

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 신장에서 Poly (I:C)의 단기 및 장기적인 면역 효과

성민재 · 박영진[†]

선문대학교 수산생명의학과

Short and long-term immune effects of Poly (I:C) in kidney of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Minjae Seong and Youngjin Park[†]

Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

Viral diseases cause enormous economic losses to the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) aquaculture industry in Korea. This study aimed to identify immune-related genes expressed in the kidney of olive flounder injected with Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly (I:C)). Thirty fish were divided into two groups by intraperitoneal injection of 100 μ l of diethylpyrocarbonate-treated water or poly I:C per fish. Kidney tissues at day 3 and 30 after the injection were used for RNA-seq analysis to identify differentially expressed genes (DEGs). Poly I:C group upregulated *il8*, *cfh*, *tnfaip2b*, *c3b.2*, *ly6d* and *cd38* genes at 3 days post-injection. Additionally, *cd22*, *ccl34a.3*, *c9*, *cxcl19*, *ccl27a*, *ccl17*, and *cfh* genes were upregulated at 30 days post-injection. Differential expression gene analysis showed that poly I:C has both short and long-term immune effects in olive flounder. This study provides a theoretical basis for understanding the molecular mechanism of the short and long-term immune effects of poly I:C.

Key words: Olive flounder, Immunostimulant, Poly I:C

서 론

대한민국의 양식어종 중 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 한국 및 동아시아에서 상업적 가치가 높은 양식어종으로, 넙치 양식 산업은 1980년대 인공 종묘 생산기술과 양식생산 기술이 개발되어 급격하게 성장하였다(Jung *et al.*, 2020). 이러한 성장을 통해 넙치는 2023년 기준 대한민국 양식 어류 생산량의 절반을 차지하였다(Kim *et al.*, 2002; KOSTAT,

2024). 그러나 증가하는 수산물 소비량에 대응하기 위해 넙치의 고밀도 양식이 진행되면서 넙치에 스트레스를 유발하였다(Seo & Park, 2023). 이로 인해 넙치에서 다양한 바이러스, 박테리아, 기생충 관련 질병 발생(Cho *et al.*, 2008)이 증가하였고, 막대한 경제적 손실이 발생하였다.

넙치에서 많이 발생하는 Viral Nervous Necrosis (VNN), Viral hemorrhagic septicemia (VHS), Vibriosis, Scuticociliatosis (Cho *et al.*, 2008)와 같은 질병을 예방하기 위해 항생제, 백신, 구충제 등이 사용되었다. 바이러스 질병의 경우 백신의 예방효과가 효과적이지 않고 종류가 부족하여 넙치 양식에 심

[†]Corresponding author: Youngjin Park
Tel: +82-41-530-2416, Fax: +82-41-530-2917
E-mail: yjpark88@sunmoon.ac.kr

각한 문제를 야기하고 있다(Adams, 2019). 이러한 백신의 문제를 보완하기 위해 면역증강제를 사용하여 백신의 효과를 높이려는 시도가 진행되고 있다(Tafalla *et al.*, 2013).

Poly I:C는 면역증강제로 각광받고 있으며 폴리이노신산과 폴리시티딜산으로 구성되어 Toll-like receptor 3 (TLR3)에 인식되는 합성 이중 가닥 RNA(dsRNA)이다(Alexopoulou *et al.*, 2001; Cheng & Xu, 2010). 포유류 연구에서는 poly I:C가 선천적 면역 활성화, 적응 면역 조절(Mian *et al.*, 2013), 항바이러스 및 항 종양 효과(Di *et al.*, 2019; Komal *et al.*, 2021)가 있는 것으로 보고되었다. 경골어류에서는 염증성 사이토카인 생성, I형 IFN과 항바이러스 Mx 단백질의 생산, HSP 및 케모카인 활성화를 유도하여 면역반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Das *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2017; Monjo *et al.*, 2017). 이러한 반응을 이용하여 poly I:C는 Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) (Takami *et al.*, 2010), Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) (Kim *et al.*, 2009), Infection with infectious salmon anaemia virus (ISAV) (Jensen *et al.*, 2002) 감염을 억제하는 것으로 알려져 있다. 최근 면역증강제 투여 시 선천 면역과 적응 면역, 그에 따른 유전자 발현의 조절을 확인하고 있다(Dhiman *et al.*, 2009; Olafsdottir *et al.*, 2015). 하지만 면역증강제의 단기적인 면역 효과를 봤던 연구는 많았지만 장기적인 면역 효과를 봤던 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 넙치에 poly I:C를 복강 내 주사한 뒤 3일과 30일 후에 샘플링을 진행하여 RNA sequencing을 통한 전사체 분석을 실시하였다. 그 후 차등 발현 유전자를 확인하여 poly I:C의 단기 및 장기적인 면역 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 어류

외관 및 질병의 증세가 보이지 않는 양식 넙치(약 42 g)를 구입 후 UV 살균 시스템이 설치되어 있는 200 L 수조를 이용하여 사육을 하였다. 수온은 $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 2주간 수조에 순치시켜

실험에 사용하였다. 또한 VHS, VNN 등의 넙치에 감염될 수 있는 바이러스성 질병을 PCR 및 EPC, RTG-2 및 BF-2 세포주를 이용한 세포배양 실험으로 질병이 없음을 확인한 후 실험 어류로 사용하였다.

