

넙치 치어에서의 바이러스성출혈성 패혈증 감염에 따른 체내 바이러스분포 및 초기면역유전자 발현 비교

김수진^{*,**} · 방지형^{*} · 오명주^{*†}

^{*}전남대학교 수산생명의학과, ^{**}국립수산과학원 병리연구과

Comparison of VHSV loads and early immune gene expression in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after VHSV infection

Soo-Jin Kim^{*,**}, Ji-Hyeong Bang^{*} and Myung-Joo Oh^{*†}

^{*}Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea

^{**}Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science (NIFS),
Busan 46083, Republic of Korea

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) is the etiological agent of viral hemorrhagic septicemia (VHS), which is one of the most serious viral diseases affecting cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Korea. Mortality due to VHSV infection in olive flounder appears in the cold-water season at 8 to 15°C. Among factors contributing to the onset of VHS epizootics in olive flounder, the water temperature plays essential role in regulation of VHS outbreaks. In order to estimate the VHSV infectivity and distribution, we performed cell culture and qRT-PCR in flounder target organ after VHSV infection. VHSV titration and distribution were similar between spleen and kidney. The different differential expression kinetics of four immune-related genes in spleen and kidney were observed in this study. Perforin was immediately up-regulated and then continuously expressed within 48h in both of spleen and kidney. Mx gene showed the highest immune-related gene expression in this study. IL-8 and ISG-15 were expressed in spleen. It was peaked at 15h and then gradually decreased, whereas these were not relatively expressed in kidney. Our study showed that the immune response in host was immediately activated, further study needs to interpret the interaction between host and pathogen for their survival.

Key words: VHSV, olive flounder, immune gene, infection

서 론

바이러스성출혈성패혈증바이러스 (viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)는 *Rhabdoviridae*에

속하는 RNA바이러스로 1980년대 유럽의 무지개 송어를 포함한 담수어에서 검출이 보고되었고 (Wolf, 1988), 2000년대 한국과 일본의 양식넙치에서 늦겨울에서 이른봄에 이르는 저수온기에 대량 폐사를 유발하는 대표적인 저수온성 어류 바이러스성 질병으로 알려져 있다 (Isshiki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2009). VHSV는 연어과 어류 및 해수어

[†]Corresponding author: Myung-Joo Oh
Tel: +82-61-659-7173, Fax: +82-61-659-6947
E-mail: ohmj@jnu.ac.kr

류를 포함한 약 80여종 이상의 광범위 어종에서 감수성이 보고되고 있다 (WOAH, 2021). VHSV는 해수 내 바이러스 입자가 체내로 침입하여 비장과 신장과 같은 조혈조직을 파괴하며 물을 매개로 한 감염어로부터 비감염어로의 수평감염이 주된 전파기전으로 생각된다 (Wolf, 1988). 하지만 정확한 감염기전 및 전파기전은 알려져 있지 않으며, 수온이 해당 질병의 발병과 전파에 매우 중요한 인자로 작용한다 (Sano *et al.*, 1999; Kim and Jung, 2014; Kim *et al.*, 2016, 2019, 2020). 최근 우리 연구팀에서는 수온을 이용하여 비감염 넙치 치어에 live VHSV 침지 백신법(Kim *et al.*, 2020)을 개발하였으며 in-situ hybridization법을 이용한 바이러스 초기 감염에 따른 어체 기관 내 바이러스 분포(Qadiri *et al.*, 2019; 2020; Jang *et al.*, 2022)에 대한 연구를 수행하고 있다.

본 연구에서는 VHSV 감염 후 48시간 내에 발현되는 면역 관련 유전자의 발현과 어체 내 바이러스 감염가 및 정량분석을 통해 VHSV 감염 성립과 어체 내 저항 매커니즘의 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어 및 바이러스 배양

실험어인 넙치 치어는 충청남도 태안군 소재 종묘생산장에서 전남대학교 수산과학연구소로 이송하였으며, 수온 $13 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 에서 2주간 순치 후 실험에 사용하였다. 실험에 앞서 실험어의 VHSV 무감염 여부 판단을 위해 넙치 비장과 신장을 무균적으로 적출하여 Kim *et al.*, 2014의 방법에 준하여 바이러스를 검사한 결과 감염되지 않음을 확인하였다.

