



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사학위논문

Dexamethason 및 Polyinosinic-  
polycytidylic acid 가 Koi herpesvirus  
감염에 미치는 영향



2023년 8월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

전유경

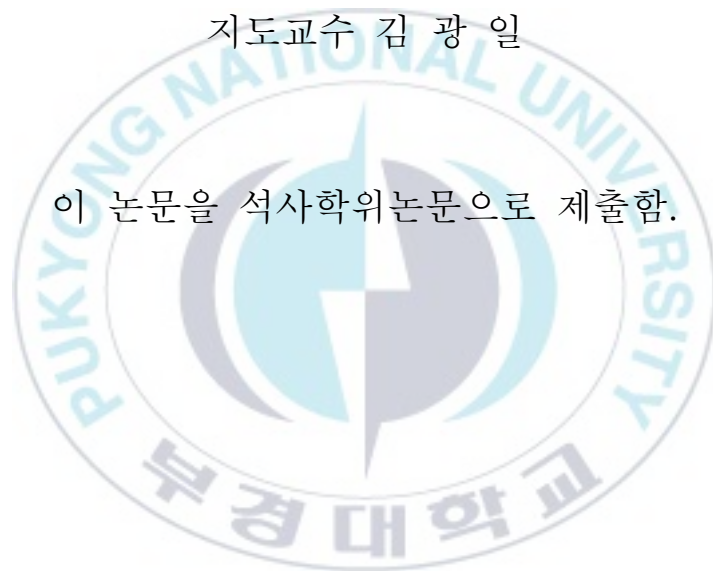
이학석사학위논문

Dexamethason 및 Polyinosinic-  
polycytidylic acid 가 Koi herpesvirus

감염에 미치는 영향

지도교수 김 광 일

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.



2023년 8월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

전유경

전유경의 이학석사 학위논문을 인준함.

2023 년 8 월 18 일



위원장 이학박사 김 도 형 (인)

위 원 농학박사 허 민 도 (인)

위 원 이학박사 김 광 일 (인)

# 목차

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 요약 .....                                                                           | iii |
| 표목차.....                                                                           | v   |
| 그림목차 .....                                                                         | vi  |
| <br>                                                                               |     |
| I. 서론 .....                                                                        | 1   |
| <br>                                                                               |     |
| II. 재료 및 방법 .....                                                                  | 4   |
| 1. 어류 시료.....                                                                      | 4   |
| 2. PCR 분석 .....                                                                    | 6   |
| 2.1 PCR .....                                                                      | 6   |
| 2.2 Cloning .....                                                                  | 7   |
| 2.3 Real-time PCR.....                                                             | 8   |
| 3. 유전형 분석 .....                                                                    | 11  |
| 3.1 계통발생학적 특성 .....                                                                | 11  |
| 3.2 유전자형 분석 .....                                                                  | 12  |
| 4. 면역조절제 처리에 따른 CCB 세포에서의 Koi herpesvirus 배양 특성 .....                              | 13  |
| 4.1 Koi herpesvirus 배양.....                                                        | 13  |
| 4.2 Dexamethason 과 Polyinosinic-polycytidylic acid 처리 농도 결정 .....                  | 15  |
| 4.2.1 NF- $\kappa$ B 발현 분석 .....                                                   | 15  |
| 4.3 Dexamethason 과 Polyinosinic-polycytidylic acid 를 처리한 CCB 세포에서의 KHV 역가 변화 ..... | 17  |

|                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5. 면역조절제 노출에 따른 잉어에서의 Koi herpesvirus 감염 특성 .....                                                | 18        |
| 5.1 초기면역인자 발현 및 조직 내 Virus genome copy 분석 .....                                                  | 18        |
| <b>III. 결과 .....</b>                                                                             | <b>21</b> |
| 1. Koi herpesvirus 검출 .....                                                                      | 21        |
| 1.1 PCR amplification .....                                                                      | 21        |
| 2. 유전형 분석 .....                                                                                  | 24        |
| 3. CCB 세포에서 면역조절제 처리에 따른 Koi herpesvirus 배양특성 .....                                              | 28        |
| 3.1 KHV 배양 .....                                                                                 | 28        |
| 3.2 Dexamethason 과 Polyinosinic-polycytidylic acid 처리농도 결정 .....                                 | 30        |
| 3.3 Dexamethason 과 Polyinosinic-polycytidylic acid 처리에 따른 KHV 역가 비교 .....                        | 32        |
| 3.4 Dexamethason 과 Polyinosinic-polycytidylic acid 처리 및 KHV 감염에 따른 CCB 세포에서의 초기 면역인자 발현 비교 ..... | 35        |
| 4. 면역조절제 노출에 따른 잉어에서의 Koi herpesvirus 감염 특성 .....                                                | 38        |
| 4.1 초기면역인자 발현 비교 .....                                                                           | 38        |
| 4.2 시간별 Koi herpesvirus 역가 변화 비교 .....                                                           | 41        |
| <b>IV. 고찰 .....</b>                                                                              | <b>43</b> |
| <b>V. 참고문헌 .....</b>                                                                             | <b>50</b> |

# Effect of Dexamethason and Polyinosinic – polycytidylic acid on Koi herpesvirus infection

전유경

부경대학교 대학원 수산생명의학과

요약

Carp (*Cyprinus carpio*) is a globally used fish species worldwide for food and ornamental purposes, with Asia accounting for 75% of total production. Viruses such as cyprinid herpesvirus-3 (carp herpesvirus, KHV), an infection caused by a pathogen contributing to the decline in carp aquaculture production, are transmitted globally through the live animal trade. Herpes viruses have a mechanism to remain latently infected in host cells and reactivate upon external stress, and latent infection can facilitate viral transmission. Similarly, KHV, an alloherpesvirus, can induce a latent infection depending on the host's immune status, but the pathway by which it evades cellular immunity is unknown. Therefore, to explain the latent infection, the infection characteristic of KHV at different immune states in the host could provide one of the important clues. This study aimed to determine genetic characterization for KHV recently isolated from necrotic gills and excessive mucus koi carp in aqua-farm in Korea and KHV infection characteristics in two different host cells' immune status. The genotype of KHV identified was Asian, and the genetic sub-typing identified as A1, which is predominantly found in Asia. In this study, two immunomodulator agents (dexamethasone, DEX and polyinosinic-polycytidylic acid, Poly I:C) were used to alter the

immune status of the host (common carp brain (CCB) cell and carp), and they were infected with KHV by immunomodulator pre-treated respectively. The results showed that NF- $\kappa$ B was down-regulated in CCB cells after DEX treatment, which was different from the results of Poly I:C. Notably, the viral genome copy of KHV after DEX treatment was higher than that of CCB cells infected with KHV alone, indicating that innate immunity affects KHV infection. The results of this study suggest that innate immunity is likely to be an important factor in KHV infection and may be used as a basic study for the characterization of latent infection.



## 표목차

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. Primers and conditions used in this study .....                                                                | 9  |
| Table 2. SYBR-Green based real-time PCR primers used in this study .....                                                | 16 |
| Table 3. Sub-genotyping of KHV by analysis variant regions of ORF136 gene, Enlarged 9/5<br>gene, Enlarged TK gene ..... | 25 |



## 그림목차

Figure 1. Clinical signs of domestic koi carp; (A) Gill necrosis, (B) Excess mucus.....5

Figure 2. Overview of carp injection study design. 1st injection means immunomodulation (DEX or Poly I:C) exposure and 2nd injection is KHV. Arrow in hollow at the top represents the time scale hours after immunomodulation treatment. At time 1st injection carp were injected with DEX or Poly I:C and PBS in controls. And time 2nd injection carp were injected with KHV, PBS in controls. Carp were challenged by intraperitoneal injection with KHV 6 hours after 1st injection. Three carp in each of 6 groups were sacrificed at the time 12, 24 and 48hours after 2nd injection. For analysis, 40mg of kidney was extracted from one individual and divided into two.....20

Figure 3. The quantification of KHV genome copies in the kidney of koi carp with clinical symptoms. The low-level group is determined as having  $\leq 1.5 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L, while the high-level group has  $> 1 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L. The dots on the figure is the virus genome copy numbers of each individual, the straight lines indicate the mean values of each group.....22

Figure 4. Cytopathic effect of KHV in CCB cells (A) 80% confluency of control cells, (B) 14 days post KHV inoculation. ....23

Figure 5. Phylogenetic analysis of the Enlarged TK gene of koi herpesvirus identified from koi carp. The phylogenetic tree was constructed using the Maximum-likelihood

algorithm with 1,000 bootstrap replicates using MEGA software (ver.11.0.10). Specific genogroups are denoted by different colors: Asian (red) and European types (blue). This study's isolate (ScKc-2105) is highlighted in bold and red. ....26

Figure 6. Sequence analysis of the Enlarged TK gene and ORF136 gene. (A) The Asian type variants were determined based on the number of serial “T” nucleotides in no. 877-885 region. Specifically, variants with 8 nucleotides were classified as A2, while with 7 nucleotides were classified as A1. (B) Partial sequences exist in the Asian type. ....27

Figure 7. Correlation between TCID<sub>50</sub>/mL results from titration on CCB cells with the Reed and Muench method and genomic copies of KHV. ....29

Figure 8. Expression of NF-κB in CCB cells treated with various concentrations of immunomodulators (DEX, Poly I:C). The cDNA was quantified using real-time PCR and then statistically analyzed via two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ) using GraphPad Prism version 9.5.1. ....31

Figure 9. Virus genomic titer (means ± SD) after pre-treated with DEX or Poly I:C. Then KHV genomic copy was quantified in (A) Intracellularly, (B) 200μL of supernatant after 6, 12, 24, 48, 96, and 168 hours from virus infection.....34

Figure 10. CCB cells inoculated KHV after being pre-treated with DEX or Poly I:C. The expression of innate immune factors was then measured after 6, 12, 24, and 48 hours from virus infection ((A) IFN, (B) IRF7, (C) NF-κB, (D) TNF-α). ....37

Figure 11. Expression of innate immune factors in only treatment DEX or Poly I:C groups,  
KHV injection with pre-treated each immunomodulator. Another group is  
injected with only KHV. ....40

Figure 12. Quantification of KHV genome copies in groups ( $n=3$ ) injected with KHV after pre-  
treated with DEX or Poly I:C, and injected with only KHV group. ....42



## 1. 서론

잉어(*Cyprinus carpio*)는 전 세계적으로 식용 및 관상 어종으로 활용되는 어종으로 전 세계 내수면 어류 양식 생산량의 약 38.3%(18807천 톤)를 차지하고 전체 생산량 중 약 75%가 아시아 지역으로(FAO, 2022), 중국 약 53.06%(2600만 톤), 인도 약 16.32%(800만 톤), 인도네시아 6.12%(300만 톤) 순으로 생산되고 있다. 잉어의 양식 생산량 감소에 기여하는 주된 요인은 수질오염, 온도 변화, 양식장 환경 악화, 감염성 질병이다.

잉어의 생산성을 저하시키는 감염성 질병의 대표적인 원인체로는 *Aeromonas hydrophila*, *Flexibacter columnaris* 등 세균과 *Alloherpesviridae*, *Rhabdoviridae* 등의 바이러스이며 특히, 잉어과 어류의 감염성 질병을 야기하는 바이러스 중 cyprinid herpesvirus(CyHV)는 지속적으로 확산되고 있는 실정이다(Hedrick et al., 2005). Cyprinid herpesvirus는 *Alloherpesviridae* 과 *Cyprinivirus* 속으로 분류되며 대표적으로 3종이 잉어과 어류에서 감염성 질병을 일으킨다(Hanson et al., 2011). CyHV-1은 잉어와 잉어과 어류에게 전신감염하며 성어에서 포진을 유발하고 (McAllister et al., 1985; Calle et al., 1999), CyHV-2는 1992년 일본의 금붕어(*Carassius auratus*)에서 처음 분리되어 기벨리오붕어(*Carassius gibelio*) 및 금붕어의 신장 및 조혈세포 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다(Chang et al., 1999; Stephens et al., 2004). 또한, CyHV-3은 koi herpesvirus(KHV)라고도 하며 16-25℃ 범위에서 다양한 연령대 잉어에 감염되어 체표 점액 과다 분비 및 아가미 괴사 등의 증상을 야기한다.

KHV는 잉어 및 잉어 아종에 대한 중요한 병인이며(Haenen et al., 2004; Sano et al., 2004; Bergmann et al., 2004), 전 세계적으로 잉어과 어류의 양식산업에 경제적 손실을

초래하는 바이러스로 세계동물보건기구(World Organisation for Animal Health, WOAH)에서 지정한 전염병 원인체이다. KHV는 thymidine kinase (TK) 유전자 염기서열의 계통발생 분석을 통해 지역적으로 나누어진 두 가지(European, Asian) 유전형으로 분류되며(Bigarre et al. 2009; Kurita et al. 2009), 추가적으로 *SphI*-5, 9/5, TK gene의 염기서열 삽입/결손에 의한 유전 아형을 구별할 수 있다(Kurita et al., 2009). 프랑스의 수입 검역 과정 중 이스라엘의 분리주와 같은 유전형의 KHV의 검출 사례(Pokorova et al., 2005)와 더불어 1998년 말 미국에서 열린 비단잉어 전시회에서 검출된 KHV가 1998년 5월 이스라엘에서 분리된 KHV와 동일한 유전형임이 밝혀져 개인간의 교류또한 바이러스 전파의 요인으로 추측된다(Haenen et al., 2004). 뿐만 아니라 미국에서 검출된 유전형은 1999년 미국 내 양식장에서도 검출되었으며 (Way et al., 2001) 영국에서 분리된 적이 없는 KHV가 이스라엘로부터 수입된 비단잉어에서 검출되어 국제 교역을 통한 국가 간 확산 가능성이 제시되었다(Haenen et al., 2004). 국내에서는 이미 2008년도에 양식 중인 잉어에서 European type의 유전형이 검출된 점 (Kim et al., 2013)을 미루어 볼 때 새로운 유전 아형이 나타날 수 있는 가능성을 배제할 수 없다.

Herpesvirus의 복제 특성으로 세포에서 잠복감염 상태를 지속하며 확실한 감염이 없는 상태에서 장기간 유전 정보를 유지할 수 있다(Minarovits et al., 2007; Roizman et al., 2001). 이러한 잠복 감염 특성은 병원체의 면역 회피의 수단이며(Takahashi et al., 2019) 숙주는 잠재적인 carrier 상태로 미 감염개체에게 바이러스를 전파할 수 있는 가능성이 있다. 인간 및 포유류에 감염을 일으키는 herpesvirus의 잠복기(Jones et al., 2007)와 유사하게 어류에 감염을 일으키는 KHV도 잠복 감염(latent infection)이 가능한 것으로 보고되고 있다(St-Hilaire et al., 2005). 따라서, 숙주세포에서 잠복상태를 유지하는 KHV 감염 특성에 대한 이해는 바이러스의 병원성 및 확산의 측면에서 중요하다. 잠복기를 가지는 바이러스에 대한 면역억제제의 효과 평가 방법으로 dexamethason

노출 후 herpesvirus 감염에 대한 면역 반응을 억제함으로써 포유류 세포에서 단순포진 바이러스(Herpes simplex virus type 1, HSV-1), C형간염바이러스(Hepatitis C virus, HCV)의 바이러스 복제량의 변화를 측정하였으며 바이러스의 복제경로를 파악하였다 (Rootman et al., 1988; Harrison et al., 2019). 따라서, 이러한 herpesvirus의 복제 기작을 따르는 KHV의 감염 특성 이해를 위해서는 숙주 면역체계에 영향을 줄 수 있는 면역조절제의 노출에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 2021년 국내 양식 중인 비단잉어에서 검출된 KHV의 Enlarged TK와 ORF136 유전자 분석을 통한 유전형 분류 및 Enlarged 9/5, Enlarged TK 염기서열 결손/삽입 분석을 통해 유전아형을 파악하였다. 또한, KHV의 감염 특성을 알아보고자 세포의 면역반응 억제를 유도하는 dexamethasone (DEX)과 면역반응을 자극하는 polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C)를 각각 common carp brain (CCB) 세포와 잉어에 노출 후 KHV 감염에 따른 초기면역유전자 발현 및 바이러스 복제 수준을 비교하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1. Koi herpes virus 감염시료

실험에 사용한 비단잉어는 2021년 5월 국내 전라남도 순천 소재의 내수면 양식장에서 30마리 구매하였으며 평균 표준 체장은  $9.90 \pm 1.43\text{cm}$ , 평균 표준체중은  $15.71 \pm 6.46\text{g}$  이었다. 실험실로 운송될 당시 어류의 대부분은 빈사 상태로 비정상적인 유행을 하고 있었으며, 아가미는 색이 변색되고 점액 과다하게 분비되어 바이러스 감염이 의심되었다(Fig. 1). 바이러스 감염 여부를 확인하고자 개체별 아가미, 신장, 비장 pooling 조직 20mg을 사용하여 YesG<sup>TM</sup> Cell Tissue mini kit(Genet bio, Korea)로 핵산을 분리하였고 제조사의 프로토콜에 따라 total DNA를 추출하였다. 분리한 핵산 및 샘플링 이외의 조직은 이후 실험을 위하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.