Poly I:C 접종

Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C, Sigma, Saint Louis, USA)는 diethyl pyrocarbonate-treated water (D.W)에 1mg/ml의 농도로 접종 직전에 용해시켜 사용하였다. 실험구는 poly I:C를 어체당 10 µg/ml의 농도로 100 µl를 30마리에 복강 내 주사하였으며, 동일한 양의 D.W를 복강 내 주사한 넙치 30마리를 대조군으로 설정하였다. 접종 후 3일과 30일에 각각 10마리씩 샘플링하였다. 3일째 샘플링한 그룹을 Poly-3d로 명명하였고 30일째 샘플링한 그룹은 Poly-30d로 명명하였다. D.W를 주사한 30마리는 Control로 명명하였다.

RNA 시퀀싱 분석

실험어의 신장 조직 50-100 mg을 마쇄한 후 Trizol을 이용하여 Total RNA를 추출하였으며, Bio Drop Nano-Spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) 와 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)을 사용하여 RNA를 정량 및 정성분석 하여 NGS를 수행하였다.

Total RNA에서 Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, Inc., San Diego, USA)를 이용하여 mRNA를 분리하였다. 먼저 poly-A가 결합된 mRNA를 oligo-dT가 부착된 자성 비드를 사용하여 정제한 후 2가 양이온을 사용하여 fragment로 만들었다. RNA fragment들을 역전사효소와 랜덤 프라이머를 사용하여 cDNA 가닥으로 복제하였고, DNA polymerase I 과 RNase H를 사용하여 두 번째 cDNA를 합성하였다. 이렇게 완성된 cDNA 조각들은 하나의 A염기가 첨가되는 말단 복구과정을 거친 후 결합되었다. 각 product들을 정제 후 PCR을 통해 최종 cDNA library를 만들었다.

Illumina HiSeq 2000 platform (Illumina, Inc., San Diego, USA)을 이용하여 RNA-seq 진행 후에 실험구와 대조구의 발현된 유전자 양을 비교하기 위해 fragments per kilobase of transcript per million frag-

ments mapped (FPKM)와 log₂ Fold Change을 이용하였다(Kim *et al.*, 2023; Park *et al.*, 2020). 먼저 Fold Change (FC) 값이 2 이상이 되는 유전자들을 선별하고, FC 값을 log₂ 값으로 치환하여 유전자 발현량의 차이를 나타냈다.

결 과

RNA 시퀀싱 분석결과

넙치의 신장에서 추출한 RNA를 *de novo* assembly 후 trimming을 진행하였다. RNA 시퀀싱 데이터의 품질 확인을 위해 총 염기, read 개수, GC 비율 및 Q20과 Q30을 평가한 결과를 표로 나타냈다 (Table 1). 시퀀싱을 진행한 Poly-3d, Poly-30d 및 Control의 raw read는 각각 70,657,602개, 64,858,804개, 67,223,966개로 확인되었다. 이후 trimming을 진행하여 각각 69,361,130개, 63,689,516개, 65,977,556개의 read를 생성했다. Q20은 Poly-3d, Poly-30d 및

Control이 99.28%, 99.16%, 99.28%로 측정되었고, Q30은 97.48%, 97%, 97.49%로 나타났다. 마지막으로 GC 비율은 각각 49.45%, 49.3%, 49.97%로 나타났다.

Poly-3d에서 높은 FPKM 값을 가진 유전자

Poly-3d에서 가장 높은 FPKM을 가진 상위 10개 유전자를 나타낸 표이다(Table 2). Poly-3d에서 가장 높은 FPKM 값을 가진 상위 10개 유전자로는 대식세포(*cd74a*, *cd74b*), 면역글로불린(*ighv3-2*), 인터루킨(*il8*), 세포골격(*tuba8l3*) 관련 유전자 및 *pigh*, *gars*, *qlafd6*, *loc100858230*, *gig2d* 유전자가 존재한다.

Poly-30d에서 높은 FPKM 값을 가진 유전자

Poly-30d에서 가장 높은 FPKM을 가진 상위 10개 유전자를 나타낸 표이다(Table 3). Poly-30d에서 가장 높은 FPKM 값을 가진 상위 10개 유전자로는

Table 1. Summary of the RNA sequencing results

	Poly-3d	Poly-30d	Control
Raw reads	70,657,602	64,858,804	67,223,966
Total bases	6,950,213,267	6,377,852,280	6,614,430,290
Read count	69,361,130	63,689,516	65,977,556
Q20 (%)	99.28	99.16	99.28
Q30 (%)	97.48	97	97.49
GC content (%)	49.45	49.3	49.97

Table 2. Top ten contigs highly abundant in the kidney tissues of olive flounder at day 3 post Poly (I:C) injection

Contig	Symbol	Description	FPKM-Control	FPKM-Poly
c58342_g1_i1	<i>cd74a</i>	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain a	2778.95	1513.31
c48165_g4_i1	<i>pigh</i>	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class H	772.06	392.14
c58767_g1_i1	<i>gars</i>	Glycyl-tRNA synthetase	380.85	196.93
c51300_g1_i1	<i>qlafd6</i>	Stanniocalcin-1	2941.88	145.64
c60527_g1_i1	<i>loc100858230</i>	Solute carrier family 6 member 13	64.2	144.11
c29235_g1_i1	<i>cd74b</i>	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain b	277.21	136.87
c117462_g1_i1	<i>tuba8l3</i>	Tubulin, alpha 8 like 3	52.21	136.24
c54958_g1_i1	<i>gig2d</i>	Grass carp reovirus (GCRV)-induced gene 2d	237.06	125.83
c48731_g1_i1	<i>ighv3-2</i>	Immunoglobulin heavy variable 3-2	45.09	104.02
c62982_g1_i2	<i>il8</i>	Interleukin 8	22.03	100.83

