

오리방풀로부터 분리된 ORI2의 췌장염 유발 콕사키바이러스B4 증식억제

임병관¹ · 조소연¹ · 김진희^{2*}

¹중원대학교 의생명과학과, ²대구한의대학교 한방산업대학

ORI2 is a Strong Inhibitor of Coxsackievirus B4 Replication

Byung-Kwan Lim¹, Soyeon Jo¹, and Jin Hee Kim^{2*}

¹Department of Biomedical Science, Jungwon University, Goesan-gun, Chungbuk, Korea

²College of Herbal Bio-industry, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

Abstract – The ORI2 (3-[3,4-dihydroxyphenyl]acrylic acid 1-[3,4-dihydroxyphenyl]-2-methoxycarbonyl ethyl ester) was purified from the extract of *Isodon excisus*. We confirmed the antiviral effect of ORI2 in a coxsackievirus-induced pancreatitis model. Coxsackievirus B4 (CVB4) is a common cause of pancreatitis and may be reason of the type-1 diabetes. Anti-enteroviral compounds were screened by HeLa cell survival assay. Purified natural compounds were added to HeLa cells cultured 96-well plates after 10⁴ PFU/ml CVB4 pre-incubation for 30 min. ORI2 significantly improved HeLa cell survival in a dose-dependent manner. In addition, ORI2 (1 mM) treatment was dramatically decreased virus protease 2A induced eIF4G-I cleavage and viral VP1 capsid protein production. HeLa cell virus titers and viral RNA replication were significantly decreased in ORI2-treatment in a dose dependent manner (1 mM–0.001 mM). These results demonstrate that ORI2 has a strong antiviral effect. It was significantly decreased virus replication. ORI2 may be developed as a potential therapeutic agent for CVB4.

Key words – Coxsackievirus B4, Pancreatitis, *Isodon excisus*, Diabetes

Coxsackievirus B4(CVB4)는 숙주세포의 coxsackievirus and adenovirus receptor(CAR)와 결합하여 세포에 감염되는 장내바이러스로 주로 췌장에 감염되는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} CVB4는 피코르나바이러스 과에 속하며 poliovirus, rhinovirus 와 마찬가지로 장내바이러스 속에 속한다. 대부분의 장내바이러스의 감염은 증상이 없음에도 불구하고, CVB4의 감염은 급성 또는 만성 췌장염의 원인이 되며 심각한 현대의 질병 중의 하나인 당뇨와 같은 만성 질환을 발병 원인으로 예측되고 있다. 만성 췌장염은 고통스러운 질병 중의 하나로 알려져 있으며 exocrine pancreas의 염증에 의한 파괴로 발생하게 되며 소화기능의 장애를 일으키며 장기적으로 베타세포의 호르몬 이상분비를 야기하여 만성질환을 일으키게 된다.^{3,4)} 만성 췌장염은 유전적, 환경적 요소들에 의해 발병할 수 있으며 중증 급성 췌장염은 바이러스 등의 환경적인 요인들이 원인이 될 것으로 예측되고 있다. 이와 같은 급성, 만성 췌장염의 병인을 규명하기 위해 생쥐에서 CVB4를 감염시켜 유도한 췌장염 모델이 개발되었으며 여러 임상질환의 연구를 위해 사용되고 있다.⁵⁾ 췌장염 모델을 만드는데

사용되는 바이러스는 염증의 유발 경중에 따라 CVB4-P와 CVB4-V로 분류되었으며 CVB4-P는 약한 췌장염을 CVB4-V는 중증 췌장염을 일으키며 주로 바이러스의 유전자형과 바이러스의 감염에 의해 유도되는 cytokine IL-12와 IFN- γ 에 의해 결정된다.^{3,6)}

