

## 닭 기도 상피세포의 1차 배양과 유전자 재조합 바이러스의 감염 특성 연구

박미나 · 장현준 · 금대호 · 최진애 · 류재규 · 변승준 · 박종주 · 지주영 · 이경태 · 김태현 · 이현정<sup>†</sup>

농촌진흥청 국립축산과학원

### Primary Culture of Chicken Tracheal Epithelial Cells and Study on Those Characters for Recombinant Virus Infection

Mi Na Park, Hyun-Jun Jang, Dae Ho Keum, Jin Ae Choi, Jae Gyu Yoo, Sung June Byun, Jong Ju Park, Ju Young Ji, Kyung-Tai Lee, Tae-Hun Kim and Hyun-Jeong Lee<sup>†</sup>

National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

**ABSTRACT** Tracheal epithelial cells (TECs) are an important tool for studies of viral respiratory diseases. Primary TECs have been cultured from human, mouse and hamster. It is also necessary to diagnose viral respiratory disease and reveal infection mechanisms in chicken. In this study, we isolated tracheal epithelial layers from tracheal of 20-day-old chicks and cultured primary TECs from the isolated layers. Ciliated cells which were a typical morphology of TECs were observed in cultured primary TECs and maintained until cell passage 5 (15 to 20 days). When we analyzed expression patterns of epithelial marker genes (retinoic acid responder, FGF-binding protein, virus activating protease (VAP) in TECs compared to immortalized chicken embryonic fibroblast cell line (DF-1), all the marker genes are highly expressed in TECs than in DF-1. When TECs were cultured with 0.1 and 1 MOI of ND virus (rNDV-GFP strain) to test the susceptibility of TECs for ND virus, 12.6% and 48.2% of the incubated TECs were infected respectively. In addition, when DF-1 was incubated with 1 MOI of ND virus, the virus infection rate of DF-1 was three times lower than the virus infection rate of TECs. These data could contribute to study infection mechanisms of viral respiratory diseases and control them in chicken.

(Key words : chicken, tracheal epithelial cell, primary culture, viral respiratory diseases)

## 서 론

뉴캐슬병(Newcastle disease : ND)은 닭, 꿩, 메추리 등 가금류를 포함하는 조류의 급성 바이러스성 전염병으로 양계 산업에서 경제적 손실을 크게 일으키는 제 1종 법정가축전염병이다(최강석 등, 2008). 닭의 경우 심한 호흡기 증상을 보이며 높은 치사율을 나타내는 급성 전염병으로 국내에서는 1926년 최초 발생이 보고되었으며, 2001년 이후 생독 백신 분무 접종 및 ND 백신 접종을 의무화하여 그 피해를 최소화하고 있음에도 불구하고, 국내에서 ND는 근절되지 않고 지속적으로 발생하고 있는 실정이다(최강석, 2010). 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus : NDV)는 Paramyxoviridae과 Rubulavirus속에 속하는 음성 단일 가닥 RNA 바이러스로 주로 조류에서 감염성을 나타내며, 주로 기도 상피세포를 통해서 감염되는 것으로 알려져 있다(Park et al., 2003; Ibricevic et al., 2006). NDV의 경우, 개 및 소의 신장 세포, 닭의 대식 세포주 및 배양된 기도 조직 등을 대상으로 다양한 감염 연구가 수행되어 왔다(Cummiskey et al., 1973; Tobita et al., 1975; Gresland et al., 1979). 특히 닭에서 기도 상피세포의 1차 배양은 호흡기 관련 질병 연구에 있어 동물 생체 실험에 비하여 제한된 외부 환경 및 조건하에 실험을 진행할 수 있다는 점에서 중요한 연구 재료로서의 가치를 갖는다(Zaffuto et al., 2008). 최근 쥐, 인간, 햄스터 등에서 상피세포의 1차 배양방법이 확립되었으며(Ibricevic et al., 2006; Matrosovich et al., 2004; Newby et al., 2006), 닭에서도 초기 바이러스 감염에 대한 즉각적인 숙주 반응을 연구하고, 질병 메커니즘을 구명하기 위해서는 기도 상피세포 배양방법의 확립이 요구되고 있다.

