). 자궁 내막염유 수태율 향상을 위하여 povidone-iodine(Nakao, 2006) 및 항생제(Gupta 등, 1983) 등이 주로 사용되어 오고 있으나 약제에 따라서는 오히려 좋지 않은 영향을 미치는 경우가 있다(Nakao, 2006). Hussain과 Daniel(1992) 및 Targowski(1984)는 *E. coli* lipopolysaccharide(LPS) 100 μ g을 정상적인 소에 처리하여 처리후 6시간 및 24시간째에 PMN의 수가 증가하는 것을 확인하였고 Dhaliwal 등(1998)은 혼탁한 질점액이 나오는 저수태우에 *E. coli* LPS를 처리한 결과 모두 수태되었다고 보고하였다. Singh 등(2000)도 임신을 방해하는 작용을 하는 미생물에 대한 감염을 방어하는데 항생제가 주로 사용되지만 bacteria에 대한 저항성을 키우고 고비용이며 자궁의 방어기구를 약화시키는 단점을 가지고 있기 때문에 대체 요법으로서 자궁내 *E. coli* LPS 사용이 가능함을 시사하였다. LPS는 사람이나 동물에 감염되면 병을 일으키는 endotoxin의 원인 물질이기도 하지만 감염 저항성 증가, 비특이적 감염 방어, 면역 부활 작용 등 생물에게 유익한 생화학적 특성이 있다고 알려져 있어 항생제 대체물질로서 많은 연구가 활발하게 시도되고 있다(류 등, 1991). 따라서 본 연구에서는 LPS의 처리가 젖소의 번식 성적에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 균분리 및 동정

균분리 동정을 위하여, 도축장으로부터 수송해

온 젖소의 자궁에서 자궁 내막 시료를 1 cm \times 1 cm로 채취하여 혐기상태에서 거품이 생길 때까지 교반한 후 균액 300 μ l를 뽑아 혐기 배지에 도말하였고 도말한 plate는 37 $^{\circ}$ C 혐기 chamber에서 24시간 배양하였다. 혐기 배지에서 자란 균의 colony를 따서 Mac, BHI+B, BHI 배지에 배양한 후 Gram stain을 실시하였고 BHI 배지에서 자란 균의 colony를 따서 BUA+B 배지에 계대배양하였으며 BUA+B 배지에서 자란 균중에 가장 마지막으로 자란 균을 따서 AN-IF에 넣고 탁도를 63%T로 맞춘 후 Biolog용 AN micro plate에 100 μ l씩 분주하였다. 분주한 plate를 37 $^{\circ}$ C 혐기 chamber에서 20~24시간 동안 배양한 후 Biolog(Microstation, U.S.A)를 실시하여 6두의 비정상 자궁에서 공통적으로 존재하는 미생물인 *Bacteroides helcogenes*와 *Fusobacterium varium*을 검출하였다.

2. LPS 제조

시료의 UV 측정을 위하여, Sonic Processor(GEX 400, U.S.A)로 세포를 분쇄하였고 분쇄한 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 0.45 μ m 필터로 여과한 다음 여과액을 취하여 UV로 standard(*E. coli* serotype O26 B6 LPS, Sigma)와 sample(10배 및 20배 희석액)을 측정하여 *Bacteroides helcogenes*와 *Fusobacterium varium*으로부터 50 μ g/ml의 lipopolysaccharide를 분리하였다.

3. LPS 처리

LPS 처리후 번식 성적을 조사하기 위하여 2회 이상 인공 수정을 실시하여도 수태가 되지 않은 젖소(평균 수정 횟수 5.7회)를 대상으로 처리구 및 대조구 각각 25두씩을 공시하였다. 처리구는 Singh 등(2000)의 방법에 따라 *Bacteroids helcogenes*와 *Fusobacterium varium*으로부터 분리한 LPS 100 μ g을 PBS 용액 35 ml에 희석하여 수정란 이식용 카테타로 자궁내에 무균 상태를 유지하면서 주입하였고, 대조구는 PBS 용액 35 ml만을 주입하였다.

4. 발정 관찰 및 인공 수정

LPS 주입후 1주일 이후에 발정 유기 또는 자연

발정에 의하여 kamar가 발색되는 개체를 대상으로 인공수정을 실시하였다.