실험에 사용된 바이러스는 2005년 여수 소재 넙치 양식장에서 VHSV에 감염된 넙치 비장조직에서 분리한 VHSV FYeosu05 주를 사용하였다(Kim *et al.*, 2009). 바이러스는 fathead minnow (FHM) cell line을 이용하여 배양하였으며, 100 UI/mL penicillin G, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 100 µg/mL streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified essential medium (DMEM)을 사용하여 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 10일간 배양하면서 세포변성효과 (cy-

topathic effect, CPE)를 관찰하였다. 바이러스 배양액은 4°C 15분간 8,000 rpm으로 원심분리 실시 후 상층액을 취하여 실험 사용 전까지 -80°C 에 보관하였다.

VHSV 인위감염 및 면역 유전자 분석용 샘플 채취

시험에 사용된 넙치 치어는 평균 3.5 ± 0.7 g, 수온 $13 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 의 조건에서 65 L 플라스틱 수조에 각 30마리 사육하였으며, 배양된 VHSV를 근육주사법으로 $10^{5.5}$ TCID₅₀/100µL/fish의 농도로 인위감염을 실시하였으며, 시간의 경과에 따라 총 10회 (0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 24h, 36h, 48h) 3마리씩 무작위로 선별, 시료를 채취하였다. 무작위로 선별된 넙치 치어는 무균적으로 비장과 신장을 적출한 즉시 면역 유전자 발현 분석을 위한 RNA를 추출하였다.

총 RNA 추출, DNase처리 및 cDNA합성

넙치 치어 비장과 신장조직에서의 total RNA 추출은 RNAiso plus kit (Takara, Japan)을 사용하여 추출하였다. 추출한 RNA에 포함된 DNA의 오염을 제거하기 위해 DNase (Takara, Japan)를 처리하였다. DNase처리는 200 µL PCR tube에 추출한 RNA 20 µL와 시판되는 10X DNase I buffer 5 µL, recombinant DNase I 2 µL, ribonuclease inhibitor (RRI) 0.5 µL, DEPC-treated water 22.5 µL를 첨가한 후 37°C 에서 30분간 처리하였다. 그 후 0.5M EDTA 2.5 µL를 첨가하고 80°C 에 2분간 처리하였으며, DEPC-treated water 50 µL를 추가하여 최종양을 100 µL로 새로운 1.5 mL tube에 옮겨주었다. 3M sodium acetate 10µL, 100% ethanol 250 µL를 첨가하여 -80°C 에서 20분간 반응시키고 4°C 에서 10분간 12,000 rpm에서 원심분리를 실시하였다. 상층액을 제거하여 남은 침전물에 70% ethanol 250 µL을 첨가하여 4°C , 5분간 12,000 rpm으로 원심분리를 실시하였다. 이후, 상층액을 제거하고 남아있는 에탄올을 완벽히 제거한 후 DEPC-treated water 20 µL를 첨가하여 남은 침전물을 완전히 녹여주었으며 DNase를 처리한 RNA는 reverse transcriptase kit (Toyobo, Japan)를 사용하여 제조사의 설명에 따라 cDNA합성을 실시하였다.

Table 1 Standardize primer sets for the olive flounder immune response against VHSV infection

Name	Accession No.	Tm temp. (°C)	E value	Primer sequence (Forward, reverse)	Reference
β-actin	HQ386788	57	2.098	CCTCTTCCAGCCTTCATTC TGGTTCCTCCAGATAGCAC	
IL-8	AF216646	57	2.096	TCCGTGGGTGAAGAGAGT ATTAGGGTCGTGTTGAGTTGT	
ISG-15	AB519717	58	2.102	GCTGTATGACAACGGTCAGG CTCAGGAAGACCTGGATGG	
Mx	AB110446	59	2.038	TCACTGGATTTCCCAACCTC TGTCACTCAAACCTGCTGCTG	
Perforin	AB084905	57	1.93	AACAACAACAACAACCCACAC TGTCCTGTCCACACCTT	

