

아마인 추출물의 AKT 신호 조절을 통한 콕사키바이러스 증식억제

신하현¹ · 문성진¹ · 임병관^{1*} · 김진희^{2*}

¹중원대학교 의생명과학과, ²대구한의대학교 한방산업대학

Extract of *Linum usitatissimum* L. inhibits Coxsackievirus B3 Replication through AKT Signal Modulation

Ha-Hyeon Shin¹, Sung-Jin Moon¹, Byung-Kwan Lim^{1*}, and Jin Hee Kim^{2*}

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

²College of Herbal Bio-industry, Daegu Haany University, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea

Abstract – Coxsackievirus B3 (CVB3) is a very well-known causative agent for viral myocarditis and meningitis in human. However, the effective vaccine and therapeutic drug are not developed yet. CVB3 infection activates host cell AKT signaling. Inhibition of AKT signaling pathway may attenuate CVB3 replication and prevent CVB3-mediate viral myocarditis. In this study, we determined antiviral effect of the selected natural plant extract to develop a therapeutic drug for CVB3 treatment. We screened several chemically extracted natural compounds by using HeLa cell-based cell survival assay. Among them, *Linum usitatissimum* L. extract was selected for antiviral drug candidate. *L. usitatissimum* extract significantly decreased CVB3 replication and cell death in CVB3 infected HeLa cells with no cytotoxicity. CVB3 protease 2A induced eIF4G1 cleavage and viral capsid protein VP1 production were dramatically decreased by *L. usitatissimum* extract treatment. In addition, virus positive and negative strand genome amplification were significantly decreased by 1 mg/ml *L. usitatissimum* extract treatment. Especially, *L. usitatissimum* extract was associated with inhibition of AKT signal and maintain mTOR activity. In contrast, Atg12 and LC3 expression were not changed by *L. usitatissimum* extract treatment. In this study, the potential AKT signal inhibitor, *L. usitatissimum* extract, was significantly inhibited viral genome replication and protein production by inhibition of AKT signal. These results suggested that *L. usitatissimum* extract is a novel therapeutic agent for treatment of CVB3-mediated diseases.

Keywords – Coxsackievirus B3, AKT, eIF4G1, Plant extract

Coxsackievirus B3(CVB3)는 *picornaviridae* enterovirus 속에 속하는 단일 양성 가닥 RNA 유전자를 가지고 있는 매우 작은 크기의 막이 없는 장내바이러스로 심근염과 뇌수막염 질병의 주요원인 바이러스이다.¹⁻³⁾ CVB3는 급성 심근염을 일으키는 바이러스로 심각한 염증과 면역작용을 유도하고 종종 급성 사망에 이르게 한다. 또한 만성 심근염을 유발하여 최종에는 심근증으로 발전시켜 심장기능의 저하를 유도하게 된다.⁴⁻⁸⁾ 유전자 구조와 생활사가 잘 알려져 있으며 심근염, 수족구와 같은 질병과 연관성이 있어 최근 많은 관심을 받고 있으나 질병의 정도가 약하다는 상업적인 제한으로 백신개발 및 치료제 개발 연구는 진행되지 않고 있으며 제한적인 대증적인 치료만이 이루어지고 있는 실정

으로 초기 감염 예방이 가장 좋은 치료방법으로 알려져 있다.^{9,10)} 하지만 최근 생활형태의 변화로 유아들의 감염이 급증하고 있으며 민감도에 따라 급성 뇌수막염과 같은 복합 질환을 유발하여 유아를 사망에 이르게 하는 경우도 종종 있으며 중국과 동남아시아와 같은 개발도상국에서의 환자 사망률은 계속해서 증가되는 것으로 보고가 되고 있어 백신 또는 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

아마인의 학명은 *Linum usitatissimum* L.이며 중앙아시아 고산지대가 원산지인 저온식물이다.^{11,12)} 과종 후 100일 이면 수확이 가능한 단기식물로 북위 55도의 한랭지역에서만 자라며 특성상 많은 양이 생산되지 않고 7000년 전부터 식용으로 쓰였으며 유럽과 아시아를 거쳐 캐나다에 전파되었다. 우리나라에서는 생산되지 않으나 현재 수입되고 있으며, 항암작용으로 피를 맑게 해주고 혈당을 내려주는 역할을 한다. 아미노산과 섬유질, 필수지방산인 오메가3 지방산

*교신저자(E-mail): jinheekim@dhu.ac.kr, bklim@jwu.ac.kr
(Tel): +82-53-819-1588, +82-43-830-8605

을 풍부하게 가지고 있으며 심장병과 고지혈증, 동맥경화, 고혈압, 관상 동맥 질환 및 대사 증후군을 비롯하여 심장혈관질환 개선에 도움을 주고 콜레스테롤 수치를 저하시키고 면역기능 증가에 효과가 있다.¹²⁻¹⁵⁾ 본 연구에서는 아마인 추출물의 enterovirus 증식억제 활성이 확인되어 치료제 개발을 위한 후보 물질로 CVB3에의 작용 기전을 연구하였다.

