

## 항바이러스 활성 유도 물질에 대한 잉어의 선천성 면역 반응

조미영<sup>†</sup> · 김수미<sup>\*</sup> · 김은전<sup>\*\*</sup> · 손상규 · 김진우 · 박수일<sup>\*</sup>

국립수산과학원 병리연구팀, <sup>\*</sup>부경대학교 수산생명의학과, <sup>\*\*</sup>국립수산물품질검사원 통영지원

## Innate immune responses of common carp, *Cyprinus carpio* L. against antiviral activity inducers

Mi Young Cho<sup>†</sup>, Su-Mi Kim<sup>\*</sup>, Eun Jeon Kim<sup>\*\*</sup>, Sang-gyu Shon, Jin Woo Kim and Soo Il Park<sup>\*</sup>

*Pathology Team, National Fisheries Research & Development Institute, Busan, 619-902, Korea*

*<sup>\*</sup>Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

*<sup>\*\*</sup>Tongyeong branch office, National Fisheries Products Quality Inspection Service,  
Tongyeong, 650-080, Korea*

To investigate the innate immune response involved in early stage of anti-viral defence, carps were injected with UV-inactivated spring viraemia of carp virus (SVCV), poly inosinic:cytidylic acid (Poly I:C) and concanavalin A (Con A), respectively and examined lysozyme activity, serum complement activity and chemiluminescent (CL) response of leucocytes isolated from head kidney at 3 days post-injection. There was no significant difference in plasma lysozyme activities among all experimental groups. However, lysozyme activities of head kidney in the groups injected with antiviral activity inducers were significantly higher than those of the control injected with physiological saline. Bactericidal activities of serum of the groups injected with antiviral activity inducers were not significantly different from control group. However, the CL responses were significantly higher at lower dose of Poly I:C and Con A, whilst dose-dependent increase was shown in UV-inactivated SVCV-injected group. In the challenge test with  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish of SVCV at 4 days post-injection, UV-inactivated SVCV- and Poly I:C-injected groups showed higher relative percent survival (RPS) than Con A-injected group. Furthermore, strong protection was observed in the group injected higher dose of Poly I:C although showed lower activities in lysozyme and CL response. These results suggested that Poly I:C might stimulate other factors belonging to non-specific immune system have induced protective immunity against the SVCV challenged.

*Key words:* Innate immune response, Antiviral activity inducers, Carp, SVC, Poly I:C, Con A

감염에 대한 방어 작용은 크게 선천성 면역 (innate immunity)과 후천성 면역 (adaptive immunity)으로 구분되며, 이 중에서 선천성 면역은 수산 동물의 생체 방어에서 다양한 병원생물의 침입에 대한 숙주의 첫 번째 방어선으로서 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Song *et al.*, 2000; Dixon and Stet, 2001).

일반적으로 바이러스가 감염된 후 감염에 대

한 방어기작으로 특이적 면역이 형성되기까지 바이러스의 체내 증식을 제어할 수 있는 비특이적이며 즉각적인 선천성 면역의 역할이 매우 중요하다 (Dianzani and Baron, 1996). 이러한 선천성 면역에는 대식세포, 다형핵백혈구, 자연살해세포 등의 세포성 면역인자와 사이토카인, 보체 등이 관여한다 (Baron *et al.*, 2000).

잉어의 항바이러스 기작에 대한 연구는 대부

<sup>†</sup>Corresponding Author : Mi Young Cho, Tel : 051-720-2483,  
Fax : 051-720-2498, E-mail : mycho@nfrda.re.kr

분 바이러스에 대한 후천적으로 형성되는 특이적 면역 반응에 국한되어 있으며 (Fijan *et al.*, 1977; Ahne, 1986; Trsarčik and Macura, 1988; Matašin *et al.*, 1988; Ronen *et al.*, 2003), 비특이적인 면역 반응으로 바이러스 감염시 혈청 내에서 유도된 항바이러스 활성에 대해 보고된 것이 있다 (Baudouy, 1978; 조 등, 2004).

본 연구는 바이러스에 대한 잉어의 선천성 항바이러스 활성을 조사하기 위해 자외선을 처리하여 불활성화시킨 spring viraemia of carp virus (SVCV)와 합성된 dsRNA인 poly inosinic : cytidylic acid (Poly I:C) 및 T cell mitogen인 concanavalin A (Con A)를 잉어의 복강에 주사한 후 선천성 면역 반응으로서 라이소자임 및 보체의 활성과 두신 백혈구의 활성산소량을 측정하고 SVCV로 인위 감염하여 누적 폐사율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험어

시험어로 국립수산과학원 내수면양식연구소에서 사육한 바이러스에 감염된 병력이 없는 건강한 잉어 (20~30 g)를 사용하였다. 시험어는 4 ton 용량의 FRP 수조에서 반유수식으로 사육하였으며, 수온은 가온용 히터를 사용하여 20 ± 1 °C로 일정하게 유지하고, 1일 2회 시판용 사료를 먹였다.

### 2. 항바이러스 활성 유도 물질

항바이러스 활성을 유도하기 위한 자극 물질로 UV-inactivated SVCV, synthetic dsRNA polymer인 Poly I:C (Sigma, USA) 및 T cell mitogen인 Con A (Sigma, USA)를 사용하였다. SVCV VR-1390은 국립수산과학원 병리연구팀에서 분양받아 epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell에서 역가를 측정하였다. 즉,  $1 \times 10^3$  및  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/fish 농도로 조정된 SVCV를 1시간동안

자외선으로 조사하여 바이러스의 활성을 제거한 뒤 EPC cell에 접종하여 cytopathic effect (CPE) 생성 유무를 확인한 뒤 시험어에 주사하였으며, Poly I:C 및 Con A는 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma)에 각각 100, 50 및 5 µg/fish 농도로 조정하여 주사하였다. UV-inactivated SVCV, Poly I:C 및 Con A를 각 농도별로 잉어의 복강에 주사한 후 3일째 5마리씩 샘플링하여 라이소자임의 활성 및 보체의 살균능을 조사하고, 두신 백혈구를 분리하여 활성산소량을 측정하였다. 또한 각 유도 물질을 주사한 후 4일째 SVCV를  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish 농도로 인위 감염시킨 다음 2주 동안 누적폐사율을 조사하였다.

