



주요 병원균 자극에 의한 닭의 Interleukin-34 발현 분석 비교

홍 영 호[†]

중앙대학교 동물생명공학과 교수

Expression Analysis of Chicken Interleukin-34(IL-34) for Various Pathogenic Stimulations

Yeong Ho Hong

Professor, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Republic of Korea

ABSTRACT Recently, interleukin 34 (IL-34) was identified as the second functional ligand for macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFR). IL-34 functions similarly to M-CSF through its binding to the M-CSFR. There is still insufficient information on IL-34 in chickens, which has until now been reported only through predicted sequences and not through experimental research. Thus, to confirm its expression and to determine its potent biological activity, several chicken lines and cell lines were used. Cloning of recombinant chicken IL-34 and M-CSF genes was performed to investigate their modulatory effects on proinflammatory cytokine expression *in vitro*. The expression levels of IL-34, M-CSF, and M-CSFR genes were upregulated in broiler chickens with leg dysfunction (cause unknown). However, IL-34 was downregulated in most pathogen-stimulated tissues. M-CSFR expression was enhanced by recombinant IL-34 and M-CSF proteins *in vitro*. IFN- γ expression was enhanced by recombinant IL-34, but not by M-CSF. However, IL-12 expression was not regulated in any of the treated cells, and IL-1 β was decreased in all tissues. These results indicate that IL-34 and M-CSF have roles in both the classical and alternative macrophage activation pathways. Collectively, our findings demonstrate the expression of IL-34 in chickens for pathogenic trials, both *in vitro* and *in vivo*. Our results suggest that the IL-34 protein plays a role in both pro- and anti-inflammatory functions in macrophages. Therefore, further research is needed to determine the cytokines or chemokines that can be induced by IL-34 and to further elucidate the functions of IL-34 in the inflammatory pathway.

(Key words: chicken, IL-34, necrotic enteritis, *S. Enteritidis*, LPS)

서 론

대식세포(macrophage)는 내피와 조직구(histocytes)에 있으며, 주로 식균 작용에 관여한다(Van Furth et al., 1972). 단핵식세포계(mononuclear phagocyte system, MPS)는 수상돌기세포(dendritic cells)와 후에 혈액단핵세포로 분화하여 대식세포가 되는 골수의 전구세포로 정의할 수 있다(Hume et al., 2002). 대식세포는 척추동물의 모든 조직에 염증을 촉진하는 곳에서 중요한 기능을 갖는다(Geissmann et al., 2010). 대식세포의 발달은 대식세포 집락 자극 인자(M-CSF, colony stimulating factor 1(CSF1))가 필요한데, 골수 전구 세포에 있는 MCSF 수용체(M-CSFR, 또는 CSF1R)에 대한 결합을 통해 이루어진다(Mouchemore and Pixley, 2012). 대식세포

는 면역 및 상처 치유 기능을 통해 거의 모든 질병, 특히 암 및 비만과 같은 만성 질환에서 중요한 조절기능을 갖는다(Pollard, 2009). 최근의 CSF에 대한 연구는 치료의 특정 표적화를 위한 기회를 줄 수 있으며(Hamilton, 2008), M-CSF의 효과는 세포 표면 수용체인 M-CSFR에 의해 매개되며, homodimer 또는 heterodimers로서 리간드-수용체 결합을 통하여 신호 전달 조절 역할을 한다(Chen et al., 2008).

최근에 IL-34는 포유류, 조류, 그리고 어류에서 M-CSFR에 대한 두 번째 기능적 리간드로 확인되었다(Haishan Lin, 2008; Garceau Valerie et al., 2010; Wei et al., 2010; Wang and Colonna, 2014). M-CSFR 유전자는 대식세포에서 발현되며, IL-34 및 M-CSF 리간드는 대식세포 증식을 촉진할 수 있다. 수용체와 두 리간드의 공진화(co-evolution)에 대한 분

[†] To whom correspondence should be addressed : yhong@cau.ac.kr

석은 수용체와 리간드가 서로 다른 위치에서 독립적으로 결합할 수 있음을 나타낸다(Garceau Valerie et al., 2010).

인터루킨(IL)은 면역 체계에서 중요한 역할을 하는 사이토카인 그룹으로, 림프구 및 기타 세포의 성장, 이동성 및 분화를 조절하여 염증과 면역을 조절한다. IL-34는 특별히 비장 조직에서 발현되며, 인간 단핵구 생존을 지원하고 대식세포 형성을 촉진한다(Chemel M et al., 2012; Hwang et al., 2012). IL-34(IL34^{LacZ/LacZ} mice)는 접촉 과민증을 촉진하는 랑게르한스 세포와 바이러스 감염과 관련된 손상으로부터 중추 신경계를 보호하는 미세아교세포(microglia)에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Wang and Colonna, 2014). IL-34는 분비된 단백질 라이브러리의 기능적 스크리닝을 통해 확인되었으며(Haishan Lin, 2008), 이 사이토카인은 M-CSFR을 통해 대식세포의 분화와 생존을 촉진한다. 그리고 M-CSFR에 대한 결합을 통해 IL-34는 M-CSF와 유사한 기능을 공유한다. 또한 이 두 사이토카인은 사람의 혈액내 케모카인의 발현을 유도하고(Eda et al., 2010), 대식세포의 항상성을 유지해주는 역할도 한다(Munoz-Garcia et al., 2021). M-CSF 프로모터의 제어 하에 IL-34는 뼈 및 조직의 대식세포를 복구할 수 있다(Wei et al., 2010).

IL-34 mRNA는 심장, 뇌, 폐, 간, 신장, 비장, 흉선, 고환, 난소, 소장, 전립선, 결장을 포함한 성인 인간 조직에서 광범위하게 발현된다(Haishan Lin, 2008). IL-34와 M-CSF의 발현은 IL-1 β 및 TNF- α 신호전달과 같은 전염증성(proinflammatory) 사이토카인에 의해 유도되며, M-CSF는 최근 닭(Garceau et al., 2015; Garcia-Morales et al., 2014)과 금화조(zebra finch)(Garceau Valerie et al., 2010)에서 발견되었다.