PKB/AKT signaling은 세포 밖의 신호에 의해 세포 생존 및 성장과 같은 다양한 기능과 관련이 있는 중요 세포신호이다.¹⁶⁾ 특히 CVB3 증식에 있어 바이러스의 세포감염과 바이러스 유전자 복제, 바이러스 조립의 후기단계에서 필수적인 세포신호로 바이러스 감염 후 AKT의 억제는 바이러스의 증식을 저해하고 세포의 생존을 높여 CVB3의 증식에 필수적인 세포신호이다.¹⁷⁾ PKB/AKT signaling의 억제는 바이러스의 감염에 의한 세포의 보호 작용에 따른 세포의 활성을 저하시켜 CVB3 감염 세포 활성을 저해하고 단백질 생산의 억제를 통해 바이러스의 유전자 복제와 단백질 생산을 저해하여 바이러스의 증식을 유의하게 억제하는 것으로 알려져 있다.^{16,18)}

본 연구를 통해 천연물 기반 추출물의 CVB3에 대한 항바이러스 활성을 실험하였으며 이 중 뛰어난 항바이러스 효과를 나타내는 물질을 선정 하였다. 본 연구에서 활성이 확인된 아마인의 심근염, 뇌수막염 유발 CVB3에 대한 증식 억제 효과와 CVB3 증식과 관련된 세포 신호 조절을 확인 하였다. 특히 아마인의 뛰어난 AKT signaling 억제 효과를 규명하여 차후 CVB3 치료제 개발을 위한 후보물질로의 사용 가능성을 검증하였다.

재료 및 방법

Coxsackievirus 농도측정 및 세포배양 - CVB3 농도는 HeLa cell에 바이러스 감염 후 plaque forming unit(PFU) assay를 통해 결정하고 실험에 사용하였다. 바이러스 농도 확인을 위해 바이러스에 감염된 세포의 상등액을 serial dilution하여 HeLa 세포가 배양된 6-well plate에 30분간 감염시킨 후 3% Agar/DMEM을 1:1로 혼합하여 2 ml 덮어주고 37°C CO₂ incubator에서 배양하여 plaque forming unit (PFU) assay로 바이러스 농도를 측정하였다. HeLa cell은 10% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM)에서 배양하였다.^{19,20)}

아마인(Linum usitatissimum. L.) 추출 - 아마인 추출물은 건조된 100 g 아마인을 분쇄한 후 95% 메탄올로 2주간 추출한 다음 감압 농축하여 메탄올 추출물 1.5 g을 획득하여 수율 2%로 확보하였으며 사용 용도에 따라 DMSO에 녹여 100 mg/ml의 고농도 시약을 제조하고 세포배양액에 희석하여 실험에 사용하였다.^{3,18,21)} 목원대학교 생의약화학전공 이상명 교수가 추출에 사용할 아마인을 감별하였다.

Coxsackievirus 증식 억제 물질 선별 - 천연물 추출물에서 항바이러스 효능이 있는 물질을 선별하기 위해 96well-plate에 Hela 세포 배양 후 바이러스를 감염시키고 100 µg/ml부터 1 ng/ml까지 5% FBS DMEM으로 serial dilution한 추출물을 처리하여 CVB3에 대한 세포 생존 및 증식 억제 물질을 선별하였다. 추출물질 24시간 감염 후 세포 증식 검출 시약인 Cell Counting kit-8(CCK-8) 8 µl를 넣고 2시간 더 배양한다. 세포의 생존에 따라 변화되는 변화를 microplate reader(Molecular device, USA)를 사용하여 흡광도 450 nm에서 측정하여 세포의 생존을 확인하여 천연물의 항바이러스 효능을 검증 하였다.