면역유전자 발현 분석, VHSV 정량분석 (qRT-PCR) 및 감염가(TCID₅₀) 측정

면역유전자의 발현을 qRT-PCR법으로 분석하였다. 프라이머는 Avunje et al., (2011)에 언급된 것을 사용하였으며 Table 1에 정리하였다. 시판되는 Accu Prep®2X GreenStar qPCR mix(Bioneer, Korea)를 사용하여 Exicycler™96 (Bioneer, Korea)를 사용하였다. VHSV 정량분석은 Kim et al., 2014의 방법에 준하여 qRT-PCR을 실시하였고, FHM 주화세포를 이용하여 세포 변성효과를 측정한 후 Ree&Muench (1938)에 준하여 TCID₅₀법으로 바이러스 감염가를 산출하였다.

결과 및 고찰

바이러스성출혈성패혈증은 저수온기 국내 넙치 양식장에 경제적 손실을 야기하는 대표적인 어류 바이러스성 질병이다. 해당 질병은 국내에서 양식 넙치의 성별, 크기에 상관없이 발병하고 있으나 치어기에 더 많은 폐사를 일으키는 것으로 보고되고 있다(Kim et al., 2009). 본 연구에서는 넙치 치어를 대상으로 VHSV에 인위감염을 시킨 후 48시간 내에 어체 내 바이러스의 변화와 바이러스 감염에 저항하기 위한 면역관련 유전자의 발현분석을 실시하였다. VHSV의 정량분석 결과 및 감염가의 변화는 Fig. 1과 같다. 비장에서 바이러스의 감염가

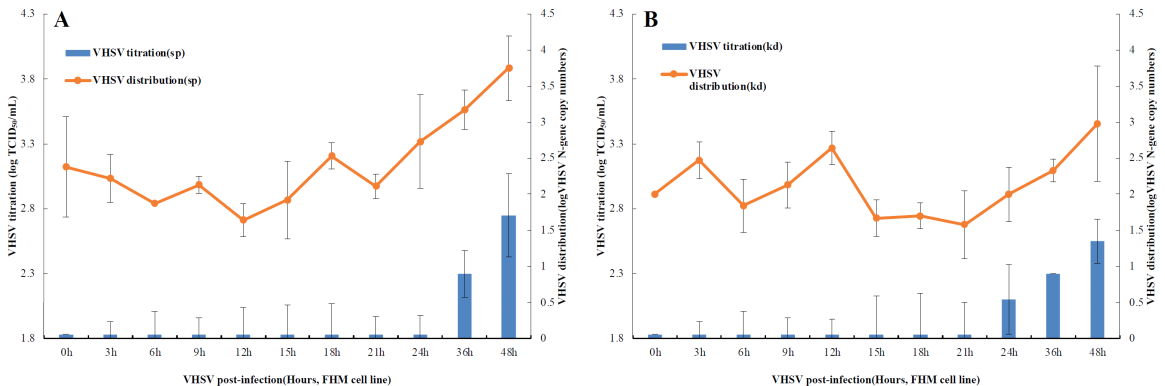


Fig. 1. Virus titration and distribution in spleen (A) and kidney (B) from VHSV-infected juvenile olive flounder. Vertical axis represents the log TCID₅₀/mL, secondary axis represents the log VHSV copy number in spleen and kidney. Horizontal axis represent the time dependent sampling period after VHSV-infection.

