

碩士學位論文

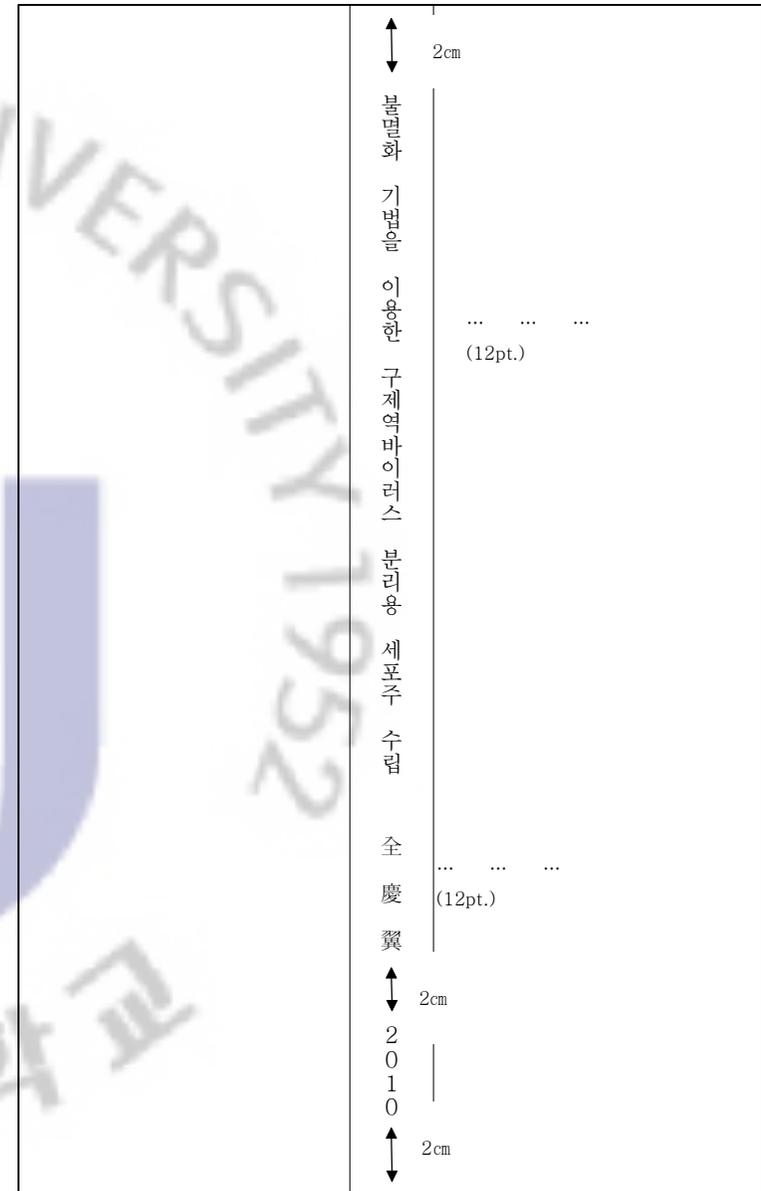
불멸화 기법을 이용한  
구제역바이러스 분리용 세포주 수립

濟州大學校 大學院

獸醫學科

全慶翼

2009年 12月



불멸화 기법을 이용한  
구제역바이러스 분리용 세포주 수립

목 차

指導教授 黃圭桂

全慶翼

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2009年 12月

全慶翼의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 : 임윤규

委員 : 황규계

委員 : 지영혼

濟州大學校 大學院

2009年 12月

I. 서	론	-----	1		
II. 재료	및	방법	-----	4	
III. 결	과	-----	21		
IV. 고	찰	-----	41		
V. 참	고	문	헌	-----	47
영	문	초	록	-----	52

## 표 차례

Table 1.	Enzyme treatments for tissue digestion -----	6
Table 2.	Real-time PCR assay design for the telomerase detection -----	16
Table 3.	PCR conditions for the detection of mycoplasma ---	18
Table 4.	PCR primers and conditions for the detection of bovine herpes virus (BHV) -----	19
Table 5.	PCR primers and conditions for the detection of bovine viral diarrhoea virus(BVDV) -----	19
Table 6.	PCR primers and conditions for the detection of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) -----	20
Table 7.	Determination of optimal digestion conditions for fetal bovine tissues using two-step enzyme treatments -----	25
Table 8.	Cell attachment rate and optimal time of Na <sub>2</sub> EDDA treatment to separate fibroblasts and epithelial cells -----	30

## 그림 차례

Fig 1.	Schematic diagram of Na <sub>2</sub> EDDA treatments -----	11
Fig 2.	Diagram of total process for retrovirus particle production -----	13
Fig 3.	Survival rate of digested cells from different organs -----	22
Fig 4.	Digestion of minced organs by collagenase treatments -----	23
Fig 5.	Digestion of minced organs by dispase treatments -----	24
Fig 6.	Effects of culture time and number of passages on the separation of fibroblasts by Na <sub>2</sub> EDDA treatments-----	27
Fig 7.	Separation of fibroblasts from epithelial cells -----	28
Fig 8.	PCR detection of retrovirus vector -----	31
Fig 9.	Immortalized primary bovine epithelial cell lines -----	33
Fig 10.	The growth curve of immortalized bovine kidney cell lines -----	35
Fig 11.	The growth curve of immortalized primary bovine epithelial cell lines -----	35
Fig 12.	The population doubling time of immortalized primary bovine epithelial cell lines-----	36

Fig 13. Real-time PCR analysis of telomerase expression in immortalized primary bovine epithelial cell lines -----	37
Fig 14. Real-time PCR analysis of telomerase expression in immortalized primary bovine epithelial cell lines -----	38
Fig 15. PCR analysis of mycoplasma contamination in established cell lines -----	39
Fig 16. PCR analysis of virus contamination in established cell lines. -----	39
Fig 17. Susceptibility test of established cell lines for foot-and-mouth disease virus infection and propagation -----	40

## I. 서론

구제역은 그 전염성이 아주 강하고 급속히 전파되기 때문에 세계 각국에서는 구제역의 확산을 막기 위해 살처분정책을 사용하고 있다. 따라서 구제역은 발생에 따른 직접적 피해(폐사, 성장지연, 생산성 저하, 번식장애 등)와 더불어 살처분에 따른 축산업계의 경제적 피해가 아주 큰 질병이라 할 수 있다. 이와 더불어 육류소비의 저하와 관광산업의 위축 등 간접적 손실을 주고 사회적 혼란까지 야기할 수 있는 중요한 가축전염병이다.

구제역의 발생이 많은 나라는 영국인데 2001년에 650만 마리 이상의 가축이 도살되어 약 16조원의 경제적 손실을 입었다. 우리나라에서는 1935년 이후 구제역발생이 없어서 오랫동안 구제역 청정지역으로 여겨져 오다가 2000년을 기점으로 구제역이 발생하기 시작하여 2002년에는 162개 농장에서 16만두의 돼지를 살처분하는 등 큰 경제적 손실을 입었다.

구제역의 확산을 막기 위해서는 신속한 진단이 선행되어야 한다. 구제역 진단에 가장 효율적인 방법 중 하나는 감수성이 높은 세포에 검사재료를 접종하여 구제역바이러스를 검출하는 것이다. 현재 구제역바이러스 분리를 위해 돼지 친화계통바이러스는 돼지 신장 유래 세포주(IB-RS-2), 소 및 기타 반추류 유래 바이러스는 햄스터 세포주(BHK-21)나 소 초대신장세포를 활용하고 있는데 햄스터 세포주는 구제역바이러스에 대한 감수성이 떨어진다. 바이러스증식이 잘 되는 소 초대배양신장세포는 유효계대수가 짧아 바이러스의 진단에 오래 사용하기 어렵고 초저온 동결 후 해동 시 감수성이 떨어진다. 그러므로 구제역 바이러스의 검출을 위해 필요할 때마다 초대배양세포를 새로이 작성해야 하는데 초대세포작성에 필요한 신선한 소조직의 공급이 되어야한다는 문제점과 이로 인하여 진단이 신속하게 이루어지기 어렵다는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 소유래 구제역바이러스의 분리를 위한 새로운 세포주의 개발이 시급하다.

초대배양세포의 가장 큰 장점 중 하나는 암 조직으로부터 제작된 세포주 또는 암화 된 세포주와 달리 각 장기의 세포가 가지고 있는 생리학적 특성을 그

대로 간직하고 있다는 점이다. 각 동물의 장기 유래 상피세포의 초대배양은 세포의 특성 조사와 기능적 검사 그리고 바이러스의 분리 및 감수성 테스트 등에 많이 사용이 되고 있다. 특히 상피세포는 섬유아세포와 달리 바이러스에 대한 감수성이 높아서 초대배양 시 얻고자 하는 주된 세포종류의 하나이다. 반추류에 감염하는 구제역바이러스의 경우 초대배양세포에서 잘 자랄 수 있는데 섬유아세포에는 감수성이 전혀 없어서 상피세포의 순수 분리배양이 요구된다.

성우나 송아지에서의 초대배양 방법은(Civiale 등, 2003; Leung 등, 2007) 연구가 되어 있으나 소태아를 이용한 연구는 미진한 실정이다. 태아를 이용한 초대배양은 분열기에 있는 세포가 풍부하여 초대배양 시 오랜 기간 세포가 생존하고 분열속도도 왕성한 많은 장점(Strange 등, 2007)을 지니고 있다. 초대배양 시 사용하는 많은 효소들 가운데 collagenase와 dispase는 trypsin과 달리 세포 독성이 적어서 장시간 동안 조직이나 세포에 적용이 가능(Crabtree 등, 1989; Benya 등, 1991; Panja 등, 1994)하고 세포간의 연결을 효과적으로 절단 할 수 있으며 농도와 처리시간을 잘 조정하면 상피세포만을 분리 할 수 있어 초대배양 세포에서 섬유아세포의 포함을 최소화 할 수 있다. 또한 초대배양 시 RBC가 다량 포함되어 있으면 RBC가 세포의 부착을 저해하게 된다.

상피세포의 배양에 있어서 가장 문제가 되는 것 중 하나가 섬유아세포의 혼입이라 할 수 있다. 섬유아세포는 상피세포보다 세포간의 결합력이 강하고 상피세포보다 분열이 빠른 특성을 가지고 있다. 이러한 특성 때문에 상피세포와 섬유아세포가 함께 자라고 있으면 계대수가 늘어나면서 상피세포의 비율은 점점 줄어들고 섬유아세포의 비율은 점점 늘어나는 섬유아세포우점현상이 발생하고(Sato, 2008) 이러한 우점 현상에 의하여 상피세포들은 대부분 조기 사멸하게 된다(Mod er 등, 1988). 또한 대부분의 초대배양 방법이 섬유아세포와 상피세포의 분리가 미진하여 상피세포가 사멸하지 않더라도 섬유아세포의 우점현상에 의해 상피세포의 바이러스에 대한 감수성이나 전체적인 생리적 특성이 달라지게 되어서 일관성 있는 연구 결과를 얻을 수 없게 된다(Mod er 등, 1988). 동물의 각 장기에서 상피세포를 초대배양 할 수 있는 방법들이 많이 연구되고 있지만(Sashikumar 등, 2008; Cao 등, 2009) 아직까지 완벽하게

상피세포만을 분리 할 수 있는 방법은 없다. 최선의 방법은 최대한 상피세포와 함께 분리되는 섬유아세포의 비율을 낮추거나 일단 분리된 섬유아세포를 제거하는 것이다.

초대배양 시 가장 문제가 되는 섬유아세포의 제거를 위하여 edetate disodium dihydrate ( $\text{Na}_2\text{EDDA}$ )를 이용하는 방법이 연구되었는데,  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 는 섬유아세포의 세포 간 결합의 가장 큰 비중을 차지하는  $\text{Ca}^{2+}$  결합 사이에 들어가서 섬유아세포들 간의 결합을 효과적으로 저해 할 수 있었다(Drewa 등, 2006). 물론 상피세포 또한  $\text{Ca}^{2+}$  결합을 가지고 있지만 섬유아세포에 비하여 그 비율이 낮으므로  $\text{Ca}^{2+}$ 의 결합만을 제거해 주면 섬유아세포의 박리가 먼저 일어나게 된다. 이러한 섬유아세포와 상피세포간의 박리가 이루어지는 시간적 차이를 이용하면 효과적으로 섬유아세포와 상피세포를 분리할 수 있다. 또한 상피세포와 섬유아세포가 초대배양 시 배양 용기에 붙기 위해 필요한 부착인자의 양에도 차이가 있다(Niederauer 등, 1994; Vasioukhin 등, 2000). 섬유아세포는 상피세포에 비해 초기 배양 용기에 부착을 위해 더 많은 fetal bovine serum (FBS)을 필요로 하지만 상피세포는 적은 양의 FBS만으로도 충분히 부착이 가능하다. 이러한 세포종류에 따른 특성을 이용하면 효과적으로 섬유아세포를 제거할 수 있을 것으로 사료된다.

구제역바이러스의 분리를 위하여 새로운 세포주의 개발이 꾸준히 요구되고 있는 바, 본 연구에서는 구제역바이러스에 대한 감수성이 유지되고 연속배양이 30대 이상 가능하여 신속한 바이러스의 검출에 숙주세포로 사용될 수 있는 불멸화된 소상피세포주를 구축하기 위하여 소 조직유래 초대배양상피세포를 작성하고 바이러스 감수성을 유지하는 불멸화를 유도하여 구제역바이러스 분리를 위한 감수성 높은 소 유래 세포주 개발을 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 소유래 조직의 초대배양

#### 1) 소 태아의 확보 및 장기적출

도축장을 통하여 소의 태아를 확보하고 무균적으로 자궁을 적출 한 후 무균 비닐봉지 등을 이용하여 냉장상태에 신속히 실험실로 이송하여 초대배양 재료로 사용하였다. 소 태아가 들어 있는 자궁은 70% 에탄올을 사용하여 자궁표면을 소독하고 클린벤치로 옮겨서 태아를 적출하였다. 외과용 수술가위를 사용하여 자궁을 절개하고 실크 봉합사를 이용하여 탯줄을 결찰한 후 절단하였다. Potadine 용액을 사용하여 태아의 피부를 소독하고 chlorhexidine 용액으로 Potadine 용액을 닦아낸 후 2차 소독을 실시하였다. 복강을 절개하여 무균적으로 신장, 인후두, 소장, 폐, 뇌를 적출하였다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 제주대학교동물실험윤리위원회(Animal Care and Use Committee of Cheju National University, ACUCC)의 승인 하에 동물실험표준작업지침서(standard operation procedures, SOP)에 따라 수행되었다.