본 연구에서 포유류와 조류의 IL-34에 대한 유사성을 분석하고, 닭의 다양한 병원균 감염 조직 및 세포주에서 IL-34의 발현을 비교 분석하였다. 또한 시험관 실험(*in vitro*)에서 M-CSFR 리간드인 M-CSF와 함께 IL-34의 발현을 관찰하였으며, 두 개의 리간드가 LPS에 의해 차등적으로 발현되고 조절된다는 것을 보고하였다. 그리고 *E. coli*로부터 정제된 재조합 닭 IL-34 및 M-CSF는 닭 대식세포 세포주에서 M-CSFR의 발현을 촉진하는 강력한 생물학적 활성을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 공시 동물 및 분석 시료

중앙대학교 사육실에서 5주령 ROSS 308 육계 수컷(양지

부화장, 평택) 중 독립적으로 설 수 없는 관절 이상 개체 4마리와 정상적인 개체 4마리에서 흉선, 비장, 소장, 맹장 및 총 배설강 등의 조직에서 RNA를 추출하여 사용하였다. ADOL 6.3, ADOL 7.2 line(Avian Disease and Oncology Laboratory, USDA-ARS), 그리고 White Leghorn 닭의 각 조직 total RNA를 미국 농무성 ARS의 ABBL(Animal Biosciences and Biotechnology Laboratory, Beltsville, MD)에서 공여 받았다. 2개의 근친 계통인 ADOL 6.3(resistant)과 7.2(susceptible) 계통은 avian leucosis virus과 Marek's disease virus에 저항성 및 감수성 계통으로 육종되었으며(Bacon et al., 2000), 이 계통을 이용하여 21일령에 *E. maxima* strains(10^3 to 10^4 oocysts/bird) 감염 후, 5일 후에 *C. perfringens*(1×10^9 cfu/bird)을 추가 감염시켜 괴사성 장염(necrotic enteritis, NE)을 유도하여 비장(spleen) 및 소장(small intestine) 조직을 추출하였다(Lee et al., 2011). 6개월령의 White Leghorn에 *S. Enteritidis*(1×10^8 CFU/bird) 감염 7일 후에, 폐(lung), 난소(ovary), 소장, 비장, 간(liver), 흉선(thymus), 그리고 난관(oviduct) 조직을 추출하였다. 모든 실험은 Beltsville Agricultural Research Center의 Institutional Animal Care and Use Committees의 승인 하에 수행되었다. 1일령 ROSS 육계는 무항생제/무항콕시든통제의 사료와 물을 무제한 급여하였으며, 실험 동안 일정한 광원 하에 관리되었다. *E. coli* O111:B4 유래의 Lipopolysaccharides(LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)는 phosphate-buffered saline(PBS, equivalent to 1 mg/ml)에 희석하여 사용하였다. 2주령의 각 6수 암컷 및 수컷 육계에 0.2 mg/BW/kg의 LPS를 피하 주사하였으며, 대조구는 PBS를 주사하였다. 1일 후 총 20수에서(치리구 암/수 5마리, 대조구 암/수 5마리) 심장, 간, 비장, 신장, 흉선, 췌장(pancreas), 십이지장(duodenum), 공장(jejunum), 회장(ileum), 맹장(caeca), 총배설강(cloaca), 쓸개(gall bladder), 후두(larynx), 기도(trachea), 그리고 폐 조직 등을 추출하였다. 이 실험은 중앙대학교 동물실험위원회(IACUC) 승인(No. 2016-00108)하에 수행되었다.

2. 닭 IL-34와 M-CSF 유전자 클로닝

닭의 IL-34와 M-CSF 프라이머는 predicted chicken IL-34 cDNA 염기서열(accession number XM_003641892.3)과 닭 M-CSF cDNA 염기서열(accession number NM_001193295)을 NCBI/primer-blast(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)을 이용하여 디자인하였다(Table 1). 닭의 각 조직을 섞은 cDNA를 Dream Taq green PCR Master mix(Thermo

Table 1. Primers used for cloning of chicken IL-34 and M-CSF. *Hind* III and *Eco*R I restriction enzyme site (highlighted in bold and underline) was included in the primer for vector cloning.

Primer name	Primer sequences	Tm	Product size	Accession number
IL-34 F	CGGAATTC ATGCACCAGGGCTGCGCGGC	60°C	537 bp	XM_003641892
IL-34 R	CCAAGCTT AGCGGAGTCCCACCGACAGTG			
M-CSF F	CGGAATTC ATGCCCCGCTCGGATC	63°C	813 bp	GQ249404
M-CSF R	CCAAGCTT CAGCTCCTGCGTCTCCAG			

scientific, Waltham, MA)을 이용하여 다음의 조건에서 PCR 증폭하였다; 초기 95°C/5min 반응 후, denaturation 95°C/30s, annealing temperature/30s, 그리고 extension 72°C/1min으로 35 cycles을 수행하였으며, 마지막 72°C/5min 으로 마무리하였다. PCR 결과물은 PureLink™ quick gel Extraction Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 정제 후, pCR2.1-TOPO vector(invitrogen)에 ligation 및 *E. coli* TOP10 competent cells(invitrogen)에 형질전환하였다. Blue-White 스크리닝을 통하여 positive clones을 선택하여 plasmid 추출 후 염기서열에 대한 sequencing을 실시하여 확인하였다(Genotech, Daejeon, Korea).

3. 재조합 단백질 발현 및 정제

닭 IL-34/pCR2.1-TOPO와 닭 M-CSF/pCR2.1-TOPO을 제한효소 *Eco*RI와 *Hind*III(Promega Corporation, Fitchburg, WI)으로 처리 후, PureLink™ quick gel Extraction Kit (invitrogen)으로 정제하였다. 재조합 단백질 발현 벡터인 pET32a *E. coli* expression vector(Novagen, Cambridge, MA)에 ligation 후 *E. coli* BL21(invitrogen)에 형질전환하였다. 염기서열 확인 후, 박테리아를 ampicillin을 포함한 LB media (Thermo scientific) 20°C 온도에서 0.5 mM isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside(IPTG, USB Cleveland, OH)을 처리하여 overnight(250 rpm) 배양하였다. 박테리아는 4°C 온도에서 5,000 × g로 20분간 원심분리하여 모은 후, B-PER Bacterial Protein Extraction(Thermo Scientific)을 이용하여 처리하였다. 재조합 단백질 IL-34와 M-CSF는 HisPur™ Ni-NTA Resin(Thermo Scientific)을 이용하여 정제하였으며, 3000-molecular weight cut-off membrane(Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit; EMD Millipore, Temecula, CA)을 이용하여 농축하였다. 재조합단백질은 SnakeSkin Dialysis Tubing(Thermo Scientific)을 이용하여 PBS(pH 7.0)에서 정제하였다.

4. Western Blot 분석

재조합 단백질은 sample buffer(0.125 M Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, and 0.004% bromophenol blue)와 같은 비율로 섞은 후, 95°C에서 5분간 열을 가하였으며, 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기 영동 후, PVDF western blotting membrane(Roche, Indianapolis, IN)에 blotting 하였다. Membrane은 5% skim milk를 포함하는 PBS을 이용하여 4°C에서 16시간 동안 blocking 하였다. 0.05% Tween 20(PBS-T)을 포함한 PBS을 이용하여 membrane을 3회 세척 후, Anti-6X His tag® antibody(Abcam, Cambridge, UK)을 이용하여 4°C에서 overnight 배양 하였다. Membrane은 PBS-T을 이용하여 5회 세척 후, Pierce ECL western blotting substrate(Thermo Scientific) 및 Amersham hyperfilm ECL high performance chemiluminescence film(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)과 8 × 10" X-ray cassette(Soyee product inc, Republic of Korea)을 이용하여 확인하였다.