는 36시간 이후 증가하는 양상이 확인되었고 바이러스 정량분석 결과에서도 36시간 이후 급격히 증가하는 양상이 확인되었다. 신장에서의 바이러스 감염가는 24시간부터 증가하였으며, 정량분석 결과 또한 24시간부터 48시간까지 꾸준히 증가하였다. 비장에서는 감염 24시간부터 조직 내 바이러스가 급격히 증가하였고, 신장에서는 감염 21시간부터 바이러스량이 증가하는 양상이 확인되었다. Kim *et al.*, 2019에 따르면 넙치 치어에서 VHSV 감염 후 3일차부터 바이러스 감염가의 증가 및 혈액 내 바이러스 분포를 확인하였으며 7일째에 가장 높았다. Avunje *et al.*, 2012의 보고에서는 수온 15°C에서 VHSV copy number가 3시간째 최초로 확인되어 6시간부터 꾸준히 증가하는 양상이 확인되었고, 12-48시간 내에 최고치에 도달하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 넙치 치어 체내에서 바이러스가 증가가 확인되지만 해당 연구에 비해 낮은 수준으로 증가되는 경향이 확인되었다. VHSV감염 후 넙치 치어에서의 48시간 이내에 발현되는 초기 면역관련 유전자는 Fig. 2와 같다. 본 연구에서는 perforin, interleukin-8 (IL-8), interferon stimulate gene-15 (ISG-15) 및 Mx gene의 증가를 β -actin을 reference gene으로 사용하여 상대분석을 실시하였다. 비장에서 perforin과 IL-8은 VHSV 인위감염 직후 (0h)에 확인되어 48시간까지 유전자의 발현이 확인되었다. Perforin은 감염 15h에 급격히 증가하여

48시간까지 높게 발현되었으며 IL-8도 동일하게 감염 15h부터 급격히 증가하여 18h까지 유지되는 것이 확인되었다. ISG-15의 경우 감염 12h에 급격히 발현되어 21h까지 증가하는 양상이 확인되었고 Mx gene은 본 연구에서 확인된 면역유전자 중 가장 높은 수준의 발현이 관찰되었다. 즉, Mx gene은 감염 12h에 가장 높은 발현량이 확인되었으며, 48h까지 높은 발현량을 확인할 수 있었다. 신장에서는 비장과 동일하게 VHSV 감염 직후 perforin과 IL-8의 증가가 확인되었고 비장에 비하여 높은 발현량이 확인되었으나, IL-8의 경우 감염 9h이후 신장에서는 유전자의 발현이 확인되지 않았다. Mx gene은 비장에서 3h에 발현되었으나 신장에서는 감염 직후 높은 발현량이 확인되었고 6h과 48h에 가장 높은 발현량이 확인되었다. ISG-15의 경우 감염 21h에 증가된 발현량이 확인되었으며, 비장에 비해 낮은 수준으로 발현되는 양상이 확인되었다. Perforin은 바이러스에 감염된 세포를 제거하는 데 핵심적인 역할을 하는 유전자로 알려져 있으며 현재까지 포유류, 제브라피쉬, 붕어 등 경골어류에서도 활발히 보고되고 있다(Denyer *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2020). 몇몇 연구자들은 바이러스 감염 이후 perforin의 면역 관련성을 보고하였으며, 어류에서도 RSIV 감염, VHSV 감염 및 SVC 감염에서 perforin 유전자의 증가를 보고하였다 (Verela *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Ordás *et al.*, 2011; Xu *et al.*,

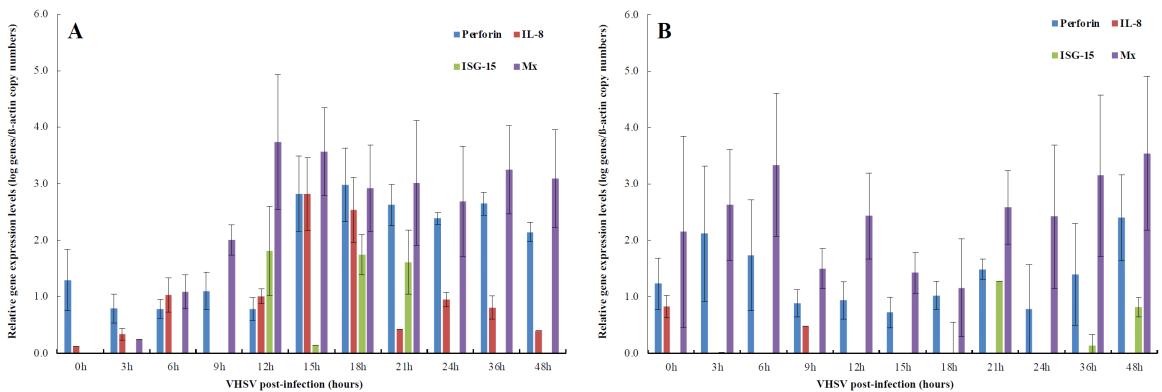


Fig. 2. Relative Immune gene expression in spleen (A) and kidney (B) after VHSV-infection within 48h in juvenile olive flounder. Vertical axis represent the relative gene expression levels. Horizontal axis represent the time dependent sampling period after VHSV-infection. Blue bar shows the relative perforin expression levels; Red bar represents IL-8, green bar shows the ISG-15 and purple bar shows relative Mx gene expression levels.