우리는 이전에 화학적 화합물에서 성장한 몇몇 항 바이러스 약물을 보고했다. Enterovirus protease 3C(3CPI)의 억제제는 쥐의 바이러스 심근염 model에서 특히 강한 항바이러스 효과를 보였다.⁷⁾ 그것은 심장에서 바이러스 복제와 심근 장애를 상당히 감소시켰다. 게다가 심근염을 일으키는 바이러스인 CVB3에 감염된 쥐의 생존은 3CPI 처리에 의해 극적으로 증가했다. 이러한 결과들은 바이러스 복제를 억제하는 것이 장내바이러스 치료에 효과적인 방법이 될 수 있다는 것을 시사한다. 새로운 장내바이러스 억제제를 개발하기 위해 천연 화합물 중 장내바이러스 복제를 억제하는 물질을 HeLa 세포를 사용하여 선별 하였으며 이중 췌장염의 원인 바이러스로 생각되는 CVB4에 항바이러스 효과를 보이는 천연물을 선택하였다.²⁾

오리방풀(*Isodon excisus* (Max.) Kudo) 추출물에서 분리한 ORI2의 장내바이러스 증식억제 효과를 발견했으며 이것

*교신저자(E-mail): jinheekim@dhu.ac.kr
(Tel): +82-53-819-1588

은 HeLa cell에서 CVB4의 증식을 억제하였으며, 특히 HeLa cell 생존 분석에서 강한 항바이러스 효과를 나타냈다. 오리방풀(*I. excisus*)는 한국에 널리 분포되어있고 알코올증독치료와 위장관 질환에 전통 민간요법으로 사용 되어 왔다. 또한, 기존의 보고에 의하면 오리방풀(*I. excisus*)에 함유된 페닐프로파노이드 화합물들은 우수한 세포사멸억제효과가 있는 알려져 있다.⁸⁾ 최근에 이들 화합물 중 ORI2가 심근염을 일으키는 콕사키바이러스(CVB3)에 대한 항바이러스 효과가 있다고 보고되어 있다.⁹⁾

CVB4 감염 세포에 대한 ORI2 처리는 숙주세포에 감염된 바이러스의 단백질 생산과 유전자 증폭의 억제로 새로운 바이러스의 복제를 유의하게 억제 하였다. 이러한 결과는 ORI2가 CVB4의 감염에 의한 급성, 만성 췌장염 치료제로 개발될 수 있는 잠재적인 능력을 확인한 것이다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 오리방풀(*Isodon excisus* (Max.) Kudo)은 2012년 8월경 지리산 일원에서 채집한 후 건조하여 사용하였으며, 한국인삼연구소 이상명 박사가 동정하였고, 표본은 대구한의대학교 표본실에 보관하였다.

시약 및 기기 - 세포배양에 사용된 DMEM 배지, fetal bovine serum(FBS)는 Gibco Laboratorie사에서 구입하였다. Tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 추출 및 분획용 용매는 모두 특급 시약을 사용하였고, 성분 분리를 위한 순상 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, ASTM, Merck)을 사용하였고, 물질분리 및 확인에 사용한 TLC plate는 Merck TLC plate silica 60F₂₅₄를 사용하였고, HPLC는 Hitachi사(Japan)의 기기를 통하여 측정하였고, column은 Shisheido사의 CAPCELL PAK C₁₈(250×10 mm, Japan)를 이용하였다. Mass 스펙트럼은 ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry, Fisons VG Quattro 400 mass spectrometer, USA)를 사용하여 측정하였고, ¹H-NMR은 Varian UNITY 300(USA)기기로 CD₃OD 용매를 이용하여 측정하였다.

ORI2 화합물의 추출 및 분리 - 오리방풀(*Isodon excisus*) 2.5 kg을 2주 동안 메탄올에 추출, 여과 후 농축하여, 얻어진 MeOH extract(39 g)를 증류수(1 L)에 현탁시켜, n-hexane, EtOAc, n-BuOH 및 H₂O 순으로 분획 후, 그 중 가장 우수한 효과를 나타낸 EtOAc 분획물(5 g)을 CHCl₃:MeOH=20:1부터 단계적으로 극성을 높인 전개용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 실시하였고, 이를 통해 얻은 활성분획(42 mg)을 HPLC(Shisheido-CapCell Pak C₁₈ UG120, 250×10 mm, UV 220 nm, CH₃CN gradient 20-100%, flow 1.5 ml/min)을 통해 정제한 후, 분자량과 ¹H-NMR data로부터 본 연구팀이 보고한바 있는 선행 문헌⁸⁾과