Western Blot Analysis - 추출물과 바이러스가 처리된 세포에서 PBS lysis buffer(1x phosphate buffer saline, 1% Triton-X 100)를 사용하여 세포를 lysis하여 단백질을 추출 하였다. 추출된 단백질은 sample buffer와 섞어 98°C 10분 heating후 10% SDS-PAGE gel에 loading 하여 100 V로 3시간 전기 영동 하였다. 전기영동 된 gel을 PVDF membrane을 사용하여 단백질 transfer를 진행하였다. Transfer 후 membrane을 5% skim milk로 blocking 하고 anti-CVB3 VP1, eIF4G1, pAKT(ser473), AKT, mTOR, ATG12, LC3, GAPDH antibody를 4°C 시에서 18 시간 반응 시킨 후 ECL 용액을 사용하여 확인하였다.

Coxsackievirus 복제 RNA 검출 - 단일 양성 가닥 RNA 유전자를 갖고 있는 CVB3의 유전자 증폭을 검증 위해 바이러스와 추출물 처리한 세포에서 TRizo로 RNA를 추출 하였다. 추출된 RNA는 1 µg을 주형으로 바이러스 양성가닥 증폭을 위해 역전사효소 Kit(Bioneer, Korea)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이때 세포에서 바이러스 증식을 알아보기 위해 VP1 sense(negative strand 증폭), antisense(positive strand 증폭) primer를 사용하여 cDNA 생산 후 VP1 primer를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR) 진행하였다. PCR 반응물 2% agarose gel에 loading하여 전기 영동으로 확인하였다.^{9,20)}

결과 및 고찰

Coxsackievirus 증식 억제 식물 추출물 선정 - CVB3는 급성 심근염을 일으키는 바이러스로 심각한 염증과 면역작용을 유도하고 종종 급성 사망에 이르게 한다. 따라서 식물 추출물 Linum Semen(Linum usitatissimum L.), Amomi Semen(Amomum xanthoides Wall.), Gossypii Semen(Gossypium nanking Meyen), Pini Pollen(Pinus densiflora Siebold et Zuccarini), Mori Ramulus(Morus alba Linné)에서 항바이러스 효능 물질을 선별하기 위해 Hela 세포 생존 실험을 통해 아마인을 선정하였다. 바이러스가 처리된 Hela 세포에 아마인 추출물을 100 µg/ml부터 1 ng/ml까지 처리하

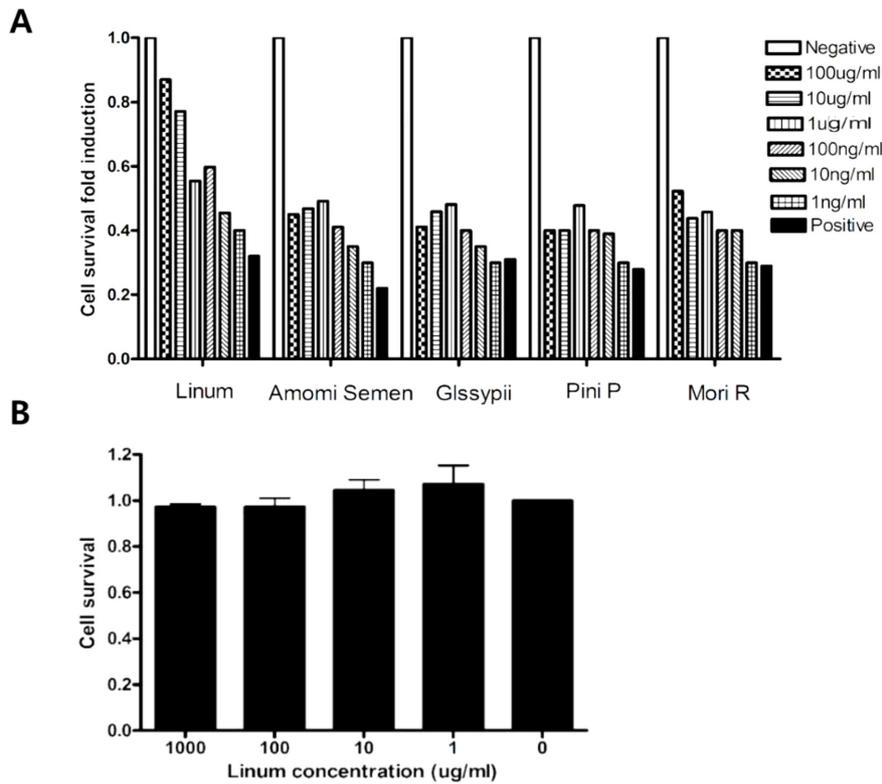


Fig. 1. Screening for anti-CVB3 natural extract. (A) Anti-enterovirus activity of natural extract was screened using *in-vitro* HeLa cell survival assay following coxsackievirus B3 infection. 100 µg/ml and 10 µg/ml concentration of *L. usitatissimum* extract significantly increase virus infected cell survival. (B) *L. usitatissimum* extract do not have cytotoxicity in 1000 µg/ml concentration. Linum Semen (*L. usitatissimum*), Amomi Semen (*Amomum xanthoides*), Gossypii Semen (*Gossypium nanking*), Pini Pollen (*Pinus densiflora*), Mori Ramulus (*Morus alba*).

