

Kaempferol의 MAPK 신호 조절을 통한 심근염 유발 엔테로바이러스 증식 억제

장진화¹ · 정해인² · 임병관^{1*} · 남상집^{2*}

¹중원대학교 의생명과학과, ²이화여자대학교 화학 · 나노과학과

Kaempferol Inhibits Enterovirus Proliferation through MAPK Signal Regulation

Jin-Hwa Jang¹, Hae-In Jeong², Byung-Kwan Lim^{1*} and Sang-Jip Nam^{2*}

¹Department of Biomedical Science, Jungwon University, Goesan-gun 28024, Korea

²Department of Chemistry and Nano Science, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea

Abstract – We investigated the efficacy of single compound of plant extract in coxsackievirus B3 (CVB3) infection. CVB3 is a main cause of Hand-foot-mouth diseases (HFMD) and viral myocarditis in children and adult. Several single compounds of plant extract were purified by HPLC and tested as antiviral drug candidate. Among them, kaempferol was selected to effective anti-enterovirus compound by HeLa cells survival assay. CVB3 infected HeLa cells were treated with kaempferol (100 µg/ml-100 ng/ml) and their antiviral effect was confirmed. After 16 hours of treatment, HeLa cells were lysed and proteins were extracted for western blot analysis. CVB3 viral capsid protein VP1 production and transcription factor eIF4G-1 cleavage was significantly decreased in 100 µg/ml kaempferol treatment. Virus replication was observed by virus RNA amplification. Kaempferol strongly reduced virus positive and negative strand RNA amplification. Moreover, MAPK signal induced by CVB3 infection, pERK and pmTOR, kaempferol treatment significantly inhibited the activity. Plant extract single compound, kaempferol, is a strong candidate to be developed non-toxic anti-enterovirus treatment agent.

Keywords – Kaempferol, Enterovirus, Coxsackievirus B3, Myocarditis, Plant extract

Enterovirus는 poliovirus와 동일한 단일 양성 가닥 RNA 유전자를 가지고 있는 picornavirus 과에 속하는 매우 작은 크기의 막이 없는 장내바이러스이다. Enterovirus에 속해 있는 coxsackievirus는 심근염, 수족구, 철허염과 같은 다양한 질병의 원인이다.^{1,2)} Coxsackievirus B3(CVB3)는 급성 심근염과 뇌수막염을 일으키고³⁻⁵⁾ Enterovirus71(EV71)은 어린이의 손발과 입에 수포가 유발되는 수족구의 주요 원인 바이러스로 밝혀져 그 치료와 증식 억제에 많은 연구가 진행되고 있다. 발열, 기침과 같은 단순 감기 증상으로 감염 증상이 시작되어 7일 이내에 증상이 나타나고 빠른 바이러스의 증식은 급성증상을 일으키며 감염 기간도 2-3주 이내로 초기 감염에 대한 대처가 매우 중요한 병원체이다.⁶⁻⁸⁾

CVB3는 유전자 구조와 생활사가 잘 알려져 있으며 많은

질병과의 연관성으로 많은 관심을 받고 있으나 사망에 이르는 치명적인 질병을 동반하지는 않아 상업적인 제한으로 백신개발 연구는 진행되지 않고 있으며 제한적인 치료만이 이루어지고 있는 실정으로 초기 감염 예방이 가장 좋은 치료방법으로 알려져 있다.⁹⁾ 하지만 최근 유아들의 감염이 급증하고 있으며 급성 뇌수막염과 같은 복합질환을 유발하는 경우 사망에 이르게 하는 것으로 보고되고 있어 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

Mitogen-activated protein kinases(MAPK) signaling은 세포의 증식 및 생존과 같은 다양한 기능과 관련이 있는 중요 세포신호이다. 특히 enterovirus의 증식에 있어 바이러스의 세포감염 초기와 바이러스 유전자 복제, 바이러스 조립의 후기단계에서 필수적인 세포신호로 enterovirus의 증식에 매우 중요하다. MAPK signaling의 억제는 바이러스의 감염에 의한 세포의 보호 작용에 따른 세포의 활성을 저해하여 enterovirus의 증식을 강하게 억제한다. 이전에 확인된

*교신저자(E-mail): sjnam@ewha.ac.kr, bklim@jwu.ac.kr
(Tel): +82-2-3277-6805, +82-43-830-8605

