

바이러스성출혈성패혈증 바이러스 감염에 대한 3-Methyl Catechol의 항바이러스성 활성

조세영^{1†} · 민나래^{2,3†} · 김영오² · 김두운^{1,2*}

¹전남대학교 식품독바이러스연구센터, ²전남대학교 식품공학과, ³한국식품안전관리인증원 인증심사팀

Anti-Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Activity of 3-Methyl Catechol

Se-Young Cho^{1†}, Na-Rae Min^{2,3†}, Young O Kim² and Duwoon Kim^{1,2*}

¹Foodborne Virus Research Center, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

³Accreditation Review Team, Korea Agency of HACCP Accreditation and Services, Gwangju 61947, Korea

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) is a fish pathogen responsible for causing enormous economic loss to the aquaculture industry not only in Korea but worldwide. Thus, it is necessary to identify natural compounds that can be used to control the spread of VHSV. In this study, the anti-VHSV activities of five catechol derivatives, i.e., catechol, pyrogallol, 3-methyl catechol, veratrole, and 3-methyl veratrole-extracted from green tea-were assessed. The antiviral activities of these derivatives were found to be dependent on their structure, i.e., the hydroxyl or methoxyl group and their substituent groups-on the benzene ring. Catechol, pyrogallol, and 3-methyl catechol exhibited relatively high 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities than veratrole, and 3-methyl veratrole. Moreover, 3-methyl catechol harboring a methyl substituent group increased the viability of the virus-infected cells and resulted in a 2.86 log reduction in the gene copies of VHSV N (per mL) in real-time PCR analysis. In conclusion, the catechol derivatives harboring hydroxyl groups in their benzene ring exhibited higher antioxidant activities than those harboring the methoxyl groups. However, catechol derivatives with a methyl group at the 3'-position of the benzene ring exhibited higher antiviral activity than those harboring a hydroxyl group. To our knowledge, this is the first study to evaluate the relationship between the structure and the anti-VHSV activity of catechol derivatives.

Keywords: Viral hemorrhagic septicemia virus, 3-methyl catechol, Antioxidant, Antiviral activity, Structure-activity relationship (SAR)

서론

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), nonstructural protein (NV) 및 RNA-dependent RNA polymerase (L)를 암호화하는 유전자로 구성되어 있으며, *Rhabdoviridae*과, *Novirhabdovirus*에 속하는 음성 단일 가닥 RNA 바이러스로 송어(*Oncorhynchus masou*), 연어(*Oncorhynchus keta*) 및 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 등의 담수어뿐만 아니

라 해산어에 이르기까지 발병된다(Basurco and Benmansour, 1995; Cano et al., 2016). 우리나라의 경우, 넙치 양식장에서 저수온기에 VHSV가 발병하여 신장 및 비장의 비대, 간 울혈 등의 증상을 동반한 전신의 출혈증상을 보이며 40-90% 대량폐사가 발생하는 것으로 보고된 바 있다(Kim et al., 2009). 이러한 문제점을 해결하기 위해 VHSV를 제어할 수 있는 연구가 지속적으로 이루어져 왔지만, catechin 구성성분 중 하나인 catechol과 같은 천연소재를 활용한 VHSV 제어연구는 현재까지 미미하다. Catechin은 dihydropyran heterocyclic ring (C-ring)에 연결

*Corresponding author: Tel: +82. 62. 530. 2144 Fax: +82. 62. 530. 2149

E-mail address: dwkim@jnu.ac.kr †contributed equally.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0644>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 644-651, October 2021

Received 13 August 2021; Revised 17 September 2021; Accepted 27 September 2021

저자 직위: 조세영(학술연구교수), 민나래(조사관), 김영오(대학원생), 김두운(교수)