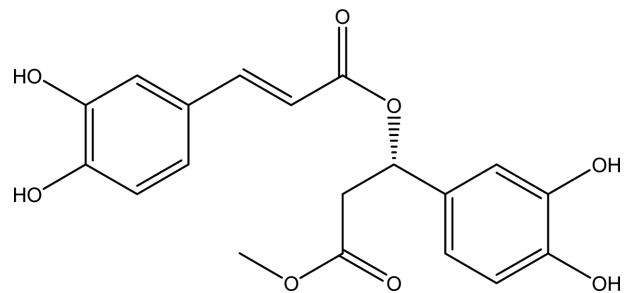


Fig. 1. Chemical structure of ORI2 (3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methoxycarbonyl ethyl ester).

비교를 통해 (3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methoxycarbonyl ethyl ester (5.8 mg) (C₁₉H₁₈O₈; MW 374)로 동정되었다(Fig. 1).

ORI2 (3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methoxycarbonyl ethyl ester): ¹H-NMR data (300 MHz, CD₃OD) 6.40 (1H, d, *J*=15.8 Hz, H-2), 7.64 (1H, d, *J*=15.8 Hz, H-3), 5.20 (1H, dd *J*=7.2, 5.7 Hz, H-1'), 3.01 (2H, d, *J*=7.2 Hz, H-2'), 6.71 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2''), 6.69 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5''), 6.57 (1H, dd, *J*=8.0, 2.0 Hz, H-6''), 6.69 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-2'''), 6.78 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-5'''), 6.96 (1H, dd, *J*=7.8, 2.1 Hz, H-6'''), 3.67 (3H, s, OCH₃); ESI-MS: *m/z* 375 [M+H]⁺

Virus and Cell lines - Coxsackievirus B4는 America Tissue Culture Collection (ATCC)의 기준 바이러스의 혈청형을 구입하여 사용하였다. 바이러스 역가는 이전의 논문에서 기술한 바와 같이 HeLa cell에서 plaque forming unit (PFU) assay를 통해 결정하여 실험에 사용하였다.¹⁰⁾ 요약하면, 바이러스 감염 세포 상등액을 준비하고 6-well plate에 배양된 HeLa 세포에 30분간 감염시킨 후 3% Difco agar/DMEM을 3 mm로 덮고 37°C CO₂ 배양기에서 이틀간 배양하여 plaque forming unit(PFU) assay로 바이러스 역가를 측정하였다. HeLa cell은 10% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM)에서 배양하였다. HeLa-UVM cell은 삼성서울병원(전은석교수)에서 분양 받았다.¹¹⁾

세포생존 실험 - Cell survival assay를 통해 화합물의 항바이러스 활성을 실험하여 CVB4 증식 억제 물질을 선별하였다.⁷⁾ 간단히 요약하여, HeLa cell을 10⁴ PFU/ml로 CVB4를 30분간 감염시키고 5% FBS DMEM에 순차적으로 희석한 화합물을 처리하였다. 18시간 감염 후, 세포 증식 검출 시약인 Cell Counting Kit 8(CCK-8) 7 μl를 넣고 2시간동안 더 배양하였다. Microplate reader(Molecular device, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존을 확인하여 항바이러스 효능을 확인하였다.

Western Blot Analysis - 세포의 단백질은 RIPA buffer

(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, 1% NP40, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate)로 분리하였다. 전체 세포 추출물의 aliquot을 12% SDS-PAGE gel에 loading하였다. 전기영동을 한 후, 단백질을 Hybond-ECL nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane은 5% non-fat dry milk solution으로 block하고 anti-enterovirus VP1 (1:1000, mouse monoclonal antibody)과 GAPDH antibodies(1:1000, raddit polyclonal antibodies; Cell signaling, USA)로 probe 하였다.