다양한 항바이러스 물질들 중 다수의 물질들이 MAPK signal을 억제하는 것으로 확인되어 MAPK가 enterovirus 증식억제를 위한 치료 물질들의 주요 목표가 될 것으로 예측된다.¹⁰⁻¹²⁾

Kaempferol은 polyphenol 계열의 항산화물질로 열매와 채소에 다량 함유되어 있다.¹³⁾ 이전의 연구에서 EV71 증식과 관련이 있을 것으로 예측되었으며¹⁴⁾ mucous 세포에서 ER stress를 감소시켜 강한 항 염증 작용을 일으키는 것으로 보고되었다.¹⁵⁾ 다양한 항산화 작용을 통해 자유라디칼의 제거를 통해 만성질환의 치료 효과가 있으며¹⁵⁾ 세포신호조절의 주요 인자 조절 작용이 있다.^{16,17)} 특히 상피세포의 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 알려져 바이러스의 세포 감염의 억제에 어느 정도 효과가 있을 것으로 생각되었다.¹³⁾ Kaempferol의 enterovirus71에 대한 항바이러스 효과는 이전의 몇몇 연구에서 증명되었으나,^{14,18)} 심근염과 뇌수막염을 일으키는 CVB3에 대한 증식억제 효과는 아직까지 연구된 예가 없다.

우리는 이전의 연구에서 다양한 천연물 및 천연물 추출 단일 분리 물질의 enterovirus에 대한 항바이러스 효과를 실험하였으며 이 중 몇몇의 뛰어난 효과를 나타내는 물질을 확인하였다.¹⁰⁻¹²⁾ 본 연구에서는 이전 연구에서 뛰어난 항바이러스 효과를 나타낸 물질들에 대해 CVB3에 대한 증식억제 효과 실험을 수행하고 그 결과 가장 우수한 증식 억제 효과를 나타낸 kaempferol의 대표적인 enterovirus로 심근염을 일으키는 CVB3에 대한 증식 억제 효과와 enterovirus 증식과 관련된 세포 신호 조절을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

Coxsackievirus와 세포배양 – Coxsackievirus 농도는 이전의 논문에서 묘사 한 것과 같이 HeLa cell에서 plaque forming unit(PFU) assay를 통해 결정하고 실험에 사용하였다.¹⁰⁾ 바이러스 농도확인을 위해 바이러스에 감염된 세포의 상등액을 serial dilution하여 준비하고 HeLa 세포가 배양된 6-well plate에 30분간 감염시킨 후 3% Difco agar/DMEM 1:1로 혼합하여 1.5 ml로 덮어주고 37°C CO₂ 배양기에서 배양하여 바이러스 감염에 의한 세포사멸을 확인하고 plaque 숫자를 세어 plaque forming unit(PFU) assay로 바이러스 농도를 측정하였다. HeLa cell은 10% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM)에서 배양하였으며 4-5일마다 계대 배양하여 새로운 세포를 준비하였다.¹⁹⁾

Kaempferol 추출 및 분리 – 80% 메탄올을 용매로서 질려자(10 kg)를 상온추출 및 감압 증류하여 얻어진 추출물(10 L)에 KNO₃(4 g)을 넣고 하루 동안 유지하였다. 침전물을 제외한 추출물을 농축한 뒤, 물과 희석하여 hexan, 에틸

아세테이트 순으로 분획을 진행하였고 이 중 에틸아세테이트 층을 실리카젤 컬럼 크로마토그래피(hexan: 에틸아세테이트, 100% hexane 으로부터 100% 에틸아세테이트)를 실시하였다. 분리된 분획물들을 소량 채취하여 액체 크로마토그래피/질량분석기(Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) 분석한 후, kaempferol 함량이 가장 많은 분획물을 고성능 액체 크로마토그래피(Phenomenex Luna C18(2), 250×100 mm, 2.0 ml/min, 5 μm, UV=254 nm)를 실시하여 분리하였다. 질려자는 동국대학교 한의과대학 이제현 교수가 감별하여 시료분리에 사용되었으며 표본번호 2015-CRS-03으로 단국대학교 약학대학에 보관되어 있음.