5. Sequence Analysis

Expert Protein Analysis System(ExpASy [www.expasy.org/tools/])을 이용하여 단백질에 대한 분자량과 이론적 등전점(theoretical isoelectric point, *pI*)을 확인하였다(Gasteiger et al., 2005). 또한 signal peptide sequence는 SignalP 4.1 software program(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)을 이용하여 예측하였다(Petersen et al., 2011). CLUSTAL Omega software(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)을 이용하여 아미노산 다중정렬(multiple alignments)을 수행하였으며, disulfide bond를 DiANNA 1.1 software(<http://clavious.bc.edu/~clotlab/DiANNA/>)로 예측하였다(Ferrè and Clote, 2005). 유사성 분석(homology analysis)은 MatGat software(<http://www3.bergen.edu/faculty/jsmalley/matgat.html>)을 이용하였으며(Campanella et al., 2003), 닭 IL-34에 대한 단백질 구조 분석(PDB)은 I-TASSER(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)을

이용하여 mouse IL-34(PDB Code c4exnF)을 이용하였으며, 그림은 Genome3D의 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)(ProteinHomology/analogY Recognition Engine V 2.0)을 이용하여 수행하였다(Kelley et al., 2015).

6. LPS 자극에 대한 HD11 세포주에서의 닭 IL-34, M-CSF, 그리고 M-CSFR 유전자의 발현 분석

닭 대식세포주인 HD11는 10% fetal bovine serum, 10,000 U/mL penicillin streptomycin(HyClone, Waltham, MA)이 포함된 RPMI 1640(Gibco, Carlsbad, CA) 완전배지에서 배양하였다. 모든 세포는 4×10^6 세포를 41°C 온도와 5% CO₂ 조건하에서 60 mm culture dish(Corning)에서 배양하였다. HD11세포는 1 µg/mL lipopolysaccharide(LPS from *E. coli* O111:B4; Sigma-Aldrich)을 이용하여 0, 2, 4, 6, 8, 12, 그리고 24 h 동안 처리 후 TRIzol(Ambion, St'Austin, TX) 처리하여 total RNA를 추출하였다.

7. IL-34 그리고 M-CSF 재조합 단백질을 이용한 HD11 세포주에서 전염증성 사이토카인(Proinflammatory Cytokine) 발현분석

닭 IL-34와 M-CSF는 *in vitro*에서 표적 세포를 발현하는 M-CSFR에 대해 유사한 효과를 나타내므로 세포 내에서도 유사한 발현 패턴을 보이는지를 조사하였다. 재조합 단백질인 닭 IL-34(200 ng/mL), 닭 M-CSF(200 ng/mL), 두 단백질 IL-34(100 ng/mL)와 M-CSF(100 ng/mL), medium, 그리고

mock control(TRX; pET32a vector, 100 ng/mL)을 대조구로 사용하였다.

각 재조합 단백질의 최적 농도는 사전 실험을 통하여 정하였다(unpublished data). 각각의 처리구는 처리 후 0, 2, 6, 12, 24, 그리고 48 h 후에 TRIzol(Ambion)에 녹여 total RNA를 추출하여 quantitative real-time PCR(qRT-PCR)을 이용한 발현 분석에 사용하였다.

8. 총 RNA 추출 및 cDNA 합성

HD11 macrophage 세포주와 ADOL 6.3/7.2 라인의 조직(thymus, spleen, intestine, caeca, cloaca), White Leghorn(lung, ovary, small intestine, spleen, liver, thymus, oviduct) 및 ROSS 308 육계의 각 조직(heart, liver, spleen, kidney, thymus, pancreas, duodenum, jejunum, ileum, caeca, cloaca, gall bladder, larynx, trachea, lung)으로부터 TRIzol을 이용하여 RNA를 추출하였다. cDNA합성을 위하여, 각 total RNA 2 µg을 DNase I(Thermo Scientific)을 처리 후, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 cDNA를 합성하여 유전자 발현분석에 사용하였다.

9. Quantitative Real-Time PCR

합성된 cDNA는 nuclease-free water을 이용하여 100 ng/µL의 농도로 희석하였으며, 100 ng template cDNA, 2 × qPCR mix Lo-ROX(ENZO Life Science, Farmingdale, NY), 5 pmole forward/reverse primers(Table 2)로 반응액을 조성 후 Light-Cycler 96(Roche)을 이용하여 다음의 반응조건하에서 qRT-PCR을 수행하였다. Pre-heating 95°C/10 min, denaturation 95°C

Table 2. Primers used for qRT-PCR

Gene	Primer sequences	Tm	Product size	Accession number
GAPDH F	TGCTGCCCAGAACATCATCC	55-65°C	142 bp	NM_204305
GAPDH R	ACGGCAGGTCAGGTCAACAA			
IL-34 F	GCCCGCTCCCTTTTCTT	52°C	117 bp	XM_003641892
IL-34 R	TGATGGCTCTGCTTCTCTTTATT			
M-CSF F	CTGTCCGAAATGTGCTTTGA	58°C	112 bp	GQ249404
M-CSF R	CGAAGGTCTCCTTGTTCTGC			
M-CSFR F	ACGGGTAGCCAAGATTTGTG	58°C	165 bp	XM_414597
M-CSFR R	AGAATGCCGTAGGACCACAC			
IL-12 F	AGATGCTGGCAACTACACCTG	54°C	123 bp	NM_213571
IL-12 R	CATTTGCCCATTTGGAGTCTAC			
IFN-γ F	AGTTGGGTTGGGAAGTTGTG	55°C	120 bp	FJ538004
IFN-γ R	AGAGATCGGCAGAAAGTTGGT			

/10 sec, annealing 52~58°C/10 sec, extension 72°C/15 sec으로 45 cycles로 수행하였다(Table 2). 유전자 발현에 대한 상대적 값은 GAPDH 유전자를 이용하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 계산하였다 (Thomsen et al., 2010).

10. 통계분석

관절이상과 정상개체간의 조직별 비교(Fig. 1)와 산란계와 육계의 조직별 처리에 대한 IL-34발현 비교(Fig. 2)는 SPSS을 이용한 Student *t* 검정, LPS처리에 대한 유전자의 시간대별 비교 및 재조합 단백질 처리에 대한 세포주의 시간대별 유전자 발현비교(Fig. 3, 6)는 일원분산분석(ANOVA)으로 처리 간 유의성을 검정하고, 처리 평균값 간의 다중검

정은 Duncan's multiple comparison test 검정 방법을 이용하였다. 모든 실험은 최소 3반복 실험을 수행하였으며, 데이터는 mean ± SEM로 표기하였고, 유의수준은 $P<0.05$ 에서 유의하게 차이가 있다고 판단하였다.