2021). IL-8은 대식세포에 의해 생성되는 염증성 사이토카인의 하나로 2차 매개물질로 작용하여 염증세포를 활성화 시키고 척추동물에서 바이러스 감염 또는 병원체 감염을 저해하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Laing *et al.*, 2002; Laing and Secombes, 2004; Wang *et al.*, 2019). 넙치 및 다양한 어종에서 바이러스 감염 후 IL-8이 증가하며 항바이러스 면역반응을 위해 IL-8의 증가가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Laing *et al.*, 2002; Mark *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2011; Nguen *et al.*, 2017; Kole *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). ISG-15는 타겟유전자를 ISGylation시켜 바이러스의 복제를 방해하는 것으로 알려져 있으며, 숙주에서 interferon response를 나타내는 대표적인 유전자 중 하나인 Mx는 어류에서 subgeneric mRNA의 transcription을 방해하여 바이러스 particle을 감소하는 역할을 하는 것으로 추측된다. 본 연구에서 면역유전자의 증감을 확인한 결과 바이러스 감염 이후 넙치 체내에서 interferon response를 나타내는 Mx gene의 꾸준한 발현이 확인되었으며 비장과 신장에서 발현되는 면역유전자의 시간차이를 확인하였다. Kim and Jung(2014)은 VHSV 감염 후 cDNA microarray 분석 결과, 본 연구와 동일하게 면역유전자의 기관별 발현 및 발현 양상차이를 확인하였다. 또한 본 연구와 동일하게 VHSV 감염 후 비장과 신장에서의 감염가 및 바이러스 분포 차이는 확인되지 않았다. 이번 결과에서 감염 수은 상에서 VHSV 감염 48시간 이내 낮은 바이러스 감염가 및 분포는 숙주의 방어력에 의해 바이러스의 증가가 상대적으로 늦게 이루어지는 것으로 추측되며, 바이러스 감염에 저항하기 위한 면역 관련 유전자의 발현은 빠른 시간에 이루어 지는 경향을 확인하였다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 (grants 2021R1A2C2007 076)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Avunje, S., Kim, W.S., Park, C.S., Oh, M.J., Jung, S.J.

2011. Toll-like receptors and interferon associated immune factors in viral haemorrhagic septicaemia virus-infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and shellfish immunology.*, 31, 407-414.

Avunje, S., Kim, S.W., Oh, M.J., Choi, I., Jung, S.J. 2012. Temperature-dependent viral replication and antiviral apoptotic response in viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)-infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and shellfish immunology.*, 32, 1162-1170.

Denyer, M.S., Wileman, T.E., Stirling, C.M.A., Zuber, B., Takamatsu, H.H. 2006. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Veterinary Immunology and immunopathology.*, 110, 279-292.

Isshiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T., Miyazaki, T. 2001. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Organ.* 47(2): 87-99.

Jang, Y.S., Kim, S.J., Yoon, S.Y., Krishnan, R., Oh, M.J. 2022. The safety of live VHSV immersion vaccine at a temperature-controlled culture condition in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology.*, 35(2), 225-230.

Kim, J.O., Kim, W.S., Kim, S.W., Han, H.J., Kim, J.W., Park, M.A., Oh, M.J. 2014. Development and application of quantitative detection method for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genogroup IVa. *Viruses.*, 6(5), 2204-2213.

Kim, K.H., Kim, H.C., Park, C.J., Park, J.W., Lee, Y.M., Kim, W.J. 2019. Interleukin-8 (IL-8) expression in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) challenge. *Development and reproduction*, 23(3), 231-238.