### 3. 라이소자임의 활성 시험

혈청 및 조직의 라이소자임 활성은 Ellis (1990)의 방법에 따라 Turbidimetric assay로 조사하였다. 시험어를 아미노안식향산으로 마취시킨 후 미부 정맥으로부터 채혈하여 혈청을 분리하였으며, 시험어에서 적출한 두신 조직은 0.004 M PBS (pH 6.2)를 첨가하여 마쇄한 다음 10,000 ×g, 10분간 원심 분리하여 얻은 상정액을 라이소자임 분석에 사용하였다. *Micrococcus lysodeikticus* (0.1 mg/ml) 현탁액 950 µl와 혈청 및 조직 상정액 50 µl를 혼합하여 25°C에서 30초 및 4분 30초 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 흡광도 값이 0.001/min 감소한 값을 1 unit로 표시하였다.

### 4. 혈청 내 보체의 살균능력 시험

혈청 내 보체의 살균 능력은 신선혈청과 *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922) 균주를 반응시켜 생균수의 변화를 측정하였다. 먼저, 각 시료를 gelatin veronal buffer<sup>2+</sup> (GVB)에 1:4로 희석하였으며, *E. coli* 균은 멸균생리식염수로 1 µg/ml 농도가 되게 조정된 후 희석액과 1:1로 혼합하였다. 이 혼합액을 27°C에서 진탕배양기로 반응시키면서 0, 1, 3, 6 및 9시간 경과할 때마다 단계

회석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 계수하였다.

### 5. 두신 백혈구의 Chemiluminescent (CL) response 시험

두신 조직에서 백혈구를 분리하여 활성산소량을 CL response으로 조사하였다. 즉, 시험어의 미부정맥에서 가능한 한 순환혈액을 모두 제거한 후에 해부하여 두신을 무균적으로 적출하였다. 적출한 두신을 nylon mesh에 넣은 다음 2% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 첨가된 L-15 medium (Sigma, USA)이 들어 있는 페트리디시에서 핀셋으로 teasing하여 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 34/51% percoll (Sigma, USA) 용액이 들어있는 실리콘 처리 시험관에 조심스럽게 층층 시킨 후 400×g, 25분간 원심 분리하여 백혈구 층을 분리하였다. 분리된 백혈구를 L-15 medium으로 3회 세척하고 0.3% trypan blue로 viability를 관찰한 후 혈청이 첨가되지 않은 L-15 medium에  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도로 조정하여 polypropylene tube에 400  $\mu$ l씩 분주하였다. 여기에 700  $\mu$ l의 luminol solution (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-1,4-dione, Sigma)을 첨가하여 10분간 반응시킨 후 잉어 혈청으로 감작한 zymosan을 300  $\mu$ l씩 첨가한 다음 automatic photoluminometer (BioOrbit 1251, Finland)로 측정하였다.

### 6. SVCV 인위 감염 시험

UV-inactivated SVCV, Poly I:C 및 Con A를 농도별로 잉어의 복강에 주사한 후 4일째에 독력이 있는 SVCV ( $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish)로 인위 감염하여 2주 동안 누적 폐사율을 조사하였다. 공격 시험에는 각 시험구별로 20마리씩 수용하였으며, SVCV의 병원성 발현을 위해 인위 감염 후 냉각 장치 (대원냉각기)를 사용하여 사육 수온을 1일 간격으로 0.5°C씩 떨어뜨려 17°C 이하로 유지하였다.

### 7. 통계 처리

대조구와 각 시험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's *t*-test 및 paired *t*-test를 실시하여  $p < 0.05$  일 때 유의적인 차이가 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 1. 라이소자임의 활성 변화

UV-inactivated SVCV ( $1 \times 10^3$  및  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/fish), Poly I:C (5, 50, 100  $\mu$ g/fish) 및 Con A (5, 50, 100  $\mu$ g/fish)를 잉어의 복강에 각각 주사한 후 3일째에 혈청 및 두신 조직 내 라이소자임의 활성을 조사하였다. 그 결과 모든 시험구에서 두신 조직의 라이소자임 활성이 높게 나타났다. 즉, 생리식염수를 주사한 대조구의 경우 혈청 및 두신 조직의 라이소자임 활성이 각각  $54.1 \pm 9.4$ ,  $90.0 \pm 3.6$  units/ml로 나타난 반면, UV-inactivated SVCV를 주사한 경우  $1 \times 10^3$  및  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/fish의 주사 농도별 시험구 혈청에서 각각  $69.6 \pm 14$ ,  $140.7 \pm 78.1$  units/ml로 나타났으며, 두신 조직에서는  $146.6 \pm 17.6$ ,  $173.3 \pm 46.6$  units/ml로 나타났다 (Fig. 1).