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed : leehj@korea.kr

본 연구는 닭의 기도 상피세포 1차 배양 방법을 확립하고, 배양된 1차 배양 세포의 특성을 규명하기 위하여 수행되었다. 이를 통하여 향후 닭 기도 상피세포의 1차 배양 방법을 이용하여 항바이러스 유전자를 과발현하는 형질 전환 세포주를 확립함으로써 닭에서 NDV의 감염 메커니즘을 이해하고, 억제할 수 있는 새로운 방법을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

## 재료 및 방법

### 1. 닭 기도 상피세포 1차 배양

본 실험에서는 축산과학원에서 유지 중인 로만 브라운 품종의 부화 직전 20일령 병아리를 이용하여 실험을 진행하였으며, 기도 상피세포(Tracheal Epithelial Cells : TECs)를 분리하기 위하여 병아리의 기도를 적출한 후, 주변의 지방 및 근육 조직을 제거하고, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 넣었다. 기도 안쪽의 상피세포만을 분리하기 위하여 기도를 세로로 절단하고, Dispase I 용액(2.5 U/mL, Roche) 1 mL에 넣어 37°C 인큐베이터에 2시간 동안 처리하였다. 뭉쳐 있는 세포를 하나의 단일 세포로 분리하기 위하여 Collagenase I(1 mg/mL, sigma) 100  $\mu$ L를 첨가하고 37°C 인큐베이터에 5분간 처리한 후, 포셉을 이용하여 안쪽의 상피세포막(cell sheet)만을 벗겨내었다. 이를 DMEM에 넣은 후, 부드러운 피펫팅을 통하여 cell sheet가 뭉쳐져 있는 것을 분리시키고, 1,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 세포 펠릿만을 수집하였다. 펠릿에 1 mL의 세포배양액을 넣어 세포를 충분히 교반시킨 후, 6 well plate에  $1 \times 10^6$  세포수로 넣어 배양하였다. 세포 배양액은 DMEM(F12, Gibco)에 1% L-glutamin(200 mM, Sigma), 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% non essential amino acid, 1% penicillin/streptomycin을 넣고 필터링한 후, 10% Fetal Bovine Serum(FBS)를 넣어 만들었

다. 세포 배양 plate는 세포가 잘 붙어 자라게 하기 위하여 10% gelatin 용액을 넣어 37°C 인큐베이터에 20분간 처리하였다.

### 2. 닭 기도 상피세포 특성 확인

1차 배양된 닭 기도 상피세포의 특성을 확인하기 위하여, epithelial cell에서 과발현되는 유전자 retinoic acid responder, FGF-binding protein, virus activating protease(VAP)의 프라이머를 이용하여 각각의 유전자의 발현 여부를 확인하였으며, 대조구로 닭 섬유아세포주(DF-1, ATCC, VA, USA)와 유전자 발현양상을 비교하였다. 항존 유전자로는 Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase(GAPDH), Ubiquitin-conjugating enzyme E2E1, Tubulin, beta 2B를 사용하였다(Zaffuto et al., 2008)(Table 1). 닭 기도 상피세포에서 RNA를 추출한 후, cDNA로 합성하여 유전자 증폭을 위하여 cDNA(25 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 10  $\times$  buffer(Genetbio, Korea) 2.5  $\mu$ L, dNTP(2.5 mM) 2  $\mu$ L, forward와 reverse primer(10 pmol) 각각 1  $\mu$ L, Taq DNA polymerase(GeNet Bio, Korea) 0.1  $\mu$ L, 3차 증류수 16.4  $\mu$ L를 첨가하여 전체 25  $\mu$ L의 반응액으로 제조하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, EtBr로 염색한 후 UV image analyzer로 관찰하였다.