Kim, S.J., Kim, J.O., Kim, W.S., Oh, M.J. 2016. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infectivity dynamics in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* with injection and immersion challenge routes. *Aquaculture.*, 265(2016), 7-12.

Kim, S.J., Oh, M.J. 2020. Potentiality to natural immunization inducement against VHS in olive flounder by live VHSV immersion vaccination at temperature controlled culture condition. *Virus Research.*, 288, 198140.

Kim, S.J., Qadiri, S.S.N., Kim, J.O., Oh, M.J. 2019. Kinetics of infectious virus and viral RNA copy

- numbers in the blood of olive flounder infected with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Virus Research.*, 267, 16-20.
- Kole, S., Avunje, S., Jung, S.J. 2019. Differential expression profile of innate immune genes in the liver of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) at host susceptible and non-susceptible temperatures. *Aquaculture.*, 505, 51-58.
- Laing, K.J., Zou, J.J., Wang, T., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T., Secombes, C.J. 2002. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology.*, 26, 433-444.
- Laing, K.J., Secombes, C.J. 2004. Chemokines. *Developmental & Comparative Immunology.*, 28, 443-460.
- Li, T., Wang, L., Zhang, Y., Guo, X., Chen, Z., Zhang, F., Yang, G., Wen, W. 2018. Molecular characterization of three novel perforins in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their expression patterns during larvae ontogeny and in response to immune challenge. *BMC Veterinary Research.*, 14(1), 299.
- Nguyen, T.T.T., Nguyen, H.J., Wang, P.C., Chen, S.C. 2017. Identification and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-8 in cobia (*Rachycentron canadum* L.) in response to *Streptococcus dysgalactiae* infection. *Fish and Shellfish Immunology.*, 67, 159-171.
- Ordás, M.C., Cuesta, A., Mercado, L., Bols, N.C., Tafalla, C. 2011. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) up-regulates the cytotoxic activity and the perforin/granzyme pathway in the rainbow trout RTS11 cell line. *Fish and Shellfish Immunology.*, 31(2), 252-259.
- Reed, J.J., Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *American Journal of Epidemiology.*, 27(3), 493-497.
- Qadiri, S.S.N., Kim, S.J., Krishnan, R., Kim, J.O., Kole, S., Kim, W.S., Oh, M.J. 2019. Localization and tissue tropism of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in experimentally infected juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*: an *in situ* hybridization and immunohistochemical study. *Aquaculture.*, 505, 242-252.
- Qadiri, S.S.N., Kim, S.J., Krishnan, R., Kole, S., Oh, M.J. 2020. Early detection and localization of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) genomic mRNAs in external tissues of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) following an immersion challenge. *Aquaculture.*, 518, 734859.
- Sun, J.S., Zhao, L., Sun, L. 2011. Interleukin-8 of *Cynoglossus semilaevis* is a chemoattractant with immunoregulatory property. *Fish and Shellfish Immunology.*, 30, 1362-1367.
- Varela, M., Forn-Cuní, G., Dios, S., Figueras, A., Novoa, B. 2016. Proinflammatory caspase A activation and an antiviral state are induced by a zebrafish perforin after possible cellular and functional diversification from a myeloid ancestor. *Journal of Innate Immunity.*, 8(1), 43-56.
- Wang, X., Ma, G., Zhang, R., Liu, L., Zhu, J., Zhu, H. 2019. Functional identification and expression responses of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) interleukin-8 and its receptor. *Fish and Shellfish Immunology.*, 87, 470-477.
- WOAH(World Organisation for Animal Health), 2021. *Manual of Diagnostic tests for aquatic animal diseases*, OIE Paris.
- Wolf, K. 1988. Viral hemorrhagic septicemia virus. In *Fish viruses and fish viral diseases*. edited by Wolf, K. Ithaca: Cornell University Press. pp. 217-249.
- Xu, J., Yang, N., Xie, T., Yang, G., Chang, L., Yan, D., Li, T. 2020. Summary and comparison of the perforin in teleost and mammals: A review. *Scandinavian Journal of Immunology.*, 94, 1-13.

Manuscript Received : May 16, 2023

Revised : May 29, 2023

Accepted : May 31, 2023