Figure 1. Clinical signs of domestic koi carp; (A) Gill necrosis, (B) Excess mucus.

## 2. PCR분석

### 2.1 PCR

잉어과어류의 바이러스 중 DNA 바이러스 (Cyprinid herpesvirus-1, -2 및 KHV) 감염 확인을 위해서 상기에서 분리한 DNA를 주형으로 각 바이러스별로 PCR을 수행하였다. RNA virus인 spring viremia of carp virus (SVCV)의 경우 yesR™ Total RNA Extraction Mini Kit(GenesGen, Korea)로 RNA를 추출하여 complementary DNA(iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, USA)를 제작하였다. 각 PCR에 사용한 primer 서열과 PCR 조건은 Table 1에 나타내었다. PCR amplification은 2X ExPrime Taq Premix(Genet Bio, Korea) 10  $\mu$ L, 10pmol의 forward, reverse primer 각 1  $\mu$ L, nuclease-free water 7  $\mu$ L와 DNA(또는 cDNA) 1  $\mu$ L를 첨가하여 total volume이 20  $\mu$ L가 되도록 하여 Alpha Cyclor 1 (PCR max, United Kingdom) 기기를 사용하여 수행하였다. PCR 증폭 산물은 HIQ Mango(BioD, Korea)가 첨가된 1.5% Agarose gel을 0.5X TAE buffer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)에 넣어 Mupid-2plus(Mupid, Japan)을 사용하여 전기영동을 실시하여 확인하였고, PCR 증폭 여부 및 산물의 크기에 따라 양 음성 여부를 판정하였다.

## 2.2 Cloning

Real-time PCR을 이용한 KHV의 정량 분석에 이용되는 표준 정량 곡선을 작성하기 위하여 재조합 유전자를 제작하였다. 먼저, 조직에서 추출한 total DNA를 Table 1의 KHV-86f/163r primer로 PCR을 수행하고, 증폭 산물(78bp)을 yesC™ Gel extraction mini(GenesGen, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 산물은 vector와 4℃에서 18시간 동안 ligation 시킨 후 component cell(*Escherichia coli* DH5a-T1)를 100 µL 첨가하여 ice에서 30분간 반응시키고, 42℃에서 40초간 heat-shock을 준 뒤, 즉시 ice에 옮겨 3분간 반응하였다. 이후 제작한 SOC(Tryptone 20g/L, Yeast extract 24g/L, NaCl<sub>2</sub>, 250mM KCL 10mg/L, 10ml of a sterile solution of 1M MgCl<sub>2</sub>, 20ml filter sterile 1M glucose/L)배지를 반응액에 250 µL첨가 후 37℃에서 90분간 진탕 배양하였다. 배양액은 Ampicillin 50 µg/ml와 X-gal(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside, Sigma, USA) 40 µg/ml이 첨가된 LB(Luria-Bertani, Difco, USA) 평판 배지에 도말하여 37℃ incubator에서 20시간 동안 배양시켰다. Plate 내에 흰색의 균 집락을 선택하여 Ampicillin 50 µg/ml이 첨가된 LB broth에 희석하여 37℃ incubator에서 18시간 동안 배양 후 yesP™ Plasmid mini kit(Genesgen, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid는  $2.7 \times 10^9$ copies/µL로 10배씩 단계 희석하여 표준 정량 곡선을 제작하기 위한 주형으로 사용하였다.

## 2.3 Real-time PCR

KHV의 유전자 정량 분석을 위해서 Gilad et al (2004)가 보고한 real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 반응 혼합물은 HS Prime qPCR Premix (Genet Bio, Korea) 10  $\mu$ L, 400nM의 forward, reverse primer (KHV-86f/KHV-163r) 각 0.8  $\mu$ L, 80nM의 probe (KHV-109p) 0.2  $\mu$ L, ROX dye 0.4  $\mu$ L DW 6.8  $\mu$ L와 DNA 1  $\mu$ L를 첨가하여 total volume은 20  $\mu$ L이 되도록 하였다. PCR 증폭은 StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied biosystems, USA) 기기를 사용하였으며 반응 조건은 Table 1에 나타내었다. 정량 분석에 사용한 표준곡선은 상기 2.2장에 기재한 바와 같이 real-time PCR 표적 대상 부위를 pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA)에 삽입하여 제작한 plasmid DNA를 사용하였다.

Table 1. Primers and conditions used in this study

| Virus                        | Primer             | Sequence (5' to 3')            | Condition                                                           | Base pare | Object     | Reference                             |
|------------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------|------------|---------------------------------------|
| Cyprinid herpesvirus-1       | STK1 –F            | CATGCAAGCTCGGAGACATA           | 94°C 10min,<br>(94°C 30sec, 59°C 40sec,<br>72°C 45sec) × 35 cycles, | 198       | Detection  | Rahmati-Holasoo, Hooman, et al., 2020 |
|                              | STK1 –R            | CGCAGTGGGGTATCAACTTT           | 72°C 10min                                                          |           |            |                                       |
| Cyprinid herpesvirus-2       | CyHv-2HelF         | GGA CTTGCGAAGAGTTTGATTCTAC     | 94°C 5min,<br>(94°C 30sec, 58°C 45sec,<br>72°C 45sec) × 35cycles,   | 366       | Detection  | Waltzek et al., 2009                  |
|                              | CyHv-2HelR         | CCATAGTCACCATCGTCTCATC         | 72°C 10min                                                          |           |            |                                       |
| Spring viremia of carp virus | SVCV F1            | TCT TGGAGCCAA ATAGCTCARRTC     | (95°C 1min, 55°C 1min,<br>72°C 1min) × 30cycles,                    | 714       | Detection  | Stone et al., 2003                    |
|                              | SVCV R2            | AGATGGTATGGACCCCAATACATHACNCAY | 72°C 10min                                                          |           |            |                                       |
| Cyprinid herpesvirus-3       | TK-F               | GGGTTACCTGTACGAG               | 94°C 5min,<br>(95°C 1min, 52°C 1min<br>72°C 1min) × 40cycles,       | 409       | Detection  | Bercovier et al., 2005                |
|                              | TK-R               | CACCCAGTAGATTATGC              | 72°C 10min                                                          |           |            |                                       |
|                              | Enlarged TK gene-F | AACGCGGGCCAGCTGAACAT           | 94°C 5min,<br>(94°C 30sec, 58°C 30sec,<br>72°C 1min) × 35cycles,    | 1001      | Sequencing | Kurita et al., 2009                   |
|                              | Enlarged TK gene-R | TGTGTGTATCCCAATAAACG           | 72°C 7min                                                           |           |            |                                       |
|                              | Enlarged 9/5gene-F | TCCAGCGACAGGATCTCTCG           | 95°C 5min,                                                          |           |            |                                       |
|                              |                    |                                |                                                                     | 484       | Sequencing | Kurita et al.,                        |

|                     |                                   |                                                                       |     |                |                        |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----|----------------|------------------------|
| Enlarged 9/5 gene-R | TCTGCGTGCAGCTCTCCAAC              | (94°C 30sec, 58°C 30sec,<br>72°C 1min) × 35cycles,<br><br>72°C 7min   |     |                | 2009                   |
| ORF 136 gene-F      | ATGAAGGCCTCTAAACTGC               | 95°C 5min,                                                            | 611 | Sequencing     | Zheng, et al.,<br>2017 |
| ORF 136 gene-R      | TTAGATTTTCTAAAGTGCACG             | (95°C 30sec, 58°C 45sec,<br>72°C 45sec) × 30cycles,<br><br>72°C 10min |     |                |                        |
| KHV-86f             | GACGCCGGCGACCTTGTG                | 50°C 2min,                                                            | 78  | Quantification | Gilad et al.,<br>2004  |
| KHV-163r            | CGGGTTCTTATTTTGTCTTGTT            | 95°C 10min,                                                           |     |                |                        |
| KHV-109p            | 6FAM-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-TAMRA | (95°C 15sec, 60°C 1m) ×<br>40cycles                                   |     |                |                        |

### 3. 유전형 분석

#### 3.1 계통발생학 특성

상기 2.1에서 분리한 DNA를 주형으로 Kurita et al (2009)의 방법에 따라 Enlarged TK gene을 증폭하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분간 pre-denaturation 후, 95℃에서 1분간 denaturation, 65℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 30초간 extension 하여 39 cycle 동안 반응하였고 72℃에서 7분간 post-extension 하였다. 또한 바이러스의 막 단백질 중 ORF136 유전자의 증폭을 위해 95℃에서 5분간 pre-denaturation 이후, 95℃에서 30초간 denaturation, 58℃에서 45초간 annealing, 72℃에서 45초간 extension 하여 30 cycle 동안 반응하였고 72℃에서 10분간 post-extension 하였다.

KHV의 Enlarged TK 및 ORF136 유전자 증폭 산물의 염기 분석에 따라(Bionics Co, Korea) 변이 영역을 확인하였으며 NCBI(National Center for Biotechnology Information, USA)의 Genbank에 등록된 참조 서열과 함께 염기서열의 상동성을 비교하였다. 또한 계통발생적 분석은 참조 서열과 함께 MEGA 11 software를 사용하여 maximum-likelihood algorithm(1,000 bootstrap value)으로 계통수를 나타내었다.

### 3.2. 유전 아형 분석

KHV 유전 아형을 분석하고자 Kurita et al (2009)에서 보고된 바와 같이 Enlarged TK, Enlarged 9/5 유전자 증폭 후 결손 및 반복 염기의 위치를 분석하였다. Enlarged TK 유전자 증폭을 위한 PCR 조건은 상기 3.1에 따라 수행하였고, Enlarged 9/5 gene 증폭을 위해 94℃에서 5분간 pre-denaturation 후, 94℃에서 30초간 denaturation, 58℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension 하여 35cycle 동안 반응하였으며 72℃에서 7분간 post-extension 하였다. 해당 유전자의 특이적인 증폭은 Table 1의 primer를 이용하였으며 NCBI의 GenBank에 등록된 참조 서열과 함께 염기서열의 상동성을 비교하였다.



## 4. Dexamethasone과 polyinosinic-polycytidylic acid 처리에 따른 CCB세포에서의 KHV 감염 특성

### 4.1 Koi Herpesvirus 배양

KHV 배양을 위해서 ECACC(European Collection of Authenticated Cell Cultures, England)에서 구매한 CCB 세포(Common Carp Brain cell, Cat no. 10072802)을 25℃에서 T25 plask(SPL Life Sciences, Korea)에서 배양하였다. 세포 성장 및 유지를 위해 BME medium(BME, Welgene, Korea)에 2% fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA), 1X Gentamicin(Gentamicin Solution; Welgene, Korea), 1M HEPES(Welgene, Korea), 1X non-essential amino acids (NEAA; Gibco, USA), Glucose solution(Glucose Solution, Gibco, USA)을 첨가한 세포 배양배지를 사용하였다. 세포 계대배양 2일 후에 새로운 배지로 교환하였으며 95% confluency를 나타내는 5일차에 배양배지를 제거하고 trypsin(Gibco, USA)을 사용한 세포 수득을 통해 계대배양 하였다.

KHV PCR에서 양성으로 확인된 어류의 신장 100mg과 BME medium 700  $\mu$ L를 혼합하여 bead tube로(OMNI, USA) 마쇄한 원액 500  $\mu$ L를 BME medium에 10배 희석하여 1X Gentamicin와 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 4℃에서 10분간 15,493 x g으로 원심분리한 뒤 상등액을 0.45um filter로 여과하여 그 중 500  $\mu$ L를 95% confluency로 성장된 CCB 세포에 첨가하였다. 접종한 T-25 flask는 23℃에서 2주간 배양하였으며, KHV가 세포에서 나타내는 CPE인 다수의 공포를 보일 때 -80℃와 상온(25℃)에서 3회 Freezing & Thawing을 통해 바이러스 배양액을 제작하였다. 수득한 배양 원액은 세포 유래물질 제거를 위해 4℃의 500 x g에서 10분간

centrifuge한 상층액을 0.45um filter로 여과하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.



## 4.2. Dexamethasone 과 polyinosinic-polycytidylic acid 처리 농도 결정

### 4.2.1 NF- $\kappa$ B

세포에 면역조절제 처리 시 면역억제제로서 dexamethason(DEX)과 면역자극제로서 polyinosinic-polycytidylic acid(Poly I:C)를 사용하였다. 두 가지 면역조절제를 농도별로 처리한 CCB 세포에서 NF- $\kappa$ B의 발현량을 확인 후 가장 뚜렷한 발현 시점과 농도를 확인하였다. T75-plask에서 배양한 CCB 세포를 수득한 후 Cell Counting Kit-8로 계수하여 24well plate에  $5 \times 10^4$ cells/well 농도로 seeding하였다. 18 시간 동안 배양한 CCB세포에 다양한 농도의 면역조절제를 각 100  $\mu$ L씩 투여하여 그룹별 3반복으로 수행하였다. 면역조절제 노출 6, 12, 24, 48 시간 후에 세포에서 RNA를 추출 후 complementary DNA(cDNA)를 제작하였고 house keeping 유전자인  $\beta$ -actin을 기준으로 상대발현을 분석하였다.

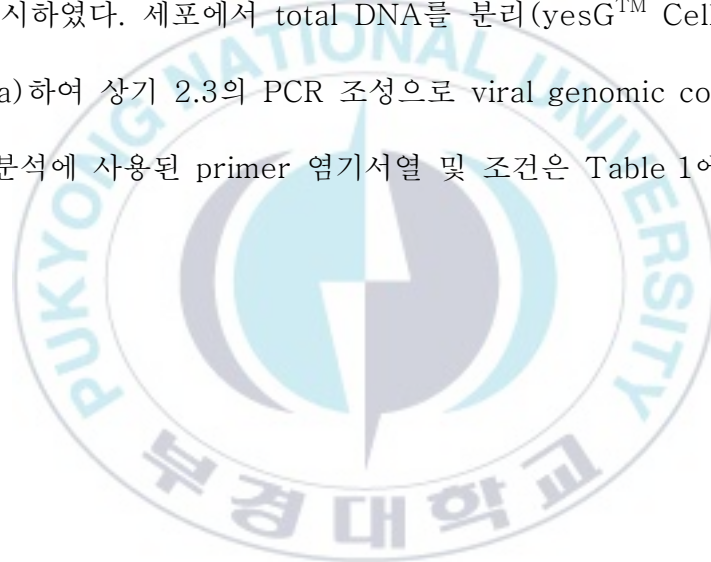
Real-time PCR 조성은 SYBR Green(PrimeQ-mastermix, genetbio, Korea) 10  $\mu$ L, forward, reverse primer 각 1  $\mu$ L, ROX dye 0.4  $\mu$ L, DW 6.6  $\mu$ L와 cDNA 1  $\mu$ L를 첨가하여 분석하였다. 분석이 끝난 후 NF- $\kappa$ B의 발현량은 delta delta CT relative quantitation법을 이용하여  $\beta$ -actin 발현에 따른 상대적인 정량으로 비교하였다. 사용한 primer의 염기서열 및 real-time PCR protocol은 Table 3에 나타내었다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 60℃부터 95℃까지의 영역에서 melting curve분석을 실시하였다.