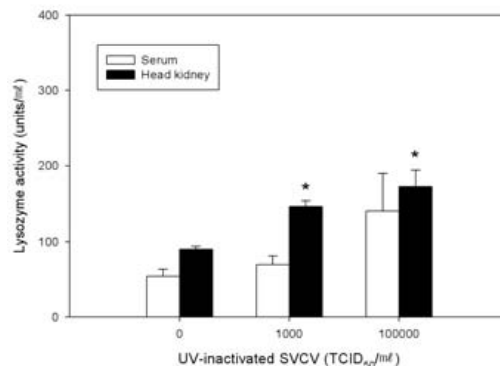


Fig. 1. Lysozyme activity in the plasma and the head kidney of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of UV-inactivated SVCV. Control fish was injected with physiological saline. Values are means  $\pm$  SE. \* Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

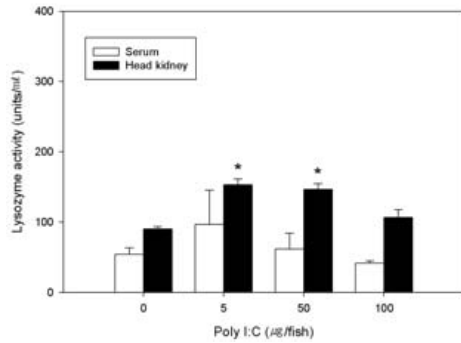


Fig. 2. Lysozyme activity in the plasma and the head kidney of carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of Poly I:C. Control fish was injected with physiological saline. Values are means  $\pm$  SE. \* Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

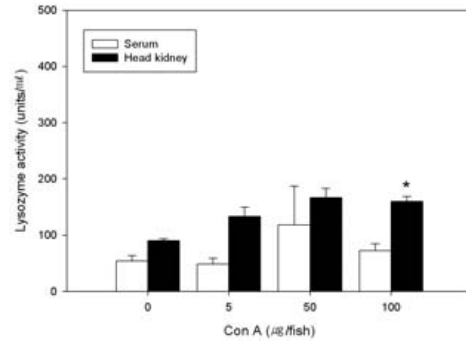


Fig. 3. Lysozyme activity in the plasma and the head kidney of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of Con A. Control fish was injected with physiological saline. Values are means  $\pm$  SE. \* Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

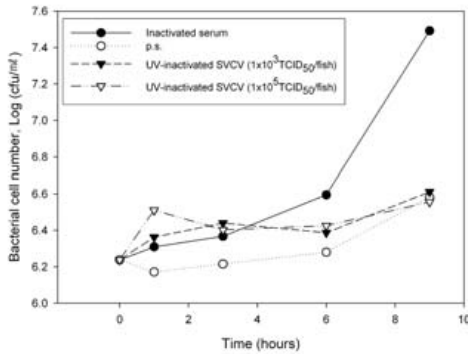


Fig. 4. Bactericidal activity of the serum complement of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of UV-inactivated SVCV. Control fish was injected with physiological saline.

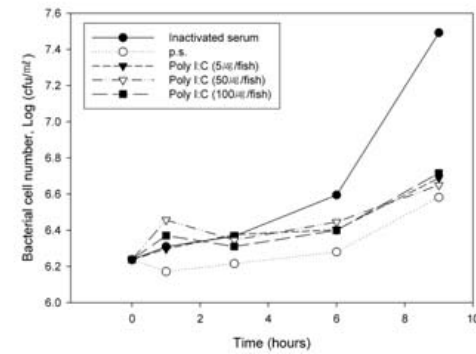


Fig. 5. Bactericidal activity of serum complement of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of Poly I:C. Control fish was injected with physiological saline.

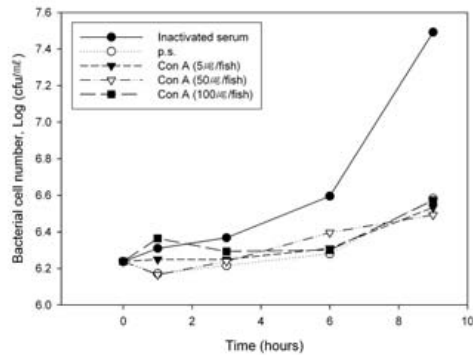


Fig. 6. Bactericidal activity of serum complement of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of Con A. Control fish was injected with physiological saline.

또한, Poly I:C 농도별 시험구의 혈청 및 두신 조직의 라이소자임 활성은 5  $\mu\text{g}/\text{fish}$  농도에서 각각  $96.8 \pm 59.9$ ,  $153.3 \pm 7.8$  units/ml로 나타났으며, 50  $\mu\text{g}/\text{fish}$  농도에서는  $61.6 \pm 27.8$ ,  $146.6 \pm 7.8$  units/ml, 100  $\mu\text{g}/\text{fish}$  농도에서는  $41.5 \pm 5.6$ ,  $106.6 \pm 10.7$  units/ml로 나타나 혈청에서는 저농도의 Poly I:C에서 높은 활성을 나타내었지만 유의적인 차이는 없었다. 또한 두신 조직에서도 동일한 경향으로 나타났으나, 5~50  $\mu\text{g}/\text{fish}$  시험구에서 대조구와 유의적인 차이를 나타내었다 (Fig. 2).

Con A를 농도별로 주사한 결과, 5  $\mu\text{g}/\text{fish}$  농도

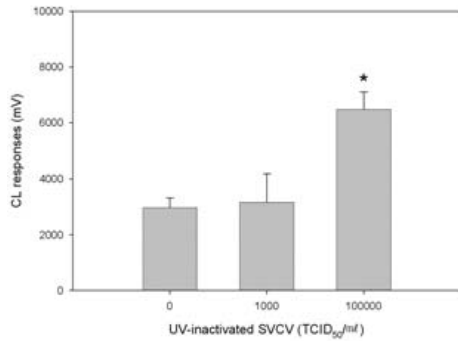


Fig. 7. Chemiluminescent responses of leucocytes isolated from head kidney of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of UV-inactivated SVCV. Control fish was injected with physiological saline. Values are means  $\pm$  SE. \* Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

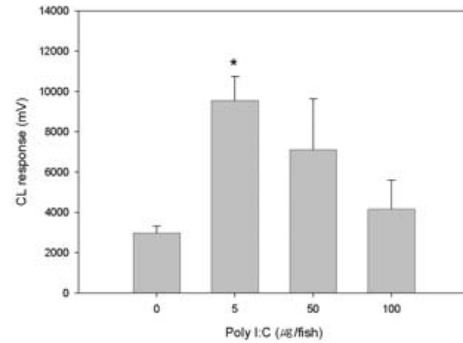


Fig. 8. Chemiluminescent responses of leucocytes isolated from head kidney of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of Poly I:C. Control fish was injected with physiological saline. Values are means  $\pm$  SE. \* Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