Table 3. Top ten contigs highly abundant in the kidney tissues of olive flounder at day 30 post Poly (I:C) injection

Contig	Symbol	Description	FPKM-Control	FPKM-Poly
c74263_g1_i4	<i>mhc1uaa</i>	Major histocompatibility complex class I UAA	327.34	191.9
c64425_g1_i1	<i>cxcl19</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 19	25.06	64.47
c64952_g1_i1	<i>ccl14</i>	C-C motif chemokine ligand 14	94.14	52.14
c63482_g1_i1	<i>ccl35.2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 35, duplicate 2	51.07	25.23
c59906_g1_i1	<i>zp4</i>	Zona pellucida glycoprotein 4	0.02	23.44
c47381_g1_i1	<i>ccl34a.3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 34a, duplicate 3	5.02	21.48
c856_g1_i1	<i>ccl27a</i>	C-C motif chemokine ligand 27A	4.51	16.16
c67388_g2_i2	<i>ccl7</i>	C-C motif chemokine ligand 7	2.83	7.81
c69361_g2_i1	<i>p18135</i>	Ig kappa chain V-III region HAH (precursor)	0.23	6.21
c67385_g1_i1	<i>cfh</i>	Complement factor H	1.8	4.58

케모카인(*cxcl19*, *ccl14*, *ccl35.2*, *ccl34.3*, *ccl27a*, *ccl7*), 면역글로불린(*p18135*), 보체(*cfh*)관련 유전자 및 *mhc1uaa*, *zp4* 유전자가 존재한다.

Poly-3d에서 차등 발현된 유전자

Poly I:C의 단기적인 면역 효과를 알아보기 위해 차등 발현 유전자와 면역 관련 유전자의 유전자 발현 수준을 확인하였다(Fig. 1A). 전체 383개 차등 발현 유전자 중 200개 유전자가 상향 조절되었고 ($p < 0.05$), 183개 유전자가 하향 조절되었다($p < 0.05$). 위 표는 대조구 대비 Poly-3d 그룹에서 상향

및 하향 조절된 DEG를 각각 상위 10개씩 나타낸 표이다(Table 4). Poly-3d에서 *hamp*, *ly6d*, *il8* 유전자가 상향 조절되었고($p < 0.05$), *q1afd6* 및 *pycard* 유전자는 하향 조절되었다($p < 0.05$). 그 외에도 면역 관련 유전자인 *mfaip2b*, *cd38*, *c3a.1*, *c3b.2*, *hspd1*, *hspa1b*, *hsp-3*, *steap4* 유전자가 상향 조절 됨을 확인하였다.

Poly-30d에서 차등 발현된 유전자

Poly I:C의 장기적인 면역 효과를 알아보기 위해 차등 발현 유전자와 면역 관련 유전자의 유전자

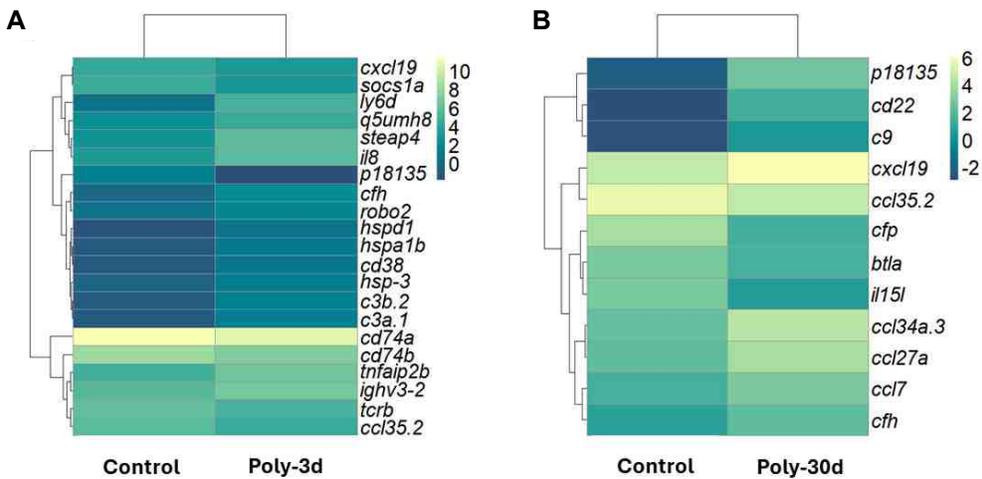


Fig. 1. Heatmaps of selected immune-related DEGs in kidney of olive flounder after Poly (I:C) injection. (A) Expression levels of Immune-related DEGs at day 3 post Poly (I:C) injection. (B) Expression levels of Immune-related DEGs at day 30 post Poly (I:C) injection. Based on FPKM values, Log2-transformed gene expression levels are shown in a gradient color scheme in each row.