Coxsackievirus 증식 억제 물질 선별 – 천연물 추출물에서 분리한 단일 물질들의 항바이러스 효능을 HeLa 세포의 생존 실험을 사용하여 CVB3에 대한 증식 억제 물질을 선별하였다. HeLa 세포를 96well-plate에 5×10⁴ 숫자로 배양하고 10⁴ PFU/ml의 CVB3를 30분간 감염시키고 5% FBS DMEM에 1 mg/ml부터 1 ng/ml까지 serial dilution 한 다양한 단일추출물질을 처리하였다.²⁰⁾ 세포 증식 검출 시약인 Cell Counting Kit-8(CCK-8) 8 μl를 감염 24시간 후에 넣고 2시간 더 배양한다. 세포의 생존에 따라 변화되는 세포배양액의 변화를 microplate reader(Molecular device, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존을 확인 천연물의 항바이러스 효능을 검증하였다.

Western blot analysis – Kaempferol과 바이러스가 처리된 세포는 RIPA buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, 1% NP40, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxy-cholate)로 lysis하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 sample loading buffer와 섞어 12% SDS-PAGE gel에 loading하고 전기 영동을 하였다. 전기 영동 된 Gel의 단백질을 Hybond-ECL nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk solution으로 block하고 anti-enterovirus VP1, eIF4G1, pAKT(s473), AKT, pERK, ERK, GAPDH antibodies(Cell signaling, CA, USA)로 4°C에서 18시간 반응한 후 확인하였다.

Coxsackievirus 복제 RNA 검출 – 단일 양성 가닥 RNA 유전자를 가지고 있는 CVB3의 유전자 증폭 확인을 위해 바이러스와 단일 추출물이 처리된 세포에서 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)로 RNA를 추출하고 정량한다. 추출된 RNA 1 μg을 주형으로 Reverse-transcription(RT) kit (NEX diagnosis, KOR)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 바이러스의 양성 가닥 증폭을 위해 VP1-antisense primer(5'-CACCGGATGGCCAATCCA-3')와 음성 가닥 증폭을 위해 VP1-sense primer(5'-GCGAAGAGTCTATTGAGCTA-3')를 사용하여 RT 반응을 수행 후 두 primer를 사용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 95°C 5분 처리 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분을 30회 반복하고 72°C 8분 반응하여 수행하

였다. PCR 반응물은 1.5% agarose gel에 100 vol로 20분간 전기 영동하여 확인하였다.

결과의 통계분석 - 모든 결과는 3회 이상의 반복 실험을 통해 얻은 결과를 mean±SD으로 나타냈다. 약물처리, 미처리 바이러스 감염 그룹 간의 결과는 student *t*-test(GraphPad Prism 4.0 for Windows; GraphPad Software, La Jolla, USA)를 사용하여 유의성을 검증하였다. **P*<0.05인 결과가 통계적으로 유의하다.

결과 및 고찰

Coxsackievirus 증식억제 단일추출물 선정 - HeLa 세포의 생존실험을 통해 CVB3에 대한 항바이러스 효과를 검증하였다. 다양한 약용식물로부터 단일 물질을 분리하였다. CVB3에 대한 증식억제 효과 검증을 위해 HeLa 세포에 단일추출물들을 100 µg/ml부터 serial dilution하고 농도별로 바이러스 10⁴ PFU와 함께 처리하여 효능을 검증하고 이중 항바이러스 효능이 뛰어난 kaempferol을 선정하였다(supplement

data). Kaempferol이 처리된 HeLa세포 생존율은 바이러스만을 처리한 positive 샘플과 비교하여 100 µg/ml 농도에서 90% 이상의 세포생존을 나타내 뛰어난 항바이러스 효능을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그러나 10 µg/ml 이하 농도에서는 세포의 생존이 급격히 감소하여 바이러스 증식억제 효과가 없었다. 10 µg/ml 이상의 농도에서 kaempferol의 coxsackievirus 증식 억제 활성을 나타냈다.

Kaempferol의 바이러스 증식 억제활성 - HeLa 세포를 12 well-plate에 배양하고 10⁴ PFU/ml CVB3와 kaempferol을 함께 세포에 처리하였다. 분리 정제된 Kaempferol은 100 µg/ml에서 100 ng/ml까지 serial dilution하여 처리하였다. 바이러스와 물질처리 후 10시간까지 세포의 바이러스 감염으로 인한 괴사발생을 관찰하고 바이러스만을 감염시킨 세포(positive)가 50% 이상 감염되었을 시점에 전체 단백질을 추출하여 western blot을 수행하였다. Kaempferol의 처리는 CVB3 막단백질 VP1의 증가와 바이러스 증식으로 발현된 바이러스 protease2A에 의한 전사개시인자 eIF4G1의 절단을 높은 투여 농도(100 µg/ml)에서 유의하게 감소시켰다(Fig.