결 과

1. 관절 이상 육계 개체의 IL-34, M-CSF, 그리고 M-CSFR Gene의 발현 분석

총 5개 조직(thymus, spleen, small intestine, caeca, cloaca)에 대하여 정상인 개체와 관절 이상을 보이는 개체에 대하여 IL-34, M-CSF, 그리고 M-CSFR 에 대한 유전자 발현 분

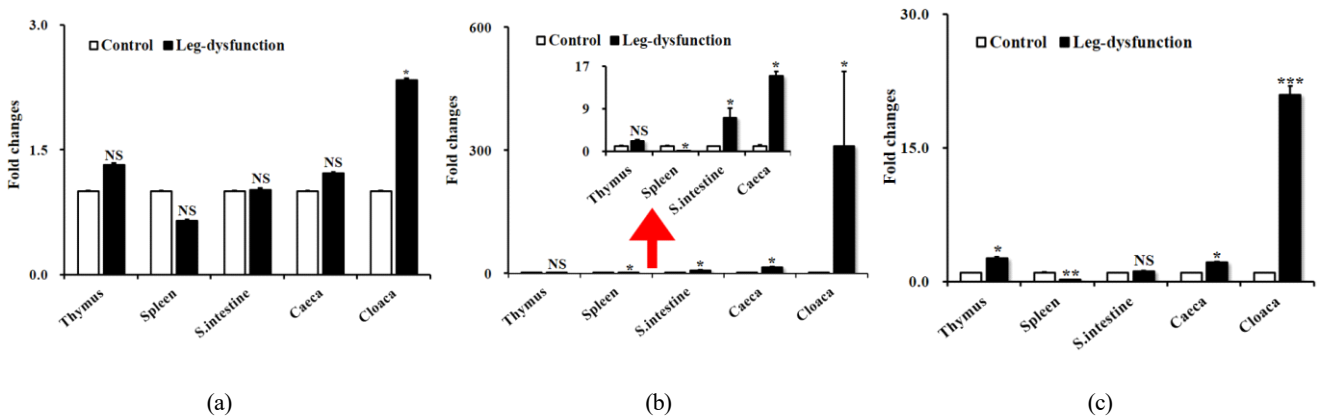


Fig. 1. Differential expression of mRNA in chicken tissues from normal and disable chickens. All data represent the mean±SEM of triplicate trials from three independent experiments. $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**), or $P<0.001$ (***) were considered to be statistically significant.

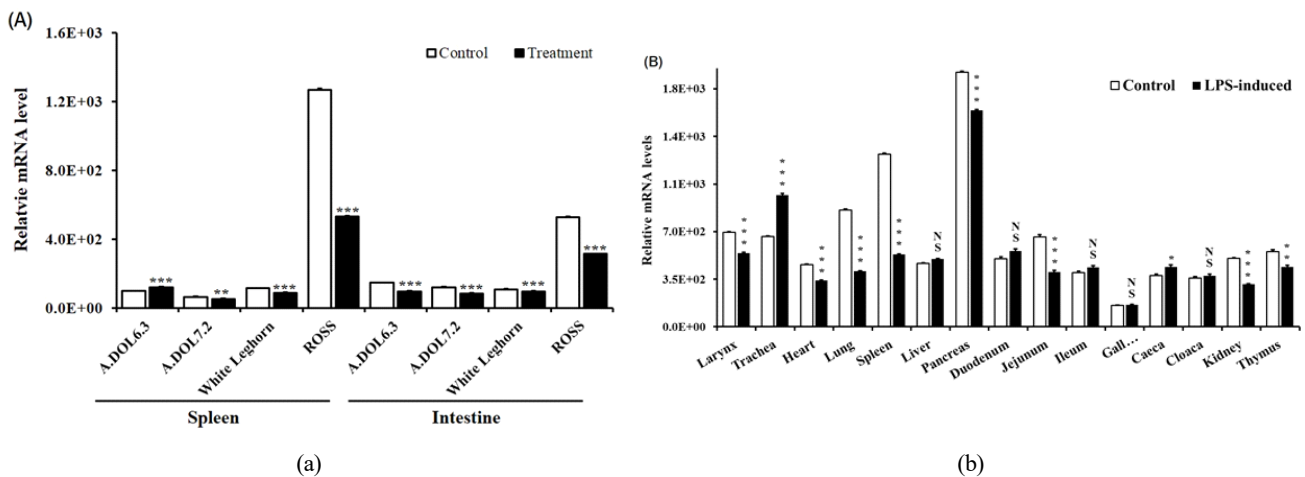


Fig. 2. Differential expression of chicken IL-34 mRNA in the spleen and small intestine (a) and LPS-stimulated broiler chickens (b). All data represent the mean±SEM of triplicate trials from three independent experiments. $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**), or $P<0.001$ (***) were considered to be statistically significant.

석을 실시하였다(Fig. 1). M-CSF와 M-CSFR 유전자의 경우, 조직간에 많은 발현 차이를 보였으며, 비장에서 가장 낮은 발현을 보인 반면, 총배설강에서 정상 개체와 이상 개체간에 가장 큰 발현 차이를 보였다. IL-34의 경우, 총배설강을 제외한 나머지 조직에서는 유의성을 보이지 않았다. Spleen의 M-CSF와 소장 M-CSFR 유전자를 제외하고는 거의 대부분의 조직에서 유의적으로 차이가 있음을 보였다.

2. 피사성장염, 살모넬라, 그리고 LPS 처리별 chIL-34 유전자 발현 비교

피사성장염(NE, *E. maxima*, *C. perfringens*), *S. Enteritidis*, LPS 그리고 대조구의 비장 및 소장에서의 IL-34 유전자 발현 비교 결과, ADOL6.3 계통의 비장 조직을 제외하고는 대부분의 조직에서 처리구 대비 대조구에서 유의하게 높게 발현되었다(Fig. 2A). 2주령의 육계 ROSS의 경우, 특히 산란계 계통인 ADOL과 WL에 비하여 전체적으로 높게 발현되었으며, 조직별 비교에서는 8개 조직, larynx, heart, lung, spleen, pancreas, jejunum, kidney, 그리고 thymus에서 처리구보다 대조구에서 높게 발현된 반면, trachea와 caeca는 처리구에서 높게 발현되었다(Fig. 2B).

3. LPS 자극 HD11 세포주에서 IL-34, M-CSF, 그리고 M-CSFR mRNA 발현

닭의 대식세포인 HD11 세포주에 LPS처리 후, 0, 2, 4, 6, 8, 12, 그리고 24 h 동안 닭 IL-34, M-CSF, 그리고 M-CSFR 유전자의 발현 분석을 실시하였다(Fig. 3). 모든 처리구에서 처리 6시간 후에 IL-34, M-CSF 그리고 M-CSFR mRNA의

발현이 유의적으로 높게 나타났다.

4. chicken IL-34 클로닝 및 특성 분석

닭의 각 조직을 섞은 cDNA를 이용하여 537bp coding sequence으로 이루어진 178-아미노산, 20.2kDa의 chIL-34을 클로닝하였다. 아미노산 서열은 MatGat software(Campanella et al., 2003)을 이용하여 타 종과 비교 분석결과, 칠면조(67.7%)와 금화조(zebrafinch, 76.7%)에 대하여 높은 유사성을 보였으나, 포유동물과는 31.0-32.8%로 낮은 유사성을 보였다(Fig. 4).

닭 IL-34은 N-terminal 1~23 아미노산의 signal peptide를 가지며, “up-down-up-down-up-down” core 구조를 갖는 짧은 beta strand와 6개의 긴 alpha helices bundle(α A- α F)로 이루어진다(Liu et al., 2012; Ma et al., 2012)(Fig. 5B). 추가로 IL-34는 6개의 six-helix bundle 중 첫번째와 마지막 6번째간의 Cys25-Cys161 disulfide bridge(α A and α F)가 있으며, Cys5-Cys10 와 Cys88-Cys173간에도 disulfide bridge가 있다. 즉 6개의 cysteine이 3개의 disulfide bridges 1-2, 3-5, 4-6(cysteine 5와 10, 25와 161, 88과 173)을 구성하였다(Fig. 5A).