바이러스 유전자 검출 - RNA 바이러스인 CVB4의 유전자 증폭을 검증하기 위해 TRIzol reagent(Invitrogen, USA)로 세포를 분리하여 RNA를 추출하고 전체 추출물의 aliquot 중 2 µl를 주형으로 Maxime Reverse-transcription(RT) kit(IntronbBiotech, Inc., KOR)을 사용하여 RT를 수행하였다. 이때 바이러스의 positive 가닥 증폭을 위해 VP1-antisense primer(5'-CACCGGATGGCCAATCCA-3')로 먼저 RT 반응을 수행하여 cDNA를 생산하고 생산된 cDNA를 주형으로 VP1-AS와 VP1-sense primer(5'-GCGAAGAGTCTATTGAGCTA-3')를 사용하여 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 수행하고 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

통계처리 - 모든 결과는 mean±SEM으로 나타냈다. Control과 바이러스 감염 그룹 간의 결과는 Mann-Whitney nonparametric t-test(GraphPad Prism 3.0 for Windows; GraphPad Software, La Jolla, USA)를 이용하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 정하였다.

결과 및 고찰

In vitro Antiviral Effect of ORI2 - 항바이러스 화합물을

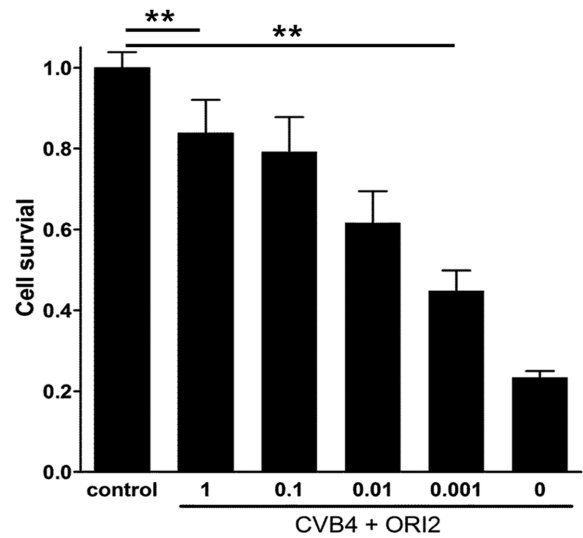


Fig. 2. Test of anti-enterovirus compounds. The antiviral activity of ORI2 was tested by using a HeLa cell survival assay following coxsackievirus B4 infection. Treatment with 1 mM ORI2 significantly increased cell survival compared to untreated cells. Data are presented as the mean plus or minus the standard error of the mean from 3 independent experiments (** $P < 0.01$).

찾기 위해서 CVB4에 대한 항바이러스 효과를 HeLa cell의 생존을 분석을 통해 검증하였다. 이중 CVB4에 감염된 HeLa cell의 생존율은 ORI2의 처리에 의해 유의하게 증가하였으며, 특히 농도에 의존적으로 항바이러스 효과를 나타냈다 (Fig. 2). 특히 비교적 낮은 농도인 0.001 µM에서 50%의 세포 생존을 나타내 ORI2가 장내바이러스인 CVB4에 대한 강력한 항바이러스 효과를 확인하였다.

CVB4 바이러스 단백질 생산 억제 - 10^4 PFU/ml CVB4를 단층 HeLa cell이 배양된 12 well-plate에 첨가하고 30분