### 3. 유전자 재조합 뉴캐슬병 바이러스(*r*NDV-GFP) 감염 실험

바이러스 감염 실험을 하기 위하여 닭 기도 상피세포를 12 well plate에 세포수를  $5 \times 10^5$ 으로 배양하였다. 세포가 plate에 딱 차게 붙으면 배양액을 제거하고, PBS로 부드럽게 2~3번 씻어주었다. 바이러스 감염 실험을 위하여, 초록색의 형광을 발하는 형광단백질인 Green fluorescent protein(GFP)을 ND 바이러스의 게놈에 삽입한 뒤, 역 유전학적 방법을 이용하여 GFP를 발현하는 유전자 재조합 뉴캐슬병 바이러스 벡

**Table 1.** List of primer sequences for RT-PCR

Gene name(Accession number)	Forward primer	Reverse primer
Retinoic acid responder(AJ3307060)	ACATCAACTCCCACGAGGCGTCC	ACTGCTGCCAACAATGGCCAAGC
FGF-binding protein(BX930139)	TGGAGTTTGGACACCTCCGGCT	TGCAGCACTCATGTCCGGTACC
VAP(CR391073)	AGAGAATGCAACGAGGAGCGCTG	TGATGCTGCAGAACTGCTCACAG
GAPDH(NM-204305)	ACACGGACACTTCAAGGGCACTG	AGGATGCAGAACTGAGCGGTGG
Ubiquitin-conjugating enzyme E2E1 (XM-478752)	GCTGGAACAGGTTGGGGTTGTGG	CCAAGCAGATGACGCCCTGGCTG
Tubulin beta 2B(TC207332)	GGCAGACACCGGCATCATGC	AGCTCAGCGCCTTCCGTGTAGTG

터(rNDV-GFP)를 제작하였다(한림대학교 의과대학 미생물학교실). 닭 기도 상피세포에 rNDV-GFP stock 5  $\mu$ L에 DMEM (serum free) 95  $\mu$ L를 넣어 100  $\mu$ L 용액을 plate에 떨어뜨렸다(1 MOI). 15분마다 plate를 흔들어주는 과정을 3번 반복하고, 45분 감염 시간이 지난 후 DPBS로 3번 씻어주었다. 세포배양액을 1 mL 넣어준 후, 37°C 인큐베이터에 24시간 보관하였다. 바이러스 감염을 확인하기 위하여 현미경으로 GFP 발현을 관찰하고, Fluorescence-Activated Cell Sorter(FACS, aria II)분석을 통하여 GFP 발현 세포 비율을 분석하였다.