5. Chicken IL-34와 M-CSF의 면역증강효과

재조합 단백질 IL-34와 M-CSF을 HD11 세포주에 처리하여 각 시간별(0, 2, 6, 12 h) IL-34, M-CSFR, IFN- γ , 그리고 IL-12 유전자의 발현을 측정하였으며, 벡터의 TRX-tag 단백질을 mock control로 사용하였다. IL-34 cytokine은 모든 처리구와 시간대별 비교에서 큰 차이를 보이지 않았으나, M-CSFR

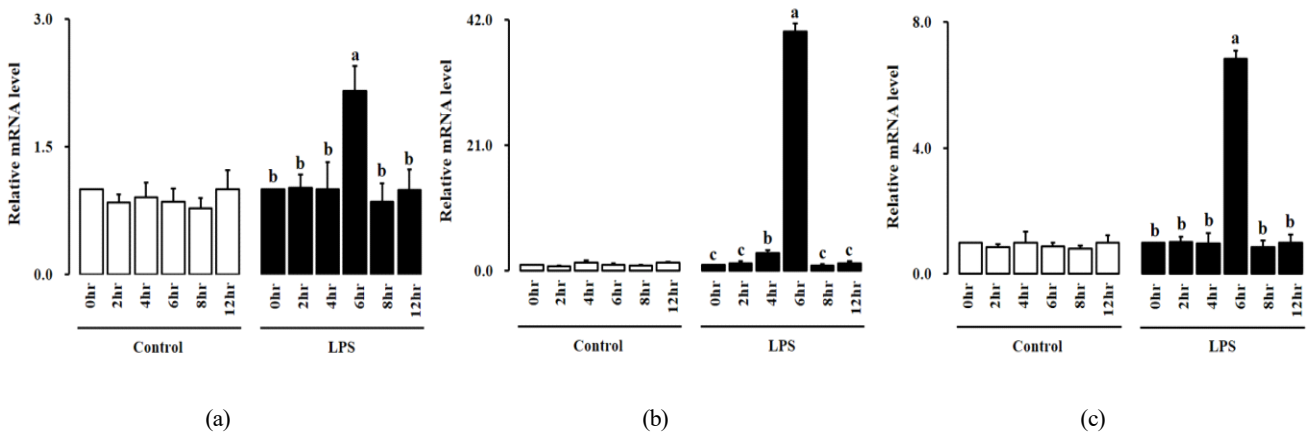


Fig. 3. Expression of chicken IL-34, M-CSF, and M-CSFR mRNA in HD11 induced by LPS. All data represent the mean \pm SEM of triplicate trials from three independent experiments. $P < 0.01$ was considered to be statistically significant.

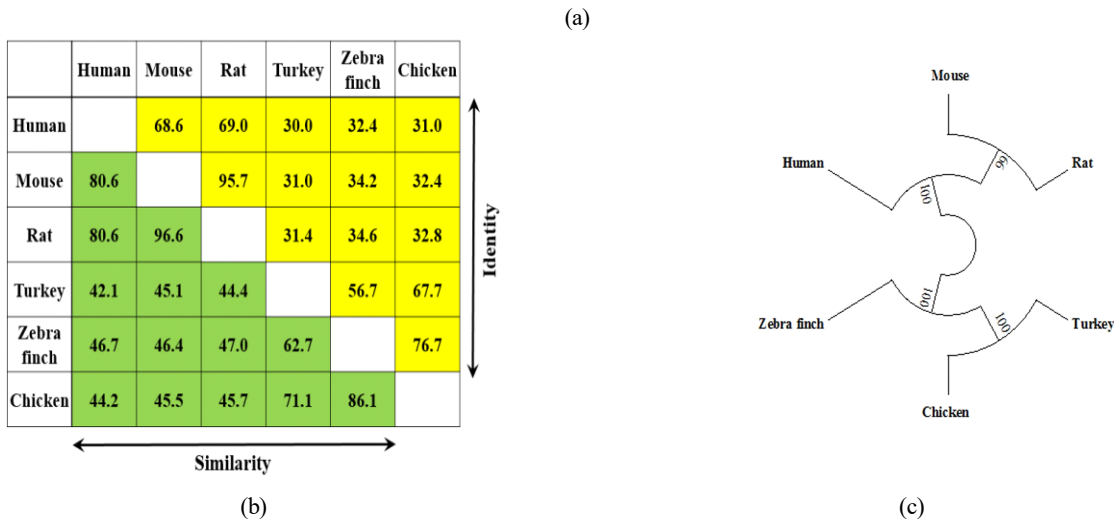
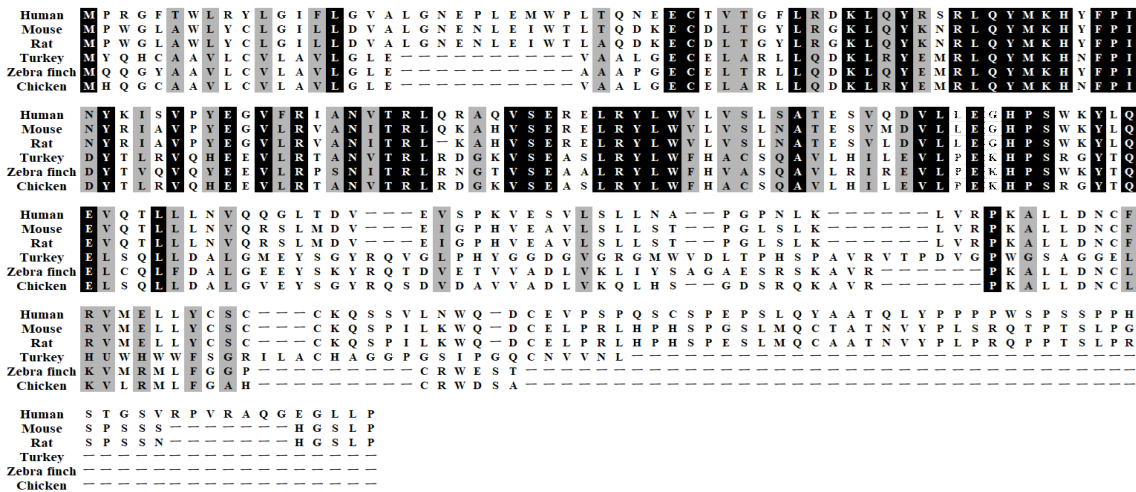


Fig. 4. Molecular features and amino acid identities of chicken IL-34. (a) Multiple alignment of avian and mammalian IL-34 deduced amino acid sequences. Sequences were aligned using CLUSTAL Omega software. The conserved amino acid sequences are shaded to indicate homology. (b) Percentage of amino acid identity and similarity of species. Comparison of identities (top right) and similarities (bottom left) of chicken IL-34 molecules with selected IL-34 sequences from mammals and avian. (c) Phylogenetic tree for IL-34.