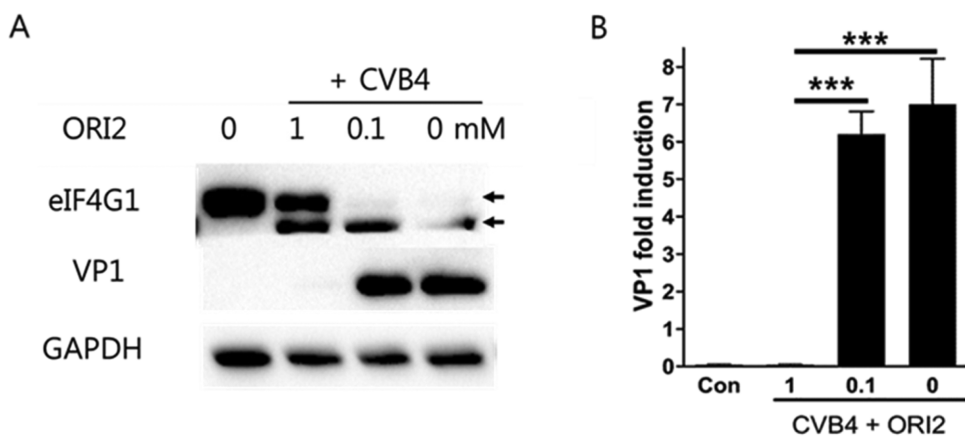


Fig. 3. ORI2 inhibits CVB4 replication. (A) ORI2 was added to HeLa cells following CVB4 infection. Virus replication was dramatically reduced by ORI2 in a dose-dependent manner. Virus capsid protein VP1 was dramatically decreased by ORI2 treatment. In addition, transcription factor eIF4GI cleavage was protected, respectively (Upper arrow: full size, lower arrow: cleaved size). Data are presented as the mean plus or minus the standard error of the mean from 3 independent experiments (** $P < 0.001$).

간 감염 시킨 후, 1 mM에서 0.1 mM 농도로 ORI2를 처리하였다. 18시간이 지난 후, 전체 단백질을 추출하여 western blot을 수행하였다. 그 결과, CVB4의 막단백질 VP1은 ORI2의 투여농도에 따라 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3A). 특히 바이러스가 증식할 때 생산하는 바이러스의 protease 2A 효소에 의해 절단되는 전사요소 단백질 eIF4GI는 세포의 단백질 생산과 생존에 매우 중요한 단백질로 바이러스 증식 시 세포의 단백질 생산 억제제를 위해 CVB3 바이러스 protease 2A에 파괴 되게 된다. ORI2의 처리농도에 따라 eIF4GI의 파괴가 급격히 감소하여 윗부분의 정상 단백질이 많이 남았으며 ORI2를 처리하지 않았을 때는 바이러스 증식에 의한 protease 2A의 생산에 의해 정상 단백질은 모두 파괴되고 밑부분의 잘려진 단백질만 일부 확인되었다. 이러한 결과는 오리방풀(*I. excisus*)에 함유된 페닐프로파노이드 성분인 ORI2가 CVB4 감염된 HeLa cell에서 CVB4 복제 억제에 효과적인 것을 보여주고 있다(Fig. 3B).

ORI2 Inhibit CVB4 Replication in HeLa Cells - ORI2의 CVB4 증식을 배양세포 상등액의 생바이러스 농도를 PFU assay를 통해 확인하였다. CVB4 감염 후 ORI2를 처리하여 배양한 세포의 배양액을 얻어 HeLa cell에 처리하고 PFU assay를 수행하여 생바이러스의 농도를 측정하였다. 결과에서 보여주는 것과 같이 ORI2의 처리는 농도에 따라 강력하게 CVB4의 복제와 증식을 억제하였다(Fig. 4). 이 결과를 통해 감염세포에서 바이러스의 단백질 생산 저해와 새로운 바이러스의 생성 억제에 ORI2가 매우 효과적으로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

CVB4 유전자 증폭 억제 - CVB4 감염 HeLa cell에서 ORI2의 바이러스 유전자 증폭 억제 효과를 rt-PCR을 수행하여 막 단백질 VP1의 positive strain 농도를 측정하였다. 바이러스의 positive strain은 직접적인 바이러스의 증식보다는 바이러스 유전자 증폭과 유전자 존재의 유무를 확인할 수 있는 매우 강력한 확인 방법으로 작은 양의 바이러스 유전자도 증폭하여 검출 할 수 있다. ORI2의 처리는 CVB4 바이러스의 유전자 증폭을 강력하게 저해 하였다(Fig. 5). 직접적인 바이러스의 증식이 저해 되어 바이러스의 유전자가 감소된 것과 동일한 결과이며 ORI2가 감염세포에서 전반적인 바이러스의 증식을 억제 할 수 있음을 확인하였다.