Table 4. Top ten highly upregulated and downregulated genes in the kidney tissues of olive flounder at 3 d post Poly (I:C) injection

Contig	Fold change	Symbol	Description
Upregulated gene			
c73311_g1_i1	38.781409	<i>hamp</i>	Hepcidin antimicrobial peptide
c49416_g1_i1	12.678856	<i>ly6d</i>	Lymphocyte antigen 6 family member D
c49506_g1_i1	7.098315	<i>steap4</i>	STEAP4 metalloreductase
c60009_g2_i1	6.05885	<i>actb</i>	Actin beta
c58282_g1_i1	5.643864	<i>zgc</i>	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3-like
c69810_g1_i3	5.057081	<i>pycard</i>	PYD and CARD domain containing
c49096_g1_i1	5.005178	<i>h2afx</i>	H2A histone family, Member X
c56632_g1_i1	4.998003	<i>his71</i>	Histone H3.3 type 1
c62982_g1_i1	4.611895	<i>il8</i>	Interleukin 8
c56822_g1_i2	4.562172	<i>ecm1b</i>	Extracellular matrix protein 1b
Downregulated gene			
c51300_g1_i1	-23.058037	<i>q1afd6</i>	Stanniocalcin 1, like
c99805_g1_i1	-11.578739	<i>Zgc</i>	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3-like
c67704_g3_i1	-11.163006	<i>hbegf</i>	Heparin binding EGF like growth factor
c72176_g2_i1	-8.12559	<i>pinlyp</i>	Phospholipase A2 inhibitor and LY6/PLAUR domain containing
c61436_g1_i1	-6.345789	<i>adma</i>	Adrenomedullin a
c69810_g1_i1	-4.051586	<i>pycard</i>	PYD and CARD domain containing
c60020_g2_i1	-3.914764	<i>ppfibp2</i>	PPFIA binding protein 2
c53714_g1_i1	-3.813346	<i>muc19</i>	Mucin 19, oligomeric
c68851_g4_i1	-3.784757	<i>ceacam5</i>	CEA cell adhesion molecule 5
c47737_g1_i1	-3.740171	<i>msmb</i>	Microseminoprotein beta

발현 수준을 확인하였다(Fig. 1B). 전체 22개 차등 발현 유전자 중 10개 유전자가 상향 조절되었고($p < 0.05$), 12개 유전자가 하향 조절되었다($p < 0.05$). 위 표는 대조구 대비 Poly-30d 그룹에서 상향 및 하향 조절된 DEG를 각각 상위 10개씩 나타낸 표이다(Table 5). Poly-30d에서는 면역글로불린(*p18135*), T 세포(*cd22*), 케모카인(*ccl34a.3*, *ccl27a*, *ccl7*, *cxcl19*), 보체(*c9*, *cfh*) 관련 유전자가 상향 조절되었고($p < 0.05$), 보체(*cfp*, *clqbp*), 케모카인(*ccl35.2*, *ccl14*), 면역글로불린(*p01607*, *p04432*), 인터루킨(*il15l*) 관련 유전자는 하향 조절되었다($p < 0.05$).

고 찰

Poly I:C는 대표적인 면역증강제 중 하나이며 다양한 면역반응을 일으킨다. 전사체 연구 기술인 RNA-seq은 빠르게 발전하면서 다양한 어종에 대

한 효과적인 연구 기술이 되었다. Poly I:C 접종 후 면역반응을 알아본 연구들은 이전에 보고된 적 있다. 그러나 대부분 poly I:C를 접종한 후 4일 이내 (Liu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2006)에서 나타나는 단기 면역효과에 대한 연구이며, poly I:C의 장기적 면역 효과에 대한 정보는 부족하여 poly I:C의 면역 효과에 대한 정보는 여전히 제한적이다. 본 연구에서는 전사체 분석을 위해 poly I:C를 접종한 넙치와 접종하지 않은 넙치의 신장을 사용하여 RNA-seq을 진행했다. 이를 통해 poly I:C 실험구 및 대조구의 차등 발현 유전자를 비교했다. 본 연구의 목적은 poly I:C를 넙치에 투여하였을 때 차등 발현되는 유전자를 알아보고 이를 통해 poly I:C의 면역효과에 대한 정보를 제공하는 것이다.

케모카인은 감염 및 염증 반응에 의해 생성되며 감염부위로 백혈구의 이동을 촉진시켜 면역반응

Table 5. Top ten highly upregulated and downregulated genes in the kidney tissues of olive flounder at 30 d post Poly (I:C) injection

Contig	Fold change	Symbol	Description
Upregulated gene			
c59906_g1_i1	22.54668	<i>zp4</i>	Zona pellucida glycoprotein 4
c69361_g2_i1	6.019432	<i>p18135</i>	Ig kappa chain V-III region HAH (precursor)
c66901_g2_i1	3.569746	<i>cd22</i>	CD22 molecule
c47381_g1_i1	3.453931	<i>ccl34a.3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 34a, duplicate 3
c70017_g2_i1	3.279102	<i>si</i>	sucrase-isomaltase
c856_g1_i1	2.925904	<i>ccl27a</i>	C-C motif chemokine ligand 27A
c67388_g2_i2	2.265258	<i>ccl7</i>	C-C motif chemokine ligand 7
c55323_g3_i1	2.166577	<i>c9</i>	Complement C9
c64425_g1_i1	2.130763	<i>cxcl19</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 19
c67385_g1_i1	2.04472	<i>cfh</i>	Complement factor H
Downregulated gene			
c61636_g1_i1	-4.530837	<i>cfp</i>	Complement factor properdin
c62437_g1_i1	-3.169038	<i>il15l</i>	Interleukin 15, like
c74263_g1_i3	-2.594809	<i>mhc1uaa</i>	Major histocompatibility complex class I UAA
c65342_g1_i1	-2.553343	<i>notch1</i>	Notch receptor 1
c63482_g1_i1	-2.257845	<i>ccl35.2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 35, duplicate 2
c103270_g1_i1	-2.144125	<i>clqbp</i>	Complement C1q binding protein
c64952_g1_i1	-2.126197	<i>ccl14</i>	C-C motif chemokine ligand 14
c43967_g1_i2	-2.125255	<i>p01607</i>	Ig kappa chain V-I region Rei
c73453_g2_i5	-2.107929	<i>prkcbb</i>	Protein kinase C, beta b
c79858_g1_i1	-2.097638	<i>p04432</i>	Immunoglobulin kappa variable 1D-39