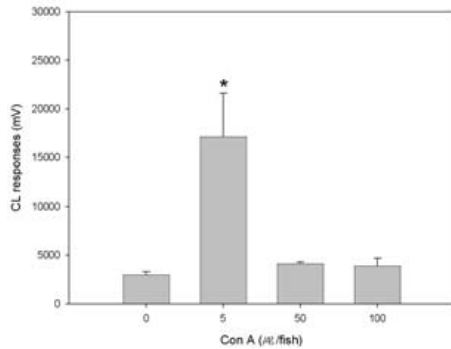


Fig. 9. Chemiluminescent responses of leucocytes isolated from head kidney of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of Con A. Control fish was injected with physiological saline. Values are means  $\pm$  SE. \* Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

에서는 혈청과 두신 조직에서 각각  $48.5 \pm 15.6$ ,  $133.3 \pm 37.1$  units/ml로 나타났으며, 50 µg/fish 농도에서는 각각  $118.6 \pm 84.2$ ,  $166.6 \pm 37.1$  units/ml, 100 µg/fish 농도에서는 각각  $72.5 \pm 19.2$ ,  $160 \pm 20$  units/ml로 나타나 혈청과 두신 조직 모두 Con A 농도가 50~100 µg/fish 일 때 라이소자임에 대한 자극 효과가 높게 나타났다 (Fig. 3).

## 2. 혈청 내 보체의 살균 능력 변화

UV-inactivated SVCV, Poly I:C 및 Con A를 시

험어에 각각 주사한 후 3일째 채혈하여 혈청 내 보체의 살균 능력을 조사한 결과, 혈청 내 보체를 불활성화시킨 inactivated serum에서는 반응 후 6시간까지 균수가 서서히 증가하다가 이후 급격하게 증가하였다. 그러나 신선 혈청의 경우 유의적인 차이는 없었으나 모든 시험구에서 생리식염수를 주사한 대조구보다 다소 낮은 살균 능력을 나타내었다 (Fig. 4, 5, 6).

## 3. 두신 백혈구의 활성 변화

UV-inactivated SVCV, Poly I:C 및 Con A를 각 시험어에 주사한 후 3일째 두신 백혈구를 분리하여 CL response를 조사한 결과, Fig. 7에 나타난 바와 같이 대조구의 경우  $2,980 \pm 338$  mV로 나타난 반면 UV-inactivated SVCV를 주사한 경우 농도별로  $3,164 \pm 1,031$  및  $6,476 \pm 620$  mV로 나타나  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/fish 시험구에서 두신백혈구의 활성이 유의적으로 증가한 것을 알 수 있었다 ( $P < 0.05$ ). Poly I:C 농도별 (Fig. 8)로는 각각  $9,565 \pm 1,180$ ,  $7,117 \pm 2,506$ ,  $4,163.7 \pm 1,437$  mV로 나타났으며, 5 µg/fish 시험구에서만 유의적인 증가를 나타내었다 ( $P < 0.05$ ). 또한, Con A 시험구 (Fig. 9)에서도 농도별로  $17,142.7 \pm 4,490$ ,  $4,128 \pm 174$  및  $3,892 \pm 820$  mV를 나타

**Table 1.** Cumulative mortalities and relative percent survival (RPS) against SVCV of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of UV-inactivated SVCV

|                          | SVCV (TCID <sub>50</sub> /fish) (n=20) |                     |                     |
|--------------------------|--|---------------------|---------------------|
|                          | PS*                                    | 1 × 10 <sup>3</sup> | 1 × 10 <sup>5</sup> |
| Cumulative mortality (%) | 85                                     | 65                  | 30                  |
| RPS (%)**                | -                                      | 24                  | 64.8                |

\* Physiological saline,

\*\* Relative percent survival (%) = [1 - (% mortality of UV-inactivated SVCV injected group) / (% mortality of control)] × 100.

**Table 2.** Cumulative mortalities and relative percent survival (RPS) against SVCV of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of Poly I:C

|                          | Poly I:C (μg/fish) (n=20) |      |      |      |
|--------------------------|---------------------------|------|------|------|
|                          | PS*                       | 5    | 50   | 100  |
| Cumulative mortality (%) | 80                        | 45   | 25   | 25   |
| RPS (%)**                | -                         | 43.7 | 68.7 | 68.7 |

\* Physiological saline,

\*\* Relative percent survival (%) = [1 - (% mortality of Poly I:C injected group) / (% mortality of control)] × 100.

**Table 3.** Cumulative mortalities and relative percent survival (RPS) against SVCV of common carp, *Cyprinus carpio* injected intraperitoneally with different concentrations of Con A

|                          | Con A (μg/fish) (n=20) |      |      |      |
|--------------------------|------------------------|------|------|------|
|                          | PS*                    | 5    | 50   | 100  |
| Cumulative mortality (%) | 80                     | 70   | 65   | 65   |
| RPS (%)**                | -                      | 12.5 | 18.7 | 18.7 |

\* Physiological saline,

\*\* Relative percent survival (%) = [1 - (% mortality of Con A injected group) / (% mortality of control)] × 100.

내어 5 μg/fish 시험구에서만 유의적인 증가를 나타내었다 (P < 0.05).