이상의 결과는 국내자생식물에 함유된 천연성분으로서 항바이러스 활성성분을 개발할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 최근 장내바이러스 속 바이러스들은 많은 일반 질병들의 발생 원인이 되고 있으며 특히 아이들에게 다양한 전염병을 유발하는 원인이다.^{12,13} Enterovirus71은 수족구병의 주요 원인으로 잘 알려져 있다.^{14,15} 본 실험에서 국내 자생식물인 오리방풀(*I. excisus*)의 페닐프로파노이드계 화합물 ORI2는 CVB4 감염 HeLa cell의 생존을 유지를 실험하기 위해 사용되었으며 ORI2 처리에 의해 CVB4의 복제가 강

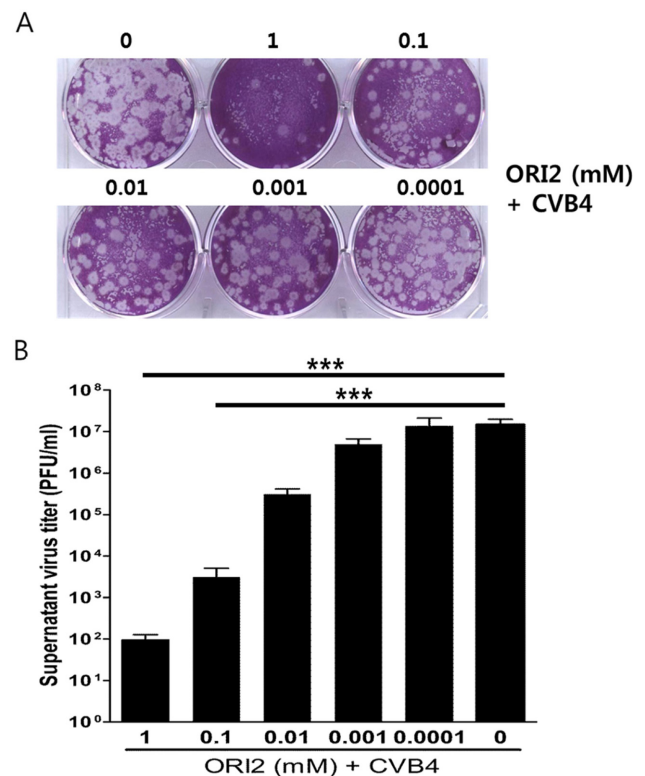


Fig. 4. Live virus propagation. ORI2 was added to HeLa cells following CVB4 infection. (A) Cell supernatant virus titer was confirmed by PFU assay in HeLa cells. Virus titer in the supernatant was significantly decreased in a dose dependent manner of ORI2. Data are presented as the mean plus or minus the standard error of the mean from 3 independent experiments (***) $P < 0.01$, (**) $P < 0.01$.

하게 억제되었다. 특히 HeLa cell에서 바이러스 막 단백질의 생산이 유의하게 감소되었고, 새로운 생바이러스의 증식이 현저히 억제 되었다. 또한 바이러스 증식에 의해 증가되는 CVB4 유전자의 복제와 증폭도 ORI2 화합물 처리에 의해 상당히 감소시키는 것을 발견하였다.

많은 항바이러스 약물들이 Balb/C 생쥐에서 CVB4에 의해 유발된 췌장염에 대하여 실험되었고,² 그 결과는 급성 바이러스 복제가 직접적인 췌장 손상을 유도하는 세포면역 반응을 유발하는 것을 보여주었다.^{3,6,16} 이러한 이전의 연구 결과들은 급성 바이러스 복제와 세포면역반응 두 가지를 다 막는 것이 장내바이러스 감염을 치료하는 것에 매우 효과적인 치료방법이 될 수 있다고 주장한다.^{17,18} 그러한 이유로, 항염증 기능은 이미 밝혀진 많은 천연화합물의 항바이러스 효과가 실험 되었다. 특히 만성질환을 유발할 수 있는 것으로 밝혀진 몇몇 바이러스에 대한 증식억제 물질 개발은 많은 관심과 연구가 수행되고 있다. 만성 췌장염은 고통스러운 질병중의 하나로 알려져 있으며 exocrine pancreas의 염증에 의한 파괴로 발생하게 되며 소화기능의 장애를