Table 2. SYBR-Green based real-time PCR primers used in this study.

| Target gene     | GenBank accession no. | Sequence (5' to 3')                                     | Product (bp) | Condition                                                        | Reference           |
|-----------------|-----------------------|---------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------|---------------------|
| IFN-1           | AB376666              | F : ACCAAACCCAAATGTGGACGTG<br>R : CCACTCATTTCCCGAAGCAGA | 97           |                                                                  | Kitao et al., 2009  |
| $\beta$ -actine | M24113                | F : CAAGATGATGGTGTGCCAAGTG<br>R : TCTGTCTCCGGCACGAAGTA  | 352          | 95°C 10min                                                       | Liu et al., 1990    |
| IRF7            | JQ698666              | F : TCCACTGAGGGTCTGATTGA<br>R : CGCTGGTGCTGACGAAGA      | 148          | (95 °C 30sec, 55°C 30sec,<br>72°C 30sec) x 40cycles              | Adamek et al., 2012 |
| NF- $\kappa$ B  | XM_042736838          | F : GATAGTGCCTTACCCTGCCTT<br>R : ATCTGTGCTCTGCTTGTCCT   | 156          |                                                                  | Onara et al., 2008  |
| TNF- $\alpha$   | AJ311800              | F : TTATGTCGGTGCGGCCTTC<br>R : AGGTCTTTCCGTTGTCGCTTT    | 101          | 94°C 5 min<br>(95°C 30sec, 63°C 30sec,<br>72 °C 1min) x 40cycles | Zhang et al., 2018  |

#### 4.3 Dexamethasone과 polyinosinic-polycytidylic acid 처리에 따른 KHV 역가 분석

$5 \times 10^4$  cells/well로 seeding하여 18시간동안 배양한 CCB 세포에 3반복구로  $2 \mu\text{g/ml}$  농도의 DEX와  $0.05 \mu\text{g/ml}$  농도의 Poly I:C를 6시간 동안 전 처리 후 배지를 제거하고, KHV를 2시간 동안 감염시켰다. 그 후 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS, Welgene, Korea)로 3회 세척 후 제거하고 새로운 배양배지를  $300 \mu\text{L}$  첨가하였다. 6, 12, 24, 48, 96, 168시간 후 상등액  $200 \mu\text{L}$ 에서 extracellular 바이러스에 대한 genome copy 값을 분석하였으며, 세포를 용해시킨 intracellular 바이러스에 대한 정량적 분석을 실시하였다. 세포에서 total DNA를 분리(yesG<sup>TM</sup> Cell Tissue mini kit, Genesgen, Korea)하여 상기 2.3의 PCR 조성으로 viral genomic copy를 측정하였으며 real-time PCR 분석에 사용된 primer 염기서열 및 조건은 Table 1에 기재하였다.



## 5. Dexamethason과 polyinosinic-polycytidylic acid 처리 후 Koi Herpesvirus감염에 따른 어류의 영향

### 5.1 초기면역인자 발현 및 조직 내 virus genome copy분석

2주간 23℃에서 순치한 잉어(16.14 ± 1.86cm, 21.72 ± 5.35g)에 DEX 2 μg/ml 또는 Poly I:C 0.05 μg/ml를 100 μL 복강 주사한 그룹과, 각 면역조절제 노출 6시간 후 KHV 5 × 10<sup>2.3</sup>TCID<sub>50</sub>/fish로 100 μL 접종한 실험구로 나누었다(Fig. 2). 총 6개의 그룹에 각 9마리의 잉어를 8L 수조에 수용하여 바이러스 증식에 적합한 23℃에서 유지하였다. 면역조절제 노출 후 바이러스를 접종하고 12, 24, 48 시간 후에 그룹별로 각각 3마리씩 sampling하여 개체당 신장 조직 20mg을 두 개씩 소분하였다. 한 개체에서 추출한 두 개의 신장 조직 샘플은 면역조절제 노출 후 바이러스 접종에 의한 면역인자 발현 분석과 virus genome copy 차이 분석에 각각 사용되었다.

면역인자의 발현을 확인하기 위하여 조직샘플에서 RNA를 추출하고 cDNA를 제작하였다. 면역인자의 발현량은 β-actin과 target gene의 비교에 따른 상대적 정량으로 비교하였으며 아래의 delta delta CT relative quantitation법을 이용하여 계산하였다. 면역인자의 발현량 분석에 사용된 PCR 조성은 상기 4.2.1과 같고, Table 3의 조건과 primer에 따라 분석하였다.

$$\Delta Ct = \text{target gene Ct} - \beta\text{-actin Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{immunomodulator}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

$$\text{Gene expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

그룹 간 virus genome copy 차이에 관한 분석을 위해 조직 샘플에서 DNA를 추출하여 정량적으로 분석하였다. Virus genome copy의 정량분석은 상기 2.3의 PCR 조성과 primer에 따라 분석하였다.



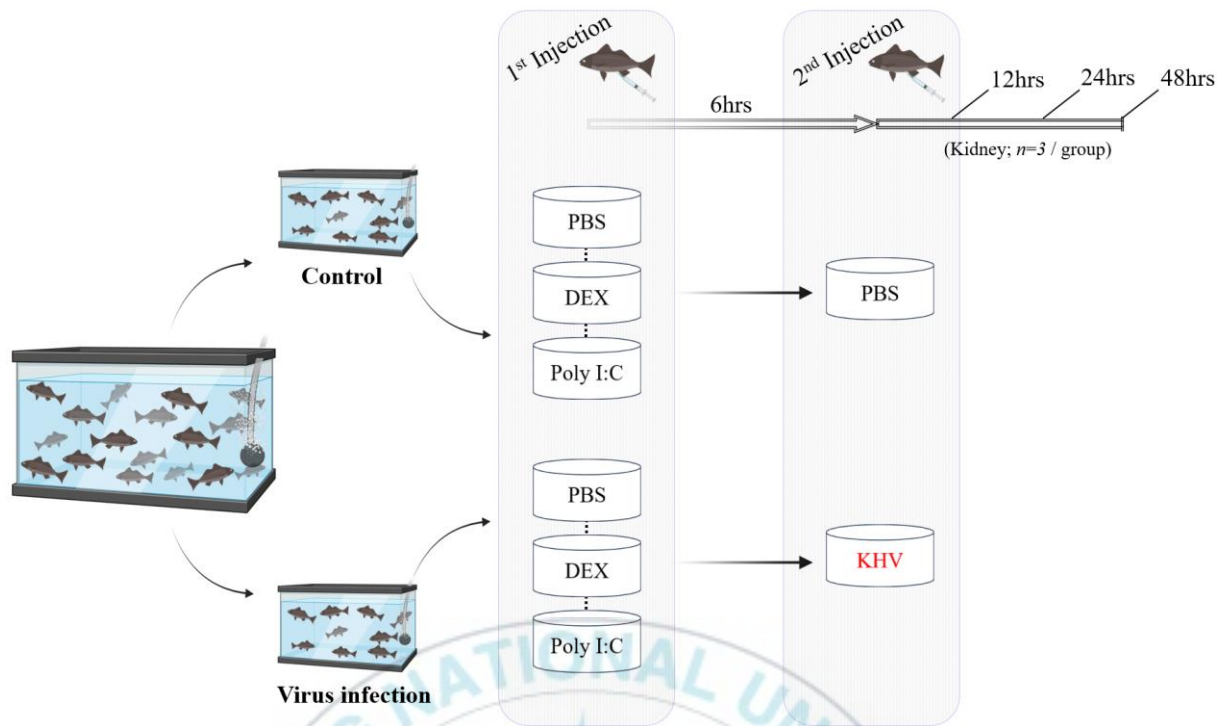


Figure 2. Overview of carp injection study design. 1st injection means immunomodulation (DEX or Poly I:C) exposure and 2nd injection is KHV. Arrow in hollow at the top represents the time scale hours after immunomodulation treatment. At time 1st injection carp were injected with DEX or Poly I:C and PBS in controls. And time 2nd injection carp were injected with KHV, PBS in controls. Carp were challenged by intraperitoneal injection with KHV 6 hours after 1st injection. Three carp in each of 6 groups were sacrificed at the time 12, 24 and 48hours after 2nd injection. For analysis, 40mg of kidney was extracted from one individual and divided into two

### 3. 결과

#### 1. Koi Herpesvirus의 identification

##### 1.1 PCR amplification

상기 바이러스 감염을 추정 진단한 비단잉어 샘플에서 잉어과 어류에 감염을 일으키는 감염성 바이러스에 대한 PCR 수행 결과 KHV가 검출되었다. PCR 분석 결과 30개체 중 29개체에서 TK gene의 특이적인 증폭 산물이 확인되었으며, real-time PCR 결과, Hammoumi et al (2016)의 감염 기준에 따라 고농도 감염( $1 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L 초과)은 전체의 30%, 저농도 감염( $1.5 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L 이하)은 70%로 나타났다 (Fig. 3). Real-time PCR 분석으로 고농도 KHV 감염을 확인한 비단잉어 신장 조직을 마쇄하여 80% confluency의 CCB 세포 T25-flask에 접종하였을 때 14일 후에 세포에서 herpesvirus가 나타내는 CPE(cytopathic effect)인 세포 내 공포 형성이 확인되었으며(Fig. 4) 이때 flask의 상등액에서 접종 농도 대비 virus genome copy가 증가한 것을 확인하였다.

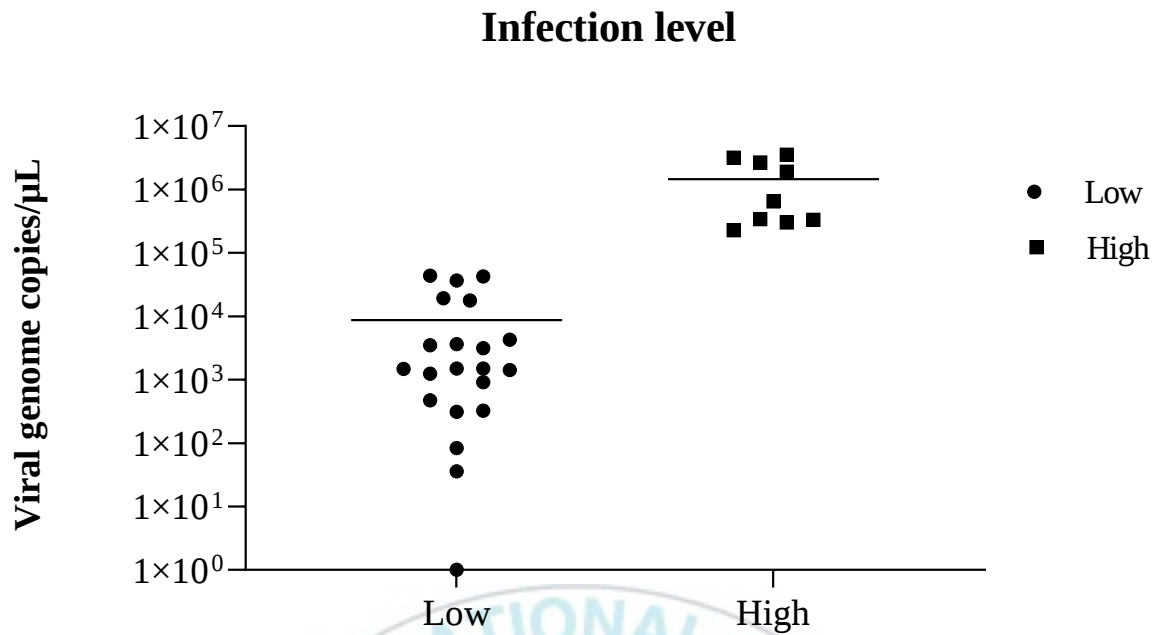
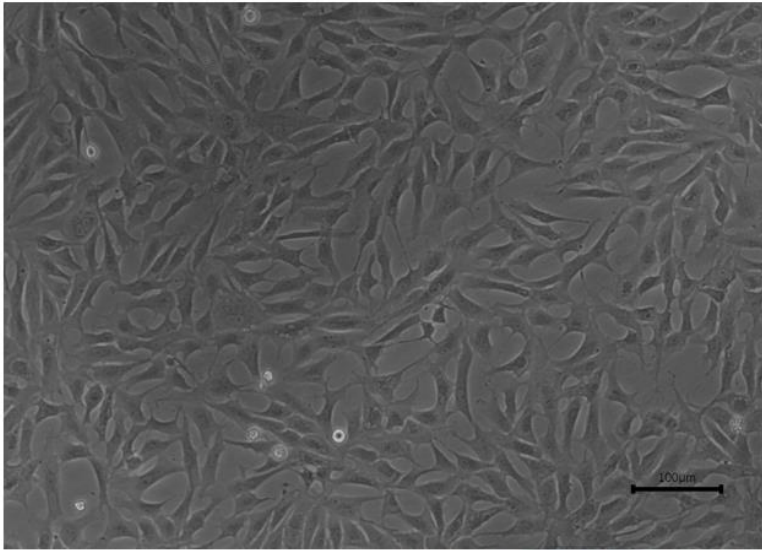


Figure 3. The quantification of KHV genome copies in the kidney of koi carp with clinical symptoms. The low-level group is determined as having  $\leq 1.5 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L, while the high-level group has  $> 1 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L. The dots on the figure is the virus genome copy numbers of each individual, the straight lines indicate the mean values of each group.

(A) Control



(B) KHV inoculation

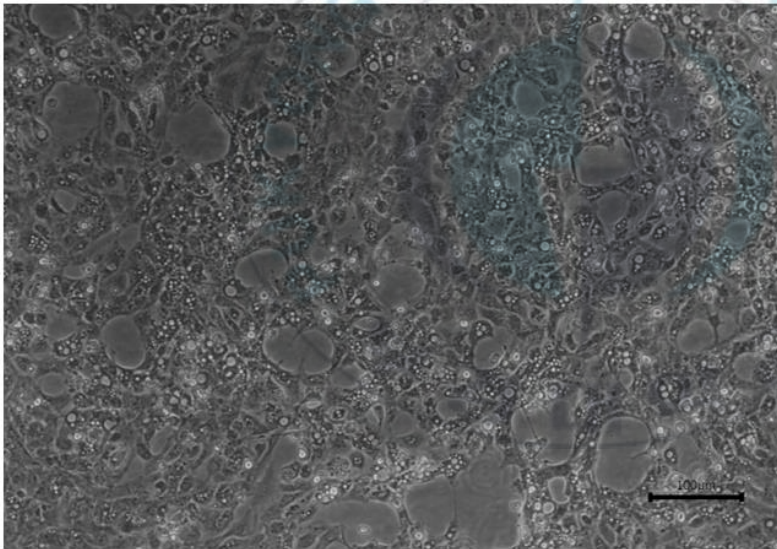


Figure 4. Cytopathic effect of KHV in CCB cells (A) 80% confluency of control cells, (B) 14 days post KHV inoculation.

## 2. 유전형 분석

KHV의 유전형 및 유전아형 분석을 위해 Enlarged 9/5, Enlarged TK 및 ORF136 유전자 염기서열을 분석하였다. Enlarged TK의 계통발생학적 분석을 통해서 본 연구에서 검출된 KHV(ScKc-2105)는 Asian type으로 분류되었다 (Fig. 5). 또한, Asian type KHV에서만 ORF 136 유전자 no. 115 부위의 “TGGTCCTCTACC” 염기의 존재를 확인할 수 있었다(Table 2, Fig. 6).