을 일으킨다(Laing & Secombes, 2004). 본 연구에서 poly I:C 접종 후 30일 된 넙치의 신장 조직은 케모카인 관련 유전자(*cxcl19*, *ccl14*, *ccl34a.3*, *ccl27a*, *ccl7*)의 발현이 증가했다. 넙치의 *in vivo* 실험에서 *ccl34a.3*이 전염증성 사이토카인인 *il-1 β* 및 *cxcl8* 유전자 발현을 증가시키고 이를 통해 신장 백혈구의 이동을 유도할 수 있다고 확인했다(Kim *et al.*, 2021). 본 실험 결과와 같이 *Aeromonas salmonicida*를 감염시킨 볼락에서는 *cxcl19*가 면역학적으로 중요한 역할을 하는 신장, 비장, 간에서 유전자가 상향 조절되어 *cxcl19*가 염증 반응과 면역반응에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다(Li *et al.*, 2021). 또한 박대에서 *Vibrio harveyi* 감염 후 두신에서 *ccl27a* 유전자의 발현이 증가하였으며, 이는 *ccl27a*가 항상성 케모카인으로서 작용하는 것을 나타낸다(Hao & Li, 2015). 생쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서 *ccl27*을 투여하였을 때 점막에서 항원 특이적 IFN- γ 및 IgA의 증가가 나타났다(Kraynyak *et*

al., 2010). 이러한 결과는 poly I:C 투여가 케모카인 유전자 발현을 증가시켜 면역반응을 강화시킬 수 있음을 시사한다.

보체는 병원균에 대한 숙주 방어 역할을 하며 다른 면역반응 및 생리적 시스템과 협력하여 선천 면역과 적응 면역을 통해 염증 촉진, 적응 면역 반응 조절 및 병원균을 용해한다(Hajishengallis *et al.*, 2017). 본 연구에서 poly I:C 접종 후 3일(*c3a.1*, *c3b.2*) 및 30일(*c9*, *cfh*)된 넙치의 신장 조직은 보체 관련 유전자의 발현이 증가했다. 기벨 잉어 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 *Cyprinid herpesvirus-2* 감염 2일 후에 *c3* 유전자의 발현이 유의하게 증가한 모습을 확인할 수 있었으며, poly I:C 투여 2일까지 *c3* 유전자의 발현이 증가된 모습을 확인했다(Fan *et al.*, 2020). 이를 통해 *c3*가 바이러스 감염에 대한 면역반응에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 또한 가숭어 *in vivo* 실험에서 poly I:C를 투여한 가숭어의 신장조직에서 *c9* 유전자가 유의하게 증

가하여 바이러스 감염 시 보체 경로가 활성화 될 수 있음을 시사한다(Liyanage *et al.*, 2018). 이러한 결과는 poly I:C 투여가 보체 유전자 발현을 증가시켜 선천 면역 반응을 강화하는 것을 시사한다.

T 세포는 병원체, 종양 및 항원에 대한 인식과 반응 및 면역학적 기억을 통해 항상성을 유지하고 면역반응을 일으켜 적응 면역의 여러 측면을 조절한다(B. V. Kumar *et al.*, 2018). 본 연구에서 poly I:C 접종 후 3일 (*cd38*) 및 30일 (*cd22*) 된 넙치의 신장 조직은 T 세포 관련 유전자의 발현이 증가했다. 철갑상어 *in vivo* 실험에서 poly I:C 투여 후 *cd22* 유전자가 유의하게 발현이 증가하였고 말초 혈액 백혈구 활성화 억제를 하는 것으로 나타났다(Chen *et al.*, 2023). *cd38*은 T 세포와 자연 살해 세포의 발현 증가와 관련된 마커이다. 인간 말초 혈액 단핵세포 *in vitro* 실험에서 poly I:C를 투여한 실험구에서 *cd38* 유전자 발현이 유의하게 증가하였으며, T세포와 자연살해세포의 활성 증가가 나타났다(Pjanova *et al.*, 2019). 이러한 결과는 poly I:C 투여를 통해 T 세포의 유전자 발현이 증가하여 백혈구 및 면역세포의 활성화를 시사한다.

넙치에 poly I:C 접종 후 발현이 증가한 다른 면역 유전자로는 인터루킨(*il8*), 열 충격 단백질(*hspd1*, *hspa1b*, *hsp-3*), 금속환원효소(*steap4*), 종양 괴사 인자(*tnfaip2b*)가 있다. 인터루킨은 면역세포의 증식, 성숙, 이동에 필수적이고, 염증반응을 조절하는 역할을 한다(Justiz Vaillant & Qurie, 2024). 조피볼락 *in vivo* 실험에서 poly I:C 투여 후 두신에서 증가된 *il8* 유전자 발현이 *il-1β*를 활성화시키고 염증 부위로 호중구 이동 및 침윤을 자극했다(Herath *et al.*, 2016). 열 충격 단백질은 다양한 스트레스 요인에 의해 상향되며 전염증성 사이토카인 및 항원제시 세포 활성화 및 성숙을 유도할 수 있는 선천적 면역 활성화 인자이다(Robert, 2003; Tsan & Gao, 2004). Ya-fish (*Schizothorax prenanti*)의 *in vivo* 실험에서 poly I:C 투여 후 두신에서 *hsp60*의 발현이 유의하게 증가하였고 이는 바이러스에 대한 특이적 및 비특이적 면역반응을 시사한다(Zhang *et al.*, 2022). 수조기 *in vivo* 실험에서 poly I:C를 투여 후 두신에서 *hsp70*의 발현이 유의하게 증가하였다(Xiang *et al.*, 2020). 이러한 결과는 열 충격 단백질