#### 4. SVCV에 대한 누적 폐사율 및 상대 생존율

UV-inactivated SVCV, Poly I:C 및 Con A를 각 시험어에 주사한 후 4일째 1 × 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/fish의 SVCV로 인위 감염한 결과, UV-inactivated SVCV를 주사한 경우 1 × 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/fish 시험구에서 64.8%의 상대생존율을 나타내었다 (Table 1). 또한, Poly I:C 주사구에서도 50 μg/fish 이상의

시험구에서 대조구에 비해 60% 이상의 상대생존율을 나타내었다 (Table 2). 그러나 Con A를 주사한 시험구에서는 유의적인 방어력의 증강 효과를 확인할 수 없었다 (Table 3).

## 고 찰

선천성 면역 반응은 후천적 면역 반응이 형성되기 전 바이러스의 감염을 억제하는 중요한 방어 기작으로 알려져 있다. 본 연구에서는 UV-

inactivated SVCV를 주사하여 바이러스 감염 초기에 형성되는 선천성 면역 반응으로서 라이소자임, 보체 및 식세포 등의 활성 등을 조사하였다. 또한 바이러스의 dsRNA 구조와 유사한 Poly I:C 및 T cell mitogen인 Con A를 잉어의 복강에 주사한 후 바이러스에 대한 면역 반응과 비교하였다. 그 결과 UV-inactivated SVCV가 두신 조직의 라이소자임 및 식세포의 활성을 자극한 것을 알 수 있었으며, Poly I:C를 저농도로 주사한 경우에도 두신 조직의 라이소자임 및 식세포의 활성이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다.

라이소자임은 선천성 면역의 중요한 인자로서 주로 대식세포, 호중구 및 호염기성 과립구에 분포하며 (Fletcher and White, 1976; Sveinbjørnsson *et al.*, 1996), 조직 중에서는 두신 조직이 plasma lysozyme의 주요 공급 장소로 알려져 있다 (Paulsen *et al.*, 2002). 어류의 라이소자임은 살균 및 항염증성 성질 (Alexander and Ingram, 1992), 읍소닌 및 항기생충 작용뿐만 아니라 항바이러스 작용 등에 관여함으로써 생체의 방어기작에서 다양한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Jolles and Jolles, 1984). 본 연구에서 UV-inactivated SVCV 및 바이러스의 구조적 유사 물질인 Poly I:C를 투여한 결과 혈청과 두신 조직의 라이소자임 활성이 증가하였으며, 특히 두신 조직의 라이소자임 활성이 단기간에 유의적으로 증가하였다. 이와 유사한 결과로서 잉어에 viral systemic necrosis of carp virus (VSNCV)의 불활화 백신을 투여한 경우 초기 반응에서 혈청 라이소자임의 활성 및 두신 백혈구의 활성이 증가하였다고 보고한 바 있다 (조 등, 2003). Desvignes 등 (2002)도 Atlantic salmon에 salmon pancreas disease virus (SPDV)로 인위 감염한 결과 대조구에 비해 식세포능, 라이소자임 및 보체의 활성이 모두 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서 Con A로 자극하였을 때에도 유사한 결과가 나타났는데 이러한 결과는 잉어의 두신 세포를 분리하여 Con A로 자극한 결과 lysozyme과 관련된 유전자의 발현이 증가되었다고 하는

Savan and Sakai (2002)의 보고와도 유사하다. 그러나 이와 달리 이 (1999)는 나일 틸라피아에 Con A를 주사한 결과, 주사 후 2주째 보체의 살균능이 다소 증가하였으나, 라이소자임 활성에 미치는 영향은 없는 것으로 보고하였다. 따라서 라이소자임이 바이러스에 대한 초기반응에 관여하는 것으로 추정되나, 어중에 따라 Con A의 lysozyme 자극 능력에 다소 차이가 있는 것으로 판단된다.

본 연구에서 UV-inactivated SVCV, Poly I:C 및 Con A의 투여로 인한 보체의 활성 변화를 *E. coli*에 대한 살균 능력으로 조사하였다. 그 결과 대조구를 포함한 모든 시험구의 신선 혈청에서 6시간까지 세균수가 다소 억제되는 경향을 보였으나 대조구와 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 이들 자극 물질들의 보체 활성에 대한 자극 효과를 확인할 수 없었다. 포유동물에서는 보체가 바이러스 및 바이러스에 감염된 세포의 살해 및 중화 작용에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다 (Cooper and Nemerow, 1986). 포유동물에서 보체에 대한 Poly I:C의 자극 효과는 다양한 결과로 나타나 있는데, guinea pigs (Li *et al.*, 2000) 및 rabbit (Kimura *et al.*, 1994)을 Poly I:C로 자극한 결과 보체 활성에 영향을 주지 않았다. 그러나 이와 반대로 Riches *et al.* (1988)은 Poly I:C로 mouse의 macrophage를 자극시킨 결과 보체 성분인 factor B 와 C3의 합성이 증가되었다고 하였다. 어류에서 바이러스 감염시 보체의 작용에 대해 연구된 바가 거의 없으나, 무지개송어의 VHSV 감염증에 보체의 고전 경로가 관여한다고 보고되었다 (Lorenzen *et al.*, 1999). 그러나 본 연구에서 UV-inactivated SVCV 및 Poly I:C에 의한 보체의 자극 효과는 없는 것으로 나타났다. 본 연구에서 보체의 활성이 낮게 나타난 이유로 이러한 반응이 주사 후 3일 이내의 단기간에 나타난 반응으로서 스트레스에 의한 억제 반응으로 추정될 수도 있다 (Saeij *et al.*, 2003). 김 (1995)은 잉어에 생리식염수, formalin-killed cell (FKC) 및