#### 2) 조직으로부터 RBC의 제거

무균적으로 적출된 각 장기 조직을 Dulbecco's modified essential medium (DMEM) 배지 속에 넣은 후 무균가위 등으로 유리 비커 안에서 가능한 잘게 자르고(mincing) 50 ml conical tube로 옮겼다. 1~2분 정치시킨 후 RBC를 제거하기 위하여 조직 소편이 다 가라앉으면 상층액을 비웠다. 조직소편이 남아있는 50 ml conical tube에 DMEM (GIBCO, New York, USA) 배지를 30 ml 첨가하여 전동 피펫을 사용하여 조직소편을 다시 부유시킨 후 30초간 정치시켜 조직소편이 가라앉기를 기다린 후 상층액을 비웠다. 이와 같은 처리를 2~3회 반복하여 RBC를 충분히 제거하였다. 각 장기 중 신장과 폐는 특히 RBC가 많이 포함되어 있어 4~5회 반복하였다. 희석법에 의한 RBC제거와 적혈구 파괴를 통한 제거 방법을 비교하기 위하여  $\text{NH}_4\text{Cl}$ /HEPES (0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01 M HEPES)용액을 사용하였다. 장기조직을 원심분리하여 상층액

을 제거하고  $\text{NH}_4\text{Cl}$ /HEPES 용액 4.5 ml를 mincing된 조직에 서서히 넣어 부유시키고 3분간 정치시켰다. 새로운 15 ml conical tube에 조직 부유액을 넣고 160 x g로 5분 동안 원심분리하고 상층액을 버린 후 5 ml의 DMEM 배지를 첨가하였다. RBC가 제거된 조직소편에 trypsin/ EDTA (0.05%/ 0.53 M, GIBCO, New York, USA)를 2 ml 첨가하고 36℃에서 3분 동안 처리하고 20회 천천히 피펫팅을 하여서 단일세포로 분리한 후 10% FBS (GIBCO, USA)가 첨가된 DMEM배지(DMEM-10)를 30 ml 첨가하고 160 x g로 3분 동안 원심분리한 후 단일세포를 수거하였다. 수거된 단일세포를 24-well cell culture cluster에  $1 \times 10^4$ 개씩 분주한 후 10% FBS가 첨가된 DMEM배지를 1 ml 첨가하고 36℃,  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 12시간 배양한 후 바닥에 부착된 세포의 비율을 구하였다.

#### 3) 조직의 효소처리

소 태아의 각 조직을 잘게 절편하고 RBC가 제거된 1 g의 각 조직을 실험에 사용하였다. 각 조직을 단일세포로 분리하기 위하여 1차와 2차를 통하여 효소 처리를 하였다. 37℃ DMEM 배지 5 ml에 0.25% collagenase를 첨가하여 10~60분 동안 37℃,  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 처리하고, collagenase의 처리가 완료되면 0.01%의 dispase를 첨가하여 10분 ~ 60분 동안 반응을 시킨 후 천천히 20번 가량 피펫팅을 하여서 세포를 분리하였다. 상층액을 수거하고 DMEM 배지를 10 ml 첨가한 후 160 x g에서 3분간 원심분리 하였다. 가라앉은 세포만을 새로운 배지에 부유시키고 T25 세포배양용 flask에 배양하였다.

Trypsin에 의한 효소처리는 다음과 같이 실시하였다. trypsin/EDTA (0.05%/ 0.53 M) 1 ml를 조직소편에 첨가하고 3분간 37℃ 인큐베이터에서 반응 시킨 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 10 ml 첨가하여 trypsin의 작용을 정지시켰다. 160 x g에서 3분간 원심분리한 후 가라앉은 세포만을 새로운 배지에 부유시키고 T25 세포배양용 플라스크에 배양하였다. 소 태아의 소장 조직은 내강에 효소를 채워서 세포를 분리하는 방법과 잘게 절편한 후 효소를 처리하는 방법을 비교하였다. 소 태아 소장 조직을 4 Cm 길이로 잘라

내고 PBS를 이용하여 소장 조각의 외부를 세척한 후 1 ml 주사기를 이용하여 소장의 내강에 바늘을 삽입하고 실크 봉합사를 이용하여 바늘의 삽입부분을 결찰한 후 PBS를 이용하여 내부를 세척하였다. 내부가 세척된 소장의 내강에 0.25% collagenase 500  $\mu$ l를 첨가하여 10분~60분 동안 37 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 처리하고, collagenase의 처리가 완료되면 0.001% ~ 0.05%의 dispase 를 첨가하여 10 ~ 60분 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 소장의 내강에 DMEM 배지를 흘려보내서 단일 세포로 분리 된 상피세포를 모은 후 160 x g에서 3분간 원심분리한 후 세포수를 세고 T25 세포배양용 플라스크에 배양하였다. 한편, 소장의 조직을 mincing한 후 RBC를 제거하고 1 g의 소장 조직을 37 $^{\circ}$ C DMEM 배지 5 ml에 0.25% collagenase를 첨가하여 10분 ~ 60분 동안 37 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 처리하고, collagenase의 처리가 완료되면 0.01%의 dispase를 첨가하여 10분 ~ 60분 동안 반응을 시킨 후 피펫을 이용하여 천천히 20번 가량 피펫팅을 하여 세포를 분리하였다(Table 1). 분리된 세포를 모으기 위하여 DMEM 배지를 20 ml 첨가하고 상층액을 160 x g에서 3분간 원심분리한 후 세포수를 카운팅 하고 T25 세포배양용 flask에 배양하였다.

Table 1. Enzyme treatments for tissue digestion

Organs	1 <sup>st</sup> treatment (collagenase)		2 <sup>nd</sup> treatment		
	Concentration (%)	Time* (min)	Enzyme	Concentration (%)	Time* (min)
Kidney	0.25	10~60	dispase	0.01	10~30
			trypsin/EDTA		0.05/0.53 M
Oral cavity	0.25	10~60	dispase	0.01	10~30
Lung	0.25	10~60	dispase	0.01	10~30
Brain	0.25	10~60	dispase	0.01	10~30
Small intestine	0.25	10~60	dispase	0.01	10~30
			trypsin/EDTA	0.05/0.53 M	3

\* Reaction time of enzyme treatment

#### 4) 초대배양 세포의 생존율 비교

효소처리를 마치고 단일세포로 분리된 각 장기의 세포를 배양하여 효소의 최적 처리 조건을 알아보았다. T25 세포배양용 플라스크에 1 $\times$ 10<sup>5</sup>개로 초대배양된 세포의 부착율과 초초대배양 3일 후 계대배양 시 생존하는 세포수를 비교하였다. 세포를 처음 초대배양 하고 12시간이 지난 후 부착된 세포의 수를 현미경으로 관찰하여 부착된 세포수와 부착을 하지 못하고 죽은 세포의 비율을 구하였다. 처음 배양 후 72시간이 지나서 세포가 자라고 있는 T25 세포배양용 플라스크를 세포세척용 PBS를 이용하여 2회 세척을 하고 trypsin/ EDTA (0.05%/0.53 M) 500  $\mu$ l를 이용하여 세포를 분리시키고 FBS가 10% 첨가된 DMEM 배지 10 ml를 첨가하여 160 x g, 2분간 원심분리하여 세포를 모았다. 5 ml의 배지를 첨가하고 피펫을 이용하여 잘 부유시킨 후 100  $\mu$ l의 배지를 추출하여 trypan blue(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 용액을 첨가하여 피펫으로 잘 섞은 후 혈구계산판에 넣은 후 현미경으로 생세포를 카운트하여 세포의 수를 구하였다.

#### 4) 초대배양 세포의 계대수 측정

최적의 처리조건을 탐색하여 얻어진 내용을 바탕으로 각 장기에서 상피세포를 분리하고 상피세포가 사멸할 때 까지 계속 계대배양을 해서 몇 세대까지 계대가 가능한지 알아보고 대수증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일 간격으로 한번에 3개의 well에서 검사하여 증식곡선을 검사하였다. 1 $\times$ 10<sup>3</sup>개의 세포를 6-well plate 6개(36well)에 분주 하고 1일, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일, 12일에 세포수를 측정하였다. PBS로 원심세척하고 세포를 crystal violet (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)으로 염색한 후 세포농도를 혈구계산판으로 측정하여 3개의 well의 평균을 구하였다.

#### 5) 증식능력 검사

세포의 증식능력을 검사하기 위하여 각각 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 세대 계대배양되고 있는 세포를 대상으로 tritium 표지 thymidine을 취득하게 하고 scintillation counter로 방사능을 아래와 같이 측정하였다. 각 재료마다 T25 2

개를 4시간 배양하고 배양액을 교환한 후 세포증식 자극제를 0.01 ml 추가하였다. 1시간 배양한 후 tritium 표지 thymidine (0.5  $\mu$ Ci/ml)를 첨가하여 4 ~ 24시간 배양하였다. 아이스박스에서 1%  $\text{NaN}_3$  0.01 ml를 추가해 반응을 정지시키고 PBS로 2번 세척한 후 0.2 N NaOH 0.5 ml로 세포를 용해시켰다. 5분 뒤 용해 세포액을 시험관으로 옮기고, 0.5 ml의 0.2 N NaOH 용액으로 씻어서(well에서 남은 세포 수거) 시험관에 추가한 후 2 N 염산 0.2 ml로 중화시켰다. 50% trichloroacetic acid (TCA) 0.15 ml를 첨가해 4°C에서 30분간 정지한 후 원심침전하고 침전을 5% TCA로 한번 씻었다. 침전을 glass filter에 옮기고 5% TCA에 2번, 그리고 에틸알콜과 아세톤을 이용하여 차례로 씻었다. Glass filter를 vial에 넣고 scintillation 10 ml을 첨가한 뒤 베타카운터(New England Nuclear Co, Boston, USA)에서 방사능 측정하였다.

## 2. 섬유아세포 제거를 통한 초대상피세포의 선별

### 1) $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 농도에 따른 섬유아세포 제거효율

초대배양 후 세포의 성장 상태를 확인하고 섬유아세포 제거 작업을 시행하였다. 소 태아의 신장, 인후두강, 폐, 갑상선, 그리고 소장으로부터 초대배양 2세대인 세포를 각각 3개의 T25 세포배양용 flask에 24시간 배양하여 세포단층이 70%가 되도록 하고, DMEM-10을 이용하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 flask에 섬유아세포와 상피세포가 혼재하여 있는 것을 현미경으로 확인하고, 세포세척용 PBS를 4 ml 첨가하여 세포를 세척하였다. 세척 후 각각의 flask에 0.01%와 0.05% 그리고 0.5%의  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 1 ml씩 첨가하였다.  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 첨가하고 3~5분 동안 현미경을 통하여 섬유아세포가 박리되는지를 관찰하였다. 섬유아세포가 박리되기 시작하면 flask를 손가락으로 가볍게 쳐주면서 상피세포가 박리되기 직전까지 처리를 하였다. 상피세포의 세포질이 수축을 시작하면  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  용액을 흡입하여 완전히 비운 후 20% FBS가 함유된 DMEM배지(DMEM-20)를 1 ml 첨가하여 세척한 후 흡입하여 비우고, 다시 DMEM-20을 1 ml 첨가하여 세척하였다. 세척을 완료하고 DMEM-10을

5 ml를 첨가하여 배양하고 6시간 후 섬유아세포가 제거된 정도를 현미경을 통하여 관찰 하였다.

### 2) 계대수와 배양 시간에 따른 섬유아세포 제거효율

계대수가 1번, 4번, 8번, 그리고 12번인 신장 세포를 대상으로 각각 24시간 후 70%의 세포단층을 이루도록 세포수를 조절하여 plating하였다. 그리고 각각 12, 24, 36 그리고 48시간동안 배양한 후 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 이용한 섬유아세포의 제거 실험을 실시하였다. 시간별로 배양된 flask에 섬유아세포와 상피세포가 혼재하여 있는 것을 현미경으로 확인을 하고, 세포세척용 PBS를 4 ml 첨가하여 세포를 세척하였다. 세척 후 각각의 flask에 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 1 ml씩 첨가하고 3~5분 동안 현미경을 통하여 섬유아세포가 박리되는지를 관찰하였다. 섬유아세포가 박리되기 시작하면 flask를 손가락으로 가볍게 쳐주면서 상피세포가 박리되기 직전까지 처리를 하였다. 상피세포의 세포질이 수축을 시작하면  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 흡입하여 완전히 비운 후 1 ml의 DMEM-20을 첨가하여 두 번 세척하였다. 세척을 완료하고 5 ml의 DMEM-10을 첨가하여 배양하고 6시간 후 섬유아세포가 제거된 정도를 현미경을 통하여 관찰 하였다.