5. 통계 분석

본 연구에서 얻어진 실험 자료의 통계 처리는 MINITAB™을 이용하여 평균간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

세포벽 구성 성분이 Gram-negative로서 lipopolysaccharide를 가지고 있는 미생물인 *Bacteroides*와 *Fusobacterium* (Scanlan, 1988)으로부터 분리한 LPS를 2회 이상 수정해도 수태되지 않은 개체들에 대하여 LPS 100 μ g을 PBS 용액 35 ml에 희석하여 처리한 후 인공 수정을 실시한 결과 대조구에서 20.0%, 처리구에서 56.0%의 수태율을 나타내었다(Table 1). Singh 등(2000)은 *E. coli* LPS 처리 후 첫 발정시 균분리를 한 결과 균이 발견되지 않은 9두에서는 모두 임신이 되었는데 반하여, *Klebsiella* spp., *S. aureus*, *Pseudomonas* spp. 등의 균이 발견된 3두에서는 모두 임신이 이루어지지 않았다고 보고하여 *E. coli* LPS를 처리함으로써 수태율이 높아진다는 것을 시사하여 본 시험에서 처리구의 수태율이 높은 것을 뒷받침해 주고 있다.

본 시험의 대조구와 처리구에서 수태율이 비교

적 낮게 나타난 것은 7~10월 사이에 시험이 수행되어 여름철 고온 스트레스가 어느 정도는 수태에 영향을 미쳤으리라 사료되고, 공시축들의 평균 수정 횟수가 5.7회의 저수태우를 대상으로 수행하였기 때문인 것으로 사료된다.

LPS 처리후 2회 이상 인공 수정에 의해 수태된 비율은 Table 2에서 보는 바와 같이 대조구에서 40.0%, 처리구에서 64.0%로 처리구가 대조구에 비하여 높은 경향을 나타내었다.

Gupta 등(1983)은 저수태우에 Lugol's iodine, strepto-penicillin 및 증류수를 처리하여 수태율을 조사한 결과 각각 44.3, 47.0 및 36.7%로 Lugol's iodine 및 strepto-penicillin 처리의 경우가 증류수의 경우에 비하여 7.3~10.3% 높게 나타났다고 보고하였으나 본 실험에서 제시된 24.0%보다는 낮은 경향이였다.

Singh 등(2000)은 자궁내의 탐식 다형핵 백혈구의 비율을 분석 비교한 보고서에서 LPS 처리전(0시간째), 처리후 6시간째, 24시간째, 48시간째 및 72시간째에 대조구의 경우 시간의 경과에 따라 처리전과 차이를 나타내지 않았으나, *E. coli* LPS를 처리한 구의 경우 처리후 6시간째부터 유의적으로 증가하여 72시간째까지 대조구에 비하여 유의적으로 높게 유지되었다고 보고하여 *E. coli* LPS 1회 처리에 의해 자궁내 환경이 개선되는 것을 시사해 주고 있다.

Table 1. Conception rate following the first service after LPS treatment

Group	Number of head	Pregnant		Non-pregnant	
		n	Rate (%)	n	Rate (%)
Control	25	5	20.0	20	80.0
Treatment	25	14	56.0	11	44.0

Table 2. Cumulative conception rate following overall services (more than 2 times) after LPS treatment

Group	Number of head	Pregnant		Non-pregnant	
		n	Rate (%)	n	Rate (%)
Control	25	10	40.0	15	60.0
Treatment	25	16	64.0	9	36.0

Table 3. Number of services per conception after LPS treatment

Group	Number of head	Services per conception
Control	10	2.0±0.1 ^a
Treatment	16	1.2±0.4 ^b

^{a,b} Means with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

LPS 처리후 2회 이상 인공 수정에 의해 수태된 대조구 10두 및 처리구 16두의 수태당 종부 횡수는 Table 3에서 보는 바와 같이 대조구가 2.0±0.1회, 처리구가 1.2±0.4회로서 처리구가 대조구에 비하여 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

적 요

본 연구는 젖소에 있어서 lipopolysaccharide의 처리가 번식 성적에 미치는 영향을 구명하기 위하여 2003년부터 2005년까지 3년간에 걸쳐 축산연구소 개방형 깔짚우사에서 사육중인 홀스타인 착유우 50두를 대상으로 처리구 및 대조구 각각 25두씩을 공시하였고 분만후 20일째에 1회에 한하여 *Bacteroids helcogenes*와 *Fusobacterium varium*으로부터 분리한 LPS 100 µg을 PBS 용액 35 ml에 희석하여 수정란 이식용 카테타로 자궁내에 주입한 후 발정 발현시 인공 수정을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS 처리후 첫 수정에 의한 수태율은 대조구 및 처리구가 각각 20.0% 및 56.0%로 처리구가 대조구에 비하여 높은 경향을 나타내었다.
2. LPS 처리후 2회 이상 수정에 의한 수태율은 대조구 및 처리구가 각각 40.0% 및 64.0%로 처리구가 대조구에 비하여 높은 경향을 나타내었다.
3. 수태된 개체들의 수태당 종부횡수는 대조구 및 처리구가 각각 2.0±0.1회 및 1.2±0.4회로 처리구가 대조구에 비하여 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

Ahlers D and Grunert E. 1993. Zur Problematik der Behandlung des infizierten Uterus beim Rind im Puerperium. Prakt. Tierarzt Sondert. Coll Vet. XXIV, pp. 57-62.