Lipopolysaccharide (LPS)를 각각 주사한 후 이 물질에 대한 보체의 활성을 조사한 결과, 생리식염수를 주사한 경우 보체의 활성이 현저하게 저하되었으나, 3일째부터 정균 작용을 나타내다가 5일째 살균 작용을 나타내었으며, FKC를 주사한 경우 7일 이후 보체의 활성이 회복된 반면 LPS를 주사한 경우 14일째에도 다소 약한 정균 작용을 나타내었다고 하였다. 또한 생리식염수를 주사한 경우에 비해 FKC 및 LPS를 주사하였을 때 보체 활성의 저하 현상이 빠르게 나타난 이유로서 생리식염수에 비해 이들 물질이 보체의 대체경로를 활성화 시키는 작용이 강해 시험관 내의 보체가 빠르게 소비되기 때문으로 주장하였다. 본 연구에서도 유의적인 차이는 없었으나 생리식염수를 주사한 대조구에 비해 UV-inactivated SVCV, Poly I:C 및 Con A 시험구에서 보체의 활성이 다소 낮게 나타났다. 따라서 라이소자임 및 식세포에 비해 보체의 활성이 스트레스에 더 민감한 것으로 추정되며 병원 인자의 감염 그 자체가 스트레스 인자로 작용할 수도 있다는 측면에서 본다면 보체가 바이러스 감염이 성립되기 전에 어체 내에서 충분한 방어력을 제공하지 못하는 것으로 추정된다.

본 연구에서 나타난 선천성 면역 반응이 바이러스에 대한 방어력에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 자극 물질들을 주사한 후 4일째 감염력이 있는 SVCV로 인위 감염하고 상대생존율을 조사하였다. 그 결과 Con A 시험구에서는 방어력을 확인할 수 없었으나 라이소자임 및 식세포 활성에서 높은 자극 효과를 나타낸 Poly I:C와 UV-inactivated SVCV가 SVCV에 대한 방어력에서도 높은 상대생존율을 나타내었다. Con A는 T cells mitogen으로서 포유동물의 Con A system은 leukocyte proliferation에 관여하는 여러 인자들에 대한 연구에서 매우 유용한 모델로 사용되고 있으며 (Yin *et al.*, 1999), 어류에서도 림프구의 proliferation에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (조 와 박, 1996; Caspi *et al.*, 2002; Liewes *et al.*, 2002). 어류에서 Con A가 바이러스에 대한 방어

력에 미치는 영향에 대해서는 거의 연구된 바가 없으나, 본 연구의 결과와 유사한 것으로서 잉어에 Con A를 주사한 결과 림프구의 수가 증가하였으나, *Edwardsiella tarda*에 대한 상대생존율은 10%로 나타나 방어력에는 영향을 미치지 않았다고 보고한 바 있다 (조 와 박, 1996). 따라서 알려진 바와 같이 Con A가 잉어의 림프구를 자극하는 것으로 판단되나 이러한 자극 효과가 바이러스에 대한 초기 방어력에는 영향을 미치지 못하는 것으로 판단된다. Con A와는 달리 Poly I:C 시험구에서 나타난 높은 방어력은 잉어류 및 연어과어류에서 보고된 바 있는데, Masycheva 등 (1995)은 잉어에 Poly I:C를 주사한 후 *Rhabdovirus carpio*로 인위 감염한 결과 78.8~100%의 높은 방어 효과가 나타났다고 하였으며 조 등 (2004)도 잉어에 50~100 µg/fish 농도의 poly I:C를 주사한 후 SVCV로 인위감염한 결과 대조구에 비해 60% 이상의 상대생존율을 나타내었다고 보고하였다. 연어과 어류에서도 Poly I:C 주사 후 IHNV 및 Erythrocytic Necrosis Virus (ENV)에 대한 누적 폐사율이 감소하였다 (Eaton, 1990). Jensen 등 (2002)도 Atlantic salmon의 pre-smolt (25~35 g)에 400 µg/fish 농도의 Poly I:C를 주사한 결과 infectious salmon anemia virus (ISAV)에 대한 방어력을 나타내었다고 하였다.

Poly I:C는 synthetic dsRNA polymer로서 바이러스의 dsRNA의 구조와 닮아 영장류와 다양한 종류의 세포에서 효과적인 type I IFN 유도 물질로 사용되고 있으며 (Giron *et al.*, 1981; Lampson *et al.*, 1981; Nakamura *et al.*, 1982), 그 외에도 macrophage, NK cell 및 B cell의 활성을 증가시키고 사이토카인의 생성을 증가시키는 등 다양한 면역 조절 기능을 가지고 있다 (Ishikawa and Biron, 1993; Manetti *et al.*, 1995). 이러한 면역 증강 효과와는 반대로 포유동물을 대상으로 한 일부 연구에서 고농도의 Poly I:C의 독성이 보고되고 있으나 (Phillips *et al.*, 1971; Homan *et al.*, 1972; Qu *et al.*, 2002) 어류에서는 Poly I:C의 독 작용에 대한 연구 결과가 매우 부족한 편이다.



Lockhart 등 (2004)은 Atlantic salmon의 post-smolt에 Poly I:C를 다양한 농도로 복강 주사하고 누적폐사율을 조사한 결과 200  $\mu\text{g}/\text{fish}$ 를 주사한 경우 35%의 누적폐사율이 나타났으며 500  $\mu\text{g}/\text{fish}$ 를 주사한 경우 70%의 높은 누적폐사율을 나타내었다고 하였다. 본 연구에서는 Poly I:C를 5~200  $\mu\text{g}/\text{fish}$  농도로 주사하고 누적 폐사율을 조사한 예비 실험에서 3주 동안 모든 실험구에서 폐사가 발생하지 않았으나, Poly I:C를 100  $\mu\text{g}/\text{fish}$  농도로 주사하고 비특이적 면역 반응을 조사한 결과 50  $\mu\text{g}/\text{fish}$  이하의 농도에 비해 라이소자임 및 두신백혈구의 활성이 감소한 것으로 나타났다. 그러나 라이소자임 및 식세포 활성이 다소 감소한 고농도의 Poly I:C에 대해서도 높은 방어력이 유도된 것으로 나타나 면역 인자에 대한 Poly I:C의 자극 효과 및 독성 반응에 차이가 있는 것으로 추정되므로 추후 바이러스에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 Poly I:C의 적정 농도 및 다양한 항바이러스 활성에 미치는 효과에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