된 두 개의 방향족 고리(A- 및 B-ring)로 구성되며 B-ring의 수산기 개수와 C-ring의 3번 위치에 결합된 gallic acid 유무에 따라 epigallocatechin (EGC), galocatechin (GC), catechin (C), epigallocatechin gallate (EGCG)으로 구분된다(Braicu et al., 2013; Lorenzo and Munekata, 2016). Catechin 구조의 3번 위치에 결합된 gallic acid와 B-ring 5'번 위치의 수산기는 radical 소거능에 기여하며(Rice-Evans et al., 1996; Heim et al., 2002; Chobot et al., 2009), catechin의 구조적 특징에 따라 바이러스와 세포막의 결합을 방해하여 바이러스 핵산의 증식을 억제하는 것으로 보고되고 있다(Saha et al., 2010; Xu et al., 2017). Catechol은 catechin B-ring의 3'번과 4'번 위치에 각각 수산기가 결합되어 있는 페놀화합물로서 방향족 고리의 수산기의 수와 관능기에 따라 구조가 매우 다양하며(Robbins, 2003; Gülçin, 2011; Gülçin, 2012; Gülçin and Beydemir, 2013), 이들 화합물은 항암, 항염증, 항산화 및 항바이러스 등 다양한 생리활성을 발휘한다고 잘 알려져 있다(Sun et al., 2000). Encephalomyocarditis virus (EMCV)의 경우, 방향족 고리에 메틸기가 있는 catechol 유도체의 항바이러스 활성은 메톡실기가 있는 유도체의 항바이러스 활성이 높다고 보고되며(Li et al., 2018a), rabies virus의 경우, 수산기의 개수에 따라 항바이러스 활성이 높으나 동일한 수 이상의 수산기를 갖더라도 ether group의 여부에 따라 항바이러스 활성에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다(Chávez et al., 2006). 또한, catechol의 항산화 활성은 단일 전자 이동(single electron transfer, SET) 및 수소 원자 이동(hydrogen-atom transfer, HAT)과 같은 약물분자구조에 기인하고 있기 때문에 catechol은 의약품 생산의 전구체로 사용되며 식품 산업에서 바닐린과 같은 합성 향료의 제조에 광범위하게 사용되는 식품 응용 분야에서 중요한 화합물로 보고되고 있다(Shirai, 1986; Srinivasan, 2014). 특히, 최근에는 3-methyl catechol과 4-methyl catechol과 같은 catechol 유도체의 생물학적 활성에 대한 많은 연구가 집중되고 있다(Callizot et al., 2001; Hüskén et al., 2002; Kauffman et al., 2003).

바이러스가 감염될 경우, 숙주 내 과량의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 유도하여 세포의 기능을 저하시킨 다음 바이러스가 복제 및 증식되어 결론적으로 세포사멸을 유도한다고 보고되고 있다(Kim, 2009; Kim and Chong, 2018). 즉 바이러스 감염으로 인해 숙주 세포 내 과도하게 생성된 ROS가 세포막의 구성성분인 지질(lipid)을 과산화(peroxidation)할 뿐만 아니라 핵산을 산화시켜 세포의 기능 저하를 유도한다(Perlemuter et al., 2003). 보통 세포는 glutathione (GSH) 등과 같은 산화방어 작용을 통해 생성된 ROS를 제거하나, 그 기능이 저하되면, 바이러스 복제에 유리한 환경인 pH가 낮아짐에 따라 바이러스가 복제되고 증식되는데, 이로 인해 결국 세포는 사멸하게 된다고 밝혀지고 있다(Ciriolo et al., 1997). 2-iodoxybenzoic acid에 의해서 coumarin 산화를 통해 얻어진 catechol 및 pyrogallol 유도체 연구에서는 DPPH radical 소거

능이 우수한 페놀화합물이 influenza A virus (IAV)에 대한 항바이러스에서 높은 활성을 보였다(Bizzarri et al., 2017). 이는 항산화 활성이 높은 페놀화합물에 대해서 항바이러스 활성을 기대해 볼 수 있는 것으로 사료되었다. 그러나, 6-nitro-1,2,4-triazolozines로부터 변형된 페놀화합물 연구에서는 catechol 및 pyrogallol 잔기가 포함된 합성화합물에서 가장 높은 항산화 능력을 보였지만 IAV (H1N1)에 대한 항바이러스 활성과의 상관관계는 낮은 것으로 보고되었다(Ulomskiy et al., 2020). 이와 같이 catechol 유도체에 대하여 합성되는 방법 및 방향족 고리 골격에 따라 항산화 활성 및 항바이러스 활성에 관하여 아직까지 명백히 규명되지 않고 있어 더 많은 연구가 필요하며, 더욱이 VHSV와 관련하여 catechol 유도체의 항산화 활성 및 항바이러스 활성에 대한 structure-activity relationship (SAR)에 관한 연구는 미미하다.