이 항바이러스 면역과정에 관여한다는 것을 시사한다. 금속환원효소인 *steap4*는 철 및 구리 항상성에 관여하며 염증성 사이토카인 반응 및 스트레스를 통해 발현되어 세포를 손상으로 보호하는 역할을 한다(Scarl *et al.*, 2017). 무지개 송어 *in vivo* 실험에서 *Yersina ruckeri*에 감염시킨 무지개 송어 신장의 *steap4* 양이 증가한 것을 확인하였고, 이를 통해 *steap4*가 염증 및 면역반응에 관여한다는 것을 확인하였다(G. Kumar *et al.*, 2018). 종양 괴사 인자는 종양 세포 괴사, 세포사멸 및 염증반응을 통해 병원체로부터 숙주를 보호하는 역할을 한다(Chu, 2013). 초어 *in vitro* 실험에서 *Aeromonas hydrophila*를 감염시킨 신장 세포에서 miR-142a-3p가 *tnfaip2*를 발현을 조절하여 세포사멸을 유발하는 것을 확인하였고, 이는 *tnfaip2*가 면역반응에 관여한다는 것을 나타낸다(Tao *et al.*, 2021). 이러한 결과들을 종합했을 때 poly I:C의 투여가 여러 면역 유전자들의 발현을 증가시켜 면역반응을 강화하는 것을 시사한다.

Poly I:C 접종 후 3일 차에 발현된 면역 유전자 중 *cd74a*, *cd74b* 유전자의 FPKM 값이 control 대비 감소했다. *cd74*는 대식세포에서 발현되어 항원 제시 및 염증신호 전달을 수행한다(Borghese & Clanchy, 2011). *cd74* 유전자 발현 감소는 T 세포(*cd38*), 보체(*c3a.1*, *c3b.2*), 인터루킨(*il8*) 관련 유전자가 증가한 모습을 통해 선천 면역에서 적응 면역으로 전환되는 시기라고 예상된다. Poly I:C 접종 후 30일 차에 발현된 면역 유전자 중 *ccl14* 유전자의 FPKM 값이 control 대비 감소했다. *ccl14*는 단핵구, 호산구, T 세포의 화학주성을 촉진하는 케모카인이다. 다양한 인간 암에서의 *ccl14* 발현을 본 연구에서 *ccl14*가 면역세포 침윤을 조절하는 것을 확인하였다(Gu *et al.*, 2020). *ccl14* 유전자 발현 감소는 poly I:C 접종 후 장시간 지나 면역반응이 감소하면서 단핵구, 호산구, T 세포의 화학주성이 감소한 것으로 예상된다. Poly I:C 접종 3일 차에는 대식세포(*cd74a*, *cd74b*), 보체(*c3a.1*, *c3b.2*, *cfh*) 외에 림프구 분화(*ly6d*) 및 세포골격(*tuba8l3*)과 같은 유전자들의 발현이 증가하였고, poly I:C 접종 30일 차에는 케모카인(*cxcl19*, *ccl14*, *ccl34a.3*, *ccl27a*, *ccl7*), 보체(*cfh*), T 세포(*cd22*)관련 유전자의 발현이 증가

하였다. 이러한 결과를 통해 poly I:C는 단기 및 장기적으로도 면역효과가 존재하며, 초기에는 선천 면역 관련 유전자의 발현이 증가하고, 후기에는 케모카인과 T 세포와 같은 적응 면역 관련 유전자의 발현이 증가하는 모습을 확인하였다.

결론적으로, RNA-seq 데이터 분석을 통해 poly I:C 투여가 케모카인, 보체 및 T 세포 및 면역과 관련된 여러 유전자를 발현시키는 것으로 확인되었다. poly I:C 투여시 발현되는 케모카인은 염증 반응 및 백혈구의 화학주성을 통해 면역반응을 일으키며, 또한 보체와 T 세포는 선천 면역과 적응 면역에 관련된 여러 면역세포 및 유전자를 발현시켜 바이러스 감염을 억제한다. 그 외에도 면역 관련 유전자인 인터루킨, 열 충격 단백질 및 금속환원효소의 발현 수준이 poly I:C 투여 시 상향 조절됨을 확인하였다. 이러한 결과는 poly I:C가 단기뿐만 아닌 장기적인 면역 효과도 있다는 것을 나타낸다. 그러나 poly I:C 투여 후 장기적인 면역 유전자의 발현은 케모카인, 보체 및 T 세포에 치중되어 있으므로 시기에 따른 면역 유전자 발현 변화를 확인하기 위한 추가적인 연구가 필요하다. 또한 신장 외의 다른 면역기관에서의 poly I:C 투여 후 장기적인 면역 유전자 발현을 확인하여 면역 증강제로써 poly I:C의 효과를 검증할 필요가 있다.

사 사

이 논문은 2023년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단 기초연구사업의 지원을 받아 수행된 연구임(RS-2023-00251522).