잉어의 선천성 면역 인자가 관여하는 항바이러스 면역 반응을 조사하기 위해 UV-inactivated SVCV, Poly I:C 및 Con A를 주사한 후 3일째 라이소자임 활성, 혈청 내 보체의 살균능력 및 식세포의 활성산소량을 조사하였다. 그 결과, 모든 실험구에서 혈청 내 라이소자임의 활성은 유의적인 차이를 나타나지 않았으나, 두신 조직의 라이소자임 활성은 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다. 또한, 혈청 내 보체의 살균 능력도 모든 실험구에서 대조구와 유의적인 차이가 없었다. 그러나 식세포의 활성은 UV-inactivated SVCV 실험구에서는 농도에 따라 증가한 것으로 나타났으며, Poly I:C 및 Con A 실험구에서는 저농도에서 활성이 증가한 것으로 나타났다. 바이러스에 대한 방어력을 조사하기 위해 주사 후 4일째  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish 농도의 SVCV로 인위

감염한 결과 UV-inactivated SVCV 및 Poly I:C 실험구에서는 Con A 실험구에 비해 높은 방어력을 나타내었다. 또한, Poly I:C 실험구에서 라이소자임 및 식세포 활성이 다소 감소한 고농도에서도 높은 방어력이 유도된 것으로 나타나 이러한 결과는 Poly I:C에 의해 자극된 또 다른 비특이적 면역 인자가 SVCV에 대한 방어반응에 관여한 것으로 추정된다.

## 감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 (양식어류 백신개발 및 임상효과 연구, RP-2007-AQ-036)의 지원에 의해 운영되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Ahne, W.: The influence of environmental temperature and infection route on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) to spring viremia of carp virus (SVCV). *Vert. Immunol. Immunopathol.*, 12: 383-386, 1986.
- Alexander, J.B. and Ingram, G.A.: Noncellular non-specific defence mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 249-280, 1992.
- Baron, S., Singh, I., Chopra, A., Copenhaver, D. and Pan, J.: Innate antiviral defenses in body fluids and tissues, *Antiviral Res.*, 48: 71-89, 2000.
- Baudouy, A.M.: Host-virus relationship during experimental spring viremia in carp. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.*, 286: 1225-1228, 1978.
- Cooper, N.R. and Nemerow, G.R.: Complement dependent mechanisms of virus neutralization. In: Ross, G. D. (ed.), *Immunology of the Complement System*. Academic Press, pp. 139-162, 1986.
- Caspi, R.R., Shahrabani, R., Kehati-Dan, T. and Av-

- talion, R.R.: Heterogeneity of mitogen-responsive lymphocytes in carp (*Cyprinus carpio*). Dev. Com. Immunol., 8: 61-70, 2002.
- Desvignes, L., Quentel, C., Lamour, F. and Le Ven, A.: Pathogenesis and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr experimentally infected with salmon pancreas disease virus (SPDV). Fish Shellfish Immunol., 12: 77-95, 2002.
- Dianzani, F. and Baron, S.: Nonspecific defenses. In: Baron, S. (ed.), Medical microbiology. The university of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Tx, pp. 631-640, 1996.
- Dixon, B. and Stet, R.J.M.: The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. Dev. Com. Immunol., 25: 683-699, 2001.
- Eaton, W.D.: Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic : cytidylic acid. Dis. Aquat. Org., 9: 193-198, 1990.
- Ellis, A.E.: Lysozyme assay. In *Techniques in Fish Immunology* (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. Muiswinkel, eds), Fire Haven, SOS publications, pp. 101-103, 1990.
- Fijan, N., Petrincic, Z., Stanel, Z., Kezic, N. and Teskeredzic, E.: Vaccination of carp against spring viremia : comparison of intraperitoneal and peroral application of live virus to fish kept in ponds. Bull. Off. Epiz., 92: 1055-1068, 1977.
- Fletcher, T.C. and White, A.: The lysozyme of the plaice *Pleuronectes platessa* L. Comp. Biochem. Physiol., 55: 207-210, 1976.
- Giron, D.J., Smith, K.C., Hoffman, J.A. and Fowler, J.A.: Enhancement of viral RNA-induced interferon production in L cells treated with insulin and Amphotericin B methyl ester. J. Interferon Res., 1: 581-586, 1981.
- Homan, E.R., Zendzian, R.P., Schott, L.D., Levy, H.B. and Adamson, R.H.: Studies on Poly I:C toxicity in experimental animals. Toxicol. App. Pharmacol., 23: 579-588, 1972.
- Ishikawa, R. and Biron, C.A.: IFN induction and associated changes in splenic leukocyte distribution. J. Immunol., 150: 3713-3727, 1993.
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A. and Robertsen, B.: Effects of Poly I:C on the expressions and resistance against infection by infectious salmon anemia virus in Atlantic salmon. Fish Shellfish Immunol., 13: 311-326, 2002.
- Jolles, P. and Jolles, J.: What's new in lysozyme research? Always model system, today as yesterday. Mol. Biochem., 63: 165-189, 1984.
- Kimura, T., Nakayama, K., Penninger, J., Kitagawa, M., Harada, H., Matsuyama, T., Tanaka, N., Kamiyo, R., Vilcek, J. and Mak, T.W.: Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. Science, 264: 1921-1924, 1994.
- Lampson, G.P., Field, A.K., Tytell, A.A. and Hilleman, M.R.: Poly I:C/Poly-L-Lysin : potent inducer of interferons in primates. J. Interferon Res., 1: 539-549, 1981.
- Liewes, E.W., Van Dam, R.H., Vos-Maas, M.G. and Bootsma, R.: Optimization and kinetics of *in vitro* stimulation of carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes. Vet. Immunol. Immunopathol., 3: 325-343, 2002.
- Li, S., Sehic, E., Ungar, A.L. and Blatteis, C.M.: Complement does not mediated the febrile responses of guinea pigs to muramyl depeptide and polyribinosinic-polyribocytidylic acid. J. Thermal. Biol., 25: 51-58, 2000.