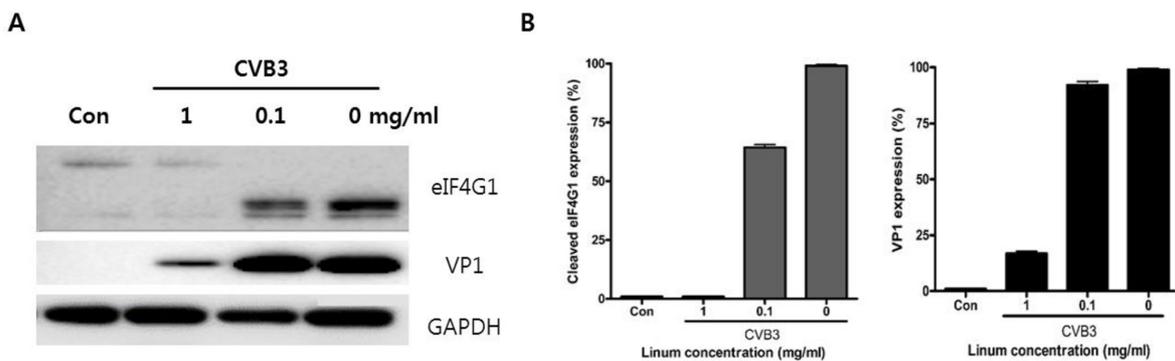


Fig. 2. *L. usitatissimum* extract inhibit CVB3 replication in HeLa cells. (A) *L. usitatissimum* extract was significantly inhibited CVB3 replication. Viral capsid protein VP1 and cleaved eIF4GI were reduced by high concentration *L. usitatissimum* extract treatment. (B) Western blot band was quantified by image J software.

였다. 세포 생존율이 CVB3만을 감염시킨 샘플(positive)과 비교하여 100 µg/ml 농도에서 80%이상의 세포 생존을 나타내 뛰어난 항바이러스 활성을 나타냈다. 또한 세포 독성 실험에서도 1 mg/ml의 농도에서도 세포에 대한 독성을 보이지 않아 아마인 추출물이 비교적 안전한 천연물질임을 확

인하였다(Fig. 1).

CVB3 바이러스 단백질 생산 억제 - 배양된 HeLa 세포에 바이러스를 10⁵ PFU로 감염시키고 1, 0.1 mg/ml 농도의 아마인 추출물을 처리하였다. 처리 후 바이러스로 인해 세포 괴사 발생을 관찰하고 positive 샘플이 60% 이상 감염되

어 세포독성을 나타낼 때 단백질을 추출하여 western blot 을 수행하였다. 아마인 추출물 투여 농도에 따라 CVB3 막 단백질 VP1 증가와 바이러스 증식으로 발현된 바이러스 protease 2A의 동물세포 전사인자인 eIF4G1의 절단을 1 mg/ml 농도에서 유의하게 억제 시켰다(Fig. 2). CVB3-GFP 바이러스를 감염시켜 세포내 바이러스 단백질의 생산을 GFP의 발현으로 관찰하였으며 아마인 추출물을 바이러스 감염과 함께 1, 0.1 mg/ml로 넣어 주었을 때 GFP의 발현이 처리 농도에 따라 유의하게 감소되었다(Fig. 3A). 바이러스의 증식 또한 1 mg/ml 아마인 추출물 처리로 바이러스만을 감염시킨 샘플과 비교하여 유의하게 감소하였다(15 ± 1.7 vs 1703 ± 103 PFU/ml, Fig. 3B).

아마인 추출물의 CVB3 유전자 증폭 억제 - 바이러스 증식은 유전자의 증폭으로 시작되며, 바이러스 처리된 세포에서 아마인 추출물이 CVB3 증식억제가 바이러스 유전자의 증폭을 억제할 수 있는지 확인하기 위해 HeLa 세포를 12well-plate 배양하여 CVB3와 아마인 추출물을 처리하고 세포독성이 확인되는 시점에 RNA를 추출하였다. RT-PCR을 통해 바이러스의 positive와 negative strand RNA의 증폭을 확인하였으며 아마인 추출물은 농도에 따라 바이러스 유전자의 증폭을 유의하게 억제하여 뛰어난 바이러스 증식 억제 활성을 보여주었다(Fig. 4).