References

- Adams, A.: Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 210-214, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413:6857, 732-738, 2001. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Borghese, F. and Clanchy, F. I. L.: CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15:3, 237-251, 2011. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.550879>
- Chen, Y., Wu, X., Lai, J., Liu, Y., Song, M., Li, F. and Gong, Q.: Transcriptome sequencing of the spleen of the Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*) under *Edwardsiella tarda* and poly(I:C) treatments. *Aquaculture Reports*, 28, 101442, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101442>
- Cheng, Y.-s. and Xu, F.: Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*, 10:12, 1219-1223, 2010. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.12.13450>
- Cho, M.-Y., Kim, M.-S., Choi, H.-S., Park, G.-H., Kim, J.-W., Park, M.-S. and Park, M.: A statistical study on infectious diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Journal of fish pathology*, 21:3, 271-278, 2008.
- Chu, W.-M.: Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*, 328:2, 222-225, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.014>
- Das, B. K., Ellis, A. E. and Collet, B.: Induction and persistence of Mx protein in tissues, blood and plasma of Atlantic salmon parr, *Salmo salar*, injected with poly I:C. *Fish & Shellfish Immunology*, 26:1, 40-48, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.009>
- Dhiman, N., Smith, D. I. and Poland, G. A.: Next-generation sequencing: a transformative tool for vaccinology. *Expert Review of Vaccines*, 8:8, 963-967, 2009. <https://doi.org/10.1586/erv.09.67>
- Di, S., Zhou, M., Pan, Z., Sun, R., Chen, M., Jiang, H., Shi, B., Luo, H. and Li, Z.: Combined Adjuvant of Poly I:C Improves Antitumor Effects of CAR-T Cells [Original Research]. *Frontiers in Oncology*, 9, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00241>
- Fan, Y., Zhang, X., Zhou, Y., Jiang, N., Liu, W. and Zeng, L.: Molecular cloning of Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) complement component C3 and its expression profile after Cyprinid herpesvirus 2 infection. *J Vet Med Sci*, 82:1, 47-55, 2020. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0125>
- Gu, Y., Li, X., Bi, Y., Zheng, Y., Wang, J., Li, X., Huang, Z., Chen, L., Huang, Y. and Huang, Y.: CCL14 is a prognostic biomarker and correlates with immune infiltrates in hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*, 12:1, 784-807, 2020. <https://doi.org/10.18632/aging.102656>
- Hajishengallis, G., Reis, E. S., Mastellos, D. C., Ricklin, D. and Lambris, J. D.: Novel mechanisms and func-

- tions of complement. *Nat Immunol*, 18:12, 1288-1298, 2017. <https://doi.org/10.1038/ni.3858>
- Hao, L.-x. and Li, M.-f.: Molecular characterization and expression analysis of nine CC chemokines in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 47:2, 717-724, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.003>
- Herath, H. M. L. P. B., Elvitigala, D. A. S., Godahewa, G. I., Umasuthan, N., Whang, I., Noh, J. K. and Lee, J.: Molecular characterization and comparative expression analysis of two teleostean pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8, from *Sebastes schlegeli*. *Gene*, 575:2, Part 3, 732-742, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.082>
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A.-I. and Robertsen, B.: Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 13:4, 311-326, 2002. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0406>
- Jung, J.-Y., Kim, S., Kim, K., Lee, B.-J., Kim, K.-W. and Han, H.-S.: Feed and Disease at Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Farms in Korea. *Fishes*, 5:3, 21, 2020. <https://www.mdpi.com/2410-3888/5/3/21>
- Justiz Vaillant, A. A. and Qurie, A. (2024). Interleukin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.
- Kim, H.-J., Yasuike, M., Kondo, H., Hirono, I. and Aoki, T.: Molecular characterization and gene expression of a CXC chemokine gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23:6, 1275-1284, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.07.006>
- Kim, H. J., Oseko, N., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or Poly(I:C). *Diseases of Aquatic Organisms*, 83:2, 105-113, 2009. <https://doi.org/10.3354/dao02000>
- Kim, H. J., Park, J. S., Kwon, S. R. and Park, Y.: Determining transcriptomic response of kidneys of olive flounder to viral hemorrhagic septicemia virus infection using next-generation sequencing. *Aquaculture*, 562, 738886, 2023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738886>
- Kim, J.-Y., Park, J. S., Jung, T. S., Kim, H. J. and Kwon, S. R.: Molecular cloning and characterization of chemokine C-C motif ligand 34 (CCL34) genes from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 116, 42-51, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.06.012>
- Kim, K.-D., Lee, S.-M., Park, H. G., Bai, S. C. and Lee, Y.-H.: Essentiality of Dietary n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids in Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33:4, 432-440, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00022.x>
- Komal, A., Noreen, M. and El-Kott, A. F.: TLR3 agonists: RGC100, ARNAX, and poly-IC: a comparative review. *Immunologic Research*, 69:4, 312-322, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09203-6>
- KOSTAT. Preliminary Results of the Survey on the Status of Fish Culture in 2023. 2-4, 2024. (Daejeon, Korea)
- Kraynyak, K. A., Kutzler, M. A., Cisper, N. J., Khan, A. S., Draghia-Akli, R., Sardesal, N. Y., Lewis, M. G., Yan, J. and Weiner, D. B.: Systemic immunization with CCL27/CTACK modulates immune responses at mucosal sites in mice and macaques. *Vaccine*, 28:8, 1942-1951, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.095>
- Kumar, B. V., Connors, T. J. and Farber, D. L.: Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48:2, 202-213, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Kumar, G., Hummel, K., Noebauer, K., Welch, T. J., Razzazi-Fazeli, E. and El-Matbouli, M.: Proteome analysis reveals a role of rainbow trout lymphoid organs during *Yersinia ruckeri* infection process. *Scientific Reports*, 8:1, 13998, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31982-6>
- Laing, K. J. and Secombes, C. J.: Chemokines. *Developmental & Comparative Immunology*, 28:5, 443-460, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.006>
- Le, Y., Jia, P., Jin, Y., Liu, W., Jia, K. and Yi, M.: The antiviral role of heat shock protein 27 against red spotted grouper nervous necrosis virus infection in sea perch. *Fish & Shellfish Immunology*, 70, 185-194, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.032>
- Li, Y., Zhang, P., Gao, C., Cao, M., Yang, N., Li, X., Li, C. and Fu, Q.: CXC chemokines and their receptors in black rockfish (*Sebastes schlegelii*): Characterization, evolution analyses, and expression pattern after *Aeromonas salmonicida* infection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 109-124, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.014>
- Liu, Q.-N., Tang, Y.-Y., Zhou, M.-J., Luo, S., Li, Y.-T., Wang, G., Zhang, D.-Z., Yang, H., Tang, B.-P. and He, W.-F.: Differentially expressed genes involved in immune pathways from yellowhead catfish (*Ta-*