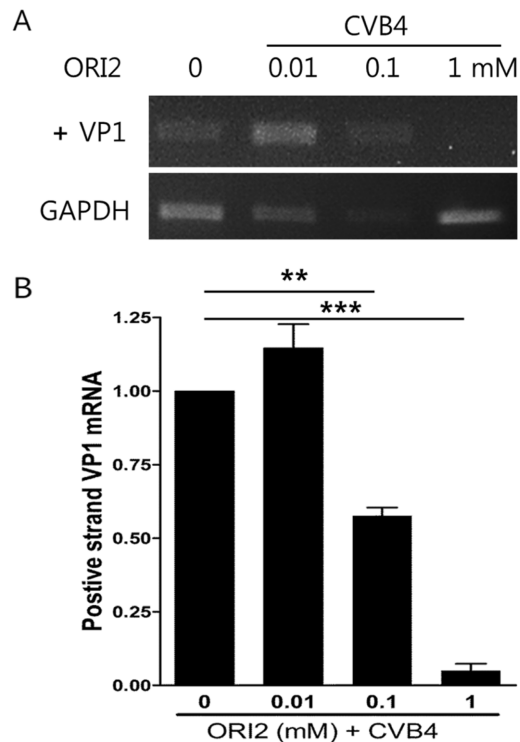


Fig. 5. ORI2 inhibit CVB4 gene amplification. CVB4 gene amplification was confirmed by rt-PCR. CVB4 capsid protein VP1 gene amplification was significantly decreased by ORI2 treatment. Virus VP1 gene detection level showed a strong correlation with viral protein and new virus production in vitro. Data are presented as the mean plus or minus the standard error of the mean from 3 independent experiments (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

일으키며 장기적으로 베타세포의 호르몬 이상분비를 야기하여 만성질환을 일으키게 된다. 이러한 초기염증의 유도가 바로 CVB4의 감염에 의해 유도될 것으로 생각 되고 있으며 다양한 연구를 통해 증명이 되고 있다.

본 연구팀은 몇몇 후보 화합물을 확보하였고, 그들의 항바이러스 활성을 평가하였다. 오리방풀 추출물로부터 분리된 ORI2는 이전 연구에서 항 세포 사멸 효과를 보여주었다.⁸⁾ 또한, 본 연구에서 enterovirus와 같은 장내바이러스인 CVB4에 대한 강력한 바이러스 증식 억제 효과를 보여주었다.

결론

본 연구에서는 오리방풀(*Isodon excisus*)로부터 분리한 페닐프로파노이드계 ORI2 화합물의 CVB4에 대한 항바이러스 효과를 측정하였으며, ORI2의 CVB4에 대한 유전자 복제와 바이러스 증식억제 효과를 세포 실험을 통해 확인하였다. 향후 CVB4에 의해 유도된 췌장염 동물 모델에서 그 실제 효능을 연구해야 할 것으로 사료되며, 이번 항바이러스

결과를 통해 볼 때 ORI2가 장내바이러스 췌장염의 치료약물로서 개발 될 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