Kurita et al (2009)에 따라 유전자 아형을 분석한 결과, 본 연구에서 검출된 KHV는 Enlarged 9/5 gene의 2개의 변이부분에서 Asian type의 참조서열과 동일한 염기를 나타내었다. Enlarged TK gene의 분석 결과 8개의 변이 부분 중 Asian type의 유전 아형을 분류하는 주요 기준인 no. 877-885 region의 연속적인 “T” 염기의 개수가 7개로 분석되어 Asian type 하위 유전아형 중 A1으로 분류되었다 (Table 2, Fig. 6).

Table 3. Sub-genotyping of KHV by analysis variant regions of ORF136 gene, Enlarged 9/5 gene, Enlarged TK gene

| Strain name      | GenBank<br>Accession no. | Origin      | Area         | Year        | ORF136       | Enlarged 9/5 gene region |         |    |     | Enlarged TK gene region |         |           |             |         |         | Genotype<br>/<br>variant |
|------------------|--------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------------------|---------|----|-----|-------------------------|---------|-----------|-------------|---------|---------|--------------------------|
|                  |                          |             |              |             | 115-126      | 184-187                  | 212-218 | 94 | 778 | 813-814                 | 849/850 | 877-885   | 945-956     | 957-958 | 961-967 |                          |
| <b>ScKc-2105</b> | -                        | Koi carp    | <b>Korea</b> | <b>2021</b> | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | <b>A1</b>                |
| J2_101110        | KX544843                 | Common carp | Indonesia    | 2010        | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | A1                       |
| CB4_181110       | KX544844                 | Common carp | Indonesia    | 2010        | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | A1                       |
| J1_101110        | KX544845                 | Common carp | Indonesia    | 2010        | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | A1                       |
| I_09_2i3         | KX544846                 | Common carp | Indonesia    | 2009        | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | A1                       |
| I_10_3           | KX544847                 | Common carp | Indonesia    | 2010        | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | A1                       |
| PP3_070411       | KX544848                 | Common carp | Indonesia    | 2011        | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | A1                       |
| T                | MG925491                 | Common carp | Taiwan       |             | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | A1                       |
| TUMST1           | AP008984                 | Koi carp    | Japan        | 2003~2005   | TGGTCCTCTACC | TTTT                     | AAAAAA  | C  | A   | -                       | AA      | TTTTTTT   | CTTTAAAAAAA | -       | AGATATT | A1                       |
| GY-01            | MK260013                 | Common carp | China        | 2018        | TGGTCCTCTACC | TTTTT                    | AAAAAAA | C  | A   | AT                      | AA      | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | A2                       |
| Cavoy            | MG925485                 | Common carp | Israel       | 1998        | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | -       | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E1                       |
| FL               | MG925487                 | Common carp | Belgium      |             | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | -       | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E1                       |
| I                | MG925489                 | Common carp | Israel       |             | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | -       | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E1                       |
| KHV-U            | DQ657948                 | Koi carp    | USA          | 2003        | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | -       | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E1                       |
| E                | MG925486                 | Common carp | UK           |             | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | -       | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E2                       |
| KHV-I            | DQ177346                 | Koi carp    | Israel       | 1998        | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | -       | TTTTTTT   | CTTTTAAAAAA | CA      | AGATATT | E3                       |
| KHV-GZ11         | KJ627438                 | Koi carp    | China        | 2015        | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | AA      | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E4                       |
| MN               | MT914509                 | Common carp | USA          | 2019        | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | AA      | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E4                       |
| PoB3             | KX544842                 | Common carp | Poland       | 2013        | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | AA      | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E4                       |
| GZ11-SC          | MG925488                 | Common carp | China        |             | -            | TTTT                     | AAAAAAA | C  | G   | AT                      | AA      | TTTTTTTTT | CTTTAAAAAAA | CA      | AGATATT | E5                       |

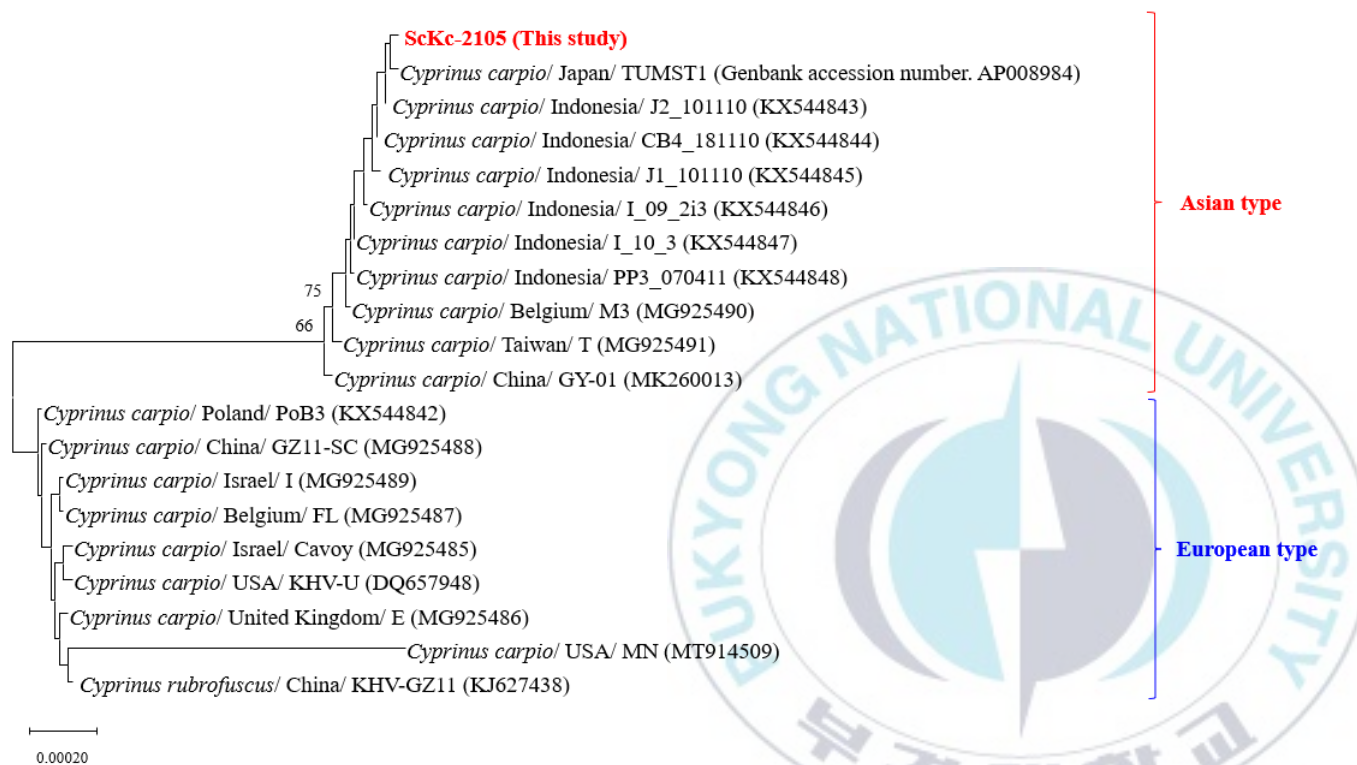


Figure 5. Phylogenetic analysis of the Enlarged TK gene of koi herpesvirus identified from koi carp. The phylogenetic tree was constructed using the Maximum-likelihood algorithm with 1,000 bootstrap replicates using MEGA software (ver.11.0.10). Specific genogroups are denoted by different colors: Asian (red) and European types (blue). This study's isolate (ScKc-2105) is highlighted in bold and red.

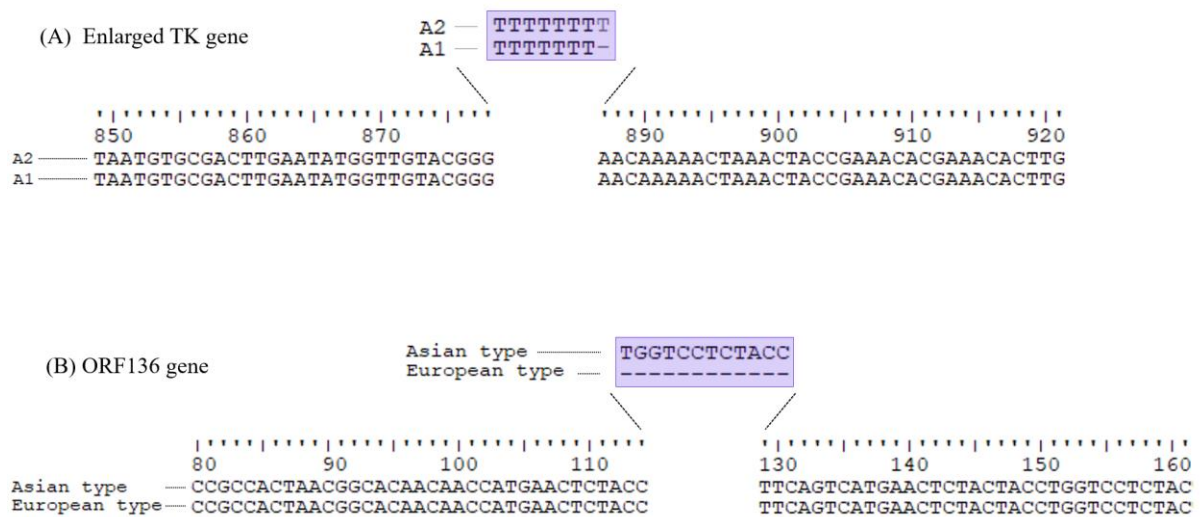


Figure 6. Sequence analysis of the Enlarged TK gene and ORF136 gene. (A) The

Asian type variants were determined based on the number of serial “T” nucleotides in no. 877–885 region. Specifically, variants with 8 nucleotides were classified as A2, while with 7 nucleotides were classified as A1. (B) Partial sequences exist in the Asian type.

### 3. CCB(Common Carp Brain)세포에서 Dexamethasone과 polyinosinic-polycytidylic acid 처리에 따른 KHV 배양 특성

#### 3.1 KHV 배양

KHV 역가(virus genome copy 와  $TCID_{50}/mL$ ) 간의 상관관계를 파악하고자 24well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well의 CCB 세포를 seeding 후 18시간 동안 배양하였고, 연속적으로 10배씩 희석한 바이러스 접종액을 5구간으로 5반복하여 접종하였다. 원액에서는 접종 3일 후에 세포 내 공포를 나타내기 시작하였으며 최종적으로 14일에는  $5 \times 10^{3.3} TCID_{50}/mL$ 임을 확인하였다. 또한 virus 배양원액 genomic copy를 정량적으로 측정하였을 때 원액에서  $9.66 \times 10^9$  copies/mL로 산출되었으며 배양한 KHV와  $TCID_{50}$ 의 상관관계는 Figure 7에 나타내었다.

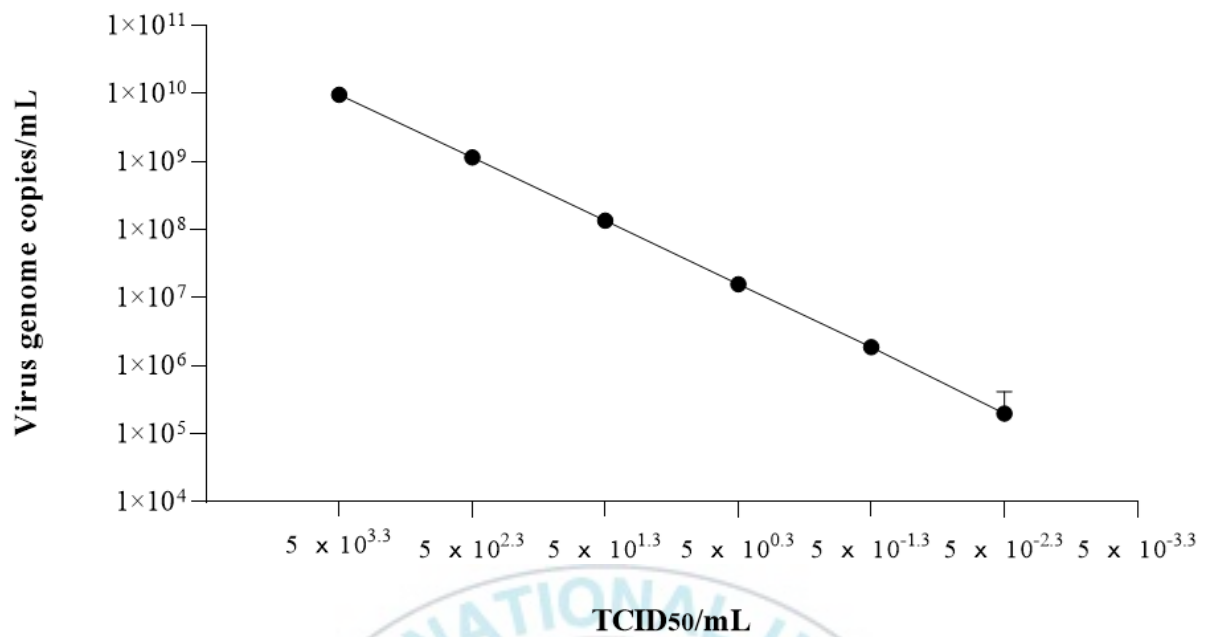


Figure 7. Correlation between TCID<sub>50</sub>/mL results from titration on CCB cells with the Reed and Muench method and genomic copies of KHV.

### 3.2. Dexamethasone 과 polyinosinic-polycytidylic acid 처리 농도 설정

면역조절제 처리에 의한 면역인자방출 효율이 가장 높은 농도와 시간을 결정하기 위해서 CCB 세포에 DEX와 Poly I:C를 농도별로 처리하였다. 처리 후 6, 12, 24, 48 시간 후에 세포에서 RNA를 추출 후 cDNA를 제작하였으며 delta delta CT relative quantitation 법을 이용하여  $\beta$ -actin과 NF- $\kappa$ B의 비교에 따른 상대적 정량으로 발현량을 비교하였다.

DEX 처리 그룹의 경우  $2\mu\text{g/mL}$ 의 농도 구간에서 6시간 후 대조구의 NF- $\kappa$ B발현량과 비교하여 가장 낮았다(0.81배). Poly I:C 처리 그룹의 경우  $0.05\mu\text{g/mL}$ 의 농도 처리 구간에서 6시간 후에 가장 높은 발현량(18.82배)을 보였으며 48시간까지 연속적인 하향 발현을 나타내었다. 따라서 이 후 바이러스 감염 실험에서 면역조절제의 농도로 DEX는  $2\mu\text{g/mL}$ , Poly I:C는  $0.05\mu\text{g/mL}$  농도를 사용하였다(Fig. 8).

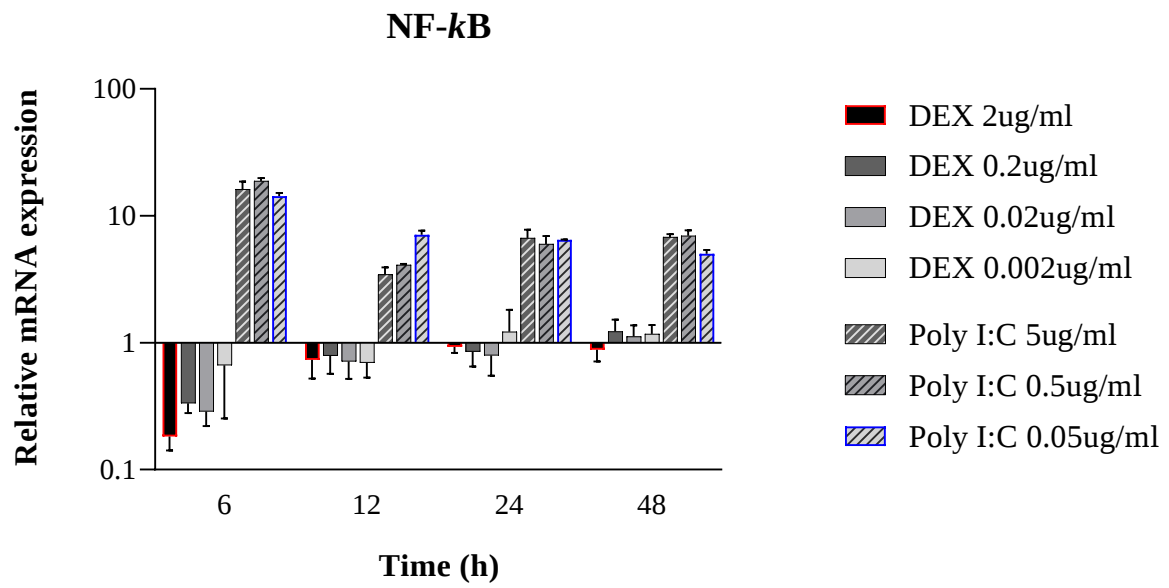


Figure 8. Expression of NF- $\kappa$ B in CCB cells treated with various concentrations of immunomodulators (DEX, Poly I:C). The cDNA was quantified using real-time PCR and then statistically analyzed via two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ) using GraphPad Prism version 9.5.1.