따라서, 본 연구는 VHSV 감염에 따른 양식어류의 대량폐사 저감화를 위하여 항산화 활성이 우수한 catechol 유도체들의 VHSV 증식 억제 여부를 평가하였다. 특히, 3-methyl catechol은 우수한 ROS 제거능과 함께 VHSV 감염에 따른 세포사멸을 억제함으로써 항바이러스 효과를 규명하였다. 이는 양식어류에서 VHSV 감염을 제어하기 위한 사료첨가제로 활용될 것으로 사료된다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 catechol, pyrogallol, 3-methyl catechol, veratrole, 3-methyl veratrole, alpha-tocopherol, DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), DMSO (dimethyl sulfoxide) 및 PBS (Phosphate-buffered saline)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 5종의 폴리페놀성 화합물은 DMSO 용액에 녹여 1 M의 stock solution으로 제조 후, 세포 처리 시 DMSO 함유량이 최종적으로 0.1%가 되도록 배지에 희석하여 사용하였다.

세포 및 바이러스 배양

어류 세포인 FHM (fathead minnow)은 10%의 fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, San Francisco, CA, USA), penicillin G (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL)이 포함된 Leibovitz's L-15 (L-15₁₀) 배지에서 20°C 온도를 유지하여 CO₂ 농도 없이 저온배양기(MIR-153; SANYO, Osaka, Japan)에 3일 마다 계대 배양하여 세포생존을 실험에 사용하였다. 바이러스 성출혈성패혈증 바이러스(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)는 genogroup IVa (KCTC13845BP)를 사용하였으며, 10^{8.8} TCID₅₀/mL인 바이러스를 사용 직전까지 -80°C에 보관하였다.

Catechol 유도체의 항산화력 측정

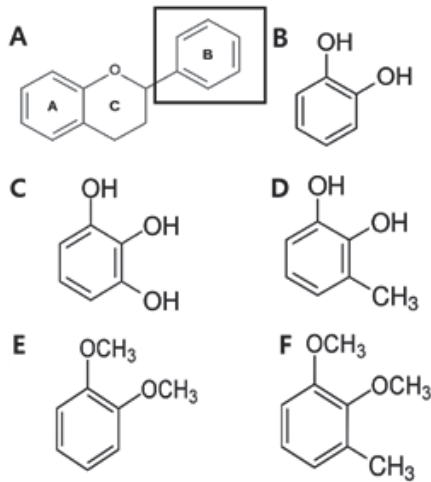


Fig. 1. Basic structure of flavonoids in polyphenols (with B-ring, A), catechol (B), pyrogallol (C), 3-methyl catechol (D), veratrole (E) and 3-methyl veratrole (F).

Catechol 유도체 물질은 catechin의 B-ring의 벤젠 고리에 수산기 유무 및 3번 위치에 메틸기 유무에 따라 5종으로 분류하였다(Fig. 1). DPPH radical scavenging assay를 실시하여 catechol 유도체의 구조적 특성에 따른 항산화 활성을 검토하였다(Bortolomeazzi et al., 2007).

5종의 catechol 유도체 및 양성대조군으로 선택한 alpha-tocopherol은 메탄올에 녹여 10 μM 농도로 제조하였다. DPPH radical 용액은 0.2 mM 농도로 메탄올에 녹여 10분 동안 교반하여 사용하였으며, 음성대조군은 시험군 대신 메탄올 100 μL 을 사용하였다. 메탄올에 녹인 6종의 시험군 화합물은 각각 100 μL 와 0.2 mM DPPH 150 μL 를 black 96-well plate (SPL, Pocheon, Korea) well에 주입하여 25°C 배양기에 30분간 반응하였다. SYNERGYHT microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도값을 측정하였다. Catechol 유도체의 DPPH radical 소거능은 흡광도값을 이용하여 아래 식을 사용하여 radical 소거율을 계산하였다. A_0 는 음성대조군의 흡광도값을, A_1 는 실험군의 흡광도값을 아래의 DPPH radical scavenging activity 계산식에 적용하여 비교 분석하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Catechol 유도체의 세포생존율 평가

VHSV 감염에 대한 세포생존율을 평가는 다음과 같은 선처리 방법을 적용하였다. 10% FBS가 첨가된 L-15배지(L-15₁₀)와 함께 24시간 동안 단층으로 배양된 FHM 세포에 각각 5종의 catechol 유도체를 100 μM 농도로 4시간 동안 처리하였다. 세포배양액을 제거하고, PBS로 세척된 세포에 0.2 multiplicity

of infection (moi) 농도의 VHSV를 접종하여 2시간 동안 감염시켰다. 이 후 배지 전액을 제거하고 2% FBS가 첨가된 L-15배지(L-15₂)로 교환하여 20°C에서 42시간 배양하였다. 세포 생존율 평가방법은 Tominaga et al. (1999)에 따라 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kyoto, Japan) 시약을 20°C에서 8시간 동안 처리 후 SYNERGYHT microplate spectrophotometer를 이용하여 450 nm에서 측정하여 흡광도를 백분율(%)로 환산하여 세포생존율을 평가하였다.