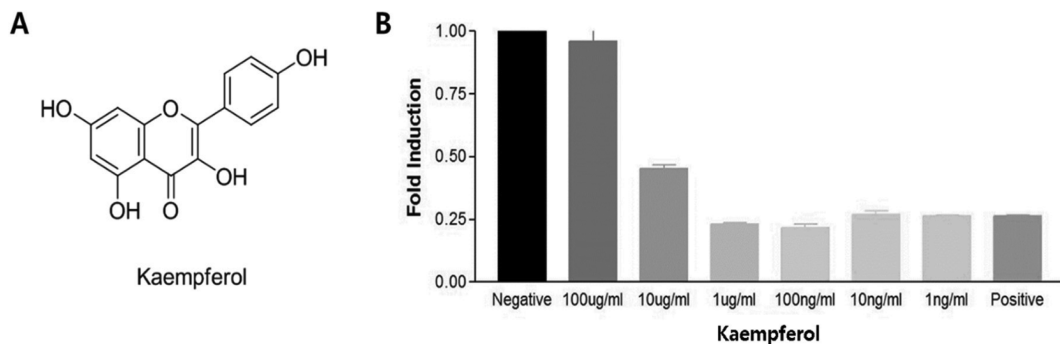


Fig. 1. Anti-enterovirus effect of kaempferol. (A) Kaempferol structure, (B) Anti-enterovirus activity of kaempferol was observed using in-vitro HeLa cell survival assay following coxsackievirus B3 infection. From 100 µg/ml to 1 ng/ml concentration of kaempferol treatment significantly increased cell survival.

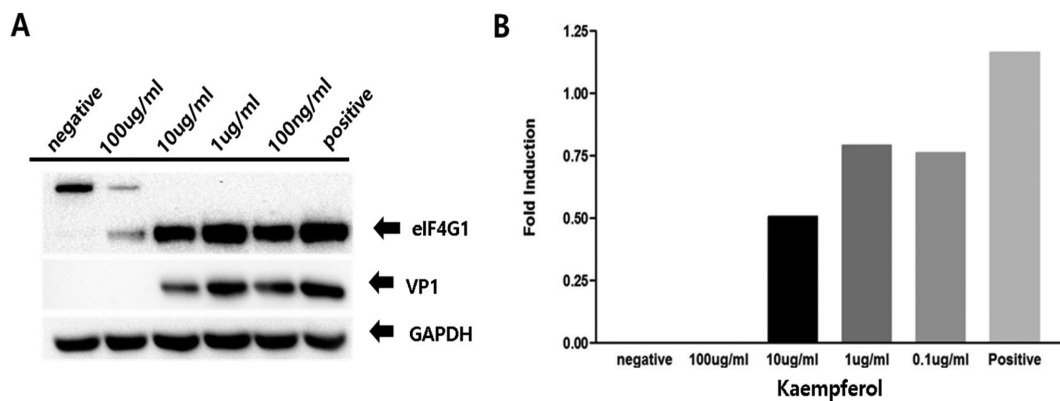


Fig. 2. Kaempferol inhibit CVB3 replication. (A) Kaempferol significantly inhibited CVB3 replication. eIF4G1 cleavage was decreased in 100 µg/ml kaempferol treatment. Viral capsid protein VP1 was significantly decreased. (B) Quantification of western blot analysis VP1 levels.

2A). 이를 통해 kaempferol이 CVB3의 증식을 효과적으로 저해하는 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 특히 바이러스의 VP1 막 단백질은 100 µg/ml 투여 시 매우 낮은 농도가 관찰되어 kaempferol의 뛰어난 enterovirus 증식억제 활성을 보였다(Fig. 2B).