### 3.3 Dexamethasone과 polyinosinic-polycytidylic acid 전 처리에 따른 Koi Herpesvirus 감염역가 비교

면역조절제 전 처리 후 KHV 감염에 따른 virus genome copy를 분석하고자 24 well plate에 18시간 동안 배양한 CCB 세포에 면역조절제로서  $2\mu\text{g/mL}$ 의 DEX(DEX+KHV),  $0.05\mu\text{g/mL}$ 의 Poly I:C(Poly I:C+KHV)를 각  $100\mu\text{L}$ 씩 첨가 후 KHV를 접종하였다. 바이러스 접종 이후 6, 12, 24, 48, 96, 168 시간에 세포(Intracellular)와 상등액(Extracellular)에 존재하는 KHV의 virus genome copy를 산출하여 면역조절제 처리에 따른 바이러스의 역가를 비교하였다. Intracellular의 바이러스 복제량과 Extracellular 바이러스 복제량을 비교하였을 때 Intracellular의 모든 실험구에서 Extracellular보다 더 높은 virus genome copy를 나타냈다.

Intracellular와 extracellular 사이의 virus genome copy 분석에서 DEX와 Poly I:C를 각각 전 처리 후 KHV를 접종한 그룹, 바이러스만 접종한 세 가지 그룹에서 6시간 후에 각각 2.1배, 3.41배, 4.44배 차이가 있었으며 12시간의 경우 4.55배, 3.79배, 4.97배로 차이가 늘었으나, 24시간의 경우(각 1.11배, 1.39배, 1.84배)와 48시간(각 1.34배, 1.26배, 1.75배)의 경우에는 세포 내 복제량과 세포 외 방출량에 차이가 적었지만, 이후 96시간부터는 각 4.85배, 4.30배, 2.71배로 차이가 많아지기 시작했다. 168시간 후에 DEX+KHV 그룹에서 6.67, KHV 그룹에서 7.94배로 접종 시간 별 가장 높은 방출량 차이를 나타냈지만, Poly I:C+KHV 그룹에서는 2.78배로 상대적으로 낮은 복제량 차이를 나타냈다.

또한 모든 시간 구간에서 면역조절제 처리의 여부에 따른 바이러스 genome copy에 차이를 보였다. Intracellular의 경우 DEX+KHV 그룹이 KHV만 접종한 그룹보다 모든 시간구간에서 1.12~1.53배 더 높은 역가를 나타내었고, Poly I:C+KHV 그룹은

0.33~0.92배 낮은 역가를 나타내었다. Extracellular의 경우 바이러스 접종 후 48시간까지는 DEX+KHV 그룹이 KHV만 접종한 그룹보다 높았지만 168시간의 결과에서는 이전보다 낮은 복제량 차이를 나타내었다. 한편, 6시간 후에 Poly I:C+KHV 그룹은 KHV만 접종한 그룹과 비슷한 바이러스 역가를 나타내었는데 이후에는 차이가 증가하여 168시간 후에는 Poly I:C+KHV 그룹에서 0.65배 낮게 측정되었다.

결론적으로 모든 시간 구간에서 DEX를 전 처리 후 KHV를 접종한 그룹이 KHV만 접종한 그룹 보다 virus genome copy가 더 높게 측정되었고, Poly I:C를 전 처리 후 KHV를 접종한 그룹이 KHV만 접종한 그룹 보다 낮게 측정되어 면역조절제에 의한 바이러스 복제량에 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 9).



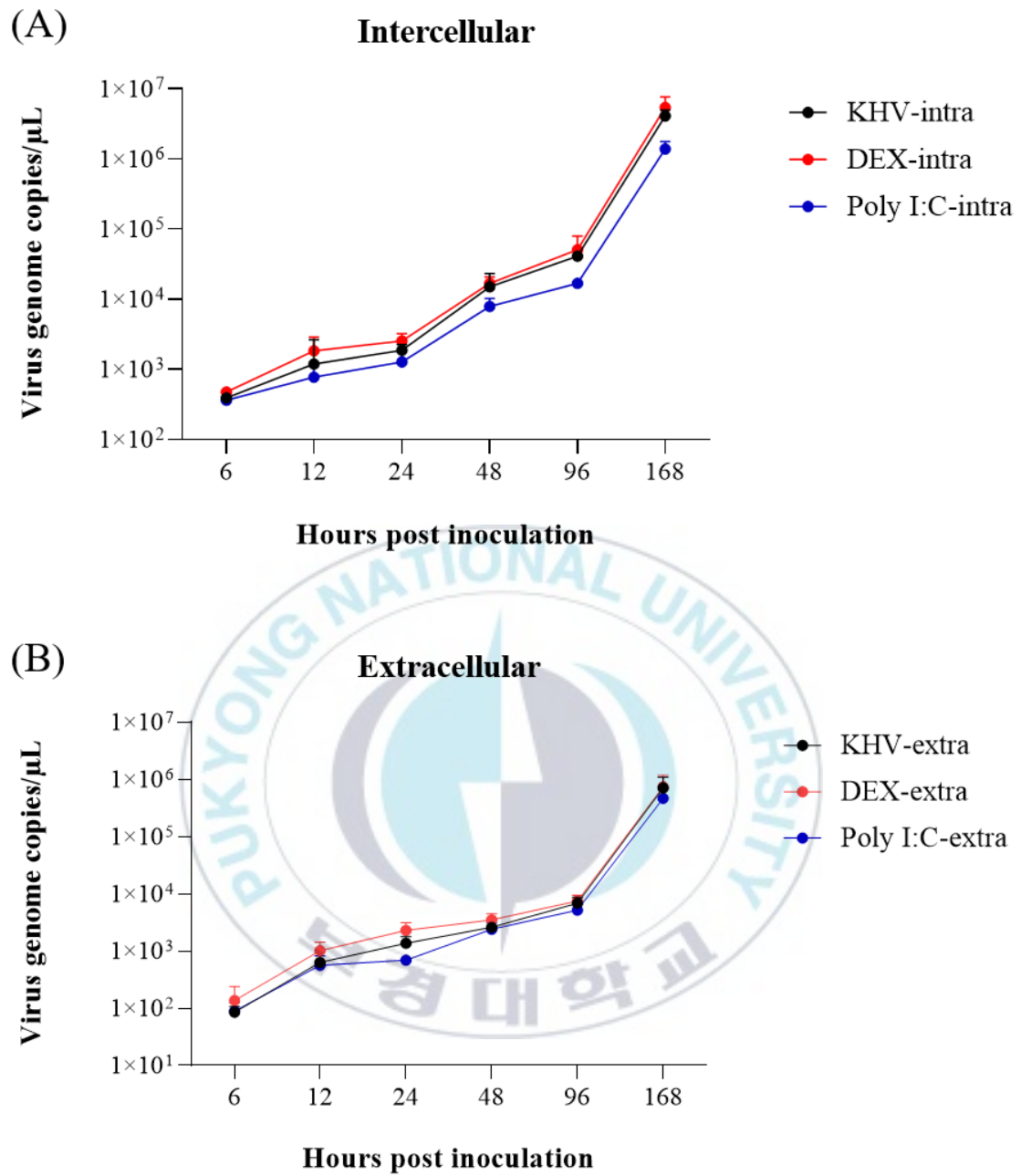


Figure 9. Virus genomic titer (means  $\pm$  SD) after pre-treated with DEX or Poly I:C.

Then KHV genomic copy was quantified in (A) Intracellularly, (B) 200  $\mu\text{L}$  of supernatant after 6, 12, 24, 48, 96, and 168 hours from virus infection.

### 3.4 Dexamethasone과 polyinosinic-polycytidylic acid 처리 후 KHV접종에 따른 CCB cell의 초기 면역인자 발현 비교

각 농도의 DEX와 Poly I:C를 처리한지 6 시간 후 바이러스를 접종하였으며 각 시간 구간에서의 면역유전자 방출량을 분석하였다(Fig. 10).

Interferon (IFN-1) 발현에서 KHV 접종 그룹의 경우 24시간까지는 연속적인 상향 발현을 보이다가 48시간 후에 대조구보다 하향 발현되어 KHV 접종그룹의 IFN-1 방출은 24시간에 가장 많이 방출되었고 이후 시간에는 감소하였다. DEX+KHV 그룹의 경우 6시간에는 IFN-1에서 유의미하지 않은 하향 발현을 나타내었지만 12시간에는 오히려 낮은 상향 발현을 보였고 24시간 후에는 대조구와 비슷한 수준을 보이다가 48시간에는 Poly I:C와 비슷한 수준으로 1.51배 상향 발현되었다. 반면에 Poly I:C+KHV 그룹의 경우 바이러스 접종 6시간 후에 대조구보다 2.36배 상승하였으며 24시간까지는 감소하다가 48시간에는 다시 증가하는 경향을 보였다.

Interferon regulatory factor 7 (IRF7)의 경우 모든 실험구에서 6시간 후 대조구보다 상향 발현을 보이다가 12시간에 DEX+KHV 그룹과 Poly I:C+KHV 그룹에서 각각 1.78배, 1.44배 유의미한 상향 발현을 보였고, 24시간 후에는 이전보다 낮은 발현량을 나타내었으나 48시간에는 각각 1.48, 1.47배 상향 발현되었다. 반면에 KHV 접종 그룹의 경우 48시간에 대조구보다 하향 발현된 것으로 분석되었다.

NF- $\kappa$ B의 경우 KHV 접종 그룹에서 6시간 후, 1.24배의 상향 발현을 보였지만 이후 연속적으로 줄어들어 24시간 후 대조구보다 하향 발현되었다. DEX+KHV 그룹에서는 전체 시간 구간에서 대조구에 비교하여 하향 발현을 나타내었다. Poly I:C+KHV 그룹의 경우 6시간의 대조구보다 3.21배 상향 발현되었으며 이후 24시간까지 연속적으로 발현량이 줄어 24시간에는 1.34배 상향 발현되었으나

48시간에는 전보다 상승하여 대조구보다 2.50배 상향 발현되었다. 모든 실험구에서 24시간 까지는 6시간 보다 발현량이 줄어들지만 48시간 이후에는 상승하였다.

TNF- $\alpha$ 의 경우 면역조절제 처리를 한 실험구에서 12시간 까지는 발현량이 상승하다가 이후에는 연속적으로 줄어들었다. KHV만 접종한 실험구의 경우 6시간 후에 대조구보다 1.30배 낮은 상향 발현을 나타내었고 이후의 실험구에서도 유의미한 차이를 보이지 않았다. 반면에 48시간에는 모든 그룹에서 가장 낮은 유전자 발현을 나타내었다. 한편, DEX+KHV 그룹의 경우 모든 시간 구간에서 상향 발현을 나타내었고 12시간 후에는 대조구보다 2.36배 상향 발현되었다.



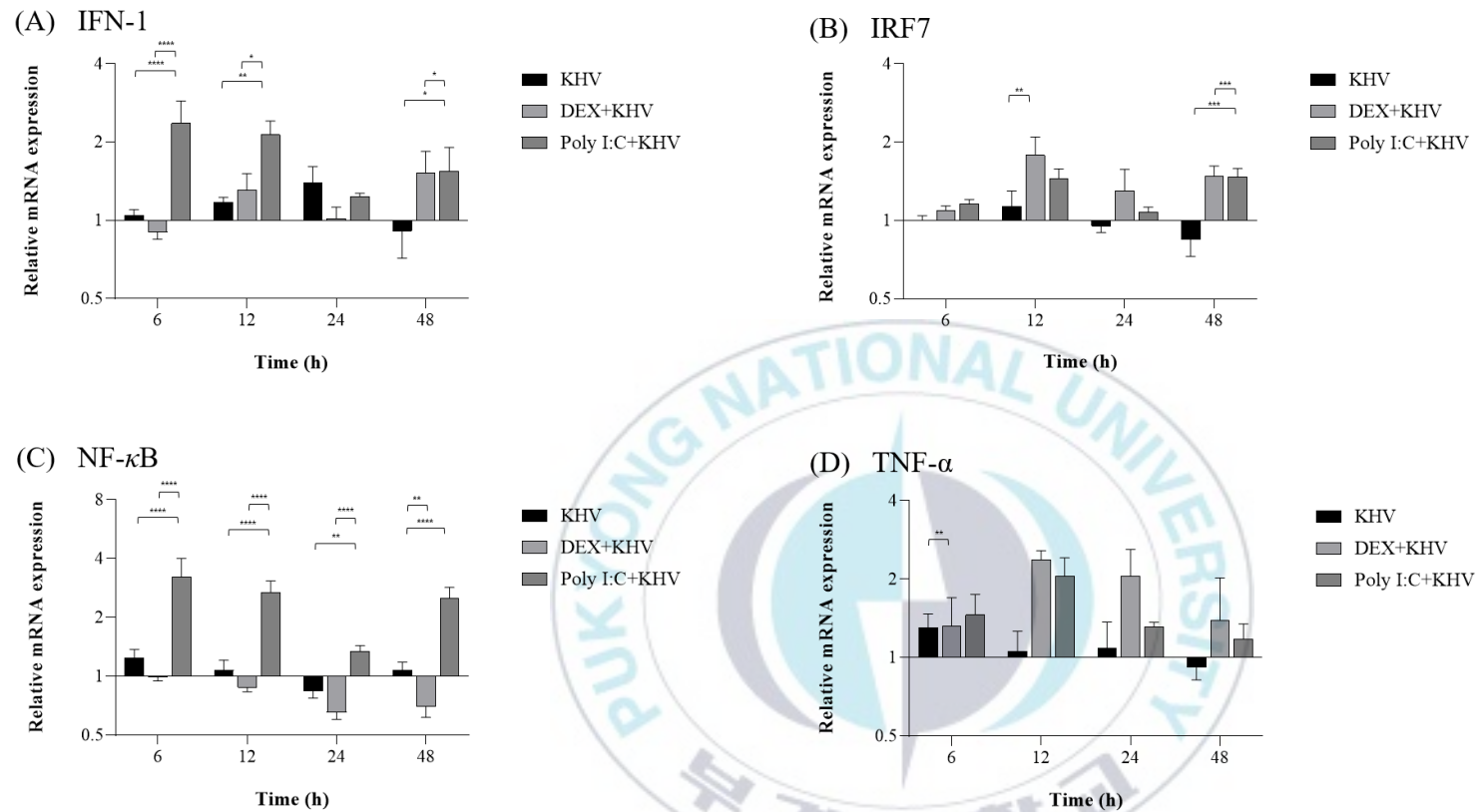


Figure 10. CCB cells inoculated KHV after being pre-treated with DEX or Poly I:C. The expression of innate immune factors was then measured after 6, 12, 24, and 48 hours from virus infection ((A) IFN, (B) IRF7, (C) NF- $\kappa$ B, (D) TNF- $\alpha$ ).

#### 4. 잉어에서 Dexamethasone 과 polyinosinic-polycytidylic acid 처리에 따른 virus 감수성 비교

##### 4.1 초기면역인자 발현 비교

잉어에게서 면역조절제 처리(DEX-con, Poly I:C-con)와, 처리 후 KHV접종(DEX+KHV, Poly I:C+KHV)에 의한 초기 면역인자 발현을 분석하였다. 면역인자의 발현 분석은 1, 2차 접종에서 모두 PBS만 접종한 대조구와 비교되었다(Fig. 11).