Ahmad R, Amin SM and Kazmi SE. 1985. Studies on the bacterial causes of delayed uterine involution in postpartum buffaloes. Pak. Vet. J., 5: 168-170.

Akhtar MH and Singh BK. 1979. Viability and fertility rate of spermatozoa in bovine cervical mucous under normal and disease conditions. Indian Vet. J., 56:112-117.

Correa MT, Erb H and Scarlett J. 1993. Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. J. Dairy Sci., 76:1305-1312.

Dhaliwal GS, Murray RD and Woldehiwet Z. 15 September 2001. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. Anim. Reprod. Sci., 67:135-152.

Dhaliwal GS, Singh J and Singh N. 1998. Treatment of repeat breeding in dairy cows-a comprehensive approach in: Proceedings of the 20th World Buiatrics Congress. Sydney. pp. 673-676.

Dohmen MJW, Huszenicza GY, Fodor M, Kulcsár M, Vámos M, Porkoláb L, Szilágyi N and Lohuis JACM. 1996. Bacteriology and fertility in healthy postpartum cows and cows with acute endometritis. Proc. XIX world Buiatrics Congress. pp. 238-241.

Gupta RC, Simha AK and Krishnaswamy A. 1983. Studies on the efficacy of some post-service intrauterine infusions on the conception rate in repeat breeding cattle. Theriogenology, 20:559-564.

Hill AW, Hibbit KG and Shears AL. 1976. Increased antibacterial activity against *E. coli* in serum after the induction of endotoxin tolerance. Infect. Immun., 14:257-265.

Hussain AM and Daniel RCW. 1992. Effects of

- intrauterine infusion of *Escherichia coli* endotoxin in normal cows and in cows with endometritis induced by experimental infection with *Streptococcus agalactiae*. *Theriogenology*, 37: 791-810.
- Jainudeen MR and Hafez ESE. 1993. Reproductive failure in females. In reproduction in farm animals. 6th ed. E.S.E. Hafez(ed). Philadelphia Lea & Febiger. pp. 261-286.
- Kaneene JB and Miller R. 1995. Risk factors for metritis in Michigan dairy cattle using herd- and cow-based modeling approaches. *Prev. Vet. Med.*, 23:183-200.
- Khan N, Ahmad M, Ahmad R and Ahmad A. 1985. Post partum uterine involution and causes of its delay. *Proc 1st World Buffalo Congr. Cairo Egypt*. p. 964.
- Lafi SQ and Kaneene JB. 1988. Risk factors and associated economic effects of the repeat breeder syndrome in dairy cattle. *Vet. Bull. (London)*, 58:891-903.
- Lafi SQ and Kaneene JB. 1992. Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I. Epidemiological modeling. *Prev. Vete. Med.*, 14:87-98.
- Laven RA and Peters AR. 1996. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Vet. Rec.*, 139:465-471.
- Mellado M and Reyes C. 1994. Associations between periparturient disorders and reproductive efficiency in Holstein cows in northern Mexico. *Prev. Vet. Med.*, 19:203-212.
- Peter JH and Ball H. 1997. Late embryo and early fetal mortality in the cow. *Animal Breeding Abstracts*, 65:75-95.
- Scanlan CM. 1988. Introduction to veterinary bacteriology. Department of veterinary microbiology and parasitology. Texas veterinary medical center, Texas A&M University, College station, Texas. p. 8.
- Semambo DKN, Boyd JS, Taylor DJ, Ayliffe TR and Omran SN. 1992. Ultrasonographic study of early embryonic loss induced by *Actinomyces pyogenes* in cattle. *Vet. Rec.*, 131:7-12.
- Singh J, Sidhu SS, Dhaliwal GS, Pangaonkar GR, Nanda AS and Grewal AS. 2000. Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 59:159-166.
- Targowski SP. 1984. Immunologically induced uterine inflammation. in: *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and AI. Urbana, Champaign, VI*. pp. 473-475.
- Nakao T. 2006. 한국우병학회 제11차 학술대회 및 한·일 합동 산업동물 심포지움. 소의 주요 생산성 저해질병에 대한 대책 : 고비유우의 번식장애의 특징과 그에 대한 대책. *한국우병학회지*, 11:1-21.
- 류병호, 박우열, 김희숙, 박종옥. 1991. *Proteus vulgaris* RH-90에서 추출하여 감마선 조사시킨 Lipopolysaccharide(LPS)의 항암 및 면역 활성화에 미치는 영향. *한국생물공학회지*, 6:45-54.

(접수일: 2006. 9. 5 / 채택일: 2006. 9. 22)