Kaempferol에 의한 CVB3 유전자 증폭 억제 - 바이러스의 증식은 유전자의 증폭으로부터 시작되며 특히 RNA를 유전자로 가지고 있는 enterovirus의 유전자 증폭은 바이러스 감염 초기 짧은 시간 내 매우 빠르게 진행된다. 그러므로 kaempferol의 CVB3 증식억제 활성과 작용점 연구를 위해 바이러스 유전자 증폭 억제 검증은 필수이다. Kaempferol을 CVB3와 함께 10시간 동안 HeLa 세포에 처리 후 total RNA를 추출하고 바이러스의 유전자를 reverse transcription (RT)을 수행하여 cDNA로 합성하였다. 바이러스의 positive와 negative strand RNA의 증폭을 합성된 cDNA PCR을 통해 검증하였다. Kaempferol 100 µg/ml 처리는 CVB3 바이러스의 positive와 negative strand 유전자의 증폭을 강력하게 억제하여 뛰어난 바이러스 증식 억제 활성을 나타냈다(Fig. 3). 그러나 농도가 10 µg/ml로 낮아지면 항바이러스 효과가 급격히 약해져 차후 적정농도의 설정이 매우 중요할 것으로 생각되었다.

Kaempferol의 바이러스 감염세포 MAPK 신호 조절 - Enterovirus의 증식에 있어 세포신호의 조절은 매우 밀접한 관계를 가지고 있다. 이전의 연구에서 MAPK 세포신호는 바

이러스의 초기 감염과 증식 시기에 가장 중요한 세포 신호임이 밝혀졌으며 이러한 MAPK 세포신호의 활성억제는 세포의 활성은 물론 enterovirus의 증식을 억제한다. Kaempferol의 CVB3 증식억제 메커니즘 규명을 위해 바이러스 감염 후 kaempferol 처리에 따른 대표적인 MAPK인 ERK1/2와 이와 상호관계를 가지고 autophagy를 형성하는 mTOR의 활성변화를 관찰하였다. ERK의 활성을 나타내는 인산화 ERK(pERK)는 kaempferol 100 µg/ml 처리에 50% 이상 유의한 감소를 나타냈으며 mTOR의 인산화(pmTOR)는 75% 이상 유의하게 감소했다(Fig. 4). 본 결과를 통해 kaempferol의 MAPK 신호억제 작용이 바이러스 증식조절의 주요 메커니즘임을 확인할 수 있었다. 또한 kaempferol의 mTOR 신호의 억제 효과는 다른 바이러스에 적용할 수 있는 폭넓은 사용 가능성을 보여준 매우 중요한 발견이다.

이 연구를 통해 식물추출물의 단일물질을 분리하여 항바이러스 효과를 실험하여 새로운 항 enterovirus 치료보조제의 개발 가능성을 실험하였다. 우리나라는 예전부터 다양한 식물을 병의 치료제로 사용하여 왔으며 이러한 식물 약제에 대한 정보와 지식이 잘 정립되어 있다. 하지만 이러한 다양한 정보에도 식물 추출물의 다양한 성분들에 대한 분석의 어려움으로 단일물질의 질병에 대한 폭넓은 연구는 미비한 실정이다. 특히 바이러스성 질병에 대한 적용은 바이러스 연구의 희소성과 어려움으로 많은 적용이 이루어지지 않고 있는 실정이다.²¹⁾