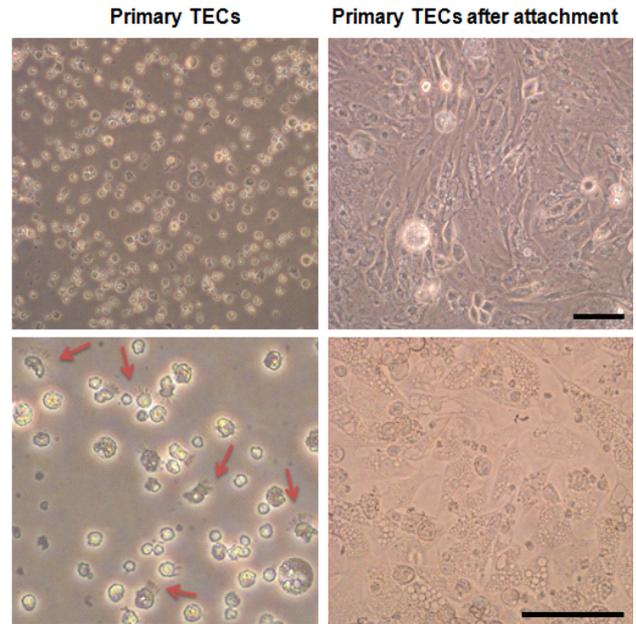
### 결과 및 고찰

#### 1. 닭 기도 상피세포 1차 배양

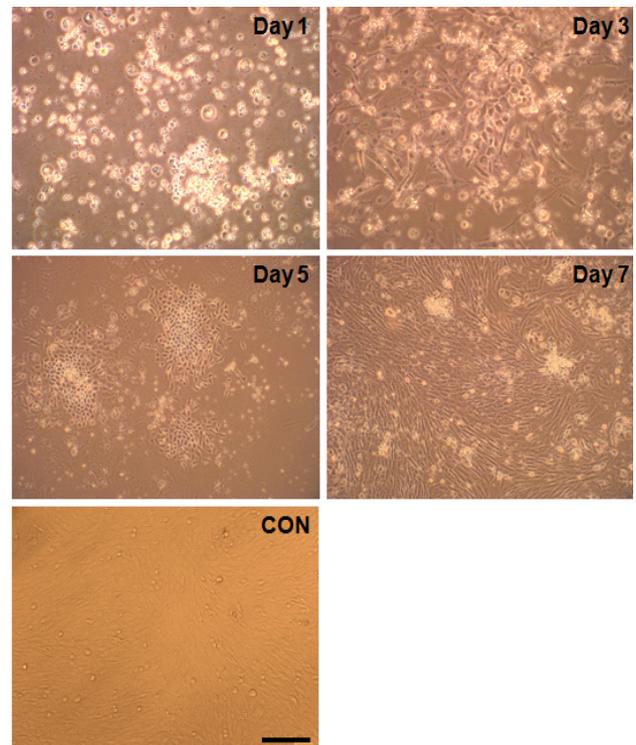
부화 직전의 20일령 병아리에서 닭 기도 상피세포막을 분리하여 배양하였을 때 1차 배양 직후의 세포모양과 바닥에 붙어서 자라는 세포모양을 현미경을 통하여 관찰하였고, 기도 상피세포의 특성인 섬모를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 배양한 닭 기도 상피세포는 콜로니 형태의 cell cluster를 이루면서 주변으로 상피세포들이 증식하는 형태를 보였다. 닭 기도 상피세포를 1차 배양 시 6 well plate에  $1 \times 10^6$  세포수로 배양을 시작하였을 때, 세포가 바닥에 95% 이상 붙어 자라기까지 5~7일 정도가 소요되었다(Fig. 2). 닭 기도 상피세포의 계대 배양 시 6 well plate에  $5 \times 10^5$  세포수로 배양하였고, 1차 배양에 비하여 세포가 붙어 자라는 속도가 빨라졌으며 3~4일 정도 배양하였을 때 세포가 바닥에 95% 이상 붙고, 약  $2 \times 10^6$ 에서  $3 \times 10^6$ 으로 초기 배양을 시작한 세포수에서 4~6배 정도로 그 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 계대 배양을 5번(15일에서 20일) 이상 진행한 후에도 1차 배양을 시작할 때 관찰할 수 있었던 기도 상피세포의 특성인 섬모를 확인할 수 있었다. 그러므로 이 실험에서 20일령 병아리의 기도 내부 상피층으로부터 기도 상피세포를 분리해 낼 수 있었고, 또한 분리된 기도 상피세포의 특성을 유지하면서 일정 기간 배양할 수 있다는 사실을 확인하였다.

#### 2. 1차 배양된 닭 기도 상피세포 특성 확인

1차 배양한 세포가 기도 상피세포임을 유전자 단계에서 검증하기 위하여 기도 상피세포의 마커 유전자를 이용하여 특성을 확인하였다(Song et al., 2001; Beer et al., 2005; Runkel et al., 2006). 닭 섬유아세포주(DF-1)를 대조구로 하여 기도 상피세포 마커 유전자인 Retinoic acid responder, FGF-binding protein 그리고 Virus activating protein(VAP) 유



**Fig. 1.** Morphologies of primary TECs. The floating primary TECs were observed after primary TECs were isolated from tracheal epithelial layers of 20-day-old chicks (left) and the TECs were observed after cell attachment (right). Arrow indicates ciliated cell. Scale bar indicates 50 $\mu$ m.



**Fig. 2.** Cell growth patterns of primary TECs. Cell growth patterns of TECs were observed at 1, 3, 5 and 7 day after primary culture. Scale bar indicates 50 $\mu$ m. CON, DF-1.