- Ramsingh, A. I., Lee, W. T., Collins, D. N. and Armstrong, L. E. (1997) Differential recruitment of B and T cells in coxsackievirus B4-induced pancreatitis is influenced by a capsid protein. *J. Virol.* **71**: 8690-8697.
- Ramsingh, A. I. (2008) CVB-induced pancreatitis and alterations in gene expression. *Curr. Top Microbiol Immunol.* **323**: 241-258.
- Ramsingh, A. I., Lee, W. T., Collins, D. N. and Armstrong, L. E. (1999) T cells contribute to disease severity during coxsackievirus B4 infection. *J. Virol.* **73**: 3080-3086.
- Caggana, M., Chan, P. and Ramsingh, A. (1993) Identification of a single amino acid residue in the capsid protein VP1 of coxsackievirus B4 that determines the virulent phenotype. *J. Virol.* **67**: 4797-4803.
- Stevens, T., Conwell, D. L. and Zuccaro, G. (2004) Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J. Gastroenterol.* **99**: 2256-2270.
- Potvin, D. M., Metzger, D. W., Lee, W. T., Collins, D. N. and Ramsingh, A. I. (2003) Exogenous interleukin-12 protects against lethal infection with coxsackievirus B4. *J. Virol.* **77**: 8272-8279.
- Yun, S. H., Lee, W. G., Kim, Y. C., Ju, E. S., Lim, B. K., Choi, J. O., Kim, D. K. and Jeon, E. S. (2012) Antiviral activity of coxsackievirus B3 3C protease inhibitor in experimental murine myocarditis. *J. Infect. Dis.* **205**: 491-497.
- Lee, C. H., Kim, J. H., Lee, H. J., Lee, S. M. and Kho, Y. H. (2001) Two new constituents of *Isodon excisus* and their evaluation in an apoptosis inhibition assay. *J. Nat. Prod.* **64**: 659-660.
- Lim, B. K. and Kim, J. H. (2014) ORI2 inhibits coxsackievirus replication and myocardial inflammation in experimental murine myocarditis. *Bio. Pharm. Bull.* **37**: 1650-1654.
- Lim, B. K., Choi, J. H., Nam, J. H., Gil, C. O., Shin, J. O., Yun, S. H., Kim, D. K. and Jeon, E. S. (2006) Virus receptor trap neutralizes coxsackievirus in experimental murine viral myocarditis. *Cardiovasc. Res.* **71**: 517-526.
- Lim, B. K., Choe, S. C., Shin, J. O., Ho, S. H., Kim, J. M., Yu, S. S., Kim, S. and Jeon, E. S. (2002) Local expression of interleukin-1 receptor antagonist by plasmid DNA improves mortality and decreases myocardial inflammation in experimental coxsackieviral myocarditis. *Circulation* **105**: 1278-1281.
- Huber, S. A. and Lodge, P. A. (1986) Coxsackievirus B-3 myocarditis. Identification of different pathogenic mechanisms in DBA/2 and Balb/c mice. *Am. J. Pathol.* **122**: 284-291.

13. Racaniello, V. R. *Chapter 24, The picornaviridae; The Viruses and Their Replication. Fields Virology* (2007).
14. Wang, S. M. and Liu, C. C. (2014) Update of enterovirus 71 infection: epidemiology, pathogenesis and vaccine. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **12**: 447-456.
15. Pinkert, S., Westermann, D., Wang, X., Klingel, K., Dorner A., Savvatis, K., Grossl, T., Krohn, S., Tschöpe, C., Zeichhardt, H., Kotsch, K., Weitmann, K., Hoffmann, W., Schultheiss, H. P., Spiller, O. B., Poller, W. and Fechner, H. (2009) Prevention of cardiac dysfunction in acute coxsackievirus B3 cardiomyopathy by inducible expression of a soluble coxsackievirus-adenovirus receptor. *Circulation* **120**: 2358-2366.
16. De Palma, A. M., Thibaut, H. J., Li S., Van, Aelst I., Dillen, C., Swinnen, M., Verbeken, E., Neyts, J. and Opdenakker, G. (2009) Inflammatory rather than infectious insults play a role in exocrine tissue damage in a mouse model for coxsackievirus B4-induced pancreatitis. *J. Pathol.* **217**: 633-641.
17. Tan, E. L., Wong, A. P. and Poh, C. L. (2010) Development of potential antiviral strategy against coxsackievirus B4. *Virus Res.* **150**: 85-92.
18. Jaidane, H. and Hober, D. (2008) Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* **34**: 537-548.

(2014. 8. 11 접수; 2014. 9. 11 심사; 2014. 11. 12 게재확정)