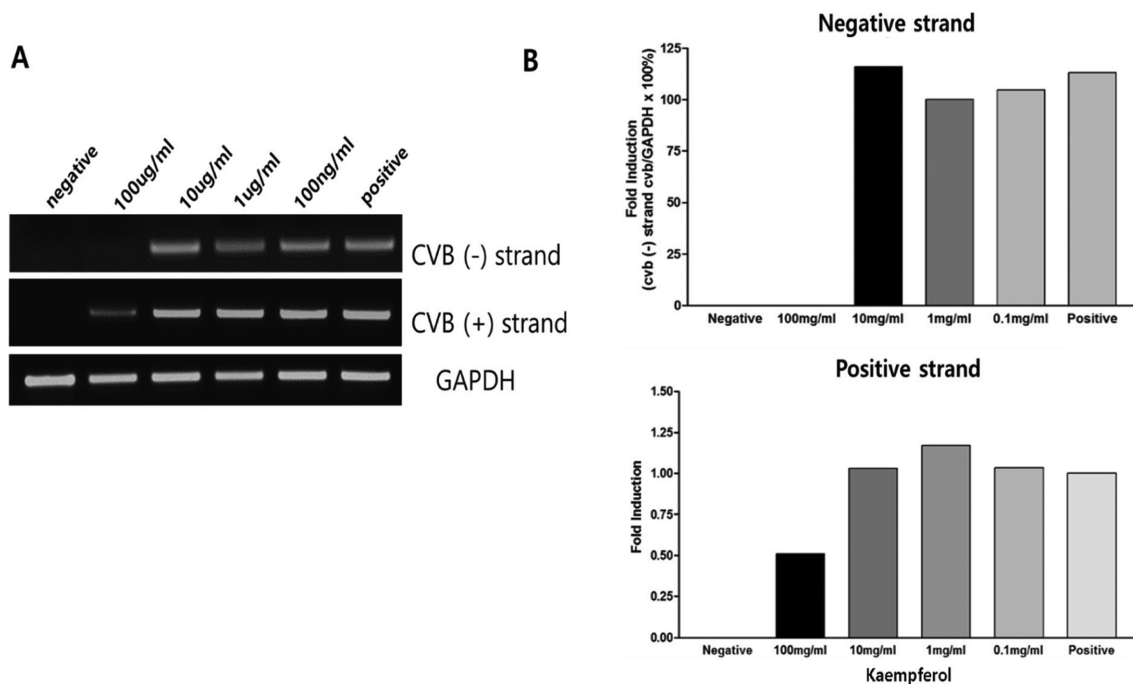


Fig. 3. CVB3 gene amplification. (A) CVB3 gene amplification was confirmed in CVB3 infected HeLa cells with kaempferol treatment. Both positive and negative strand of VP1 were significantly decreased in 100 µg/ml kaempferol treatment. (B) Quantification of RT-PCR results.

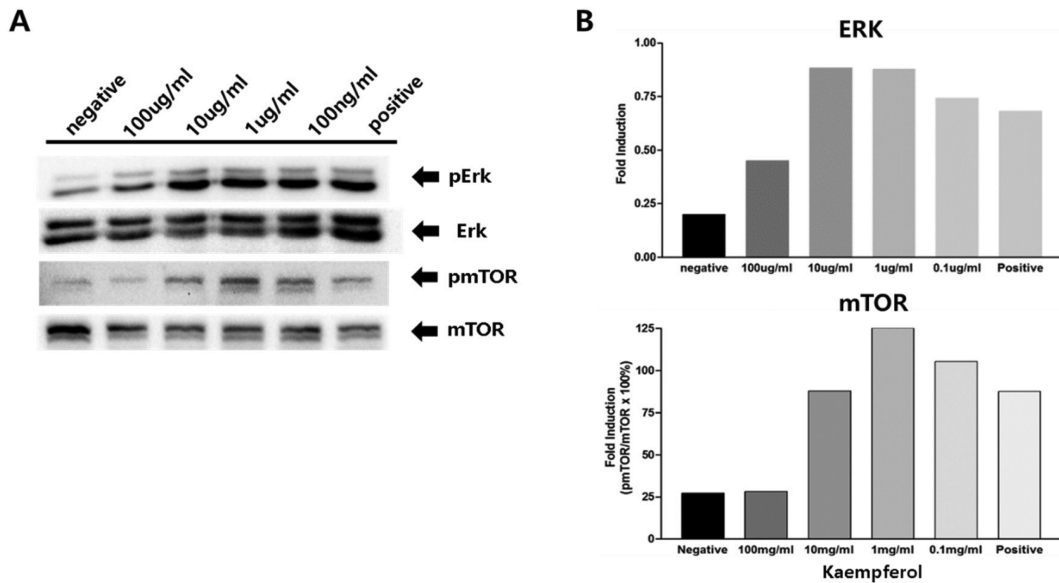


Fig. 4. Inhibition of MAPK cell signaling activity. (A) Kaempferol 100 µg/ml treatment significantly suppressed ERK and mTOR phosphorylation. These signaling molecule activity may correlate with CVB3 replication in HeLa cells. (B) Quantification of western blot results.

질려자로부터 단일물질로 분리된 kaempferol은 뛰어난 항산화, 항염증 효능이 알려져 있고 세포의 신호조절을 통해 세포의 활성을 유지해 주는 기능이 밝혀져 일부에서는 건강보조 식품으로 적용되고 있다.^{13,15)} 하지만 심근염과 뇌수막염을 일으키는 콕사키바이러스 B3(CVB3)의 증식억제와 관련된 기능연구는 전무한 상태로 본 연구의 뛰어난 가치를 보여주고 있다. 최근 장내바이러스들 중 수족구병의 주요 원인인 Enterovirus71에^{8,22)} 대한 kaempferol을 비롯한 몇몇 물질의 항바이러스 효과에 대한 연구가 보고되었다.^{14,18)} CVB3는 심근염과 뇌수막염을 일으키는 바이러스로 알려져 있고 아이들에게 다양한 전염병을 유발하는 원인이 되고 있다.^{23,24)} 하지만 CVB3에 대한 치료나 감염 억제를 위한 약물 개발이 되어 있지 않은 실정으로 독성이 없는 천연물 기반 항바이러스 물질의 개발은 소아들의 바이러스 감염의 따른 고통 감소와 약물 개발의 비용절감 측면에서 매우 의미가 있는 연구이다.