- Lockhart, K., Bowden, T.J. and Ellis, A.E.: Poly I:C-induced Mx responses in Atlantic salmon parr, post-smolts and growers. *Fish Shellfish Immunol.*, 17: 245-254, 2004.
- Lorenzen, N., Olesen, N.J. and Koch, C.: Immunity to VHS virus in rainbow trout. *Aquaculture*, 172: 41-61, 1999.
- Manetti, R., Annunziato, E., Tomasevic, L., Giannino, V., Parronchi, P., Romagnani, S. and Maggi, E.: Polyinosinic acid. poly cytidylic acid promotes T helper type I -specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon-alpha and interleukin-12. *Eur. J. Immunol.*, 25: 2656-2660, 1995.
- Masycheva, V.I., Alikin, Y.S., Klimenko, V.P., Fadina, V.A., Shchelkunvova, I.S., Shchelkunova, T.I. and Kupinskaya, O.A.: Comparative antiviral effects of dsRNA on lower and higher vertebrates. *Vet. Res.*, 26: 536-538, 1995.
- Matašin, Ž., Fijan, N. and Petrincec, Z.: Vaccination of carp against spring viremia with inactivated vaccine. In: *Ichthyopathology in Aquaculture*, (eds.) N. Fijan, S. Cvetnić and T. Wikerhauser, JAZU, Zagreb, 1988.
- Miles, A.A. and Misra, S.S.: The estimate of the bacterial power of blood. *J. Hygiene*, 38: 873-885, 1938.
- Nakamura, O., Shitara, N., Matsutani, M., Takakura, K. and Machida, H.: Phase I - II trials of poly (ICLC) in malignant brain tumor patients. *J. Interferon Res.*, 2: 1-4, 1982.
- Paulsen, S.M., Lunde, H., Engstad, R.E. and Robertsen, B.: *In vivo* effects of  $\beta$ -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish shellfish Immunol.*, 12: 1-16, 2002.
- Phillips, B.M., Hartnagel, R.E., Kraus, P.J., Tamayo, R.P., Fonseca, E.H. and Kowalski, R.L.: Systemic toxicity of polyinosinic acid : polycytidylic acid in rodents and dogs. *Toxicol. App. Pharmacol.* 18: 220-230, 1971.
- Qu, W.M., Miyazaki, T., Terada, M., Mori, S., Kanono, H. and Nose, N.: A novel autoimmune pancreatitis model in MRL mice treated with polyinosinic:polycytidylic acid. *Clin. Exp. Immunol.*, 129: 27-34, 2002.
- Riches, D. W., Henson, P.M., Remigio, L.K., Catterall, J.F. and Strunk, R.C.: Differential regulation of gene expression during macrophage activation with a polyribonucleotide. The role of endogenously derived IFN. *J. Immunol.*, 141: 180-188, 1988.
- Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steiniz, M. and Kotler, M: Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*, 21: 4677-4684, 2003.
- Savan, R. and Sakai, M.: Analysis of expressed tags (EST) obtained from common carp, *Cyprinus carpio* L., head kidney cells after stimulation by two mitogens, lipopolysaccharide and concanavalin-A. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131: 71-82, 2002.
- Saeij, J.P.J., Verburg-van Kemenade, L.B.M., van Muiswinkel, W.B. and Wiegertjes, G.F.: Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: *in vitro* modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis. *Dev. Com. Immunol.*, 27: 233-245, 2003.
- Song, W.C., Sarrias, M. R. and Lambris, J. D.: Complement and innate immunity. *Immunopharmacol.*, 49: 187-198, 2000.
- Sveinbjørnsson, B., Olsen, R. and Paulsen, S.: Immunocytochemical localization of lysozyme

- in intestinal eosinophilic granular cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 19: 349-355, 1996.
- Trsarčik, J. and Macura, B.: Spring viremia of carp-development of a vaccine in Czechoslovakia. In: *Ichthyopathology in Aquaculture*, (eds). N. Fijian, S. Cvetnić and T. Wikerhauser, ZAZU, Zagreb, 1988.
- Yin, Z., He, J.Y, Gong, Z., Lam, T.J. and Sin, Y.M.: Identification of differentially expressed genes in ConA-activated carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes. *Com. Biochem. Physiol.*, 124: 41-50, 1999.
- 김선명: 이스라엘 잉어의 보체 활성화에 미치는 스트레스의 영향. 부경대학교 학위논문, 11-24, 1995.
- 이상윤: 구기자 (*Lycii fructus*) 추출물이 나일틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)의 면역반응에 미치는 효과. 부경대학교 학위논문, p29, 1999.
- 조미영, 박수일: Mitogen 투여에 대한 잉어 순환 혈액 림프구의 반응. *한국어병학회지*, 9: 95-109, 1996.
- 조미영, 손상규, 김이청, 김진우, 오명주, 정성주, 박수일: 잉어바이러스성신경괴사증바이러스 (VSNCV) 백신투여에 대한 잉어의 면역반응. *한국어병학회지*, 16: 175-181, 2003.
- 조미영, 김은전, 임상구, 김진우, 박수일: 잉어 두신 백혈구에서 생성된 Interferon-like cytokine (ILC)의 항바이러스 활성화. *한국어병학회지*, 17: 75-82, 2004.

---

Manuscript Received : July 11, 2007

Revision Accepted : August 9, 2007

Responsible Editorial Member : Jung-Ho Kim  
(Kangnung Univ.)