전자와 항존 유전자인 Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase(GAPDH), Ubiquitin-conjugating enzyme E2E1, 그리고 Tublin beta 2B 유전자에 대한 reverse transcription-PCR(RT-PCR)을 수행하였다. RT-PCR 결과, 기도 상피세포의 마커 유전자들이 1차 배양된 기도 상피세포에서 DF-1보다 높게 발현하는 반면에 항존 유전자의 경우, 기도 상피세포와 닭 섬유아세포주 사이에 차이가 없음을 확인하였다(Fig. 3). 이 실험을 통하여 1차 배양된 기도 상피세포가 전형적인 상피세포 특이적 유전자를 발현하고 있다는 사실을 확인할 수 있었으며, 이러한 유전자의 발현 양상은 기존의 섬유아세포와는 확연하게 다른 양상을 보인다는 것을 증명하였다.

### 3. rNDV-GFP 감염 실험

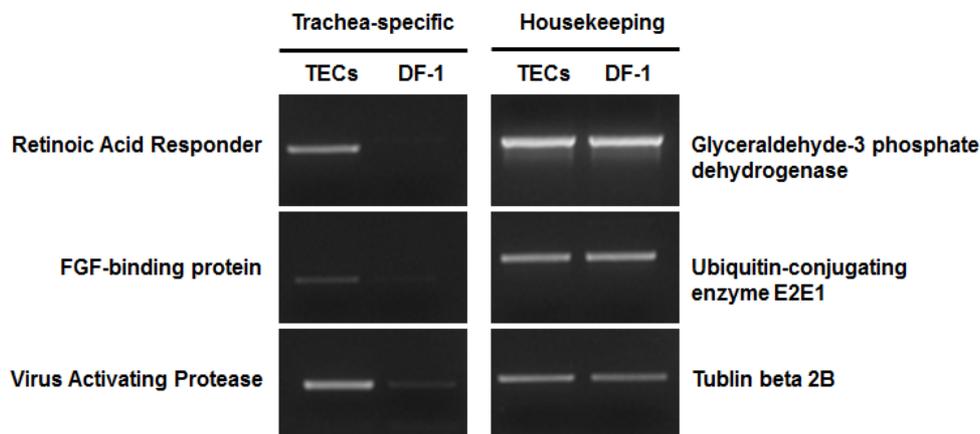
호흡기를 통해 감염되는 뉴캐슬병 바이러스에 대한 감수성을 실험하기 위하여 1차 배양한 닭 기도 상피세포에 rNDV-GFP를 감염시켰다. rNDV-GFP 농도를 0.1 MOI(Multiplicity of infection)와 1 MOI로 하여 바이러스를 감염실험을 진행하였으며, GFP 발현율을 Fluorescence activated cell sorter(FACS)를 통하여 분석하였다. 그 결과, 0.1 MOI에서 GFP 발현율이 13.2%, 12.6%, 12.1%로 평균 12.6% rNDV-GFP 감염율을 보였고, 1 MOI에서는 GFP 발현율이 48.6%, 47.9%, 49.4%로 평균 48.6% rNDV-GFP 감염율을 보여 0.1 MOI보다 1 MOI에서 약 4배 가량 감염률이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 1차 배양된 기도 상피세포가 ND 바이러스에 특이적 감수성을 보이는지 알아보기 위하여 대조구인 닭 섬유아 세포주에 1 MOI의 ND 바이러스를 감염시켰다. 그 결과, GFP 발현율은 11.9%, 13.9%, 14.7%로 평균 13.5% rNDV-GFP 감염율을 보였으며, 1차 배양한 닭 기도

상피세포가 DF-1에 비하여 뉴캐슬병 바이러스에 대한 감수성이 3배 가까이 높다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그러므로 ND 바이러스의 직접적인 감염 경로로 알려진 닭의 기도 상피세포가 체외 배양된 상태에서도 그 고유한 바이러스 감수성을 유지할 수 있다는 사실을 확인하였다.