결론

본 연구는 질려자 추출물 단일분리물질 kaempferol의 심근염 유발 enterovirus에 대한 증식억제와 이와 관련된 MAPK 세포신호 억제 활성을 검증하였으며 이에 따른 바이러스 감염 초기 유전자 증폭 억제는 효과적인 바이러스 증식 억제 작용이 가능하게 함을 보여주었다. 이러한 결과는 향후 kaempferol의 enterovirus 감염 예방과 치료를 위한 독성이 없는 천연물 약물로의 개발 가능성을 보여주었다.

사사

이 논문은 중원대학교 교내학술연구비 지원을 받아 수행되었으며(#2016-027), 임병관, 남상집은 본 논문에서 공동교신저자로 참여하였음.

인용문헌

1. Feldman, A. M. and McNamara, D. (2000) Myocarditis. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1388-1398.
2. 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.
3. Knowlton, K. U., Jeon, E. S., Berkley, N., Wessely, R. and Huber, S. (1996) A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J. Virol.* **70**: 7811-7818.
4. Knowlton, K. U. and Badorff, C. (1999) The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance. *Circ. Res.* **85**: 559-561.
5. Xiong, D., Yajima, T., Lim, B. K., Stenbit, A., Dublin, A., Dalton, N. D., Summers-Torres, D., Molkentin, J. D., Duplain, H., Wessely, R., Chen, J. and Knowlton, K. U. (2007) Induc-

- ible cardiac-restricted expression of enteroviral protease 2A is sufficient to induce dilated cardiomyopathy. *Circulation* **115**: 94-102.
6. Chen, Y. C., Yu, C. K., Wang, Y. F., Liu, C. C., Su, I. J. and Lei, H. Y. (2004) A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. *J. Gen. Virol.* **85**: 69-77.
 7. Chen, Z., Sun, H., Yan, Y., Wang, Y., Zhu, C., Zhou, W., Huang, L., Wang, M., Mize, M., Tian, J. and Ji, W. (2015) Epidemiological profiles of hand, foot, and mouth disease, including meteorological factors, in Suzhou, China. *Arch. Virol.* **160**: 315-321.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Park, S. H., Gong, J. H., Choi, Y. J., Kang, M. K., Kim, Y. H. and Kang, Y. H. (2015) Kaempferol Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Mucus Hypersecretion in Airway Epithelial Cells And Ovalbumin-Sensitized Mice. *PLoS One* **10**: e0143526.
 14. Tsai, F. J., Lin, C. W., Lai, C. C., Lan, Y. C., Lai, C. H., Hung, C. H., Hsueh, K. C., Lin, T. H., Chang, H. C., Wan, L., Sheu, J. J. and Lin, Y. J. (2011) Kaempferol inhibits enterovirus 71 replication and internal ribosome entry site (IRES) activity through FUBP and HNRP proteins. *Food Chem.* **128**: 312-322.
 15. Chen, A. Y. and Chen, Y. C. (2013) A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem.* **138**: 2099-2107.
 16. Calderon-Montano, J. M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C. and Lopez-Lazaro, M. (2011) A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini. Rev. Med. Chem.* **11**: 298-344.
 17. Hannum, S. M. (2004) Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**: 1-17.
 18. Zhang, W., Qiao, H., Lv, Y., Wang, J., Chen, X., Hou, Y., Tan, R. and Li, E. (2014) Apigenin inhibits enterovirus-71 infection by disrupting viral RNA association with trans-acting factors. *PLoS. One* **9**: e110429.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 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. Racaniello, V. R. (2007) The picornaviridae Chapter24, The Viruses and Their Replication. Fields Virology. (2017. 7. 24 접수; 2017. 8. 7 심사; 2017. 9. 14 게재확정)