아마인 추출물 처리를 통한 세포 활성 신호 억제 - CVB3의 증식에 있어 세포신호 조절은 매우 밀접한 관계를 가지고 있다. 이전의 연구에서 AKT 세포신호는 바이러스의 초기 감염과 증식 시기에 가장 중요한 세포 신호임이 밝혀졌으며 이러한 AKT 세포신호의 활성억제는 감염세포에서 CVB3의 증식을 억제한다. 이 연구에서 아마인 추출물이 CVB3 감염시에 바이러스 증식 억제 및 세포 신호 조절을 통한 세포 생존의 유지를 AKT의 활성을 통해 확인하였다. 아마인 추출물의 AKT 신호억제 작용 및 바이러스 증식조절의 주요 메커니즘을 규명하기 위해 HeLa 세포에 CVB3 감염 후 아마인 추출물을 처리하여 AKT와 autophagy를 억제하는 mTOR의 활성변화를 관찰하였다. 추출물 1 mg/ml 처리에서 CVB3 감염에서도 AKT의 인산화를 억제하였으며 mTOR의 인산화를 대체로 유지하였다. 그러나 autophagy를 형성하는 ATG12, LC3의 변화가 나타나지 않아 mTOR 활성을 통한 autophagy 억제는 나타나지 않았다. 아마인 추출물의 처리는 세포 활성 신호 분자 AKT의 억제를 통해 바이러스의 증식을 최소화하여 세포의 생존을 유지함을 확인하였다(Fig. 5). 본 결과는 아마인 추출물의 AKT 세포신호 억제는 바이러스 감염 초기 감염세포에서 바이러스의 유전자 증폭과 단백질 합성 억제를 통해 새로운 바이러스의 생성을 막을 수 있음을 보여주었다(Fig. 6).

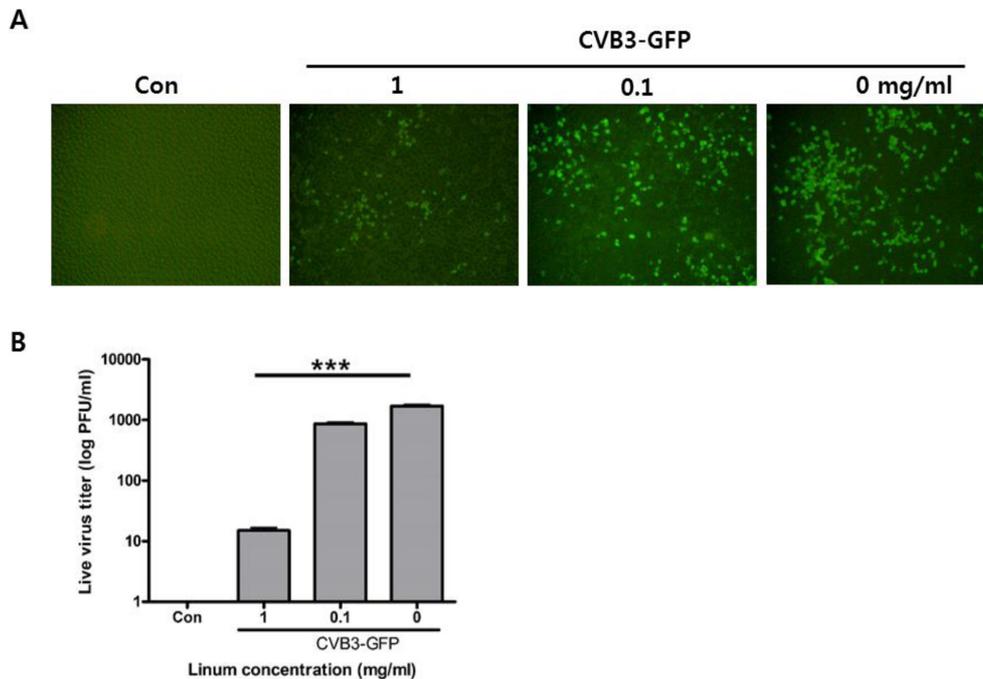


Fig. 3. *L. usitatissimum* extract inhibit CVB3 progenitor production. (A) CVB3 propagation was observed by CVB3-GFP infection. Virus replication correlated with GFP expression. 1 mg/ml of *L. usitatissimum* extract was significantly reduced GFP expressed cell number. (B) The live virus of cell supernatant was measured by PFU assay. *L. usitatissimum* extract was significantly reduced progeny virus production. Data are presented as the mean plus or minus the standard error of the mean from 3 independent experiments (***) $P < 0.01$; **) $P < 0.01$).