### 3) 배지의 FBS농도에 따른 세포의 부착과 $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리 실험

0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처음 처리하고 2차로 처리하기까지 세포를 배양할 때 사용하는 배지의 FBS농도와 배양시간이  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 의 2차 처리 시 섬유아세포의 제거효율에 미치는 영향을 조사하였다. 초대배양 계대수가 4번인 신장세포를 100%의 세포단층이 되도록 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 세포세척용 4 ml의 PBS로 세척한 후 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 1 ml씩 첨가하여 3분 동안 현미경을 통하여 섬유아세포가 박리되는지를 유심히 관찰하였다. 섬유아세포가 박리되기 시작하면 DMEM-20 배지를 5 ml 첨가하고 flask를 가볍게 쳐주어서 섬유아세포를 부유시켰다. 배지를 수거하여 160 × g로 3분간 원심분리하여 섬유아세포를 모은 후 trypsin/EDTA (0.05%/0.53 M)를 500  $\mu$ l 첨가하여 1분간 반응시켜 뭉쳐있는 섬유아세포를 단일세포로 분리하였다. 1분 후 5 ml의 DMEM-10을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 160 × g로 3분간 원

심분리하여 단일세포로 분리된 섬유아세포를 모았다. 24-well 세포배양용 plate에 섬유아세포를  $1 \times 10^3$ (unit/ml)이 되도록 분주하고 각각 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지와 2% FBS가 포함된 DMEM배지(DMEM-2), 5% FBS가 포함된 DMEM배지(DMEM-5) 그리고 DMEM-10 배지로 배양하였다. 앞의 실험에서 섬유아세포가 제거된 상피세포에 trypsin/ EDTA를  $500 \mu\text{l}$  첨가하여 1분간 반응시킨 후 단일세포로 분리가 되면 DMEM-10을 5 ml 첨가한 15 ml tube로 옮기고  $160 \times \text{g}$ 로 3분간 원심분리하여 상피세포를 모았다. 24-well 세포배양용 plate에 상피세포를  $1 \times 10^3$ (unit/ml)이 되도록 분주하고 각각 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지와 DMEM-2, DMEM-5 그리고 DMEM-10 배지로 배양하였다. 24-well 세포배양용 plate에서 배양되고 있는 각각의 섬유아세포와 상피세포를 6시간, 12시간, 18시간 그리고 24시간 간격으로 관찰하여 배양용기에 부착한 비율을 구하고, 시간별로 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하여 세포가 분리되는 시간과 비율을 관찰하였다.

#### 4) 최적의 $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리 조건

현재까지 실험된 결과를 바탕으로 초대배양 후 섬유아세포를 제거하기 위한 최적의 조건을 알아보기 위한 실험계획을 정하고(Fig. 1) 각각의 장기에서 처리조건을 탐색하였다. 초대배양 계대수가 4번인 각 장기 유래의 세포를 1차로 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하고 DMEM-2 배지로 각각 6시간, 12시간 그리고 24시간 배양 후 2차로 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리를 하였다. 2차 처리가 끝난 후 DMEM-2 배지로 각각 6시간, 12시간 그리고 24시간 배양을 하고 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 3차로 처리하였다. 각 처리 단계에서의 섬유아세포의 제거 비율과 상피세포가 박리되기 시작하는 시점의 시간을 관찰하였다.

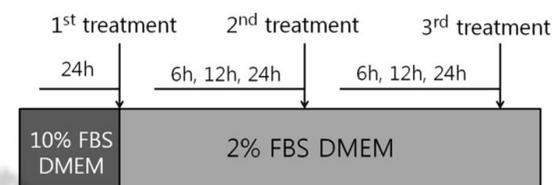


Fig. 1. Schematic diagram of  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatments for the separation of fibroblasts from epithelial cells. DMEM containing 10% FBS was used for primary culture and DMEM containing 2% FBS was used just after first treatment. Hours of cell culture before treatment were indicated.

### 3. 세포의 불멸화 및 불멸화세포 선별

#### 1) 레트로바이러스 벡터 제작과정

레트로바이러스 벡터는 Michiie Sakamoto (Department of Pathology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku 160-8582, Tokyo)로부터 공여 받아 실험에 사용하였다. 벡터의 제작과정은 다음과 같다.

#### 가. pCLXSN-ACC-hTERT

(1) poly(A)+RNA : HeLa Cell을 이용하여 RT-PCR (Thermoscript reverse transcriptase(Invitrogen, California, USA) 와 KOD polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan)을 통하여 RNA 추출하였다. 본 연구에서 사용한 primer는 다음과 같다.

forward primer GGAATTCGCCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCC  
reverse primer GCTCTAGATTAGTCCAGGATGGTCTTGAAGTCT

(2) recombining two clones

forward primer	AAAAAGCAGGCTCCACCATGCCGCGCTCCCGC CTGCCGAGCC
reverse primer	AGAAAGCTGGGTTAGTCCAGGATGGTCTTGAAGT CT
adaptor primers	
forward primer	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
reverse primer	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

(3) pDONR201 벡터로 BP reaction을 통하여 cDNA cloning하였다.

(4) pCLXSN 벡터(Imgenex, San Diego, CA)의 multicloning site에 attR, ccdB (Invitrogen)가 들어가도록 제작하여 pDEST-CLXSN을 제작하였다.

(5) pDEST-CLXSN에 hTERT (cDNA) 삽입하여 pCLXSN-ACC-hTERT를 제작하였다.

나. pCMSCV-puro-hBmi-1

(1) K526 cell에서 RT-PCR (Thermoscript reverse transcriptase (Invitrogen, California, USA) 와 KOD polymerase를 통하여 RNA 추출하였다.

forward primer	ACGCGTCGACCGCCATGCATCGAACAACGAGAAT
reverse primer	CGGATCCTCAACCAGAAGAAGTTGCTG

(2) pDONR201 벡터로 BP reaction을 통하여 cDNA cloning하였다.

(3) pMSCVpuro vector의 5'LTR 위치에 CMV/LTR fusion promoter를 삽입하여 pCMSCV-puro vector를 제작하였다.

(4) pCMSCV-puro vector의 MCS에 hbmi-1 (cDNA)을 삽입하여

pCMSCV-puro-hBmi-1 벡터를 제작하였다.

2) 레트로바이러스 입자의 제작

안정적으로 세포내로 유전자를 도입시키기 위하여 불멸화에 사용할 레트로 바이러스 입자를 Retrovirus Packing System (TAKARA Bio, Osaka, Japan)을 사용하여 co-transfection을 통하여 제작하였다(Fig. 2). 293cell에 recombinant retrovirus vector와 pGP vector 그리고 pE-ampho vector를 Calcium phosphate transfection method로 co-transfection을 하였다. co-transfection 후 7-11시간동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C로 incubating한 후 새로운 배지로 교환해 주었다. Transfection 48시간 후 원심분리로 상층액을 수거하고 0.45 μm sterilized filter를 사용하여 filter후 -80°C에 보관하고 transduction에 사용하였다.

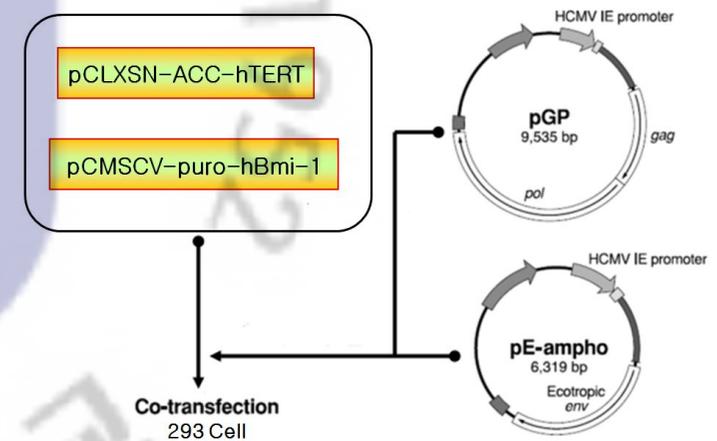


Fig. 2. Diagram of total process for retrovirus particle production.

### 3) Telomerase 발현 세포의 cloning

Telomerase가 발현되는 세포를 선별하기 위해 G418 (geneticin)을 배지에 500 ug/ml로 첨가하고 매일 G418이 첨가된 배지로 갈아주면서 2주일 정도 배양을 지속하였다. 살아남은 세포는 G418 농도를 반으로 줄인 배지를 이용하여 배양하면서 불멸화 여부를 확인하였다.

### 4. 세포특성 확인 및 구제역바이러스 감수성 검사

#### 1) 세포배양 가능 계대수의 측정

세포를 계대배양하여 30대 이상 계대가 가능한지, 그리고 대수증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일 간격으로 한번에 3개의 well에서 검사하였고 대수증식기 이후 confluent로 된 후 증식곡선을 검사하였다.  $1 \times 10^3 \times 36$ (개)의 세포를 6-well plate 6개에(36well) 분주 하고 1일, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일 그리고 12일에 세포를 수거하여 PBS세척 후 crystal violet 염색을 하여 세포농도를 혈구 계산판으로 측정하고 한번에 3개의 well의 평균을 구하였다.

세포의 증식능력을 검사하기 위하여 tritium 표지 thymidine을 취득한 세포를 scintillation counter로 방사능을 측정하였다. T25 세포배양용 flask 2개에 4시간 배양하여 배양액을 교환하고 세포증식 자극제를 0.01 ml 추가하고 1시간 배양한 후 tritium 표지 thymidine을(0.5  $\mu$ Ci/ml)을 첨가하여 4~24시간 배양하였다. 아이스박스에서 1%  $\text{NaN}_3$  0.01 ml 추가해 반응 정지시키고 PBS 2번 세척, 0.2 N NaOH 0.5 ml로 세포를 용해시켰다. 5분 뒤 용해 세포액을 시험관으로 옮기고, 0.5 ml의 0.2 N NaOH 용액으로 씻어서(well에서 남은 세포 수거) 시험관에 추가한 후 2 N 염산 0.2 ml로 중화시켰다. 50% TCA 0.15 ml 첨가해 4°C에서 30분 정지하여 침전을 시키고 원심침전 한 후 침전을 5% TCA로 한번 씻었다. 침전을 글라스필터에 옮기고 5% TCA에 2번, 그리고 에틸알콜과 아세톤을 이용하여 차례로 씻었다. Glass filter를 vial에 넣고 10 ml의 scintillation을 첨가한 뒤 베타카운터에서 방사능 측정하였다.

### 2) Telomerase 발현양상 조사

불멸화 과정을 거친 세포들을 5세대별로 나누어 telomerase 발현양상을 TRAPeze<sup>®</sup>RT Telomerase Detection Kit, FAM detection (Chemicon international, California, USA)을 사용하여 Real-Time PCR (iQ5 Real-Time PCR Detection System, Bio-RAD, California, USA)을 통하여 조사 하였다. 각각의 제작 세포주 세포를  $1 \times 10^6$ 개씩 5세대 별로 준비하고 TSR8 quantitation control, 1000 cell equivalents of telomerase positive extract control, minus telomerase control, no template control (NTC), experimental sample control (and heat treated)을 제작하여 real-time PCR을 수행하였다. Real-Time PCR을 위한 디자인은 Table 2와 같다.

Table 2. Real-time PCR assay design for the telomerase detection

	1	4	7	10
	2	5	8	11
	3	6	9	12
A	TRS8 <sup>a</sup> 40 amoles	Sample 1	Sample 1 Heat Treated	Sample 1 + TSK <sup>b</sup>
B	TRS8 4 amoles	Sample 2	Sample 2 Heat Treated	Sample 2 + TSK
C	TRS8 0.4 amoles	Sample 3	Sample 3 Heat Treated	Sample 3 + TSK
D	TRS8 0.04 amoles	Sample 4	Sample 4 Heat Treated	Sample 4 + TSK
E	Positive Extract <sup>c</sup>	Sample 5	Sample 5 Heat Treated	Sample 5 + TSK
F	Minus telomerase control	Sample 6	Sample 6 Heat Treated	Sample 6 + TSK
G	NTC <sup>d</sup>	Sample 7	Sample 7 Heat Treated	Sample 7 + TSK
H		Sample 8	Sample 8 Heat Treated	Sample 8 + TSK

<sup>a</sup> Control template, TRS8 is an oligonucleotide with a sequence identical to the TS primer extended with 8 telomeric repeats AG (GGTTAG)

<sup>b</sup> Inhibition/normalization control, 0.2 amole/ $\mu$ L TSK template

<sup>c</sup> Telomerase positive cells ( $10^6$  cells)

<sup>d</sup> No template control

### 3) 염색체 검사

불멸화 과정을 거친 세포들을 24시간 동안 배양하여 약 70%정도의 단층이 형성되도록 하였다. Colchicine (Sigma-Aldrich, California, USA)을 0.1  $\mu$ g/ml 되게 배지에 섞어 세포에 첨가하고 24시간 동안 배양, trypsin처리 그리고 원심분리를 통하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 저장액(0.075 M

KCl)에 20분 동안 반응한 후 ice-cold acetic acid/methanol(1:3, v/v)로 고정하였다. 원심을 통하여 세포를 회수하고 고정액 1 ml를 첨가하여 세포를 다시 부유시켰다. 부유된 세포액을 30 cm 높이에서 슬라이드 글라스에 한 방울 drop시킨 후 80 $^{\circ}$ C에서 3시간 건조 한 후 검사 염색(Giemsa stain)을 하고 현미경을 통해 실험 샘플 마다 10개씩의 염색체 무리를 관찰하여 염색체 수와 이상여부를 검사하여 세포가 암세포화 되었는지 확인하였다.

### 4) 배양특성 및 모양 관찰

세포를 계대배양하면서 상피세포의 모양 유지, contact inhibition 현상, 복층(multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 관찰하여 세포가 암세포화 되었는지 그리고 상피세포의 특성을 유지하는 지를 확인하였다.

### 5) 잡균 및 바이러스 감염여부 확인

불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염여부와 바이러스 감염여부를 PCR을 통하여 확인하였다.