본 실험에서는 부화 전 병아리의 기도 상피 내면에서 기도 상피세포를 분리하여 1차 배양하였으며, 이를 일정기간 1차 배양한 후에도 기존에 알려진 기도 상피세포의 특성과 유사한 형태를 유지하고 있다는 사실을 밝혔다. 또한 배양된 기도 상피세포가 유전자 단계에서도 섬유아세포와는 다른 상피세포 고유의 유전자 발현 양상을 나타낸다는 사실을 확인할 수 있었다. 마지막으로 체외 배양된 기도 상피세포가 섬유아세포에 비하여 ND 바이러스에 특이적인 감수성을 나타낸다는 사실을 증명하였다. 또한 ND 바이러스 감염 후에도 1차 배양된 기도 상피세포 특이적인 유전자의 발현양상에는 변화를 보이지 않았다. 이들 결과를 통하여 닭에서 기도 상피세포의 체외배양 가능성을 확인할 수 있었고, 나아가 닭에서 ND 바이러스를 비롯한 호흡기 감염 질병의 세포 수준의 감염 메커니즘 연구와 병독성 진단 및 치료 연구에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

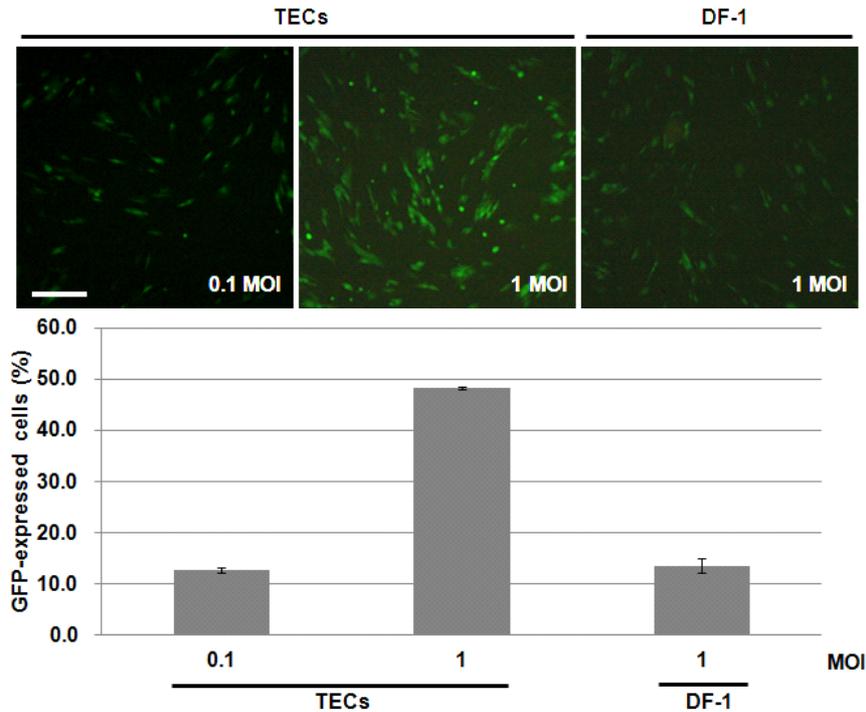
## 적 요

닭에서 기도 상피세포는 호흡기 관련 질병 연구에 있어 제한된 외부 환경 및 조건하에 동물 생체 외 실험을 진행할 수 있다는 점에서 중요한 연구재료로써 이용될 수 있다. 최근 쥐, 인간, 햄스터 등에서 상피세포의 1차 배양 방법이 확립되었으며, 닭에서도 초기 바이러스 감염 경로 기관에 대



**Fig. 3.** Gene expression pattern of primary TECs and DF-1.

Expression patterns of trachea-specific marker genes and house keeping genes were compared between TECs and DF-1 by RT-PCR.



**Fig. 4.** ND virus Infection for TECs and DF-1.

TECs and DF-1 were incubated with ND virus (rNDV-GFP strain) and the GFP-expressed cells were detected by fluorescent microscopy and quantified by flow cytometry. Scale bar indicates 50µm.