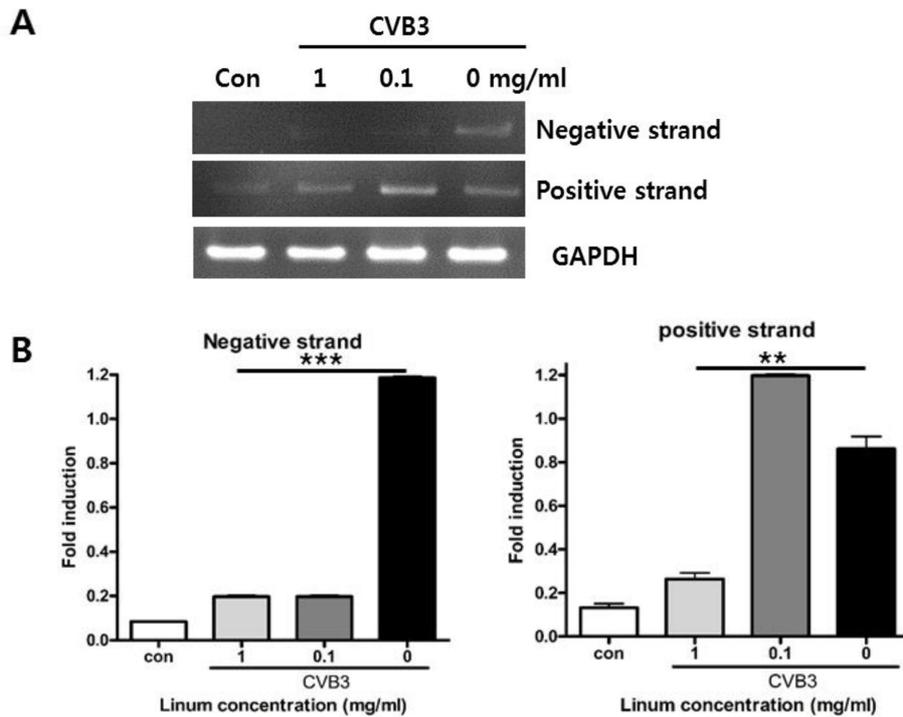


Fig. 4. *L. usitatissimum* extract inhibit CVB3 genome amplification. (A) CVB3 genome amplification was confirmed in CVB3 infected HeLa cells with *L. usitatissimum* extract treatment. CVB3 capsid protein VP1 gene positive and negative strand were amplified by reverse transcription PCR. Both strand of VP1 gene was significantly decreased by extract treatment. (B) Data are presented as the mean plus or minus the standard error of the mean from 3 independent experiments (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

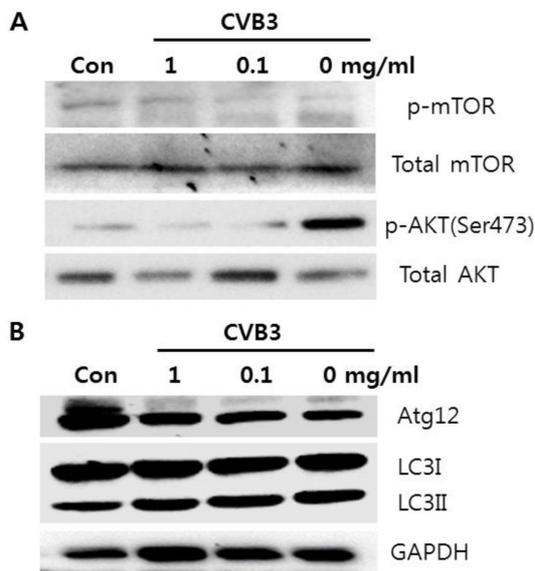


Fig. 5. *L. usitatissimum* extract inhibits cell survival signaling molecule activity. (A) *Linum* Semen extract was added to HeLa cells following CVB3 infection. AKT Ser473 phosphorylation were dramatically inhibited by *L. usitatissimum* extract in 1 mg/ml treatment. (B) *L. usitatissimum* extract was not inhibited autophagy formation relate signal molecules such as Atg12 and LC3. Data are presented from 3 independent experiments.