IFN-1의 경우 KHV 접종그룹에서 접종 24시간 후 대조구보다 하향 발현되었지만 48시간 후에는 8.75배 상향 발현되었다. DEX-con의 경우 48시간 후 발현량에서 대조구보다 0.72배 하향 발현되었으나 전 처리 후 KHV를 접종하였을 때 5.55배 상승하는 결과를 나타내었다( $P < 0.0001$ ). Poly I:C-con의 경우 대조구보다 5.90배 상승하였고 Poly I:C+KHV의 경우 17.24배 상향 발현되었다( $P = 0.0047$ ).

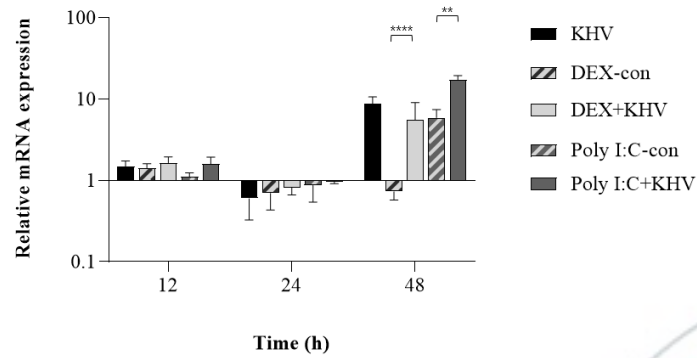
IRF7의 경우 KHV 접종그룹에서는 24시간까지는 대조구의 발현량과 비슷하거나 유의미하지 않게 하향 발현되는 결과를 나타내었지만 48시간 후에는 24.64배 상향 발현되었다. DEX-con과 Poly I:C-con 또한 24시간까지는 유의미하지 않은 발현을 나타내었지만 48시간 후에는 각각 18.52배, 17.37배 상향 발현된 결과를 나타내었다. 또한 각 면역조절제 처리 후 KHV를 접종한 그룹에서는 각 236.95배, 257.22배 상승하였다( $P < 0.0001$ ).

NF- $\kappa$ B의 경우 KHV 접종그룹에서는 48시간까지 연속적인 상향 발현을 나타내었으며 48시간 후에는 9.94배 상향 발현되었다. DEX-con의 경우 12시간에는 대조구보다 유의미하지 않은 상향 발현을 나타내었지만 이후 시간에는 대조구보다 낮은 발현을 나타내었다. 반면에 DEX+KHV의 경우 24시간까지는 대조구와 차이가 많진

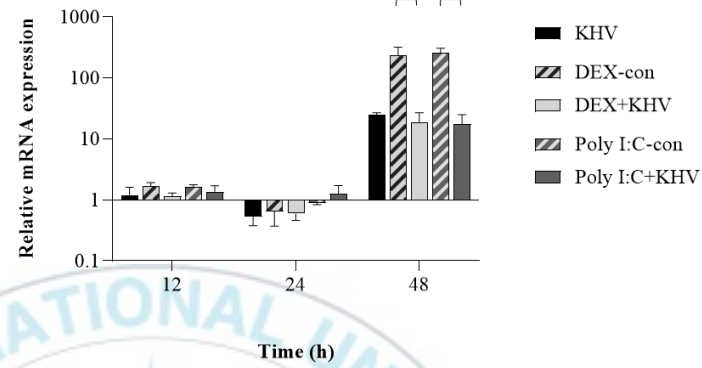
않았지만 48 시간 후에는 13.91배 상향 발현 되었다( $P < 0.0001$ ). Poly I:C-con과 Poly I:C+KHV 그룹에서 모든 시간 구간에서 대조구 대비 상향 발현을 나타내었지만 (5.29배, 7.62배) 전 처치 후 KHV 접종한 그룹이 접종하지 않은 그룹보다 1.37배 더 많이 발현되었다.

TNF- $\alpha$ 의 경우 KHV 접종그룹에서 24시간에 가장 낮고(0.61배) 48시간에 가장 높은 결과(39.65배)를 나타내었다. DEX-con의 경우 12시간에 가장 높은 발현을 보였는데(4.12배) 이후 시간에는 연속적으로 하향 발현되어 48시간 후에는 대조구와 0.03배 차이가 있었다. 반면에 DEX+KHV의 경우 24시간까지 대조구과 큰 차이를 보이지 않다가 48시간 후에는 모든 시간 구간 중 가장 높은 44.72배 상향 발현이 확인되었다( $P < 0.0001$ ). Poly I:C-con의 경우 DEX-con과 마찬가지로 12시간에 가장 높았고 이후 시간에는 연속적으로 하향 발현되었는데 24시간 후는 대조구보다 유의미하지 않은 하향 발현을 나타내었다. 반면에 Poly I:C-t는 48시간 후에 35.70배 상향 발현되었다( $P < 0.0001$ ).

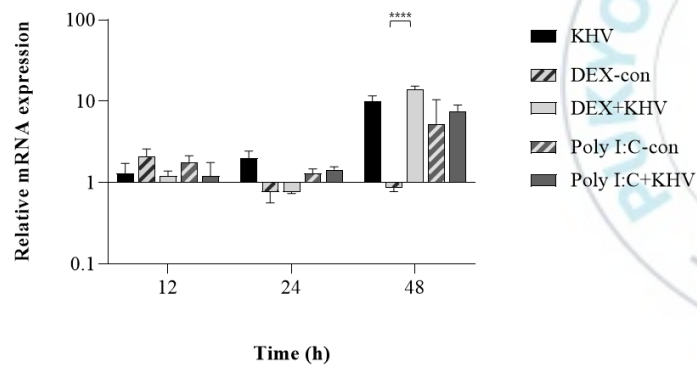
(A) IFN-1



(B) IRF7



(C) NF- $\kappa$ B



(D) TNF- $\alpha$

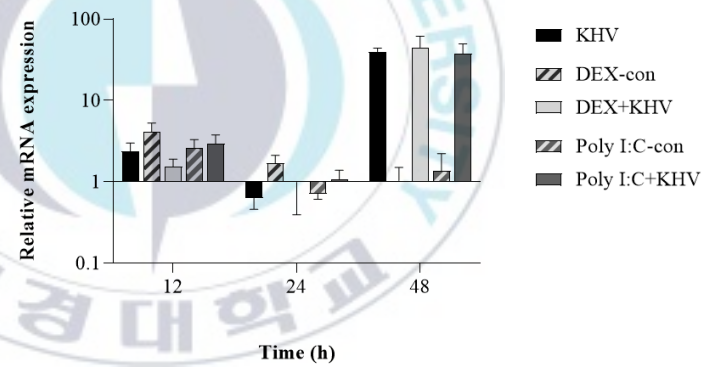


Figure 11. Expression of innate immune factors in only treatment DEX or Poly I:C groups, KHV injection with pre-treated each immunomodulator. Another group is injected with only KHV.

## 4.2 시간별 koi herpesvirus 역가 변화 비교

KHV 접종 이전에 면역조절제에 노출된 그룹(DEX+KHV, Poly I:C+KHV)과, 노출되지 않은 그룹(KHV)에서 감염 초기의 virus genome copy 발현 차이를 알아보고자 하였다. KHV만 접종한 그룹에서 접종 12시간 후 신장 조직 1mg에서  $1.48 \times 10^3$ copies/mg를 나타내었고 실험 종료 시점인 48시간 후에는  $1.36 \times 10^3$ copies/mg로 지속적인 바이러스의 복제가 관찰되지 않았다(Fig. 12). 한편, 면역자극제로서 Poly I:C를 전 처리 후 KHV를 접종한 그룹의 경우 12시간후에  $1.14 \times 10^3$ copies/mg, 48시간 후에는  $1.12 \times 10^3$ copies/mg의 virus genome copy를 나타내어 면역자극제 전처리에 따른 KHV 복제에 차이가 나타나지 않았다. 반면에 면역억제제로서 DEX를 전 처리 후 KHV를 접종한 그룹의 경우 12시간에 신장 조직 1mg에서  $1.16 \times 10^4$ copies를 나타내었고 24시간에는  $7.03 \times 10^4$ copies/mg, 실험 종료 시점인 48시간 후에는  $1.70 \times 10^5$ copies/mg를 나타내어 면역억제제에 처리에 의한 지속적인 바이러스 증식이 확인되었다.

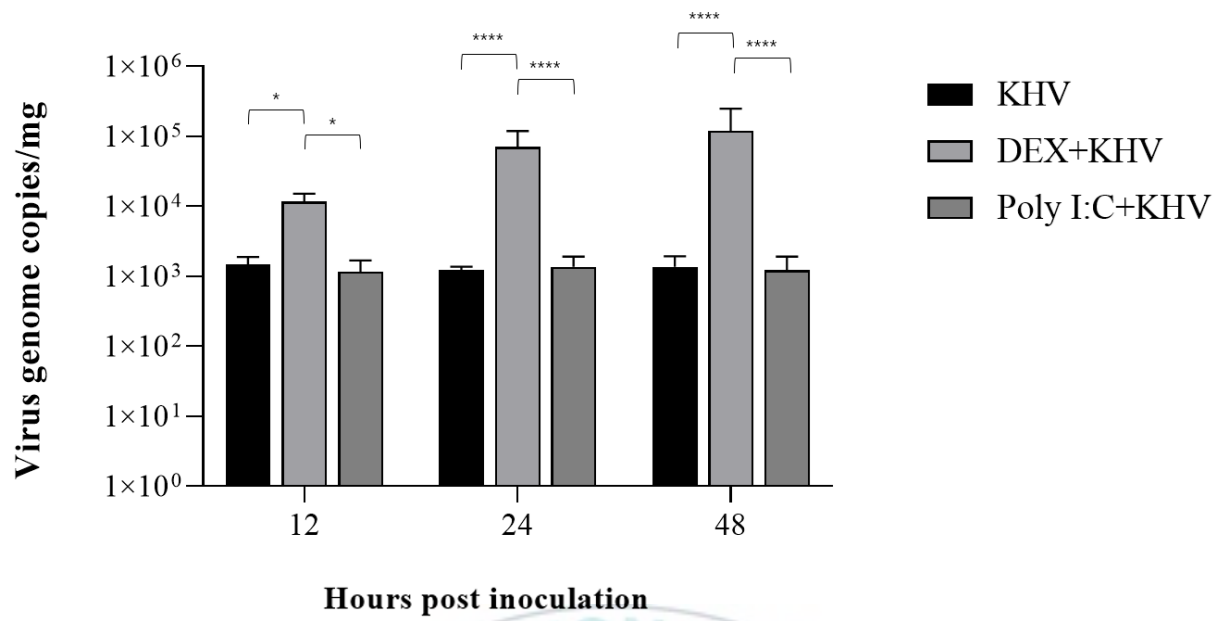


Figure 12. Quantification of KHV genome copies in groups ( $n=3$ ) injected with KHV after pre-treated with DEX or Poly I:C, and injected with only KHV group.

## 4. 고찰

본 연구에서는 국내 양식 중인 비단잉어에서 검출된 KHV에 대해 유전형 및 아형에 대해 분류하였으며, 면역 반응 억제 유도 물질인 DEX와 자극물질인 Poly I:C 노출에 따른 KHV 감염 특성을 알아보고자 CCB 세포 및 잉어에서의 초기 면역유전자 발현과 바이러스의 복제 수준을 분석하였다.

본 연구에서 검출된 KHV의 Enlarged TK 유전자 염기서열에 대한 계통발생학적 상관관계를 분석한 결과 Asian type으로 분류되었으며 (Fig. 5), 인도네시아, 일본, 대만, 국내에서 보고된 바이러스와 동일한 그룹 내에 속하였다(Hammoumi et al., 2016; Aoki et al., 2007; Gao et al., 2018). 또한 Kurita et al. (2009)의 방법으로 KHV의 Enlarged 9/5 유전자의 두 가지 변이영역과 Enlarged TK gene 8가지 변이영역에 염기의 삽입/결손에 따라 Asian type의 경우 A1-2, European type의 경우 E1-5의 유전 아형으로 세분화하였고, 이번 연구에 사용한 KHV의 유전아형은 A1으로 분류되었다 (Table 3, Fig. 6). 총 9개의 Asian strain 참조서열과 Enlarged TK gene의 염기서열은 100% (GenBank accession no. MK260013는 99.5%) 일치하였고, Enlarged 9/5 gene의 경우 98.85% (GenBank accession no. MK260013는 98.2%)로 높은 염기서열 상동성을 나타내었다. Antychowicz et al (2005)의 연구에서 높은 수준의 염기서열 상동성을 나타내는 것은 virus가 공통된 장소에서 기원했을 가능성이 있다고 언급함에 따라 이번 연구에서 사용된 KHV는 일본의 최초 Asian type 분리주 (TUMST1, GenBank accession no. AP008984)와 동일한 Asia 지역에서 유래하였을 가능성이 시사된다. European type의 경우 5가지의 변이종이 있는 것으로 확인되었지만 Asian type의 경우 두 가지 변이종의 존재가 확인되었는데, 유전적 다양성이 적다는 것은 단기간에 급속한

확산이 일어났을 가설에 근거하여(Kimbi et al., 2004, Kramvis and Kew, 2007) 상대적으로 과거에 발생한 European type 보다 Asian type의 급속한 확산 가능성이 제시된다. 또한, Dong et al (2013)의 연구에서는 Asian type KHV의 경우에만 ORF136 유전자 no.115 부위에 일부 특징적인 염기서열의 존재를 확인하였는데, 본 연구에서 검출된 ScKc-2105 strain에서도 동일 부위에서 “TGGTCCTCTACC” 염기서열을 확인할 수 있었다 (Table 3, Fig. 6). 이는 기존에 Kurita et al. (2009)에서 제시된 Enlarged TK 유전자(약 1001bp)에 비해 상대적으로 길이가 짧은(약 611bp) 유전자로 유전형 분류가 가능함을 보여주는 결과이며 향후 KHV 유전형에 대한 신속한 판별을 위해서 ORF136 유전자의 특정부위를 genetic maker로 활용할 수 있음을 시사한다.

KHV는 인간 및 포유류의 herpesvirus와 마찬가지로 세포의 면역 메커니즘을 회피하며 잠복감염 상태를 지속할 수 있다(Reed et al., 2014). Herpesvirus의 잠복기는 Establishment(초기감염), Maintenance(잠복), Reactivation(잠복기로부터의 재활성)의 3단계로 알려져 있으며(Joens, 2016), 초기 바이러스의 노출 후 숙주세포에서 바이러스 증식이 중단되지만 외부의 스트레스 요인에 의해 재활성 되는 메커니즘을 가지고 있다. Eide et al (2011)의 연구에서 비단잉어에 KHV의 인위감염 이후 약 28일간 분변과 아가미에서 KHV의 DNA가 검출되지 않았으나 이후 인위적으로 수온상승조건을 주었을 때 바이러스의 복제가 확인되어 KHV의 잠복 감염 가능성과 재활성의 가능성을 제시하였다. 따라서, KHV의 잠복 감염에 대한 이해를 위해서는 숙주 면역 상태와 바이러스 복제 간의 상관관계에 대한 기초 연구가 필요하며, 본 연구에서는 숙주 면역인자 발현 차이를 유발하기 위해서 면역억제제인 DEX와 자극제인 Poly I:C를 CCB 세포와 잉어에 노출시켜 숙주 면역 상태에 따른 KHV의 감염 특성을 파악하고자 하였다.