ROS생성 저해능 확인

Black 96-well plate (SPL)에 FHM 세포를 1.0×10^5 cells/mL의 농도로 24시간 배양한 후, 100 μM 의 3-methyl catechol을 처리하여 30분 동안 반응하였다. 0.2 moi 농도로 희석된 VHSV를 세포에 접종하고 2시간 후 전액 제거하였다. 이후, 무혈청 L-15배지(L-15₀) 100 μL 를 이용하여 세포를 세척하고, phenol red가 포함되지 않은 무혈청 L-15배지(L-15₀) (Welgene, Kyeonsan, Korea)로 희석된 10 μM 의 DCFH-DA를 세척된 세포에 100 μL 씩 주입하고 30분 동안 반응하였다. SYNERGYHT microplate spectrofluorometer를 이용하여 emission 530 nm, excitation 480 nm 조건에서 형광신호를 측정하여 세포내 ROS 생성 저해능을 확인하였다(Dikalov and Harrison, 2014).

Real-time PCR을 이용한 VHSV의 복제 저해 확인

FHM 세포를 2.1×10^5 cells/mL의 농도로 48-well plate에 배양한 후 3-methyl catechol 50, 100, 150, 200 μM 을 처리하고 12시간 동안 배양하였다. 세포배양액을 제거하고, PBS로 세척된 세포에 0.2 moi 농도의 VHSV를 2시간 동안 접종하였다. 이 후 배지 전액을 제거하고 2% FBS가 첨가된 L-15배지(L-15₂)로 교환하여 20°C에서 42시간 배양하였다. 배양 종료 후 각 농도별 상층액을 수집하여 real-time PCR 분석을 수행하였다. RNA는 RNAiso Plus (Takara, Kusatsu, Japan)를 사용하여 회사에서 제공하는 방법에 따라 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 MMLV Reverse Transcriptase cDNA Synthesis Kit (Beams Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 random 6-mer (Takara) 프라이머, dNTPs, RNase inhibitor를 포함한 20 μL 반응액으로 37°C에서 60분 동안 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형 2 μL 와 VHSV의 N-gene의 특이적인 프라이머 N_F (5'-ATC GAA GCC GGA ATC CTT ATG C-3')와 N_R (5'-CCT TGA CGA TGT CCA TGA GGT TG-3') 및 TB green® Premix Ex Taq™ (Takara)이 포함된 20 μL 반응액으로 제조하였다. 실시간 유전자증폭 반응 조건은 95°C 30초(1회), 95°C 5초, 60°C 10초, 72°C 20초(45회)이며 Thermal Cycler Dice® Real Time System III (TP950; Takara) 이용하여 표준검량 곡선을 작성하여 바이러스 역가를 절대정량을 수행하였다(Nguyen et al., 2016).

Selectivity index (SI) 평가

본 연구에서는 바이러스 치료제를 선별할 때 참고되는 SI 값을 측정하여 후보물질에 대한 항바이러스제의 가능성 유무를 평가하였다(Peña-Morán et al., 2016). 50% cytotoxic concentration (CC_{50})값을 50% effective concentration (EC_{50})으로 나누어 세포 독성과 항바이러스 활성 사이의 SI 값을 산출하였으며, 값이 클수록 효과적이며 안전하게 활용할 수 있는 약물로 분석하였다. 세포독성의 지표가 되는 CC_{50} 을 측정하기 위하여, 96-well plate에 FHM 세포 1.0×10^5 cells/mL의 농도로 배양한 후 3-methyl catechol을 50, 100, 200, 500, 800 μ M으로 처리하여 48시간 동안 20°C 에서 배양하였다. 음성대조군으로 0.1% DMSO를 처리하여 동일한 조건으로 FHM 세포를 배양하였다. 세포 생존을 평가를 위하여 10 μ L의 CCK-8 시약을 세포에 추가하여 20°C 에서 8시간 동안 추가 배양하였다. 반응이 종료된 96-well plate는 SYNERGYHT microplate spectrophotometer를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도를 백분율(%)로 환산하여 각 농도별 세포독성을 plotting하여 CC_{50} 을 구하였다.