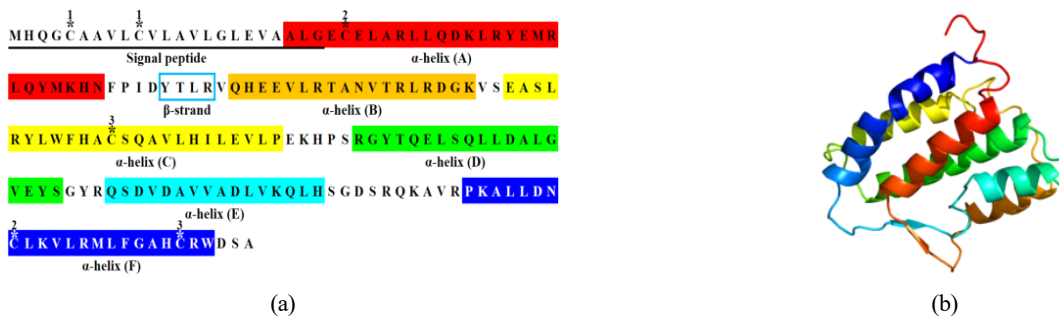


Fig. 5. Structure-based sequence analysis of the chicken IL-34. (a) Amino acids sequence of chicken IL-34. Image colored by rainbow N to C terminus. Disulfide bonds are shown as a pair of asterisk and number (*1, *2, and *3). (b) Ribbons representation of the chicken IL-34 structure. The PDB file for the chicken IL-34 was generated using I-TASSER (<http://zzanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER>) with the crystal structure of mouse IL-34 structure as template (PDB Code c4exnF).

유전자는 IL-34, M-CSF, 또는 두 단백질 동시 처리구의 6시간에서 유의적인 차이를 보였다(Figure 6A, B). IFN- γ 역시 IL-34, M-CSF, 그리고 두 단백질 동시 처리구의 6시간에서 유의적으로 높게 발현하였다(Fig. 6C). 하지만 IL-12 cytokine

은 M-CSF 처리구의 6시에서만 차이를 보였다(data not shown). 4개의 유전자 M-CSF, M-CSFR, IFN- γ , 그리고 IL-12 모두 12시간 이후에 감소하였으며, 전염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, 그리고 IL-10에 대하여 분석하였으나, 유의적인

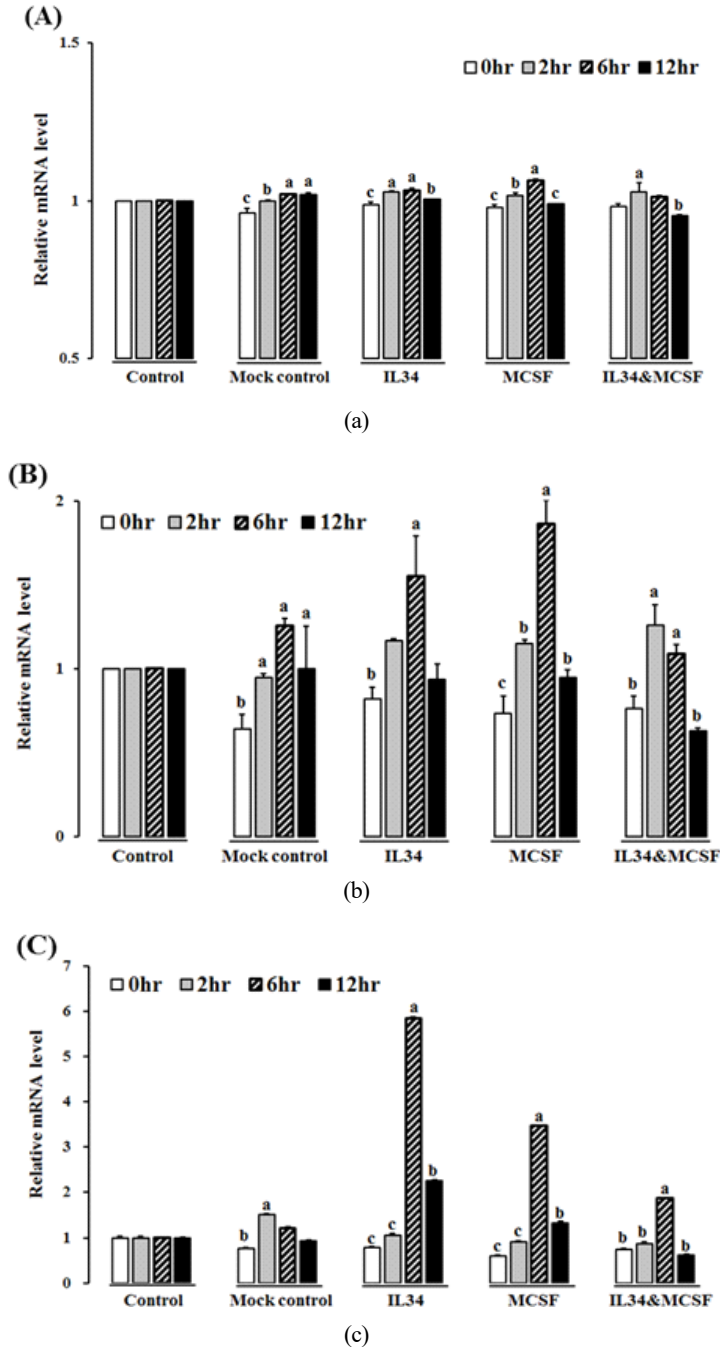


Fig. 6. Modulation of chicken IL-34 and M-CSF in HD11 macrophage cell line. Gene expression was expressed as a fold change that was calculated as the average expression level of stimulated samples divided by that of the time-matched controls. The mean \pm SEM of triplicates is shown. The *p*-values of samples ANOVA among stimulated samples and their time matched controls is shown above the bars as: (a) chicken IL-34 (b) M-CSFR (c) IFN- γ .

차이는 없었다(data not shown).

고 찰

본 연구는 여러 종류의 병원균에 대한 닭 IL-34의 특성 분석에 대한 내용으로 IL-34는 M-CSFR에 대한 또 다른 잠재적 ligand이다. IL-34는 M-CSFR에 결합하며, M-CSF 역시 결합 시 경쟁관계에 있다. IL-34와 M-CSF는 구조적으로 유사하여 M-CSFR의 같은 결합부위를 갖는다(Lin et al., 2008; Garceau V. et al., 2010). 본 연구에서 포유동물과 조류 IL-34와 비교 시 포유류와는 낮은 유사도(31.0~32.8%), 조류와는 높은 유사도를 보였다(67.7~76.7%). 닭 IL-34 유전자는 6개의 helix bundle이 “up-down-up-down-up-down” folds를 이루는 topological diagram을 보여주었는데, 이는 기존의 mouse CSF-1의 구조를 이루는 four-helix bundle(PDB Code 3ejj)과는 다른 결과이지만(Garceau et al., 2010), mouse IL-34 구조(PDB Code 4cexnF)를 기반으로 IL-34의 단백질 구조를 완성하였다.