본 연구에서는 두 가지 면역 조절제 처리 후 6시간에 DEX에 의한 NF- $\kappa$ B의 발현 억제와 Poly I:C 상향 발현이 높은 수준으로 확인되었다 (Fig. 8). NF- $\kappa$ B는 세포의

염증 반응에 관여하는 인자를 조절하는 핵심 전사 인자로서 외부에서 병원체의 침입 시 사이토카인의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다(Gilmore et al., 2006). 합성된 glucocorticoid (GC) 인 DEX는 glucocorticoid receptor(GR)와 복합체를 형성하여 세포 내로 유입되며, GR은 세포 내에서 글루코코르티코이드 반응성 요소(Glucocorticoid-responce element, GRE)와 복합체를 형성한다. GR-GRE 복합체는 핵 속에서 NF- $\kappa$ B의 DNA 전사 결합을 억제하며(transpression) interferon, Interleukin, Toll-like receptor와 같은 염증성 사이토카인의 발현을 감소하여 Cyclooxygenase-2와 같은 항 염증 유전자의 전사(transactivation)를 상향 조절하는 것 있는 것으로 알려져 있다(Morgan et al., 2011; Unlap et al., 1997). 본 연구에서도 CCB 세포에 DEX를 농도별로 처리하였을 때 고농도 처리 그룹의 경우 48시간 후에도 세포의 NF- $\kappa$ B 발현이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 8). 이러한 NF- $\kappa$ B의 하향 발현은 Crinelli et al (2000)의 연구에서 제시된 GR의 직접적인 상호작용에 따른 결과라고 사료된다. Sergerie et al (2007)의 연구에서 DEX 전처리에 의한 인간세포(인간잇몸섬유아세포, Human gingival fibroblasts)의 NF- $\kappa$ B 억제 메커니즘으로 Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) 단독 처리 그룹보다 면역억제제의 동시 처리 그룹에서 바이러스의 복제 증가를 확인하였고, 본 연구에서의 DEX 처리에 따른 CCB 세포에서의 NF- $\kappa$ B 발현 억제는 포유류 세포와 유사한 기작으로 나타날 수 있을 것으로 사료된다.

한편, dsRNA와 유사한 구조를 가진 Poly I:C는 세포 내에서 Toll-like receptor 3 (TLR3)에 의해 인식되어 interferon regulatory factor 3 (IRF3)을 활성화시킬 수 있으며, IRF3의 활성화는 1형 IFN을 생산을 유도하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 유발한다고 알려져 있다(Kawai et al., 2008; Yamamoto et al., 2003). 본 연구에서도 CCB 세포에 Poly I:C를 처리한 결과 48시간 이후에도 모든 농도 구간에서 대조구에 비해 NF- $\kappa$ B가

상향 발현되는 것으로 나타났다(Fig. 8). 이러한 Poly I:C 처리에 따른 NF- $\kappa$ B의 상향 발현은 잉어에서 유래된 CIK(Ctenopharyngodon idella kidney cell, 초어신장세포) 세포에서 Poly I:C 노출이 NF- $\kappa$ B의 유도에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 p53의 상향 발현을 확인하여(Huang et al., 2017) Poly I:C가 동일한 잉어과 어류 유래 세포인 CCB 세포에서도 충분히 초기 면역인자의 발현을 유도할 수 있음을 입증한다.

면역조절제의 전처리에 의한 면역 상태가 KHV의 감염수준에 미치는 영향을 파악하고자 CCB 세포에서는 면역조절제를 처리하지 않은 그룹과, 처리 후 바이러스를 접종한 그룹으로 나누었고, 어류에서는 면역조절제 처리 그룹과, 처리 후 바이러스 접종그룹으로 세분화하였다. 세포에서 NF- $\kappa$ B의 발현은 KHV만 접종한 경우 6시간에서 24시간까지 연속적으로 하향 발현되었지만(Fig. 10), 잉어의 경우 KHV 접종 48시간까지도 상향 발현을 나타내었다(Fig. 11). DEX 전처리 후 KHV를 감염시킨 CCB 세포에서는 48 시간까지 NF- $\kappa$ B가 하향 발현되었으나 잉어에서는 상향 발현되는 것으로 나타났다. CCB 세포에서의 하향 발현은 Herpes simplex virus Type 1 (HSV-1)의 감염 메커니즘처럼 I $\kappa$ B $\alpha$ 를 하향 조절함에 따라(Hiscott et al., 2001) NF- $\kappa$ B의 유도를 회피 또는 GR과의 직접적인 상호작용에 의한 NF- $\kappa$ B 발현 억제로 사료된다(Crinelli et al., 2000). 본 연구에서 DEX 전 처리 후 KHV에 감염된 잉어에서는 CCB 세포와의 상반된 결과가 나타나 NF- $\kappa$ B 발현을 유도하는 다른 면역인자의 영향이 있었을 것으로 추정된다. 특히, NF- $\kappa$ B는 세포 내에서 RelA(p65), NF- $\kappa$ B1(p50; p105), NF- $\kappa$ B2(p52; p100)의 발현 억제인자와 함께 복합체를 구성하여 존재하기 때문에(Verma, 2004), 다양한 면역인자 pathway 뿐만 아니라 단백질 발현의 상관관계 분석이 필요할 것으로 사료된다. 한편, corticosteroid인 GC는 스트레스 반응과 관련된 cortisol로 알려져 있으며, 숙주 세포에 DEX의 처리는 스트레스 요인으로 작용될 수 있다(Kook et al., 2016). 잉어과 어류인

초어(*Ctenopharyngodon idella*)에 복강 주사 행위의 결과, 혈장 cortisol 농도가 3일 후까지도 대조구에 비해 4배 이상 상승한다고 보고되었으며(Wang et al., 2005), 스트레스 자극은 세포의 초기 면역인자, 항염증 사이토카인의 분비를 증가시킨다고 알려져 있다(Tort, 2011). 따라서, 본 연구에서 잉어에 복강 주사를 하는 것은 스트레스 반응이 추가적으로 유발되었을 것으로 시사되며, 향후 연구에서 DEX 노출 법에 따른 cortisol 변화와 KHV 감염 간의 상관관계가 필요할 것으로 사료된다.

CCB 세포와 잉어 실험 결과에서  $\text{TNF-}\alpha$ 의 경우 면역억제제인 DEX를 treatment 한 그룹의 경우 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. Kumari et al (2012)에 따르면 glucocorticoid의 급성 노출은 미토콘드리아의 활성 증가에 따른 세포 내 칼슘 신호와 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 증가시키는 기작을 가지고 있다고 하였다. 선행연구에 근거하여 세포에서 미토콘드리아의 활성을 측정하는 방법으로 CCB 세포의 cell viability를 흡광도 측정한 결과 DEX 처리 그룹이 대조구보다 1.4배 상승하였다(data not shown). 또한 ROS의 증가는  $\text{TNF}$ 와  $\text{TNF}$ 의 수용체 신호 전달 조절을 통해 세포의  $\text{TNF-}\alpha$ 를 증가시킨다는 연구결과에 따라(Nathan and Ding et al., 2010), 인위적인 스트레스 요인(Kook et al., 2016)인 DEX 처리에 의한 미토콘드리아의 활성화에 의해  $\text{TNF-}\alpha$ 가 상향 발현되었다고 사료되지만, 잉어 세포에서 미토콘드리아에 의한 면역인자 발현에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 반면, Poly I:C에 노출된 CCB 세포(Poly I:C+KHV)에서  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  발현은 모든 시간 구간에서 대조구에 비해 상향 발현되었으며 다른 면역인자와 어류 분석결과에서도 동일한 경향으로 나타났다(Fig. 10, Fig. 11). Adamek et al (2012)의 연구에서도 Poly I:C를 전 처리한 CCB 세포에 KHV를 접종하였을 때 IFN과 IRF7등의 초기 면역인자 발현이 유도되었고 이에 따라 virus genome copy의 감소가 확인되었다고 언급하였다. 본 실험의 결과에서도 Poly I:C의 노출에 의한 면역 자극이 확인되어 면역의 자극이

KHV의 복제에 영향을 미칠 수 있다는 것이 시사된다.

면역조절제의 처리에 의한 면역반응 조절은 CCB 세포 및 잉어 체내의 KHV genome copy에서도 영향을 주는 것으로 확인되었다(Fig. 9, Fig. 12). CCB 세포에 면역조절제를 전처리 후 KHV를 접종한 결과 세포 내(Intracellular)와 배양액(Extracellular)의 virus genome copy는 모든 시간 구간에서 DEX+KHV 그룹이 KHV만 처리한 그룹보다 높았다(Fig. 9). 또한, 잉어 실험에서도 DEX 전 처리 후 KHV 접종한 그룹(DEX+KHV)의 잉어 체내 virus genome copy 값은 지속적인 증가를 보였으나, KHV 단독 접종 및 Poly I:C 전 처리 후 KHV를 접종한 그룹의 잉어에는 시간별로 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 한편, 면역 조절제의 노출에 의한 virus genome copy의 차이에 관한 연구는 포유류에서도 확인이 되었는데, DEX를 노출한 Swiss webster mice에 HSV-1를 감염 시켰을 때 바이러스의 복제량이 증가하였다고 보고하였다(Harrison et al., 2019). 이전 연구결과를 통해 이미 인간 및 포유류에서 DEX의 전처리가 virus의 역가를 더욱 높일 수 있다는 것이 입증되었으며 이번 연구결과에서도 동일한 경향을 나타내었다. 특히, DEX를 노출한 송아지의 삼차신경절(trigeminal ganglionic)에 잠복하고 있던 Bovine herpesvirus 1(BHV-1)는 DEX 처리가 삼차신경 뉴런의 apoptosis를 촉진한다고 밝혔다(Winkler et al., 2002). 어류의 경우, Herpesvirus anguillae(AngHV-1)에 노출 이력이 있는 뱀장어에 DEX를 처리 시 잠복 감염 상태인 바이러스의 재활성이 관찰되었다(Van Nieuwstadt et al., 2001). 따라서, DEX는 KHV 감염 표적 인자의 전사를 억제하여 바이러스의 복제 효율성을 높일 수 있는 가능성을 시사하며, DEX 노출에 따른 숙주의 초기 면역 변화와 이에 따른 바이러스 복제 효율의 변화는 향후 Herpesvirus의 잠복-재활성 기작의 파악에서 중요한 방법론을 제공할 수 있을 것이다.

결론적으로, 본 연구에서는 국내 양식 중인 비단잉어에서 확인된 KHV에 대하여

Enlarged TK 및 Enlarged 9/5 유전자의 변이영역 분석을 통해 Asian type KHV의 A1형으로 계통분류하였다. 또한, Enlarged TK gene (약 1001bp)보다 비교적 짧은 서열인 ORF 136 (611bp) 유전자를 이용하여 유전형을 판별할 수 있는 genetic marker로의 활용 가능성을 확인하였다. 두 가지 면역조절제(DEX, Poly I:C) 처리에 따른 CCB 세포와 잉어에서의 초기 면역인자 발현 및 바이러스 복제 수준을 분석한 결과, DEX 노출 시 CCB 세포에서 NF- $\kappa$ B가 하향 발현되었으며, 이에 따라 감염 초기에 KHV의 genome copy도 증가할 수 있음을 확인하였다. 반면, Poly I:C에 노출된 세포와 잉어의 경우에 면역 자극에 의해 NF- $\kappa$ B가 유도되었고 어류 실험에서도 동일한 경향을 나타내어 바이러스 단독 접종 그룹보다 virus genome copy가 낮았다. 따라서 DEX 노출에 의한 면역인자 억제는 KHV의 복제를 쉽게, Poly I:C의 노출에 의해 자극된 면역은 KHV의 복제를 어렵게 하였으므로 초기 면역의 조절은 KHV의 복제에 중요한 역할을 할 것이라 사료된다.

최종적으로, 본 연구는 숙주 세포의 초기 면역인자 발현 차이에 따른 KHV의 감염과 복제 차이를 확인하였으며 KHV의 잠복감염에 대한 특성 구명의 기초연구로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

## V. 참고문헌

- Abbas, A. T., Abdel-Aziz, M. M., Zalata, K. R., & Tel-D, A. A. G. (2005). Effect of dexamethasone and *Nigella sativa* on peripheral blood eosinophil count, IgG1 and IgG2a, cytokine profiles and lung inflammation in murine model of allergic asthma. *The Egyptian journal of immunology*, 12(1), 95–102.
- Adamek, M., Rakus, K., Chyb, J., Brogden, G., Huebner, A., Irnazarow, I., & Steinhagen, D. (2012). Interferon type I responses to virus infections in carp cells: In vitro studies on Cyprinid herpesvirus 3 and Rhabdovirus carpio infections. *Fish & shellfish immunology*, 33(3), 482–493.
- Antychowicz, Jerzy., Reichert, michal., Matras, marek., Bergmann, Sven. M., & Haenen, olga (2005). Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of koi herpesvirus isolated in Poland. *BMLLETIN-VETERINARY INSTITUTE IN PMLAWY*, 49(4), 367.
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A. J., Waltzek, T. B., Bercovier, H., & Hedrick, R. P. (2007). Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *Journal of virology*, 81(10), 5058–5065.
- Avarre, J. C., Madeira, J. P., Santika, A., Zainun, Z., Baud, M., Cabon, J., Caruso, D., Castric, J., Bigarré, L., Engelsma, M., & Maskur, M. (2011). Investigation of Cyprinid herpesvirus-3 genetic diversity by a multi-locus variable number of tandem repeats analysis. *Journal of Virological Methods*, 173(2), 320–327.

- Avarre, J. C., Santika, A., Bentenni, A., Zainun, Z., Madeira, J. P., Maskur, M., Bigarré, L., & Caruso, D. (2012). Spatio-temporal analysis of cyprinid herpesvirus 3 genetic diversity at a local scale. *Journal of Fish Diseases*, 35(10), 767–774.
- Bergmann, S. M., Kempter, J., Sadowski, J., & Fichtner, D. (2006). First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. *Bulletin–European Association of Fish Pathologists*, 26(2), 97.
- Bergmann, S. M., Lutze, P., Schütze, H., Fischer, U., Dauber, M., Fichtner, D., & Kempter, J. (2010). Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 30(2), 74–84.
- Bigarré, L., Baud, M., Cabon, J., Antychowicz, J., Bergmann, S. M., Engelsma, M., Pozet, F., Reichert, M., & Castric, J. (2009). Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 158(1–2), 51–57.
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T. W., & Brenner, D. (2016). TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends in cell biology*, 26(4), 249–261.
- Calle, P. P., T. McNamara, and Y. Kress. 1999. Herpesvirus associated papillomas in koi carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 30:165–169.

- Chang, P. H., Lee, S. H., Chiang, H. C., & Jong, M. H. (1999). Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan. *Fish Pathology*, 34(4), 209–210.
- Chen, C., Yang, J. S., Lu, C. C., Chiu, Y. J., Chen, H. C., Chung, M. I., Wu, Y. T., & Chen, F. A. (2020). Effect of quercetin on dexamethasone-induced C2C12 skeletal muscle cell injury. *Molecules*, 25(14), 3267.
- Compston, L. I., Li, C., Sarkodie, F., Owusu-Ofori, S., Opare-Sem, O., & Allain, J. P. (2009). Prevalence of persistent and latent viruses in untreated patients infected with HIV-1 from Ghana, West Africa. *Journal of medical virology*, 81(11), 1860–1868.
- Costes, B., Fournier, G., Michel, B., Delforge, C., Raj, V. S., Dewals, B., Gillet, L., Drion, P., Body, A., Schynts, F., Lieffrig, F., & Vanderplasschen, A. (2008). Cloning of the koi herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome demonstrates that disruption of the thymidine kinase locus induces partial attenuation in *Cyprinus carpio* koi. *Journal of virology*, 82(10), 4955–4964.
- Crinelli, R., Antonelli, A., Bianchi, M., Gentilini, L., Scaramucci, S., & Magnani, M. (2000). Selective inhibition of NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 26(3), 211–222.