한 병독성을 진단하고, 감염 메커니즘을 규명하기 위해서 기도 상피세포 배양 방법의 확립이 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 20일령 병아리의 기도 내 상피세포층에서 기도 상피세포를 분리하였으며, 분리된 기도 상피세포의 1차 배양을 수행하였을 때 전형적인 기도 상피세포의 형태인 섬모를 관찰할 수 있었고, 15일에서 20일 이상 배양 시에도 그 형태를 유지할 수 있다는 사실을 확인하였다. 또한 상피세포 마커 유전자(retinoic acid responder, FGF-binding protein, virus activating protease(VAP))를 이용하여 배양된 기도 상피세포에서 기도 상피세포 특이적인 유전자가 섬유아세포주에 비하여 높게 발현한다는 사실을 확인하였다. 마지막으로 1차 배양된 기도 상피세포의 ND 바이러스 감수성을 알아보기 위하여 각각 0.1 MOI와 1 MOI의 ND 바이러스를 1차 배양된 기도 상피세포에 체외 감염시켰을 때, 12.6%와 48.2%의 감염율을 보였다. 또한 섬유아세포주에 1 MOI의 ND 바이러스를 감염시켰을 때 13.5% 감염율을 보여, 1차 배양된 기도 상피세포가 ND 바이러스에 3배 이상 높은 바이러스 감수성을 나타내는 결과를 확인하였다. 그러므로 본 연구는 향후 닭에서 바이러스성 호흡기 질환의 감염 경로 및 메커니즘을 연구하고, 나아가 질병의 예방 및 치료에 있어서 중요한 기초자료로써 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 사 사

본 연구는 2013년 농촌진흥청 국립축산과학원의 연구비 (과제번호: PJ006469) 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Beer HD, Bittner M, Niklaus G, Munding C, Max N, Gopelt A, Werner S 2005 The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of FGF-7, FGF-10 and FGF-22 and regulates FGF activity: Implications for epithelial repair. *Oncogene* 24:5269-5277.
- Cumiskey JF, Hallum JV, Skinner MS, Leslie GA 1973 Persistent newcastle disease virus infection in embryonic chicken tracheal organ cultures. *Infec Immun* 8(4):657-664.
- Gresland L, Niveleau A, Hupper J 1979 Replication cycle of newcastle disease virus in three host cells of different permissiveness. *J Gen Virol* 45:569-578.
- Ibricevic A, Pekoxz A, Walter MJ, Newby C, Battaile JT, Brown EG, Holtzman MJ, Brody SL 2006 Influenza virus

- receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *Journal of Virology* 80(15):7469-7480.
- Matrosovich MN, Matroshvich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD 2004 Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS* 101(13):4620-4624.
- Newby CM, Rowe RK, Pekosz A 2006 Influenza A virus infection of primary differentiated airway epithelial cell cultures derived from Syrian Golden hamsters. *Virology* 354:80-90.
- Park MS, Shaw ML, Monoz JJ, Cros JF, Nakaya T, Bouvier N, Palese P, Garcia SA, Basler CF 2003 Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the nipah V, W, C proteins. *Journal of Virology* 77(2):1501-1511.
- Runkel F, Michels M, Franken S, Franz T 2006 Specific expression of annexin A8 in adult murine stratified epithelia. *J Mol Hist* 37:353-359.
- Song Y, Jayaraman S, Yang B, Matthay MA 2001 Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification and surface liquid hydration. *J Gen Physiol* 117: 573-582.
- Tobita K, Sugiura A, Enomoto C, Furuyama M 1975 Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells(MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* 162:9-14.
- Zaffuto KM, Estevez CN, Afonso CL 2008 Primary chicken tracheal cell culture system for the study of infection with avian respiratory viruses. *Avian Pathology* 37(1):25-31.
- 최강석 이은경 전우진 권준현 양창범 2008 흰뺨검둥오리 (*Anas poecilorhyncha*)에서 분리된 뉴캐슬병 바이러스의 특성. *대한수의학회지* 48(2):153-159.
- 최강석 2010 최근 국내에서 유행하는 뉴캐슬병 바이러스의 특성 고찰. *한국가금학회지* 37(1):89-99.
- (접수: 2013. 10. 1, 수정: 2013. 11. 18, 채택: 2013. 11. 20)