#### 가. 마이코플라즈마 감염검사

마이코플라즈마 감염여부는 PCR kit (Mycoplasma PCR detection kit, iNtRON, seoul, Korea)을 통하여 확인하였다. PCR 조건은 Table 3과 같다.

Table 3. PCR conditions for the detection of mycoplasma

PCR condition	Temp.	Time
Initial denaturation	94°C	1 min
35 Cycles	Denaturation	94°C 30 sec
	Annealing	60°C 20 sec
	Extension	72°C 1 min
Final extension	72°C	5 min

나. 바이러스 감염검사

세포와 배지에서 PCR로 유전자를 증폭시킨 다음, 아가로스 겔에 전기 영동하여 bovine herpesvirus (Table 4), bovine viral diarrhoea virus (Table 5) 그리고 bovine parainfluenza virus type 3 (Table 6)의 유전자 존재여부를 검사하였다.

Table 4. PCR primers and conditions for the detection of bovine herpes virus (BHV)

	Sequence	Position	Amplicon size
BHV-P4(F) Forward Primer	GCCGCAAGTTTATGCTGTAT	706~849	144
BHV-P4(R) Reverse Primer	CATCGAGGCAGTGTAGGTCT		
PCR conditions			
Pre-denaturation: 95°C, 2 min		1 cycle	
Denaturation: 95°C, 30 sec		45 cycle	
Annealing: 52°C, 30 sec			
Extension: 72°C, 1 min			
Post-extension: 72°C, 5 min		1 cycle	
Final-extension: 30°C, 3 min			

Table 5. PCR primers and conditions for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV)

	Sequence	Position	Amplicon size
BVDV 4(F) Forward Primer	GGAAGTGACGAAAGCTGTA	752~892	122
BVDV 4(R) Reverse Primer	AGAGGGCAGTCAAGCCTATT		
PCR conditions			
Pre-denaturation: 95°C, 2 min		1 cycle	
Denaturation: 95°C, 30 sec		45 cycle	
Annealing: 58°C, 30 sec			
Extension: 72°C, 1 min			
Post-extension: 72°C, 5 min		1 cycle	
Final-extension: 30°C, 3 min			

Table 6. PCR primers and conditions for the detection of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3)

		Sequence	Position	Amplicon size
BPIV-3(F)	Forward Primer	ATGTTCAAACTATATCCCCT	7113~	124
BPIV-3(R)	Reverse Primer	CTATCATGAGTCATTCTGTGA	7263	
PCR conditions				
Pre-denaturation: 95°C, 2 min		1 cycle		
Denaturation: 95°C, 30 sec		45 cycle		
Annealing: 52°C, 30 sec				
Extension: 72°C, 1 min				
Post-extension: 72°C, 5 min		1 cycle		
Final-extension: 30°C, 3 min				

6) 구제역바이러스 감수성 검사(수의과학검역원)

수의과학검역원에서 구제역바이러스에 대한 감수성 검사를 수행하였다. 신장 T2 세포주와 신장 T3 세포주 그리고 일반초대배양 소 신장세포를 IBRS-2 세포주와 구제역바이러스(AS/SKR/2002, IBRS-2 세포에서 4번 계대배양된 구제역바이러스) 감수성 시험을 하였다.

III. 결 과

1. 소유래 조직의 초대배양

1) 각 조직에서의 RBC 제거

소태아의 조직을 적출하고 상피세포의 생존율을 높이기 위하여 RBC제거를 하였다. 희석에 의한 RBC제거 방법을 사용하였을 경우 1 ml의 세포부유액에 남아있는 RBC 숫자는 신장, 구강, 소장, 폐 그리고 뇌에 있어서 각각  $20 \pm 5 \times 10^3$ ,  $5 \pm 2 \times 10^2$ ,  $10 \pm 4 \times 10^3$ ,  $13 \pm 4 \times 10^4$  그리고  $18 \pm 7 \times 10^4$  이었고,  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{HEPES}$  용액을 사용한 경우 신장, 구강, 소장, 폐 그리고 뇌에 있어서 각각  $34 \pm 7 \times 10^2$ ,  $15 \pm 5 \times 10^2$ ,  $50 \pm 6 \times 10^2$ ,  $78 \pm 8 \times 10^3$  그리고  $6 \pm 8 \times 10^3$ 이였다. 이처럼 RBC의 제거 효율을 비교한 결과 남아있는 RBC의 개수는 서로 비슷하여서 희석에 의한 RBC의 제거로도 충분히 RBC의 제거 효과를 얻을 수 있었다. RBC를 제거하고 수거된 단일세포를 24-well 세포배양용 plate에 12 시간 배양한 후 바닥에 부착된 세포의 비율을 관찰한 결과  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{HEPES}$  용액을 이용하면 RBC의 제거는 효율적으로 이루어지지만 희석에 의한 RBC 제거방법에 비교하여 초대배양 시 세포의 생존율은 낮아지는 것을 관찰하였다 (Fig. 3).

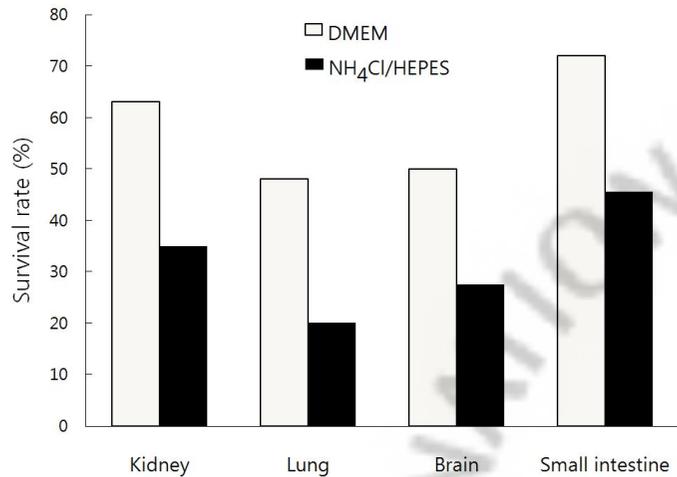


Fig. 3. Survival rate of digested cells from different organs after removing RBC either by dilution method or by lysis method. Dilution of minced tissues with culture medium (DMEM) and discard supernatant 2 minutes after sedimentation. Treatment of minced tissues with 0.83% NH<sub>4</sub>Cl in HEPES.

### 2) 각 장기별 효소처리에 의한 세포의 수율

Collagenase 처리 후 30분까지는 분리되는 세포의 수가 꾸준히 증가하였지만 50분 이후부터는 더 이상 세포수의 증가는 보이지 않았다. 신장의 경우 세포를 많이 얻기 위해서는 30분 이상 collagenase를 계속 처리하는 것이 좋으나 30분이 지나면 섬유아세포가 함께 분리되는 비율이 폭발적으로 증가하게 된다. 따라서 섬유아세포의 분리를 최소화하여 상피세포를 얻기 위해서는 30분 이내로 처리하는 것이 유리하였다. 다른 장기들도 40~50분까지 계속하여 분리되는 세포의 양은 증가하지만 collagenase의 처리가 20분이 지나면 섬유아세포의 분리 비율이 증가하게 되었다(Fig. 4). Dipase의 처리시간은 장기별로 25분이 될 때 까지 수거되는 세포의 총량은 계속 증가하였다. 신장과 폐의

경우 10분, 인후두강과 소장의 경우 15분 그리고 뇌의 경우는 20분이 지나면 서부터 섬유아세포의 분리비율이 현저히 증가되었다(Fig. 4). 소장의 경우 내강에 효소를 충전 하는 방법과 mincing에 의한 효소처리의 방법에서 모두 좋은 결과를 나타내었다.

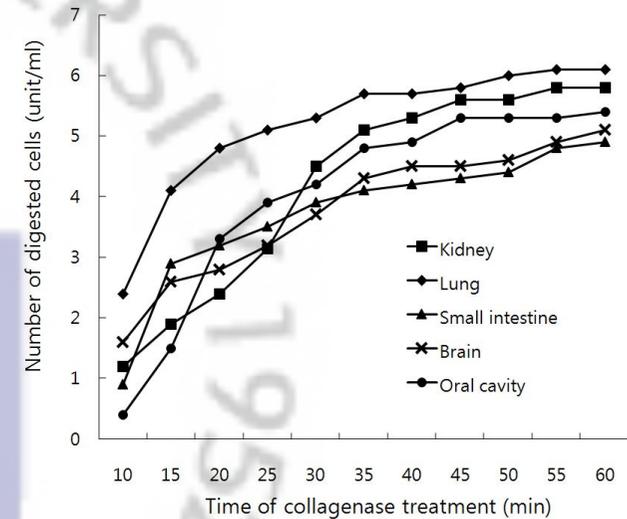


Fig. 4. Digestion of minced organs by collagenase treatment. Proper time of collagenase treatment was about 30 minutes since longer treatment than 30 minutes resulted in more contamination of fibroblasts as well as low survival of digested cells after plating.

### 3) 효소처리에 의한 세포의 생존율

현재까지 확인된 최적의 효소처리조건을 사용하여 각 조직에서 세포를 분리한 다음 T25 세포배양용 플라스크에  $1 \times 10^5$ 개씩 분주하고 12시간 후 현미경으로 관찰하여 세포의 부착률을 확인하였다. 세포의 부착률은 각 조직에 따라

서 다소 차이가 있었지만 55% - 70% 정도 되었고 신장유래 세포가 배양용기 표면에 부착이 가장 잘되는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 또한 72시간 배양한 후 생세포수를 비교하여 각 장기유래 세포들의 성장속도를 조사하였다. 초기에 배양된 각 장기의 세포가 일정한 속도로 분열을 하는 것이 아니라 조직의 특성에 따라서 세포분열 속도가 확연히 다르다는 것을 알 수 있었는데 신장세포와 소장세포가 다른 조직유래의 세포들 보다 분열 속도가 빠름을 알 수 있었다(Fig. 5).

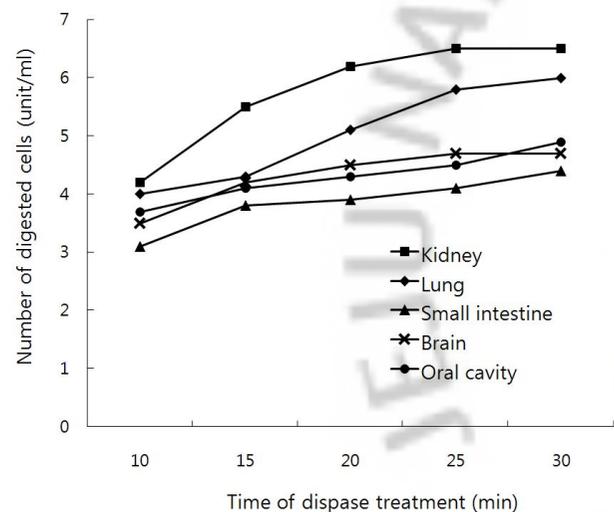


Fig. 5. Digestion of minced organs by dispase treatment. Proper time of dispase treatment was about 10-15 minutes since longer treatment than 15 minutes resulted in more contamination of fibroblasts as well as low survival of digested cells after plating.

#### 4) 각 장기별 최적의 효소처리 조건

최적의 효소처리 조건을 정리하면 Table 7과 같다. 이 조건으로 섬유아세포가 전혀 없는 순수한 상피세포만을 얻는 것은 어려웠고 각 장기별로 최적의 효소처리 조건은 유사하였다.

Table 7. Determination of optimal digestion conditions for fetal bovine tissues using two-step enzyme treatments

Organs	1 <sup>st</sup> treatment (collagenase)		2 <sup>nd</sup> treatment (dispase)	
	Concentration(%)	Time(min)	Concentration(%)	Time(min)
Kidney	0.25	30	0.01	10
Oral cavity	0.25	20	0.01	15
Lung	0.25	20	0.01	10
Brain	0.25	20	0.01	20
Small intestine	0.25	20	0.01	15

#### 2. 섬유아세포 제거를 통한 초대상피세포의 선별

##### 1) Na<sub>2</sub>EDDA 농도별 처리

소 태아의 신장, 인후두강, 폐, 갑상선, 그리고 소장의 초대배양 2세대인 세포를 각각 배양하고 0.01%와 0.05% 그리고 0.5%의 Na<sub>2</sub>EDDA를 1 ml씩 첨가하여 섬유아세포를 제거한 결과 섬유아세포가 박리되어 나오는 시점과 상피세포가 박리되기 시작하는 시점간의 시간적인 차이는 Na<sub>2</sub>EDDA의 농도가 높아질수록 줄어들었으나 분리되는 섬유아세포의 양에는 유의한 차이점이 없었다. 하지만 높은 농도에서 처리할 경우 섬유아세포와 상피세포의 분리가 이루어지는 시간적인

차이가 줄어들게 되어 실험자가 처치를 하기위한 충분한 시간적 여유가 없는 경우가 발생하기도 하였다. 따라서 이후의 실험에서는 시간적 여유가 충분하고, 유사한 실험에서 다른 연구자가 선택하였던 0.01% Na<sub>2</sub>EDDA로 실험을 시행하였다.

## 2) 계대수와 배양 시간에 따른 실험

소 태아의 장기를 초대배양한 후 계대수와 배양 시간에 따른 섬유아세포의 제거 효율을 실험하였다. 초대배양의 계대수가 증가하면서 섬유아세포가 제거되는 비율은 점점 감소하였다(Fig 6). 초대배양 세포를 4번 계대할 때 까지는 섬유아세포의 제거율이 높지만 8번 계대를 한 장기들은 50% 이하의 제거율을 보였다. 또한 계대수가 12번을 넘어가면 Na<sub>2</sub>EDDA처리에 의한 섬유아세포의 분리와 상피세포의 분리가 거의 같이 이루어지는 것을 관찰 할 수 있었다. 12번 계대를 한 세포에서 Na<sub>2</sub>EDDA를 이용하여 섬유아세포만을 분리하기는 사실상 어려웠다. 섬유아세포가 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하여도 세포질이 완전히 수축하지 않았다. 계대수가 4번 이하의 경우는 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하고 현미경으로 관찰하면 Fig. 7의 B 사진에서 보는바와 같이 섬유아세포의 세포질이 빠르게 수축하여 서로 엉겨 붙는 모습을 관찰 할 수 있었지만, 계대수가 12번인 경우는 섬유아세포의 세포질이 50% 정도만 수축하고 더 이상 수축을 하지 않았다.