- Dong, C., Li, X., Weng, S., Xie, S., & He, J. (2013). Emergence of fatal European genotype CyHV-3/KHV in mainland China. *Veterinary Microbiology*, 162(1), 239–244.
- Dong, C., Weng, S., Li, W., Li, X., Yi, Y., Liang, Q., & He, J. (2011). Characterization of a new cell line from caudal fin of koi, *Cyprinus carpio koi*, and first isolation of cyprinid herpesvirus 3 in China. *Virus research*, 161(2), 140–149.
- Dragan, A. I., Hargreaves, V. V., Makeyeva, E. N., & Privalov, P. L. (2007). Mechanisms of activation of interferon regulator factor 3: the role of C-terminal domain phosphorylation in IRF-3 dimerization and DNA binding. *Nucleic acids research*, 35(11), 3525–3534.
- Duan, H., Xu, Y., Zhou, Y., Wang, F., Ding, C., & Cao, J. (2020). Electron microscopic observation of infected CCB and whole genome analysis of Koi herpesvirus isolate GY01. *bioRxiv*.
- Eide, K. E., Miller-Morgan, T., Heidel, J. R., Kent, M. L., Bildfell, R. J., LaPatra, S., Gregory Watson, G., & Jin, L. (2011). Investigation of koi herpesvirus latency in koi. *Journal of Virology*, 85(10), 4954–4962.
- El-Matbouli, M., & Soliman, H. (2011). Transmission of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation. *Research in Veterinary Science*, 90(3), 536–539.
- El-Mayet, F. S., Toomer, G., Ostler, J. B., Harrison, K. S., Santos, V. C., Wijesekera, N., Stayton, E., Ritchey, J., & Jones, C. (2022). Progesterone Sporadically

- Induces Reactivation from Latency in Female Calves but Proficiently Stimulates Bovine Herpesvirus 1 Productive Infection. *Journal of Virology*, 96(5), e02130–21.
- Erlandsson, A. C., Bladh, L. G., Stierna, P., Yucel–Lindberg, T., Hammarsten, O., Modeer, T., Harmenberg, J., & Wikstrom, A. C. (2002). Herpes simplex virus type 1 infection and glucocorticoid treatment regulate viral yield, glucocorticoid receptor and NF- $\kappa$ B levels. *Journal of endocrinology*, 175(1), 165–176.
- FAO. (2020). The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.
- Gao, Y., Suárez, N. M., Wilkie, G. S., Dong, C., Bergmann, S., Lee, P. Y. A., Davison, A. J., Vanderplasschen, A. F. C., & Boutier, M. (2018). Genomic and biologic comparisons of cyprinid herpesvirus 3 strains. *Veterinary research*, 49(1), 1–11.
- Gilad, O., Yun, S., Adkison, M. A., Way, K., Willits, N. H., Bercovier, H., & Hedrick, R. P. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology*, 84(10), 2661–2667.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680–6684.
- Gomez, D. K., Joh, S. J., Jang, H., Shin, S. P., Choresca Jr, C. H., Han, J. E., Kim, J. H., Jun, J.W., & Park, S. C. (2011). Detection of koi herpesvirus (KHV) from koi

- (*Cyprinus carpio koi*) broodstock in South Korea. *Aquaculture*, 311(1–4), 42–47.
- Haenen, O. L. M., Way, K., Bergmann, S. M., & Ariel, E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24(6), 293–307.
- Hammoumi, S., Vallaeys, T., Santika, A., Leleux, P., Borzym, E., Klopp, C., & Avarre, J. C. (2016). Targeted genomic enrichment and sequencing of CyHV-3 from carp tissues confirms low nucleotide diversity and mixed genotype infections. *PeerJ*, 4, e2516.
- Hanson, L., Dishon, A., & Kotler, M. (2011). Herpesviruses that infect fish. *Viruses*, 3(11), 2160–2191.
- Harrison, K. S., Zhu, L., Thunuguntla, P., & Jones, C. (2019). Antagonizing the glucocorticoid receptor impairs explant-induced reactivation in mice latently infected with herpes simplex virus 1. *Journal of Virology*, 93(13), e00418–19.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & development*, 18(18), 2195–2224.
- Hedrick, R. P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J. V., Marty, G. D., Nordhausen, R. W., Kebus, M.J., Bercovier, H., & Eldar, A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(1), 44–57.

- Hedrick, R. P., Gilad, O., Yun, S. C., McDowell, T. S., Waltzek, T. B., Kelley, G. O., & Adkison, M. A. (2005). Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, 2(1), V7.
- Hermoso, M. A., & Cidlowski, J. A. (2003). Putting the brake on inflammatory responses: the role of glucocorticoids. *IUBMB life*, 55(9), 497–504.
- Hiscott, J., Kwon, H., & Génin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- $\kappa$ B pathway. *The Journal of clinical investigation*, 107(2), 143–151.
- Hiscott, J., Nguyen, T. L., Arguello, M., Nakhaei, P., & Paz, S. (2006). Manipulation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene*, 25(51), 6844–6867..
- Huang, Q., Xie, D., Mao, H., Wang, H., Wu, Z., Huang, K., Wan, Y., Xu, Q., & Hu, C. (2017). *Ctenopharyngodon idella* p53 mediates between NF- $\kappa$ B and PKR at the transcriptional level. *Fish & shellfish immunology*, 69, 258–264.
- Jones, C. (2016). Latency of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) in sensory neurons. *Herpesviridae*, 1, 24.
- Jones, C., & Chowdhury, S. (2007). A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews*, 8(2), 187–205.

- Joo, M., Hahn, Y. S., Kwon, M., Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., & Christman, J. W. (2005). Hepatitis C virus core protein suppresses NF- $\kappa$ B activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with I $\kappa$ B kinase  $\beta$ . *Journal of virology*, 79(12), 7648–7657.
- Kawai, T., & Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-1-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143(1), 1–20.
- Kim, H. J., & Kwon, S. R. (2013). Evidence for two koi herpesvirus (KHV) genotypes in South Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(3), 197–202.
- Kimbi, G. C., Kramvis, A., & Kew, M. C. (2004). Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *Journal of general virology*, 85(5), 1211–1220.
- Klafack, S., Wang, Q., Zeng, W., Wang, Y., Li, Y., Zheng, S., Kempter, J., Lee, P. Y., Matras, M., & Bergmann, S. M. (2017). Genetic variability of Koi herpesvirus in vitro—a natural event?. *Frontiers in Microbiology*, 8, 982.
- Kook, I., & Jones, C. (2016). The serum and glucocorticoid-regulated protein kinases (SGK) stimulate bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus 1 productive infection. *Virus research*, 222, 106–112.
- Kramvis, A., & Kew, M. C. (2007). Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology Research*, 37, S9–S19.

- Kumari, S., Mehta, S. L., & Li, P. A. (2012). Glutamate induces mitochondrial dynamic imbalance and autophagy activation: preventive effects of selenium. *PloS one*, 7(6), e39382.
- Kurita, J., Yuasa, K., Ito, T., Sano, M., Hedrick, R. P., Engelsma, M. Y., Haenen, O.L.M., Sunarto, A., Kholidin, E. B., Chou, H. Y., Tung, M. C., de la Peña, L. D., Lio-Po, G. D., Tu, C., Way, K., & Iida, T. (2009). Molecular epidemiology of koi herpesvirus. *Fish Pathology*, 44(2), 59–66.
- Langereis, J. D., Oudijk, E. D., Schweizer, R. C., Lammers, J. J., Koenderman, L., & Ulfman, L. H. (2011). Steroids induce a disequilibrium of secreted interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 $\beta$  synthesis by human neutrophils. *European Respiratory Journal*, 37(2), 406–415.
- Leung, T. L., & Bates, A. E. (2013). More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: Implications for food security. *Journal of Applied Ecology*, 50(1), 215–222. doi: 10.1111/1365-2644.12017
- Li, W., Lee, X., Weng, S., He, J., & Dong, C. (2015). Whole-genome sequence of a novel Chinese cyprinid herpesvirus 3 isolate reveals the existence of a distinct European genotype in East Asia. *Veterinary microbiology*, 175(2–4), 185–194.
- Lippert, U., Möller, A., Welker, P., Artuc, M., & Henz, B. M. (2000). Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H1-and H2-receptor antagonists. *Experimental dermatology*, 9(2), 118–124.

- McAllister, P. E., Lidgerding, B. C., Herman, R. L., Hoyer, L. C., & Hankins, J. (1985). Viral diseases of fish: first report of carp pox in golden ide (*Leuciscus idus*) in North America. *Journal of Wildlife Diseases*, 21(3), 199–204.
- Minarovits, J., Gonczol, E., & Valyi-Nagy, T. (Eds.). (2007). Latency strategies of herpesviruses. New York, NY: Springer.
- Mitre-Aguilar, I. B., Cabrera-Quintero, A. J., & Zentella-Dehesa, A. (2015). Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(1), 1.
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell research*, 21(1), 103–115.
- Morgan, M. J., Kim, Y. S., & Liu, Z. G. (2008). TNF  $\alpha$  and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell research*, 18(3), 343–349.
- Nakao, N., Kurokawa, T., Nonami, T., Tumurkhuu, G., Koide, N., & Yokochi, T. (2008). Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. *Innate Immunity*, 14(3), 190–196.
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). SnapShot: reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell*, 140(6), 951–951.
- Nguyen, T. M., Agbohessou, P. S., Nguyen, T. H., Thi, N. T. T., & Kestemont, P. (2022). Immune responses and acute inflammation in common carp *Cyprinus*

- carpio injected by *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) as affected by dietary oils. *Fish & Shellfish Immunology*, 122, 1–12.
- Noga, O., Hanf, G., Görges, D., Dinh, Q. T., Groneberg, D. A., Suttorp, N., & Kunkel, G. (2005). Regulation of NGF and BDNF by dexamethasone and theophylline in human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Regulatory peptides*, 132(1–3), 74–79.
- Panne, D., Maniatis, T., & Harrison, S. C. (2007). An atomic model of the interferon- $\beta$  enhanceosome. *Cell*, 129(6), 1111–1123.
- Pokorova, D., Vesely, T., Piackova, V., Reschova, S., & Hulova, J. (2005). Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Veterinarni Medicina*, 50(4), 139–148.
- Pollock, J. L., Presti, R. M., Paetzold, S., & IVth, H. W. V. (1997). Latent murine cytomegalovirus infection in macrophages. *Virology*, 227(1), 168–179.
- Powell, P. P., Dixon, L. K., & Parkhouse, R. M. (1996). An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *Journal of virology*, 70(12), 8527–8533.
- Rahman, I., Yang, S. R., & Biswas, S. K. (2006). Current concepts of redox signaling in the lungs. *Antioxidants & redox signaling*, 8(3–4), 681–689.

- Randall, R. E., & Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of general virology*, 89(1), 1–47.
- Reed, A. N. (2014). The conserved biology of herpesvirus latency: a study in cyprinid herpesvirus 3.
- Roizman, B. A. P. E. P. (2001). The family Herpesviridae: a brief introduction. *Fields virology*.
- Rootman, D. S., Haruta, Y., Hill, J. M., & Kaufman, H. E. (1988). Corneal nerves are necessary for adrenergic reactivation of ocular herpes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 29(3), 351–356.
- Sakuma, S., Kato, Y., Nishigaki, F., Sasakawa, T., Magari, K., Miyata, S., Ohkubo, Y., & Goto, T. (2000). FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *British journal of pharmacology*, 130(7), 1655–1663.
- Salosso, Y., Sunadji, R. F., & Anggrainy, K. (2020). Application of Kefa forest honey as antibacterial in the treatment of common carp *Cyprinus carpio* infected with bacteria *Aeromonas hydrophila*. *AACL Bioflux*, 13(2), 984–992.
- Sano, M., Ito, T., Kurita, J., Yanai, T., Watanabe, N., Miwa, S., & Iida, T. (2004). First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathology*, 39(3), 165–167.

- Sen, N., Sommer, M., Che, X., White, K., Ruyechan, W. T., & Arvin, A. M. (2010). Varicella–zoster virus immediate–early protein 62 blocks interferon regulatory factor 3 (IRF3) phosphorylation at key serine residues: a novel mechanism of IRF3 inhibition among herpesviruses. *Journal of virology*, 84(18), 9240–9253.
- Sergerie, Y., Boivin, G., Gosselin, D., & Rivest, S. (2007). Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *The Journal of infectious diseases*, 195(6), 817–825.
- Spitkovsky, D., Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Möller, A., & Schmitz, M. L. (2002). The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF- $\kappa$ B activation by targeting the I $\kappa$ B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25576–25582.
- Stephens, F. J., Raidal, S. R., & Jones, B. (2004). Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus. *Australian Veterinary Journal*, 82(3), 167–169.
- St-Hilaire, S., Beevers, N., Way, K., Le Deuff, R. M., Martin, P., & Joiner, C. (2005). Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Diseases of aquatic organisms*, 67(1–2), 15–23.
- Sunarto, A., & Cameron, A. (2005). Response to mass mortality of carp: an Indonesian experience. In *FAO fisheries proceedings* (No. 4, pp. 87–105).
- Takahashi, H., Fukuhara, T., Kitazawa, H., & Kormelink, R. (2019). Virus latency and the impact on plants. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2764.

- Tanaka, J., Ogura, T., Kamiya, S., Sato, H., Yoshie, T., Ogura, H., & Hatano, M. (1984). Enhanced replication of human cytomegalovirus in human fibroblasts treated with dexamethasone. *Journal of general virology*, 65(10), 1759–1767.
- Tolo, I. E., Padhi, S. K., Williams, K., Singh, V., Halvorson, S., Mor, S. K., & Phelps, N. B. (2021). Susceptibility of *Pimephales promelas* and *Carassius auratus* to a strain of koi herpesvirus isolated from wild *Cyprinus carpio* in North America. *Scientific reports*, 11(1), 1985.
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1366–1375.
- Unlap, M. T., & Jope, R. S. (1997). Dexamethasone attenuates NF- $\kappa$ B DNA binding activity without inducing I $\kappa$ B levels in rat brain in vivo. *Molecular brain research*, 45(1), 83–89.
- Van Nieuwstadt, A. P., Dijkstra, S. G., & Haenen, O. L. M. (2001). Persistence of herpesvirus of eel *Herpesvirus anguillae* in farmed European eel *Anguilla anguilla*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45(2), 103–107.
- Vancsok, C., Penaranda, M. M. D., Raj, V. S., Leroy, B., Jazowiecka–Rakus, J., Boutier, M., Gao, Y., Wilkie, G.S., Suarez, N.M., Wattiez, R., Gillet, L., Davison, A.J., & Vanderplasschen, A. F. (2017). Proteomic and functional analyses of the virion transmembrane proteome of cyprinid herpesvirus 3. *Journal of Virology*, 91(21), e01209–17.

- Ventura, J. J., Cogswell, P., Flavell, R. A., Baldwin, A. S., & Davis, R. J. (2004). JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes & development*, 18(23), 2905–2915.
- Verma, I. M. (2004). Nuclear factor (NF) –  $\kappa$  B proteins: therapeutic targets. *Annals of the rheumatic diseases*, 63(suppl 2), ii57–ii61.
- Wang, W. B., Li, A. H., Cai, T. Z., & Wang, J. G. (2005). Effects of intraperitoneal injection of cortisol on non-specific immune functions of *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Fish Biology*, 67(3), 779–793.
- Way, K., Le Deuff, R. M., Ecclestone, L., Feist, S. W., Dixon, P. F., Wildgoose, W. H., & Hedrick, R. P. (2001, September). Isolation of a herpesvirus during disease outbreaks in adult koi carp, *Cyprinus carpio*, in the UK. In Abstract from 10th Int Conf Eur Assoc Fish Pathol.
- Winkler, M. T. C., Doster, A., Sur, J. H., & Jones, C. (2002). Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. *Veterinary microbiology*, 86(1–2), 139–155.
- Wullaert, A., Heyninck, K., & Beyaert, R. (2006). Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF- $\kappa$ B and JNK activation in hepatocytes. *Biochemical pharmacology*, 72(9), 1090–1101.
- Xu, J., Zeng, L., Zhang, H., Zhou, Y., Ma, J., & Fan, Y. (2013). Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China. *Veterinary Microbiology*, 166(1–2), 138–144.

- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., & Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633), 640–643.
- Yi, Y., Zhang, H., Lee, X., Weng, S., He, J., & Dong, C. (2014). Extracellular virion proteins of two Chinese CyHV-3/KHV isolates, and identification of two novel envelope proteins. *Virus research*, 191, 108–116.