사람의 관절염(rheumatoid arthritis, RA) 환자의 관절 조직(joint tissue), 혈청(serum), 그리고 관절 낭액(synovial fluid)에서 IL-34 유전자가 많이 발현된다는 연구가 있었으며(Chemel M. et al., 2012; Hwang et al., 2012; Moon et al., 2013; Tian et al., 2013; Chang et al., 2015), 관상동맥질환(coronary artery disease) 환자의 혈청(Liu et al., 2012), 비만과 제2형의 당뇨병 환자의 혈청과 지방조직(Chang et al., 2014), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease) 환자의 점액, 회장(ileum)과 결장(colon) 조직 등에서도 많이 발현된다(Franze et al., 2015; Zwicker et al., 2015).

닭과 칠면조에서 가장 흔한 화농성 관절염(purulent arthritis)의 경우, *E. coli*, *Staphylococcus*, 또는 *S. Enteritidis* 등에 의하여 발병하며, 패혈증(septicemia)으로 발전한다(Goldenberg, 1998; Oh et al., 2010). 본 연구에서 육안으로 관절 이상 개체를 선별하여 조직별로 분석한 결과, IL-34, M-CSF, 그리고 M-CSFR의 발현이 유의적으로 증가하였지만, 일부 조직의 경우, 오히려 감소한 결과를 보였다. 이는 염증반응이 일어나기 전에 병원균(LPS)이 처리되어 면역관련 유전자가 처리구에서 감소된 것으로 판단된다.

우리는 세포주에서 2개의 리간드(IL-34 and M-CSF)와 하나의 리셉터(M-CSFR)가 LPS 자극 시 다르게 발현됨을 확인하였으며, 관절 이상 닭에서 염증반응의 반응자(responder)임을 확인하였다. 포유류 IL-34 및 M-CSF mRNA의

발현 패턴은 일시적으로 나타나며, 이는 생체 내에서 M-CSFR을 활성화한다(Wang et al., 2012). 닭 IL-34의 발현은 LPS 자극 후, 조직별로 많은 변이를 보였다. 특히, IL-34 또는 M-CSF 단독처리 시 두 단백질 동시 처리보다 높게 나타났다. 닭 IL-34는 *in vitro*에서 LPS 처리 시 증가하였다.

닭 M-CSFR 유전자는 서로 경쟁하는 IL-34와 M-CSF 단백질에 의해 자극된다(Garceau V. et al., 2010). 닭 M-CSFR 발현 역시 재조합 단백질 IL-34과 M-CSF 단독 처리에 의해 처리 후 6시간 후에 최대치를 보였으나, 병합 단백질 처리는 2시간에 최대치에 도달하여, 아마도 2개의 리간드가 receptor와의 결합(IL-34:M-CSFR, M-CSF:M-CSFR complex)이 영향을 주었을 것으로 판단된다.

대식세포의 면역 기능을 감안할 때 대식세포는 interleukin-12(IL-12)와 같은 전염증성 사이토카인을 방출하여 IFN- γ 에 반응한다(Gordon and Martinez, 2010). IFN- γ 발현은 재조합 IL-34와 M-CSF에 의해 증가하였으며, IL-12 역시 M-CSF 단독 처리시 증가하였다. 사람의 경우, M-CSF는 단핵구(monocyte)를 M2 대식세포로 분화시키며, 이 대식세포는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 같은 전염증성 사이토카인이 아닌 chemokine을 발현한다(Verreck et al., 2006). 또한 M-CSF는 LPS같은 co-stimulator와 더불어 전염증성 사이토카인과 chemokine의 발현을 유도한다(Eda et al., 2010).

대식세포에서 M-CSF에 의한 IP-10, MCP-1, MIP-1 β , 그리고 TARC 같은 chemokines의 발현에 대한 보고가 있었으나(Fleetwood et al., 2007; Irvine et al., 2009; Eda et al., 2010), 닭에서는 IL-34와 M-CSF가 IL-1 β , IL-6, 그리고 IL-10의 발현을 유도하지 않았다.

결론적으로, 닭의 다양한 품종별, 조직, 세포주, 그리고 관절 이상 닭에 대하여 다양한 질병 병원균을 처리하여 닭의 IL-34에 발현 분석 및 비교 결과, 닭의 다양한 조직 및 세포에서 발현되었으며, M-CSFR의 경우, HD11 세포주에서 재조합 chIL-34와 chM-CSF 단백질에 의해 증가하였다. 이 결과는 다양한 병원균 처리에 대한 IL-34의 발현에 대한 중요한 정보를 제공하며, 추후 닭의 IL-34을 이용한 inflammatory pathway, chemokine 발현 및 체내에서의 역할 등에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

적 요

최근에 IL-34가 MCSFR에 대한 두 번째 기능적 리간드로 확인되었으며, M-CSFR에 대한 결합을 통해 IL-34는 M-CSF와 유사한 기능을 공유한다. 지금까지 닭의 IL-34에

대한 실험적 연구가 아닌 예측된 서열로만 보고되었으며, 닭의 IL-34 기능에 대한 정보는 아직 부족하다. 닭 IL-34의 잠재적 생물학적 기능을 구명하기 위하여, 다양한 품종의 닭, 세포주에 대한 괴사성 장염, 살모넬라 및 *E. coli* 유래의 LPS 등을 처리하여 관찰하였다. 또한 닭의 IL-34와 M-CSF 재조합 단백질 생산 및 이를 이용한 전염증성 사이토카인 유도를 위하여 클로닝 및 재조합 단백질을 발현 및 정제하였다. 특히 관절이상 육계(unknown cause)에 대한 IL-34, M-CSF, 그리고 M-CSFR 유전자의 발현이 대조구보다 유의하게 증가하였으나, 병원균 자극 조직의 경우 많은 조직에서 감소함을 보였다.

M-CSFR의 발현은 *in vitro*에서 IL-34와 M-CSF 재조합 단백질에 의해 증가함을 보였으며, IFN- γ 은 재조합 단백질 M-CSF를 제외한 IL-34에 의해 증가하였다. 하지만, IL-12 발현은 유의적인 차이가 없었으며, IL-1 β 의 경우는 감소하였다. 이 결과는 IL-34와 M-CSF가 고전적인 대식세포와 대체 대식세포 모두에서 역할을 한다고 할 수 있다.

결론적으로, *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통하여 병원균 처리 시 닭의 IL-34 발현을 관찰하였으며, IL-34 재조합 단백질이 대식세포에서와 전염증성과 항염증성 반응에 중요한 역할을 함을 증명하였다. 추후에 IL-34의 사이토카인, 케모카인 그리고 염증반응 경로 등에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

(색인어: 닭, IL-34, 괴사성장염, 살모넬라, LPS)

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ015612)의 지원에 의해 이루어진 것임.