세포의 배양시간에 따른 섬유아세포의 분리율도 상당한 차이점이 있었다(Fig 6). 배양 12시간과 24시간에 0.01% Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하면 섬유아세포의 분리가 잘 되었다. 하지만 24시간이 지나면 섬유아세포의 분리 시까지 많은 시간을 필요로 하고 이에 따라서 상피세포가 같이 탈락되는 현상을 관찰 할 수 있었다. 따라서 Na<sub>2</sub>EDDA는 배양 후 12시간에서 24시간 사이에 사용하는 것이 유리하였다.

초대배양 계대수가 증가하여 더 이상 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리를 통한 섬유아세포의 제거를 기대하지 못할 시 Na<sub>2</sub>EDDA와 trypsin/EDTA를 함께 사용하여 섬유아세포를 제거할 수 있었다. 10번 이상 계대가 된 초대배양세포를 24시간 배양 후 100%의 단층이 형성되도록 배양하고, 배양 24~48시간 사이에 0.01%

Na<sub>2</sub>EDDA로 3분간 처리를 하면 섬유아세포의 세포질은 50% 정도 수축을 하게 되고 배양용기를 가볍게 쳐 주어도 배양용기에서 박리가 되지 않는 상태가 된다. 이때 trypsin/EDTA를 일반 세포계대 시 사용하는 양과 농도로 약 15~30초간 36℃에서 처리를 하고 trypsin/EDTA 처리가 끝나면 곧바로 배양용기에 가볍게 충격을 주면 섬유아세포가 박리되는데, DMEM-10을 첨가하여 세척을 하고 흡인하여 배지를 버리면 섬유아세포의 70% ~ 90%를 제거할 수 있었다.

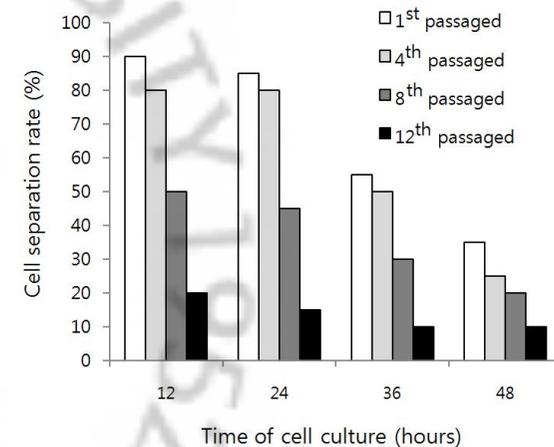


Fig. 6. Effects of culture time and number of passages on the separation of fibroblasts by Na<sub>2</sub>EDDA treatments.

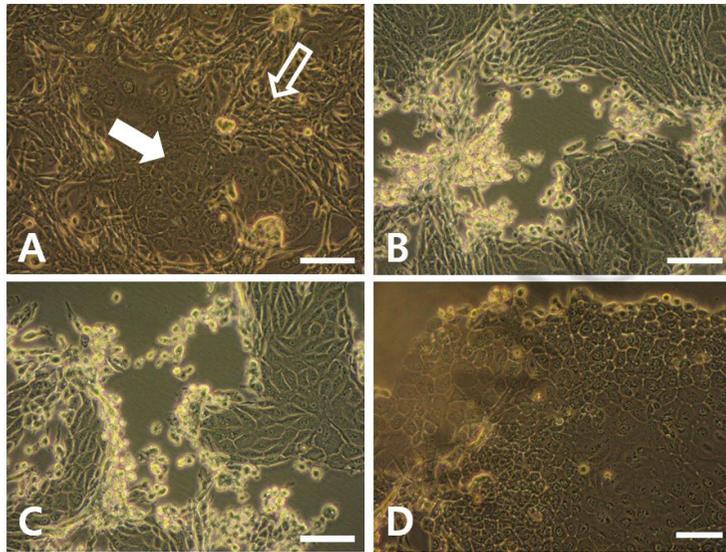


Fig. 7. Separation of fibroblasts from epithelial cells by treating with  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ . A: Cultured cells before  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatment. Empty arrow indicates fibroblasts and filled arrow indicates epithelial cells. B: Fibroblasts were rounded and detached from culture-flask by the first  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatment. C: Fibroblasts were detached from culture-flask by the second  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatment. D: Fibroblasts were completely removed from the flask by the third  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatment. Scale-bar: 40  $\mu\text{m}$ .

### 3) 배지의 FBS 농도에 따른 세포의 부착과 $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리 실험

섬유아세포와 상피세포를 분리하고 FBS 농도에 따른 세포의 부착 시간과  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리했을 시 세포가 분리되는 시간을 비교하였다. 실험결과 6시간 동안 DMEM-2 배지로 배양한 섬유아세포의 경우 60% 정도 부착을 하고 세포간의 연결도 약하여  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리할 경우 약 30~40초면 완전히 세포가 부유하기 시작하였다(Table 8). 6시간동안 DMEM-2 배지로 배양한 상피세포의 경우는 80% 정도 부착을 하였으나 섬유아세포에 비교하면 세포간의 연결이 더

단단하여 약 50~60초간  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하여야 세포가 완전히 부유하였다. 12시간동안 배양한 섬유아세포와 상피세포는 모두 90% 이상의 부착률을 보였다. 하지만  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리 시 세포가 부유하는 시간에는 차이가 있었다. 섬유아세포는 2분 30초 정도 지나면 부유하기 시작하고 상피세포는 3분 30초 정도가 지나면 부유하기 시작하였다. 세포를 배양하고 18시간이 지나면 상피세포와 섬유아세포 모두 100% 가까이 부착을 하였고 상피세포의 세포질은 풍부해 졌지만 섬유아세포의 세포질은 상피세포에 비하여 풍부하지 못하였다.  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리할 경우 섬유아세포와 상피세포의 분리가 시작되는 시간의 차이는 30초 정도였다. 24시간이 지나면 섬유아세포와 상피세포는 모두 100% 가까이 부착을 하였다. 하지만  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리 시에는 섬유아세포와 상피세포의 분리 시작 시간은 20초 정도 차이를 보였다. DMEM-5를 사용하여 배양한 경우 6시간이 경과한 세포의 부착률은 80% 이상이었으며  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리 시에 세포분리가 이루어지는 시간은 섬유아세포가 3분 정도였다. 상피세포도 섬유아세포와 비슷한 결과를 보였으며  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리 시 세포가 분리되기 시작하는 시간은 3분 보다는 길었으나 큰 차이는 없었다. 12시간 이상 배양한 섬유아세포와 상피세포의 부착률은 100%였다.  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리할 경우 섬유아세포와 상피세포의 분리가 시작되는 시간에는 유의성 있는 차이는 없었다. MDCK-10을 사용하여 배양한 경우의 결과도 DMEM-5배지를 사용한 경우와 비슷한 결과를 나타냈다. 결과적으로 DMEM-2를 사용하여 배양을 하게 되면 섬유아세포와 상피세포의 분리가 시작되는 시간적 차이가 커지므로  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하여 두 종류의 세포를 분리하는데 더욱 유리하였다.

Table 8. Cell attachment rate and optimal time of Na<sub>2</sub>EDDA treatment to separate fibroblasts and epithelial cells

Using medium	6 hours <sup>a</sup>			12 hours		18 hours		24 hours				
	attachment rate(%)		Time <sup>b</sup> (sec)	attachment rate(%)		Time (sec)	attachment rate(%)		Time	attachment rate(%)		Time (sec)
	F <sup>c</sup>	E <sup>d</sup>		F	E		F	E		F	E	
DMEM-2 <sup>e</sup>	60	80	30	90	90	60	100	100	30	100	100	20
DMEM-5 <sup>f</sup>	80	80	20	100	100	10	100	100	0	100	100	0
DMEM-10 <sup>g</sup>	80	90	20	100	100	10	100	100	0	100	100	0

<sup>a</sup> Time of cell culture before Na<sub>2</sub>EDDA treatment

<sup>b</sup> Optimal time of Na<sub>2</sub>EDDA treatment to separate fibroblast and epithelial cells

<sup>c</sup> Fibroblasts

<sup>d</sup> Epithelial cells

<sup>e</sup> DMEM medium containing 2% fetal bovine serum

<sup>f</sup> DMEM medium containing 5% fetal bovine serum

<sup>g</sup> DMEM medium containing 10% fetal bovine serum

#### 4) 각 장기별 최적의 처리방법 실험

현재까지 실험된 결과를 바탕으로 초대배양한 각 장기에서 섬유아세포를 제거하기 위한 조건(Fig. 1)을 설정하였다. 초대배양을 하고 계대수가 4번인 세포에서 24시간 이후에 세포단층이 100%가 되도록 배양하고 1차로 0.01% Na<sub>2</sub>EDDA 처리하여 DMEM-2배지로 교환하여 6시간동안 배양한 후 2차로 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하는 것이었다. 2차 처리 후 섬유아세포의 제거가 완전하지 않으면 DMEM-2배지로 12시간 배양한 후 3차 처리를 하여 섬유아세포의 대부분

을 제거할 수 있었다(Fig. 7). 1차와 2차 그리고 3차까지 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하면 계대수가 4번 이하인 경우는 섬유아세포를 90% 이상 제거가 가능하였고 상피세포의 소실도 거의 없었다. 하지만 계대수가 증가한 상태에서 Na<sub>2</sub>EDDA처리를 하게 되면 섬유아세포의 제거율도 낮아지고 상피세포의 소실율도 증가하게 되었다. 이러한 결과는 초대배양 초기에 섬유아세포의 제거가 이루어져야 한다는 점을 보여준다.

### 3. 세포의 불멸화 및 불멸화세포 선별

#### 1) 레트로바이러스 벡터의 확인

초대배양세포를 불멸화하기 위한 레트로바이러스벡터를 제한효소를 사용하여 확인하였다(Fig. 8).

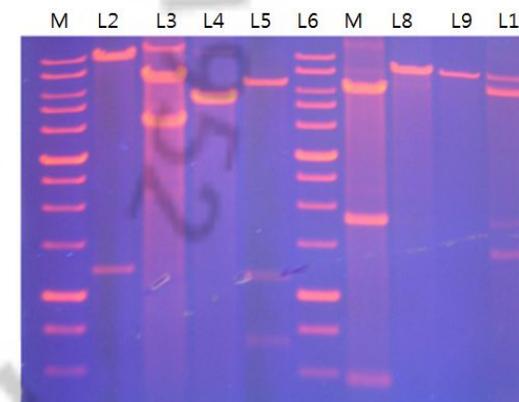


Fig. 8. PCR detection of retrovirus vector. M: 1kb Marker, lane L2: hTERT (Xba I, Hind III), lane L3: hTERT (Xcm I, Xba I), lane L4: hTERT (Afl II, Xba I), lane L5: hbmi-1 (Cla I, Hind III), lane L7: hbmi-1 (EcoR I, Cla I), lane L8: hbmi-1 (BamH I, Cla I), lane L9: hbmi-1 (Xba I), lane L10: hbmi-1 (Nde I, Xho I)

## 2) 불멸화 세포의 선별과 세포의 cloning

불멸화세포를 선별하기 위해 G418 (geneticin)을 배지에 500 ug/ml로 첨가하고 매일 G418이 첨가된 배지로 갈아주면서 2주일 정도 배양을 지속하였다. 살아남은 세포는 G418 농도를 반으로 줄인 배지를 이용하여 배양하면서 불멸화 여부를 확인하였다. 불멸화가 확인된 세포는 세포의 성장특성과 모양을 기준으로 장기별로 세포 type을 구별하여 cloning 하였다. 세포를 계대배양하면서 상피세포의 모양 유지, contact inhibition 현상, 복층(multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 관찰하여 세포가 암세포화 되었는지 그리고 상피세포의 특성을 유지하는 지를 확인하였다. Fig. 9는 불멸화된 소유래 세포의 모습이다. Fig. 9의 그림 A는 신장유래 상피 세포의 type-1 모습으로 2배수 분열에 3일이 걸렸다. 그림 B는 신장유래 상피 세포의 type-2 모습으로 2배수 분열에 2일이 걸렸고  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  처리시 가장 강하게 부착을 유지하였다. 그림 C는 신장유래 상피 세포의 type-3의 모습으로 신장 유래 세포들 가운데 가장 큰 세포질을 보유 하였으며 2배수 분열에 2일이 소요되었다. 그림 D는 인후두강 유래의 세포로 2배수 분열에 3~4일이 소요 되었고  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  처리시에 대부분이 탈락하였다. 그림 E는 소장 유래의 세포로 2배수 분열에 2~3일이 소요되었고  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  처리에도 강한 부착력을 보여주었다.