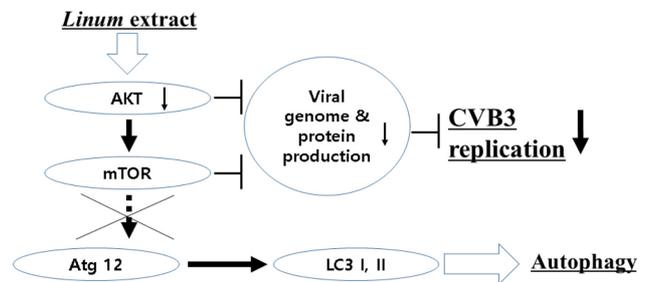


Fig. 6. Schematic diagram of *L. usitatissimum* extract antiviral mechanism. AKT Ser473 phosphorylation of survival cell signal kinase and downstream target were dramatically regulated by *L. usitatissimum* extract in a high concentration treatment. These signaling molecule activity may correlate with CVB3 replication in HeLa cells. But the inhibition of AKT signal was not associated with the regulation of autophagy formation molecules.

결론

연구를 통해 식물 추출물의 새로운 천연 항바이러스 효능을 알아보고 치료제개발의 가능성을 실험하였다. 우리나라는 예전부터 다양한 식물을 병의 치료제로 사용하여 왔으며 이러한 식물 약제에 대한 정보와 지식이 잘 정립되어 있

다. CVB3는 enterovirus에 속하며 심근염과 뇌수막염 질병을 일으키는 바이러스로 아이들에게는 다양한 전염병을 유발하는 원인이 되고 있다.^{1,4,5,22,23)} 하지만 이러한 바이러스에 대해 초기 감염 예방이 최선의 방법으로 치료나 감염 억제를 위한 약물 개발이 되어있지 않다. CVB3와 같은 작은 장내바이러스의 치료와 광범위한 전염 확산을 막기 위해서 치료제는 매우 필수적이다. 특히 천연물의 추출물을 활용한 치료제의 소재 발굴은 신약개발과 다르게 이미 생활 중에서 사용되고 있는 것이 대부분이며 식품의약품안전처에 등록이 되어있어 짧은 시간에 약으로 개발하여 임상에 적용하여 사용할 수 있는 장점이 있다.^{3,18,24)} 이러한 접근은 검증된 안전성이 확보된 물질들은 향후 급성으로 계절에 따라 발생하여 소아들을 고통스럽게 하는 CVB3 질환에 대한 치료제로 개발 될 수 있을 것으로 기대가 된다.

최근 다양한 RNA 바이러스에 의한 질병이 전세계적으로 확산되고 있으며 빠른 변이를 할 수 있는 바이러스의 특성 상 백신의 개발에는 시간적 비용적 한계가 있는 실정이다. 이와 같은 한계를 극복할 수 있는 가장 좋은 방법이 우리가 일상에서 사용가능하며 쉽게 접할 수 있는 독성이 없는 천연물을 활용한 치료제를 이용하는 것이다. 본 연구에서 아마인 추출물이 AKT 세포신호 활성 억제조절을 통해 CVB3의 증식을 유의하게 억제함을 확인하였다. 특히 바이러스 감염 세포의 활성조절을 통해 낮은 농도에서도 바이러스의 유전자와 단백질의 복제를 강하게 억제하였다. 특히 AKT 신호억제와 autophagy 활성 조절을 복합적으로 조절함을 예측할 수 있었으며 앞으로 더 구체적인 검증 연구가 필요한 부분으로 생각된다.

본 연구를 통해 아마인 추출물이 CVB3 증식억제와 치료제 개발을 위한 소재로의 적용 가능성을 입증하였으며 향후 치료제 개발에 사용될 수 있을 것이다.

사 사

Byung-Kwan Lim and Jin Hee Kim contributed as co-corresponding for this study. This study was supported by grants from the National Research Foundation (NRF) of Korea provided by the Korean Government (No.NRF-2016R1D1A1A02937046) and partly supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation (NRF) of Korea provided by the Korean Government (No.NRF-2015R1D1A1A01057214).