ORCID

Yeong Ho Hong <https://orcid.org/0000-0002-4510-7851>

REFERENCES

- Bacon L, Hunt H, Cheng H 2000 A review of the development of chicken lines to resolve genes determining resistance to diseases. *Poultry Science* 79(8):1082-1093.
- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J 2003 MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 4(1):1.
- Chang EJ, Lee SK, Song YS, Jang YJ, Park HS, Hong JP, Ko AR, Kim DY, Kim JH, Lee YJ, Heo YS 2014 IL-34 is associated with obesity, chronic inflammation, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 99(7):E1263-1271.
- Chang SH, Choi BY, Choi J, Yoo JJ, Ha YJ, Cho HJ, Kang EH, Song YW, Lee YJ 2015 Baseline serum interleukin-34 levels independently predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 35(1):71-79.
- Chemel M, Le Goff B, Brion R, Cozic C, Berreur M, Amiaud J, Bougras G, Touchais S, Blanchard F, Heymann MF, Berthelot JM, Verrecchia F, Heymann D 2012 Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 71(1):150-154.
- Chemel M, Le Goff B, Brion R, Cozic C, Berreur M, Amiaud J, Bougras G, Touchais S, Blanchard F, Heymann M-F 2012 Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71(1):150-154.
- Chen X, Liu H, Focia PJ, Shim AH, He X 2008 Structure of macrophage colony stimulating factor bound to FMS: Diverse signaling assemblies of class III receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(47):18267-18272.
- Eda H, Zhang J, Keith RH, Michener M, Beidler DR, Monahan JB 2010 Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood. *Cytokine* 52(3):215-220.
- Ferrè F, Clote P 2005 DiANNA: A web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Research* 33(suppl 2):W230-W232.
- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD 2007 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 178(8):5245-5252.
- Franze E, Monteleone I, Cupi ML, Mancina P, Caprioli F, Marafini I, Colantoni A, Ortenzi A, Laudisi F, Sica G, Sileri P, Pallone F, Monteleone G 2015 Interleukin-34 sustains inflammatory pathways in the gut. *Clin Sci (Lond)* 129(3):271-280.

- Garceau V, Balic A, Garcia-Morales C, Sauter KA, McGrew MJ, Smith J, Vervelde L, Sherman A, Fuller TE, Oliphant T, Shelley JA, Tiwari R, Wilson TL, Chintoan-Uta C, Burt DW, Stevens MP, Sang HM, Hume DA 2015 The development and maintenance of the mononuclear phagocyte system of the chick is controlled by signals from the macrophage colony-stimulating factor receptor. *BMC Biol* 13:12.
- Garceau V, Smith J, Paton IR, Davey M, Fares MA, Sester DP, Burt DW, Hume DA 2010 Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J Leukoc Biol* 87(5):753-764.
- Garceau V, Smith J, Paton IR, Davey M, Fares MA, Sester DP, Burt DW, Hume DA 2010 Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *Journal of Leukocyte Biology* 87(5):753-764.
- Garcia-Morales C, Rothwell L, Moffat L, Garceau V, Balic A, Sang HM, Kaiser P, Hume DA 2014 Production and characterisation of a monoclonal antibody that recognises the chicken CSF1 receptor and confirms that expression is restricted to macrophage-lineage cells. *Dev Comp Immunol* 42(2):278-285.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Springer. 571-607.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K 2010 Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327(5966):656-661.
- Goldenberg DL 1998 Septic arthritis. *Lancet* 351(9097):197-202.
- Gordon S, Martinez FO 2010 Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32(5): 593-604.
- Haishan Lin EL, Kevin Hestir, Cindy Leo, Minmei Huang, Elizabeth Bosch, Robert Halenbeck, Ge Wu, Aileen Zhou, Dirk Behrens, Diane Hollenbaugh, Thomas Linnemann, Minmin Qin, Justin Wong, Keting Chu, Stephen K. Doberstein, Lewis T. Williams 2008 Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome.
- Hamilton JA 2008 Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 8(7):533-544.
- Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T 2002 The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of Leukocyte Biology* 72:621-627.
- Hwang SJ, Choi B, Kang SS, Chang JH, Kim YG, Chung YH, Sohn DH, So MW, Lee CK, Robinson WH, Chang EJ 2012 Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res Ther* 14(1):R14.
- Irvine KM, Andrews MR, Fernandez-Rojo MA, Schroder K, Burns CJ, Su S, Wilks AF, Parton RG, Hume DA, Sweet MJ 2009 Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *J Leukoc Biol* 85(2):278-288.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ 2015 The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10(6):845-858.
- Lee KW, Lillehoj HS, Jeong W, Jeoung HY, An DJ 2011 Avian necrotic enteritis: Experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci* 90(7):1381-1390.
- Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, Halenbeck R, Wu G, Zhou A, Behrens D, Hollenbaugh D, Linnemann T, Qin M, Wong J, Chu K, Doberstein SK, Williams LT 2008 Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320(5877):807-811.
- Liu H, Leo C, Chen X, Wong BR, Williams LT, Lin H, He X 2012 The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1. *Biochim Biophys Acta* 1824(7):938-945.
- Ma D, Doi Y, Jin S, Li E, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A 2012 TGF-beta induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid beta neurotoxicity. *Neurosci Lett* 529(1):86-91.
- Moon SJ, Hong YS, Ju JH, Kwok SK, Park SH, Min JK 2013 Increased levels of interleukin 34 in serum and synovial fluid are associated with rheumatoid factor and anticyclic citrullinated peptide antibody titers in patients

- with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 40(11):1842-1849.
- Mouchemore KA, Pixley FJ 2012 CSF-1 signaling in macrophages: pleiotrophy through phosphotyrosine-based signaling pathways. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 49(2):49-61.
- Munoz-Garcia J, Cochonneau D, Teletchea S, Moranton E, Lanoe D, Brion R, Lezot F, Heymann MF, Heymann D 2021 The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis. *Theranostics* 11(4):1568-1593.
- Oh JY, Kang MS, An BK, Song EA, Kwon JH, Kwon YK 2010 Occurrence of purulent arthritis broilers vertically infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Korea. *Poult Sci* 89(10):2116-2122.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H 2011 SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8(10):785-786.
- Pollard JW 2009 Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology* 9(4):259-270.
- Thomsen R, Sølvsten CAE, Linnet TE, Blechingberg J, Nielsen AL 2010 Analysis of qPCR data by converting exponentially related Ct values into linearly related X0 values. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 8(05):885-900.
- Tian Y, Shen H, Xia L, Lu J 2013 Elevated serum and synovial fluid levels of interleukin-34 in rheumatoid arthritis: possible association with disease progression via interleukin-17 production. *J Interferon Cytokine Res* 33(7):398-401.
- Van Furth R, Cohn Z, Hirsch J, Humphrey J, Spector W, Langevoort H 1972 The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization* 46(6):845.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH 2006 Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 79(2):285-293.
- Wang Y, Colonna M 2014 Interleukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and Langerhans cells. *Eur J Immunol* 44(6):1575-1581.
- Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M 2012 IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* 13(8):753-760.
- Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, Huang M, Williams LT, Lin H, Stanley ER 2010 Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J Leukoc Biol* 88(3):495-505.
- Zwicker S, Martinez GL, Bosma M, Gerling M, Clark R, Majster M, Soderman J, Almer S, Bostrom EA 2015 Interleukin 34: a new modulator of human and experimental inflammatory bowel disease. *Clin Sci(Lond)* 129(3):281-290.

Received Aug. 17, 2021, Revised Sep. 3, 2021, Accepted Sep. 6, 2021