- chysurus fulvidraco*) after poly (I:C) challenge. International Journal of Biological Macromolecules, 183, 340-345, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.167>
- Liyanage, D. S., Omeka, W. K. M., Godahewa, G. I., Lee, S., Nam, B.-H. and Lee, J.: Membrane attack complex-associated molecules from redlip mullet (*Liza haematocheila*): Molecular characterization and transcriptional evidence of C6, C7, C8 β , and C9 in innate immunity. Fish & Shellfish Immunology, 81, 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.006>
- Mian, M. F., Ahmed, A. N., Rad, M., Babaian, A., Bowdish, D. and Ashkar, A. A.: Length of dsRNA (poly I:C) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type. Journal of Leukocyte Biology, 94:5, 1025-1036, 2013. <https://doi.org/10.1189/jlb.0312125>
- Monjo, A. L., Poynter, S. J. and DeWitte-Orr, S. J.: CHSE-214: A model for studying extracellular dsRNA sensing in vitro. Fish & Shellfish Immunology, 68, 266-271, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.025>
- Olafsdottir, T., Lindqvist, M. and Harandi, A. M.: Molecular signatures of vaccine adjuvants. Vaccine, 33:40, 5302-5307, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.099>
- Park, Y., Zhang, Q., Wiegertjes, G. F., Fernandes, J. M. O. and Kiron, V.: Adherent Intestinal Cells From Atlantic Salmon Show Phagocytic Ability and Express Macrophage-Specific Genes [Original Research]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580848>
- Pjanova, D., Mandrika, L., Petrovska, R., Vaivode, K. and Donina, S.: Comparison of the effects of bacteriophage-derived dsRNA and poly(I:C) on ex vivo cultivated peripheral blood mononuclear cells. Immunology Letters, 212, 114-119, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.06.010>
- Robert, J.: Evolution of heat shock protein and immunity. Developmental & Comparative Immunology, 27:6, 449-464, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00160-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00160-X)
- Scarl, R. T., Lawrence, C. M., Gordon, H. M. and Nunemaker, C. S.: STEAP4: its emerging role in metabolism and homeostasis of cellular iron and copper. Journal of Endocrinology, 234:3, R123-R134, 2017. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0594>
- Seo, J. and Park, J. (2023). Does Stocking Density Affect Growth Performance and Hematological Parameters of Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* in a Recirculating Aquaculture System? *Animals*, 13(1).
- Tafalla, C., Bøgwald, J. and Dalmo, R. A.: Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. Fish & Shellfish Immunology, 35:6, 1740-1750, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.029>
- Takami, I., Kwon, S. R., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by Poly(I:C) immunization. Diseases of Aquatic Organisms, 89:2, 109-115, 2010. <https://doi.org/https://doi.org/10.3354/dao02185>
- Tao, L., Pang, Y., Wang, A., Li, L., Shen, Y., Xu, X. and Li, J.: Functional miR-142a-3p Induces Apoptosis and Macrophage Polarization by Targeting tnfaip2 and glut3 in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) [Original Research]. Frontiers in Immunology, 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.633324>
- Tsan, M.-F. and Gao, B.: Cytokine function of heat shock proteins. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 286:4, C739-C744, 2004. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00364.2003>
- Xiang, J., Chen, R., Xu, D., Sun, Y. and Liu, H.: Characterization of pathological changes and immune-related gene expression in yellow drum (*Nibea albiglora*) in response to *Pseudomonas plecoglossicida* and poly I:C challenge. Aquaculture Reports, 17, 100350, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100350>
- Zhang, Y., Wang, X., Shi, H., Song, N., Han, F., Chai, X., Liu, Q., Wang, Y. and Gao, T.: Comparative transcriptomic analysis of the liver and spleen in marbled rockfish (*Sebastes marmoratus*) challenged with polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly (I:C)). Aquaculture, 554, 738144, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738144>
- Zheng, W., Liu, G., Ao, J. and Chen, X.: Expression analysis of immune-relevant genes in the spleen of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) stimulated with poly I:C. Fish & Shellfish Immunology, 21:4, 414-430, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.01.006>

Manuscript Received: May 30, 2024

Revised: Jun 13, 2024

Accepted: Jun 13, 2024