인용문헌

- Feldman, A. M. and McNamara, D. (2000) Myocarditis. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1388-1398.
- Lim, B. K., Xiong, D., Dorner, A., Youn, T. J., Yung, A., Liu, T. I., Gu, Y., Dalton, N. D., Wright, A. T., Evans, S. M., Chen, J., Peterson, K. L., McCulloch, A. D., Yajima, T. and Knowlton, K. U. (2008) Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. *J. Clin. Invest.* **118**: 2758-2770.
- Lee, Y. G., Park, J. H., Jeon, E. S., Kim, J. H. and Lim, B. K. (2016) Fructus amomi cardamomi extract inhibit coxsackievirus-B3 induced myocarditis in murine myocarditis model. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 2012-2018.
- Herskowitz, A., Beisel, K. W., Wolfgram, L. J. and Rose, N. R. (1985) Coxsackievirus B3 murine myocarditis: wide pathologic spectrum in genetically defined inbred strains. *Hum. Pathol.* **16**: 671-673.
- Baboonian, C., Davies, M. J., Booth, J. C. and McKenna, W. J. (1997) Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **223**: 31-52.
- Liu, P., Martino, T., Opavsky, M. A. and Penninger, J. (1996) Viral myocarditis: balance between viral infection and immune response. *Can. J. Cardiol.* **12**: 935-943.
- Martino, T. A., Liu, P. and Sole, M. J. (1994) Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ. Res.* **74**: 182-188.
- Kim, J. M., Lim, B. K., Ho, S. H., Yun, S. H., Shin, J. O., Park, E. M., Kim, D. K., Kim, S. and Jeon, E. S. (2006) TNFR-Fc fusion protein expressed by in vivo electroporation improves survival rates and myocardial injury in coxsackievirus induced murine myocarditis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**: 765-771.
- 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.
- Chen, T. C., Weng, K. F., Chang, S. C., Lin, J. Y., Huang, P. N. and Shih, S. R. (2008) Development of antiviral agents for enteroviruses. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 1169-1173.
- Schuman, B. E., Squires, E. J. and Leeson, S. (2000) Effect of dietary flaxseed, flax oil and n-3 fatty acid supplement on hepatic and plasma characteristics relevant to fatty liver haemorrhagic syndrome in laying hens. *Br. Poult. Sci.* **41**: 465-472.
- Yi, H., Hwang, K. T., Regenstein, J. M. and Shin, S. W. (2014) Fatty Acid Composition and Sensory Characteristics of Eggs Obtained from Hens Fed Flaxseed Oil, Dried Whitebait and/or Fructo-oligosaccharide. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **27**: 1026-1034.
- DeLuca, J. A. A., Garcia-Villatoro, E. L. and Allred, C. D. (2018) Flaxseed bioactive compounds and colorectal cancer prevention. *Curr. Oncol. Rep.* **20**: 59.
- Troina, A. A., Figueiredo, M. S., Passos, M. C., Reis, A. M., Oliveira, E., Lisboa, P. C. and Moura, E. G. (2012) Flaxseed

- bioactive compounds change milk, hormonal and biochemical parameters of dams and offspring during lactation. *Food. Chem. Toxicol.* **50**: 2388-2396.
15. Caligiuri, S. P., Edel, A. L., Aliani, M. and Pierce, G. N. (2014) Flaxseed for hypertension: implications for blood pressure regulation. *Curr. Hypertens. Rep.* **16**: 499.
 16. Esfandiarei, M., Luo, H., Yanagawa, B., Suarez, A., Dabiri, D., Zhang, J. and McManus, B. M. (2004) Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent. *J. Virol.* **78**: 4289-4298.
 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. Lim, B. K. and Kim, J. H. (2014) ORI2 inhibits coxsackievirus replication and myocardial inflammation in experimental murine myocarditis. *Biol. Pharm. Bull.* **37**: 1650-1654.
 19. 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.
 20. Lim, B. K., Yun, S. H., Ju, E. S., Kim, B. K., Lee, Y. J., Yoo, D. K., Kim, Y. C. and Jeon, E. S. (2015) Soluble coxsackievirus B3 3C protease inhibitor prevents cardiomyopathy in an experimental chronic myocarditis murine model. *Virus. Res.* **199**: 1-8.
 21. Lee, S. M., Lee, Y. J., Yoon, J. J., Kang, D. G. and Lee, H. S. (2014) Effect of *Poria cocos* on puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome in rats. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2014**: 570420.
 22. Badorff, C., Berkely, N., Mehrotra, S., Talhouk, J. W., Rhoads, R. E. and Knowlton, K. U. (2000) Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue. *J. Biol. Chem.* **275**: 11191-11197.
 23. 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.
 24. Han, J. Y., Jeong, H. I., Park, C. W., Yoon, J., Ko, J., Nam, S. J. and Lim, B. K. (2018) Cholic acid attenuates ER stress-induced cell death in coxsackievirus-B3 infection. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 109-114.
- (2018. 8. 24 접수; 2018. 9. 14 심사; 2018. 10. 31 게재확정)