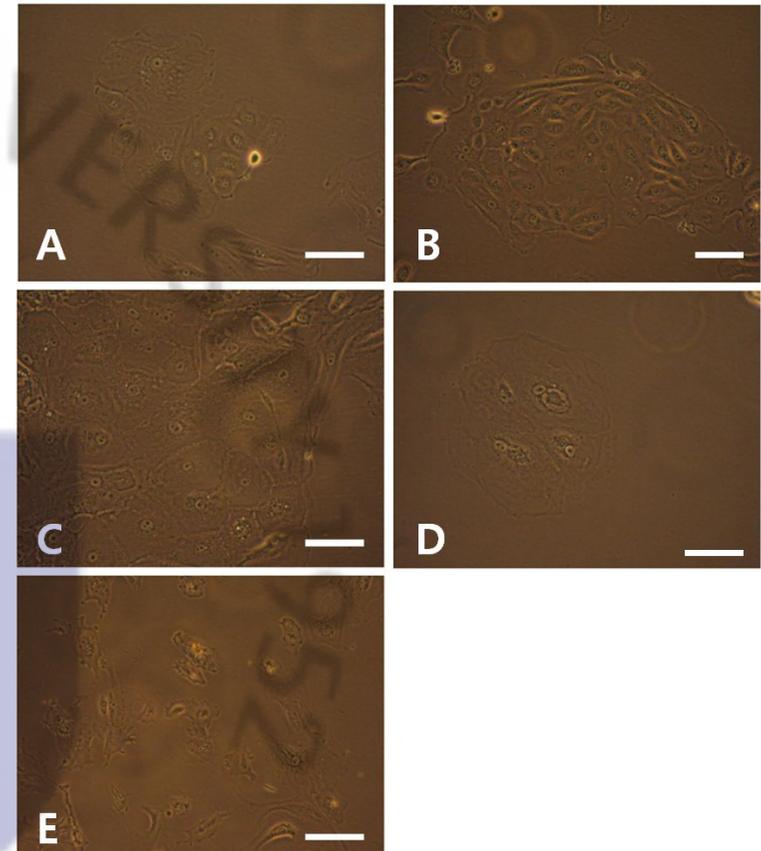


Fig. 9. Immortalized primary bovine epithelial cell lines. A: kidney type-1 cell line, B: kidney type-2 cell line, C: kidney type-3 cell line, D: oral cavity cell line, E: small intestine cell line. Scale-bar: 40  $\mu\text{m}$ .

#### 4. 세포특성 확인 및 구제역바이러스 감수성 검사

##### 1) 세포배양 가능 계대수의 측정

세포를 계대배양하여 30대 이상 계대가 가능한지, 그리고 3일 간격 1:3 비율로 계대배양 하면서 조사하였다. 대수증식기로부터 접촉에 의한 증식지해까지 2일에 한번에 3개의 well에서 검사하였고 대수증식기 이후 confluent로 된 후 증식곡선(Fig. 10, Fig. 11)과 제작된 세포주의 population doubling time (Fig. 12)을 검사하였다. 신장 유래 세포주의 대수증식기 이후 세포의 수는 신장 Type-2와 신장 Type-3가 가장 많았고 신장 Type-1과 신장 Type-4는 신장 초대배양 세포보다 낮은 세포수를 보였다. 다른 장기 유래의 세포주는 소장의 세포수가 가장 많았으며 폐가 가장 낮았다. 12일이 지나면서부터 대부분의 세포주에서 세포수의 감소가 관찰되었다. 제작된 세포주의 population doubling time은 Fig. 14에서 보는 바와 같이 신장 Type-2와 Type-3는 24세대까지 일정한 population doubling time을 보여주었다. 갑상선의 경우 30세대까지 일정한 시간을 유지하다가 한순간 세포주가 모두 사멸하는 현상을 나타내었다. 인후두강과 신장 Type-1 그리고 신장 Type-3은 population doubling time이 점점 증가하다가 더 이상 분열하지 못하고 사멸하였다.

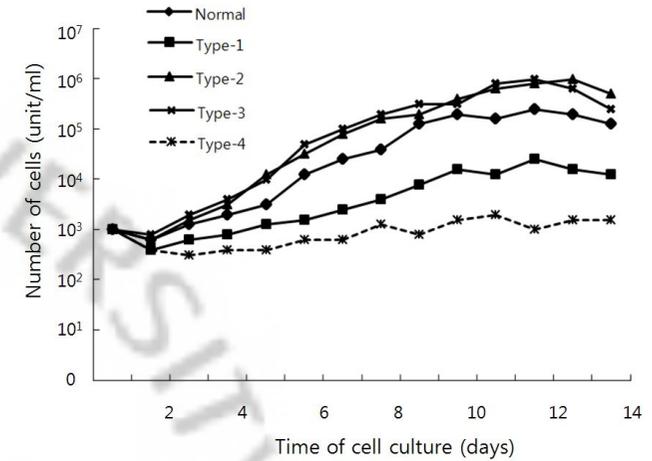


Fig. 10. The growth curve of immortalized bovine kidney cell lines.

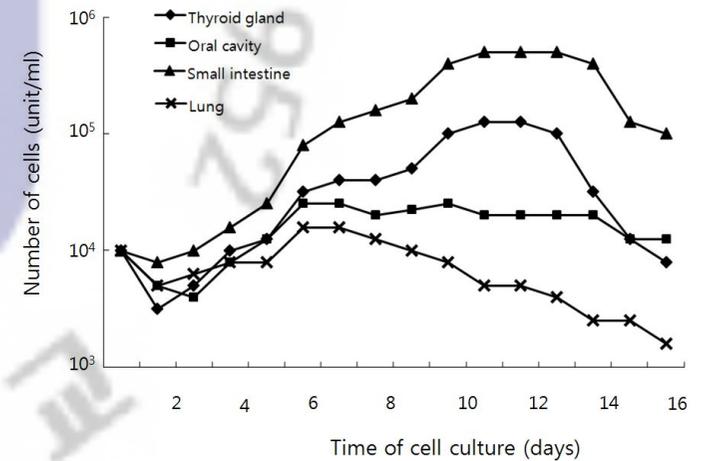


Fig. 11. The growth curve of immortalized primary bovine epithelial cell lines.

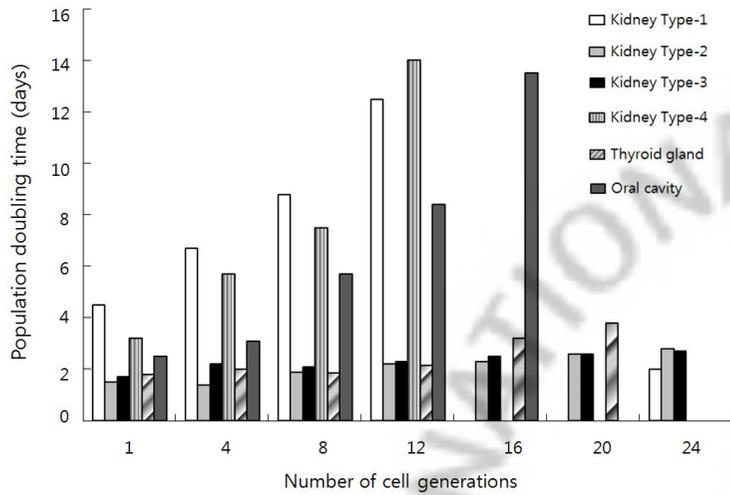


Fig. 12. The population doubling time of immortalized primary bovine epithelial cell lines.

### 2) Telomerase 발현양상 조사

불멸화 과정을 거친 세포들을 5세대별로 나누어 telomerase 발현양상을 Real Time PCR을 통하여 조사하였다(Fig. 13). 초대배양 세포의 telomerase 양이 가장 낮게 나왔으며 신장 Type-2와 신장 Type-3의 telomerase이 가장 높게 검사되었다. 제작된 세포주에서의 telomerase의 발현양상은 세포주의 세대에 따른 변화는 보이지 않았다. 초대배양세포와 인후두강 세포는 25세대까지 계대배양이 불가능 하였다.

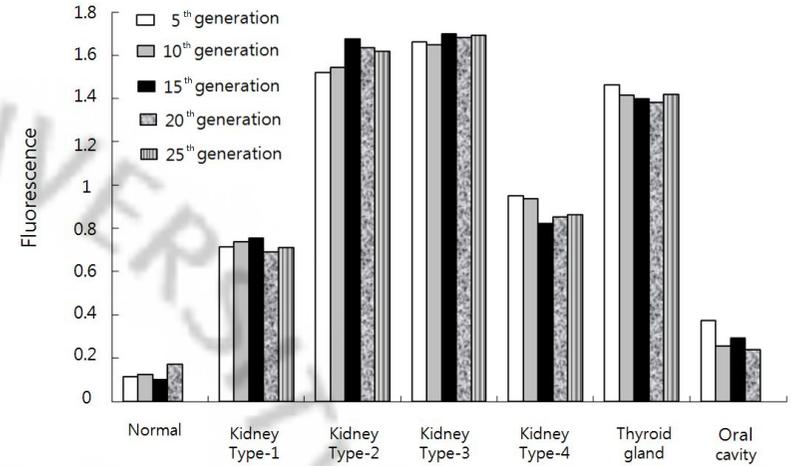


Fig. 13 Real-time PCR analysis of telomerase expression in immortalized primary bovine epithelial cell lines.

### 3) 염색체 검사

불멸화 과정을 거친 세포들을 5세대별로 염색체 검사를 하여서 암세포화가 되었는지 검사하였다. 세대가 증가하면서 염색체의 변화는 뚜렷하게 나타나지 않았다. Fig. 14는 불멸화된 신장 Type-2 세포주의 염색체표본이다.

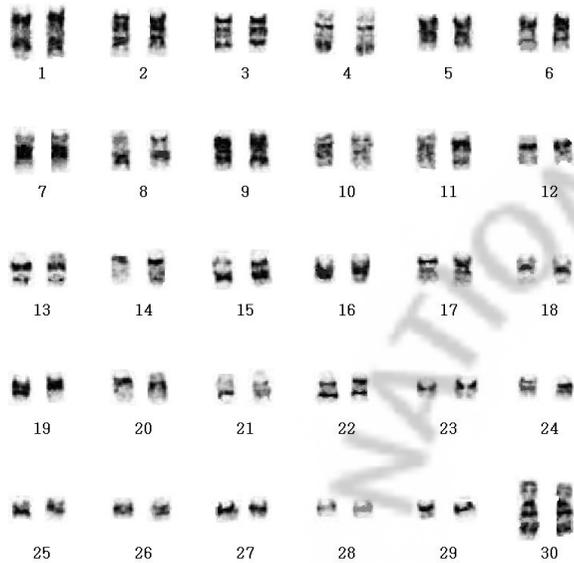


Fig. 14. The chromosome specimen of a immortalized primary bovine epithelial cell (kidney type-2).

#### 4) 배양특성 및 모양 관찰

세포를 계대배양하면서 상피세포의 모양 유지, contact inhibition 현상, 복층 (multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 현미경상으로 관찰한 결과 꾸준히 상피세포의 모양을 유지하였으며 contact inhibition 현상으로 인한 복층으로 증식하는 모습을 보이지 않았다.

#### 5) 잡균 및 바이러스 감염여부확인

불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염여부와 바이러스 감염여부를 PCR을 통하여 확인하였다. 마이코플라즈마 검사와 감염 바이러스의 종류는 fetal bovine serum의 일반적인 검사항목을 기준으로 하였다. 검사결과 모두 음성으로 나왔다 (Fig. 17, Fig. 18).

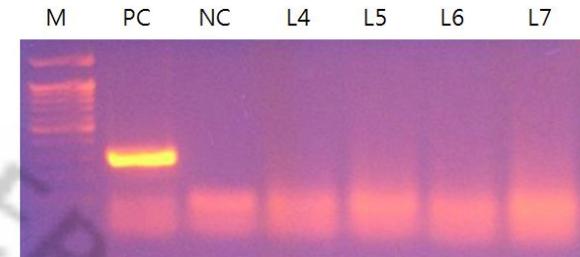


Fig. 15. PCR analysis of mycoplasma contamination in established cell lines. M: 100bp DNA marker , lane PC: positive control, lane NC: negative control, lane L4: kidney, lane L5: lung, lane L6: small intestine, lane L7: oral cavity.

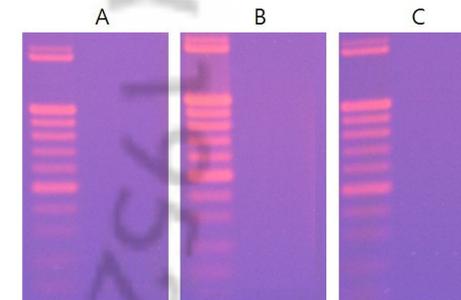


Fig. 16. PCR analysis of virus contamination in established cell lines. A: bovine herpesvirus (BHV), B: bovine viral diarrhoea virus (BVDV), C: bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3)

#### 6) 불멸화세포의 바이러스 감수성 검사

구제역바이러스에 감수성이 있는 대표적인 세포주인 IBRS-2와 제작 세포주의 바이러스 감수성을 비교하였다. 사용된 구제역바이러스 stain은 IBRS-2 세포에서 계대 배양되어 IBRS-2 세포에 순치되어있는 바이러스주임에도 불구하고 감염 24시간 이후의 TCID<sub>50</sub>/ml는 신장 Type-2 그리고 신장 Type-3에서

IBRS-2 세포보다 100배~1000배 높게 나왔다(Fig 19). 신장 Type-1과 신장 Type-4과 세포는 분열속도가 느려서 감수성 검사에 적합하지 않았다.

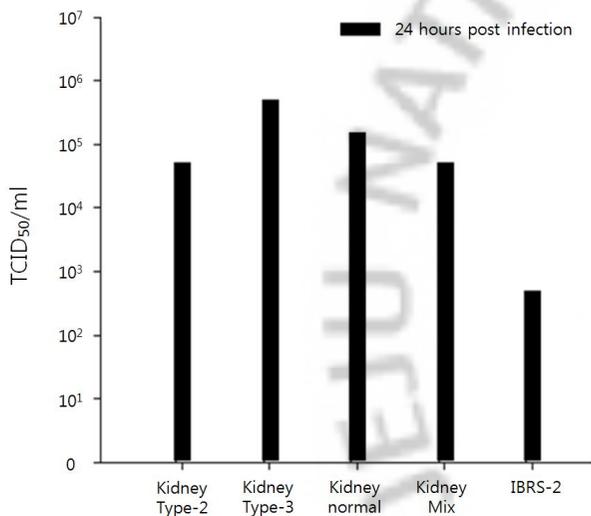


Fig 17. Susceptibility test of established cell lines for foot-and-mouth disease virus infection and propagation (tested in national veterinary research and quarantine service).

#### IV. 고 찰

구제역은 그 전염성이 아주 강하고 급속히 전파되기 때문에 세계 각국에서는 구제역의 확산을 막기 위해 살처분정책을 사용하고 있다. 따라서 구제역은 발생에 따른 직접적 피해(폐사, 성장지연, 생산성 저하, 번식장애 등)와 더불어 살처분에 따른 축산업계의 경제적 피해가 아주 크다고 할 수 있다. 이와 더불어 육류 소비의 저하와 관광산업의 위축 등 간접적 손실을 주고 사회적 혼란까지 야기할 수 있는 중요한 가축전염병이다.

구제역의 확산을 막기 위해서는 신속한 진단이 선행되어야 한다. 구제역 진단에 가장 효율적인 방법 중 하나는 감수성이 높은 세포에 검사재료를 접종하여 구제역바이러스를 검출하는 것이다. 현재 구제역바이러스 분리를 위해 돼지 친화계통바이러스는 돼지신장유래 세포주(IBRS-2), 소 및 기타 반추류 유래 바이러스는 햄스터세포주(BHK-21)나 소초대신장세포를 활용하고 있는데 햄스터세포주는 구제역바이러스에 대한 감수성이 떨어진다. 바이러스증식이 잘되는 소초대신장세포는 유효계대수가 짧아 바이러스의 진단에 오래 사용하기 어렵고 초저온 동결 후 해동 시 감수성이 떨어진다. 그러므로 구제역바이러스의 검출을 위해 필요할 때마다 새로운 초대배양세포를 빈번히 작성해야 하는데 초대세포작성에 필요한 신선한 소조직의 공급이 되어야한다는 문제점과 이로 인하여 진단이 신속하게 이루어지기 어렵다는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법으로 새로운 세포주의 작성이 시급하다. 하지만 새로운 세포주를 작성하기 위해서는 초대배양 및 불멸화를 위한 선행연구가 필수적으로 이루어져야 한다. 이를 위하여 소태아의 초대배양 방법의 정립과 초대배양 세포의 불멸화를 연구하였다.

조직을 구성하는 세포는 세포접착인자 등에 의해서 세포 상호간에 혹은 기질에 단단히 부착하고 있으므로 단일세포를 얻기 위해서는 이러한 결합을 단백질 분해효소를 사용하여 소화해야 한다. 단백질 분해 효소에는 trypsin, pronase, dispase, papain, pancreatin 등이 있는데 이러한 효소 중에 특히 collagenase는 collagen이 풍부한 중앙조직, 간, 폐 등의 조직에서 단일세포를 얻기 위해 많이 사용하고 있는데 trypsin과는 달리 세포독성이 적고 3시간이 넘는 처리시간에도

세포가 상해를 입지 않는 것으로 알려져 많은 학자가 추천을 하고 있다. 또한 박테리아에서 분리한 collagenase와 dispase는 혈청에 의해서 단백분해 기능이 억제되지 않기 때문에 혈청을 포함한 배지에서 사용이 가능하므로 혈청을 포함한 배지에서 세포분리 작업을 하면 세포의 생존율을 많이 높일 수 있다(Stenn 등, 1989; Fujita 등, 1992; Brandsch 등, 1998). 하지만 상피세포를 분리하기 위하여 이런 효소를 사용할 때 처리시간과 용량을 정확하게 결정하지 못하면 상피세포뿐만 아니라 조직을 구성하고 있는 여러 종류의 세포들 특히 섬유아세포의 분리 및 혼입이 다량으로 이루어지므로 정확한 처리 농도와 시간이 중요하다 할 수 있다.

초대배양을 위하여 조직을 잘게 자르게 되면 조직의 모세혈관에 있던 다량의 RBC가 유출되는데 그대로 효소 처리를 하여서 배양을 하게 되면 상피세포가 배양 용기에 부착하는 것을 RBC가 방해하게 되어서 결과적으로 상피세포의 배양이 실패하게 되는 원인이 된다. 특히 혈액을 많이 포함하고 있는 신장이나 폐 같은 조직은 RBC의 제거가 무엇보다도 중요하다. RBC의 파괴를 유도함으로써 RBC 제거에 많이 사용되는  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{HEPES}$  용액을(Juy 등 1979; Stähli 등 1980) 본 실험에도 사용하여 보았다. 그 결과 RBC의 제거에는 효과가 좋았으나 상피세포 자체의 생존율에 좋지 않은 결과를 보여주었다. 반면에 배지를 첨가하여 절편된 조직을 부유시킨 후 일정시간 정치시킴으로 조직이 가라앉게 한 후 상층액을 제거하는 회석법은 RBC의 제거에 있어서 비슷한 효율을 보였으며 상피세포의 생존율을 높이는 데도 훨씬 유리하다는 것을 알 수 있었다. 이는 절편된 조직에 배지를 첨가함으로써 pH와 삼투압의 안정적인 조절이 가능하고 영양분을 공급하여줌으로써 생존율이 올라간 것으로 판단이 된다. 또한 용액의 제조나 번거로운 처리과정이 없어서 조직의 처리 시간이 단축된 것도 한 원인이라고 생각된다.

조직에 효소를 처리하기 위한 최적의 조건은 Table 1에서 보는 바와 같이 장치의 종류에 따라서 시간과 농도가 약간씩 다른 것을 알 수 있다. 처리시간이 길어지면 섬유아세포의 급격한 혼입이 이루어지고 처리시간이 너무 짧으면 상피세포의 분리가 충분히 이루어지지 않는다. 일반적으로 소장외의 경우는 조직을 절편하지 않고 간(liver)의 효소처리 경우와 같이 내장에 주사기 등을 사용하여 단백질

분해 효소를 채우는 방법을 많이 사용한다(Zhao와 Duncan, 2005; Mansuroglu 등, 2009). 하지만 대형동물의 소장이나 마우스의 간처럼 내장에 주사기 바늘을 삽입하기 용이한 경우에는 상관이 없으나 동물태아의 소장에 이용하는 경우는 1 ml 주사기와 바늘을 사용한다 하더라도 장기 자체가 아주 연약하고 내강 또한 협소하기 때문에 바늘의 삽입이 어려운 점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 소장조직을 일반 장기처럼 잘게 소분한 후 효소처리를 한 결과 내강에 효소를 충전 하였을 때 보다 상피세포가 많이 분리되는 결과를 얻었다. 이는 효소가 작용할 면적이 증가하여서 상대적으로 더 많은 상피세포의 분리가 이루어지도록 하였고, 효소 처리 후 피켓팅으로 인한 기계적인 세포의 유리가 가능하여서 결과적으로 분리되는 상피세포의 양이 늘었다고 판단이 된다. Mincing에 의한 효소처리의 조건을 잘 설정하면 섬유아세포가 같이 분리되는 것을 최소화 하여 장상피세포만을 선택적으로 분리하는 것이 가능하므로 내강에 효소를 충전 하는 수고를 덜 수 있었다. 초대배양된 세포는 각장기별로 성장특성이 달랐다. 상피세포의 분열속도가 빠른 신장과 소장의 경우 1차 초대배양 시 세포의 양이 늘었지만 분열속도가 느린 뇌의 경우는 세포의 양이 많이 늘지 않은 것을 볼 수 있었다.

본 연구에서 제시한 효소의 처리 농도와 시간은 소분된 조직의 크기와 실험을 수행하는 연구자의 숙련도에 따라서 달라질 수 있다. 조직의 소분은 수술용 칼이나 안과용 가위 등으로 가능한 절단면을 매끈하게 하는 것이 중요하다. 둔탁한 기구를 사용하면 세포에 압력이 가해져서 세포를 상하게 할 수 있다. 본 연구결과를 바탕으로 다양한 동물의 태아와 장기에서 상피세포의 초대배양이 가능하다고 판단된다.

초대배양을 할 때 문제가 되는 섬유아세포를  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 와 농도가 낮은 FBS를 함유한 배지를 이용하여 효율적으로 제거하는 방법을 찾고자 하였다. 본 연구의 결과  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 시간별로 처리하면서 농도가 낮은 배지를 첨가하여 세포를 배양하면 90% 이상의 섬유아세포를 제거 할 수 있는 결과를 얻었다. Drewa 등(2006)이 발표한 논문에서 따르면  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 는 세포간의  $\text{Ca}^{2+}$  결합 사이에 들어가서 섬유아세포의 결합을 효과적으로 저해 할 수 있다고 하였다. 배양 시에 세포가 서로 결합하는 많은 형식중의 하나인 anchorage결합에 의한 세포 간 결합

(Yonemura 등, 1995)은 매우 강한테 이 결합은 상피세포가 섬유아세포보다 더  
욱 더 풍부하게 가지고 있다(Niederauer 등, 1994; Vasioukhin 등, 2000). 이로  
인해  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리할 경우 상피세포가 섬유아세포보다 더욱더 오랜 시간 배  
양 용기에 붙어 있을 수 있게 한다. 또한 FBS의 농도에 따라서 세포간의 결합이  
달라지는 것(Boisseau 등, 1992)을 이용하여 낮은 FBS의 농도에서 배양한 결과  
효율적으로 세포를 분리할 수 있었다고 사료된다.

섬유아세포를 제거할 때 DMEM-10 배지로 세포를 배양한 후 세포단층이 24  
시간 후에 100% 이상이 되도록 하는 것이 상피세포가 섬유아세포와 함께 분리  
되는 비율을 낮출 수 있었다. 이는 세포들을 밀집하여 자라게 하면 상피세포들이  
서로 결합하고 있는 힘이 강해져서  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리에 섬유아세포보다 효과적으로  
저항을 할 수 있기 때문이라고 사료된다. 1차 처리를 하면 섬유아세포의 대부분  
이 제거되지만 상피세포와 접하고 있는 경계부근의 세포들은 박리가 이루어지지  
않는다. 1차 처리 후에 6시간이 경과하여 2차 처리를 하면 상피세포와 섬유세포  
가 만나고 있는 경계 부근의 섬유아세포가 탈락되어 나오는 것을 볼 수 있었다.  
2차 처리 시간이 12시간을 넘어가게 되면 상피세포와 접하고 있는 섬유아세포의  
탈락은 일어나지 않았다. 2차 처리 후 12시간 이내에 3차 처리를 하게 되면 대  
부분의 상피세포가 섬유아세포와 함께 분리가 되는 현상이 발생한다. 3차 처리  
는 상피세포들 간의 세포연결은 충분히 회복되지만 섬유아세포의 세포들 간 연  
결이 느슨한 시기인 12시간~24시간 사이에 하는 것이 가장 유리하였다.

실험적 방법에 대한 제언을 하자면,  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리를 할 때 섬유아세포의 분리  
가 이루어지기 시작하는 시간과 상피세포의 분리가 시작되는 시간의 차이가  
30~50초로 매우 짧으므로  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리를 하면서 현미경으로 세포의 상태를  
계속 살펴보아야 한다.  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리 후 현미경을 통하여 계속 관찰하면 섬유아  
세포의 넓고 길쭉한 세포질이 수축하는 모습을 관찰 할 수 있는데, 섬유아세포가  
완전히 수축하여 서로 뭉치게 되는 시점에 배양 용기를 살짝 흔들거나 손으로  
쳐서 충격을 주면 쉽게 분리를 시킬 수 있다. 1차로 섬유아세포를 분리할 때 많  
은 양을 한꺼번에 제거하기 위하여 상피세포의 세포질이 수축하기 시작하고 나  
서도 계속하여  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리를 하면 어느 한 순간 상피세포의 대부분이 배양용  
기에서 분리가 되므로 상피세포의 세포질이 변화를 시작되면 FBS가 충분히 첨

가된 배지를 이용하여 세척을 하여야 한다. 너무 강하게 세척을 하면 상피세포가  
탈락하므로 세척 시에는 피펫에서 나오는 배지가 배양 용기에 바로 닿지 않도록  
말았거나 옆면의 벽면을 이용하여 흘러주어야 한다.  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 이용하여 초대  
배양세포에서 섬유아세포를 제거하는 실험은 어느 정도 충분한 경험과 기술적인  
노하우를 필요로 하는 것이 사실이다. 초대배양 시 계대수가 증가함에 따른 섬유  
아세포의  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 에 대한 저항성이 더 큰 인자로 작용하므로 효율적으로 섬유  
아세포를 제거하기 위해서는 적어도 8번 계대(약 15세대)하기 전에  $\text{Na}_2\text{EDDA}$   
처리를 시행하여야 한다. 결론적으로 본 연구에서는 1차와 2차 그리고 3차에 걸  
쳐서  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하는 조건을 제시하여 효율적으로 섬유아세포를 제거할  
수 있는 방법을 제시하였다. 이는 기존 초대배양 시 가장 큰 문제 중 하나였던  
섬유아세포의 우점현상을 해결 할 수 있는 실험방법으로 다양한 동물과 장기에  
서 사용이 가능할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 최종적으로 구제역바이러스에 대한 감수성이 유지되고 연속배  
양이 30대 이상 가능하여 신속한 바이러스의 검출에 숙주세포로 사용될 불멸화  
된 구제역바이러스에 감수성이 있는 소유래 세포주를 작성하고자 하였다. 제작  
된 세포주의 telomerase 발현양상조사, 세포모양 관찰, 세포배양 유효 계대수  
측정, 염색체 검사, 마이코플라스마등 잡균 감염검사와 바이러스 감염검사를 통  
하여 후보 세포주를 선정하고 선정된 후보 세포주에 대한 구제역바이러스 감수  
성 검사를 통하여 최종 후보주를 선택하였다.

제작된 세포주의 telomerase 발현양상을 Real-Time PCR을 통하여 조사한  
결과 신장 Type-2 세포주와 신장 Type-3 세포주에서 높은 fluorescence 값이  
나왔으며 25세대까지 지속적으로 telomerase가 발현되는 것을 볼 수 있었고, 세  
포 유효 계대수를 측정한 결과 25세대까지 비교적 일정한 분열속도를 보였으며  
염색체의 큰 변화도 보이지 않았다. 실험동안 오염이나 소 태아 자체의 오염 여  
부를 알아보기 위한 잡균 감염 실험과 바이러스 감염 실험에서 제작된 세포주  
모두 음성이 나왔다.

구제역바이러스에 감수성이 있을 것이라고 생각되는 유력한 세포주인 신장  
Type-2 세포주와 신장 Type-3 세포주를 불멸화를 하지 않은 일반 세포와 일  
반적으로 구제역바이러스에 감수성이 있다고 알려진 IBRS-2 세포주를 각각 구

제역바이러스의 감수성 검사결과 바이러스 접종 24시간 후 신장 Type-2 세포주와 Type-3 세포주 그리고 일반신장 세포에서 IBRS-2 세포주 보다 100~1000배 정도 높은 TCID<sub>50</sub>/ml를 보였다. 이는 제작된 신장 T2 세포주와 신장 T3 세포주가 불멸화가 되면서 일반세포가 가지고 있는 생물학적 특성을 그대로 유지하였음을 보여준다. 또한 제작된 세포주가 기존에 사용하던 IBRS-2 세포주에 비하여 100배 이상 더 높은 titer를 보임으로서 구제역바이러스의 조기 분리와 감수성 검사를 한층 더 발전시킬 것으로 예상되어진다.

제작된 세포주를 이용하면 구제역 발생 초기에 신속한 바이러스의 검출과 연구에 많은 도움이 될 것이라고 판단이 되고, 구제역 백신의 개발에 있어 중요한 요소 중 하나는 바이러스를 고역가로 생산할 수 있는 세포주의 확보라 할 수 있는데, 구축된 세포주는 이에 적합하고 또한 바이러스의 연속적 계대배양을 통하여 약독화 바이러스를 생산하는데도 적합하여 백신개발에 필요한 숙주세포로 활용이 가능하리라 판단된다. 또한 암세포가 아닌 정상 상피세포의 특성을 간직하고 있는 제작된 세포주를 앞으로 더 다양한 소유래 바이러스의 감수성 검사를 거쳐서 바이러스 검출용 숙주 세포주 혹은 바이러스 생산용 세포주로 사용이 가능할 것이다.

## V. 참고문헌

- 생물·생명공학의약품의 분자시험법 확립에 관한 연구, pp180-209. 동물세포주 배양 원료물질에서 바이러스 검출(김인섭). 식품의약품안전청.
- Benya, R.V., Schmidt, L.N., Sahi, J., Layden, T.J., Rao, and M.C. (1991) Isolation, characterization, and attachment of rabbit distal colon epithelial cells. *Gastroenterology*. 101(3), 692-702.
- Boisseau, A.M., Donatien, P., Surlève-Bazeille, J.E., Amédée, J., Harmand, M.F., Bézian, J.H., Maleville, J. and Taieb, A. (1992) Production of epidermal sheets in a serum free culture system: a further appraisal of the role of extracellular calcium. *J. Dermatol. Sci.* 3(2), 111-120.
- Brandsch, C., Friedl, P., Lange, K., Richter, T. and Mothes, T. (1998) Primary culture and transfection of epithelial cells of human small intestine. *Scand. J. Gastroenterol.* 33(8), 833-838.
- Cao, S., Wang, F., Chen, Z., Liu, Z., Mei, C., Wu, H., Huang, J., Li, C., Zhou, L. and Liu, L. (2009) Isolation and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 311(5), 368-376.
- Civiale, C., Paladino, G., Marino, C., Trombetta, F., Pulvirenti, T. and Enea, V. (2003) Multilayer primary epithelial cell culture from bovine conjunctiva as a model for in vitro toxicity tests. *Ophthalmic Res.* 35(3), 126-136.
- Crabtree, J.E., Heatley, R.V. and Losowsky, M.L. (1989) Immunoglobulin secretion by isolated intestinal lymphocytes: spontaneous production and T-cell regulation in normal small intestine and in patients with

coeliac disease. *Gut*. 30(3), 347-354.

Drewa, T., Szymkowska, K., Włodarczyk, Z., Sir, I. and Kierzenkowska-Mila, C. (2006) Does the presence of unwanted dermal fibroblasts limit the usefulness of autologous epidermal keratinocyte grafts? *Transplant Proc.* 38(9), 3088-3091.

Fujita, Y., Kobayashi, M., Kobayashi, K. and Hoshino, T. (1992) Comparison of the effect of a proteolytic enzyme dispase and a chelator for the preparation of epidermal sheet from nude mice. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*. 41(2), 70-75.

Haga, K., Ohno, S., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Fujita, M., Sakamoto, M., Galloway, D.A. and Kiyono, T. (2007) Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci.* 98(2), 147-154.

Haruo, N., Toru, T., Kei, I. and Kazuyoshi, H. (2000) Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. *Cell Tissue Res.* 303, 263-270.

Hideaki, I., Taisuke, M.i, Satoshi, G., Tohru, K., Tomoyasu, S., Ryotaro, I., Takao, I., Jun-ichi, H., Yoshiaki, T. and Akihiro, U. (2003) Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Experimental Cell Research*. 288, 35-50.

Juy, D., Legrain, P., Cazenave, P.A. and Buttin, G.A. (1979) New rapid rosette-forming cell micromethod for the detection of antibody-synthesizing hybridomas. *J. Immunol. Methods*. 30(3),

269-275.

Kei, H., Shin-ichi, O., Takashi, Y., Narisawa-Saito, M., Masatoshi, F., Michiie, S., Denise, A., Galloway and Tohru, K. (2006) Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci.* 98, 147-154.

Leung, D.W., Lindlief, L.A., Laabich, A., Vissvesvaran, G.P., Kamat, M., Lieu, K.L., Fawzi, A. and Kubota, R. (2007) Minocycline protects photoreceptors from light and oxidative stress in primary bovine retinal cell culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48(1), 412-421.

Mansuroglu, T., Dudás, J., Elmaouhoub, A., Joza, T.Z. and Ramadori, G. (2009) Hepatoblast and mesenchymal cell-specific gene-expression in fetal rat liver and in cultured fetal rat liver cells. *Histochem. Cell Biol.* 132(1), 11-19.

Marianne, E., Lehnert, Jose, L., Jorcano, Juergen, K. and Franke. (1984) Characterization of bovine keratin genes: similarities of exon patterns in genes coding for different keratins. *EMBO j.* 13, 3279-3287.

Modéer, T., Dahllöf, G. and Otteskog, P. (1988) Potentiation of fibroblast spreading by extracellular matrix from fibroblasts derived from phenytoin-induced gingival overgrowth. *Acta Odontol. Scand.* 46(2), 101-104.

Niederauer, G.G., McGee, T.D., and Keller, J.C. (1994) Attachment of epithelial cells and fibroblasts to ceramic materials. *Biomaterials*. 15(5), 342-352.

Panja, A., Barone, A. and Mayer, L., (1994) Stimulation of lamina propria lymphocytes by intestinal epithelial cells: Evidence for

recognition of nonclassical restriction elements. *J. Exp. Med.* 179(3), 943-950.

Robert, K., Naviaux, Eugenia, C., Martin, H., Inder, M. and Verma. (1996) The pCL Vector System: Rapid Production of Helper-Free, High-Titer, Recombinant Retroviruses. *J virology.* 70, 5701-5705.

Sashikumar, A., and Desai, P.V. (2008) Development of primary cell culture from *Scylla serrata*: Primary cell cultures from *Scylla serrata*. *Cytotechnology.* 56(3), 161-169.

Sato, G. (2008) Tissue culture: the unrealized potential. *Cytotechnology.* 57(2), 111-114.

Satoru, K., Mitsuhiro, N., Tohru, K., Yoshiko, M., Taro, K., Masaaki, T., Noriyuki, Y. and Masaki, I. (2003) Successful immortalization of Endometrial Glandular Cells with Normal Structural and Functional Characteristics. *American Journal of Pathology.* 163, 2259-2269.

Stähli, C., Staehelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J. and Häring, P. (1980) High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *J. Immunol. Methods.* 32(3), 297-304.

Stenn, K.S., Link, R., Moellmann, G., Madri, J. and Kuklinska, E. (1989) Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J. Invest. Dermatol.* 93(2), 287-290.

Strange, K., Christensen, M. and Morrison, R. (2007) Primary culture of *Caenorhabditis elegans* developing embryo cells for electrophysiological, cell biological and molecular studies. *Nat. Protoc.* 2(4), 1003-1012.

Takeshi, O., Tomoki, A., Tomitaka, N., Takeharu, N., Taisuke, H., Koichi, N., Takashi, N., Tohru, K. and Junya, T. (2002) Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 295, 354-361.

Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. and Fuchs, E. (2000) Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell.* 100(2) 209-219.

Yonemura, S., Itoh, M. and Nagafuchi, A. (1995) Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* 108(1), 108-127.

Yukiji, Takeda., Taisuke, Mori, Hideaki, I., Tohru, K., Satoshi, G., Shunichirou, M., Naoko, H., Makoto, I., Kaoru, Segawa, Satoshi, O., Michiie, S., Shinobu, Nakamura and Akihiro, U. (2004) Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?. *J Gene Med.* 6, 833-845.

Zhao, R. and Duncan, S.A. (2005) Embryonic development of the liver. *Hepatology.* 41(5), 956-967.

## Abstract

### Immortalization of bovine primary epithelial cells for isolating foot-and-mouth disease virus

Kyong-Leek Jeon

(Supervised by Professor Kyu-Kye Hwang)

College of Veterinary Medicine,  
Graduate School, Jeju National University,  
Jeju, Korea

Immortalized primary bovine epithelial cell lines which were sensitive to detect foot-and-mouth disease virus (FMDV) have been established by primary culturing of bovine fetal kidney, thyroid gland and laryngo-pharyngeal tissues. Epithelial cells were separated after removing fibroblasts by Na<sub>2</sub>EDDA treatment because fibroblast were not susceptible for the detection of FMDV. Each cell lines have been tested for normality by chromosome analysis, culturing patterns, shape, microorganism contamination test, and propagation potency by checking population doubling time until 25 passages. T2 and T3 cell lines (kidney epithelial cells) were continuously grown without remarkable decreasing of growth rate and steadily expressed telomerase reverse transcriptase.

T2 and T3 cell lines were about 100-times more sensitive to produce FMDV than IBRS-2 (control cell line) at 24 hours post infection. Conclusively, T2 and T3 cell lines have been proved as immortalized primary epithelial cells with normal features and high susceptibility for FMDV.

---

Keywords: Foot-and-mouth disease, primary cell, immortalization, epithelial cell, susceptibility, cattle

## 감사의 글

저의 부족하기만 한 노력이 결실을 맺었습니다. 성경책 창세기에는 ‘내가 배  
게 허락한 것을 다 이루기까지 너를 떠나지 아니하리라’는 말씀이 있습니다.  
이 논문을 시작으로 작은 열매를 하나씩 수확하려고 합니다. 앞으로 계속 이루  
어질 저의 연구에 조그마한 디딤돌이 되었으면 합니다.

너무나도 부족한 저를 받아주시고 오랜 기간 지속적인 사랑과 지혜로 학문의  
길을 밝혀주신 황규계 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 본 논문을 정성  
껏 다듬어 주시고 심사해주신 임윤규 교수님 그리고 지영훈 교수님께도 진심으  
로 감사의 말을 드립니다.

항상 따뜻한 모습으로 조언과 도움을 주셨던 이영계 교수님과 주홍구 교수님  
께도 깊은 감사를 드립니다.

논문이 완성될 수 있도록 도와주신 국립수의과학검역원 조인수 해외전염병과  
장님과 이광녕 선생님 그리고 연구를 위해 아낌없이 재료를 제공해 주신 제주  
도 도축장 김으뜸 수의사에게도 감사를 드립니다.

실험실에서 생활하면서 많은 도움과 응원을 해주시던 정진형, 인식형, 정현형  
그리고 실험실 활력소였던 순범형과 형석이, 힘든 일이 있을 때마다 찾아가면  
따뜻한 커피와 격려를 안겨주던 원영이, 우리 예방수의학 실험을 지켜 주고 있  
는 태형이, 은진이, 상이, 민호, 준영이 그리고 항상 열심히 정현이, 고마운 마  
음과 함께 미안한 마음이 더 앞서는 지혜 아울러 예방수의학 실험실 선후배님  
들께 너무너무 고맙고 감사하다는 말씀을 드립니다.

또한 어려움과 고난을 함께 나눈 친구이자 동기들, 선배, 후배 그리고 저에게  
애정과 용기를 주었던 모든 이들에게도 감사드립니다.

마지막으로 언제나 나의 편에 서서 한결같은 사랑과 믿음 그리고 아낌없는 투  
자를 해주신 아버지와 어머니께 가슴 깊이 감사드리고, 이 논문이 나오기 까지  
많은 격려와 도움을 준 누나에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

이제 석사의 길에서 한발 더 나아가 수의학 박사를 위해서 쉽지 않은 길을 가  
려고 합니다. 아무리 험난하고 어려운 길이 이 앞에 기다리고 있다고 하여도 지

금까지 저를 믿고 기다려준 많은 분들을 위하여 힘차게 나아가려고 합니다. 주  
위의 모든 분들을 실망시키는 일이 없도록 더욱더 노력하는 사람이 되겠습니다.

아버지! 아버지의 크신 사랑 덕분에 이 논문이 완성이 되었습니다.