3-methyl catechol의 EC_{50} 을 측정하기 위하여, 96-well plate에 단층 배양된 세포에 3-methyl catechol을 50, 100, 200, 500, 800 μ M을 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 이후, 배양세포에 0.1 moi 농도의 VHSV를 접종하여 2시간 동안 배양한 다음 배지 전액을 제거하고 L-15₂ 배지로 교환하여 20°C 에서 42시간 배양하였다. 음성대조군으로 3-methyl catechol 대신 0.1% DMSO를 처리하여 같은 조건으로 VHSV 감염을 수행하였다. 세포 생존을 평가를 위하여 CCK-8 시약을 10 μ L 추가하여 20°C 에서 8시간 동안 배양한 후 SYNERGYHT microplate spectrophotometer를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도를 백분율(%)로 환산하여 농도별 바이러스 감염에 대한 세포 생존율을 plotting 하여 EC_{50} 을 구하였다.

통계처리

모든 분석결과는 GraphPad Prism 프로그램(Ver. 5.01; Cary, NC, USA)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 시료 간의 유의성은 one-way ANOVA와 사후검정(Tukey 및 Dunnett multiple range test)을 실시하였으며, $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 평가하였다.

결과 및 고찰

Catechol 유도체의 항산화 활성

Catechol 유도체의 구조적 특성에 따른 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH radical scavenging 실험을 수행하였다. 그 결과, 벤젠 고리에 수산기가 부착된 3-methyl catechol, catechol 및 pyrogallol은 각각 79.0%, 79.1% 및 79.6% DPPH radical 소거능을 나타낸 반면, 메톡실기가 부착된 veratrole 및 3-methyl veratrole은 0% 이하, 6.1%의 낮은 radical 소거능을 보였다. 대

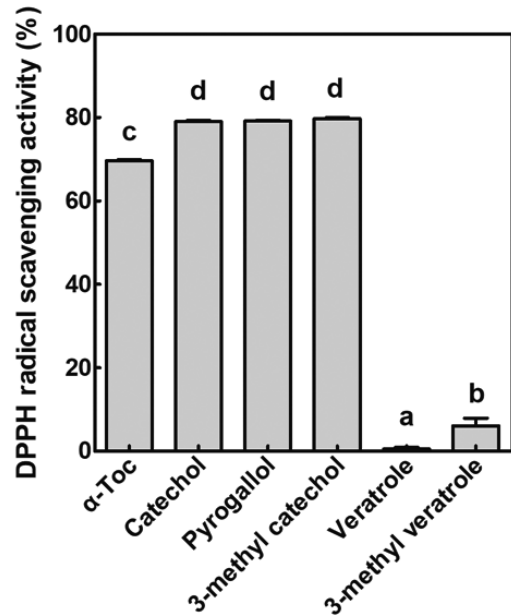


Fig. 2. Antioxidant activity measurement using DPPH radical-scavenging assay. 0.2 mM of DPPH and 10 μ M of each phenolic compound dissolved in methanol were mixed. The mixture reacted for 30 min and the absorbance at 517 nm using a spectrophotometer. Alpha-tocopherol (α -Toc) used as a standard reference. Different letters in a column are significantly different ($P < 0.05$).

조구인 α -tocopherol은 69.6%의 DPPH radical 소거능을 나타내어 3-methyl catechol, catechol 및 pyrogallol이 우수한 DPPH radical 소거능을 지닌 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Bortolomeazzi et al. (2007)에 의하면, dihydroxybenzenes>2,6-dimethoxyphenols>2-methoxyphenols 순서로 항산화 활성이 우수하였으며, 이는 radical 소거 과정에서 phenoxy radical의 안정화를 위해 para 위치에서 공액 이중 결합 역할의 중요성을 보고하였다. Xie and Schaich (2014)이 보고한 DPPH radical 반응에서 propyl gallate와 3-methyl catechol 및 catechol이 속한 그룹에서 매우 빠르고 즉각적인 radical 소거 반응을 나타내었다. 본 실험에서 사용한 catechol, 3-methyl catechol 및 pyrogallol은 dihydroxybenzenes에 속하는 화합물로 2-methoxyphenols 속하는 veratrole 및 3-methyl veratrole 보다 높은 DPPH radical 소거능 활성을 나타내었다.

Catechol 유도체의 바이러스 감염에 대한 세포생존율 평가

어류세포인 FHM 세포주에 DMSO를 처리한 대조군과 catechol 유도체를 처리하여 VHSV 감염에 대한 세포생존율을 확인하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 생존 100%의 무감염군(DMSO+mock infection)과 비교하였을 때 양성대조군(DMSO+VHSV infection)는 60%의 세포생존율을 나타내어

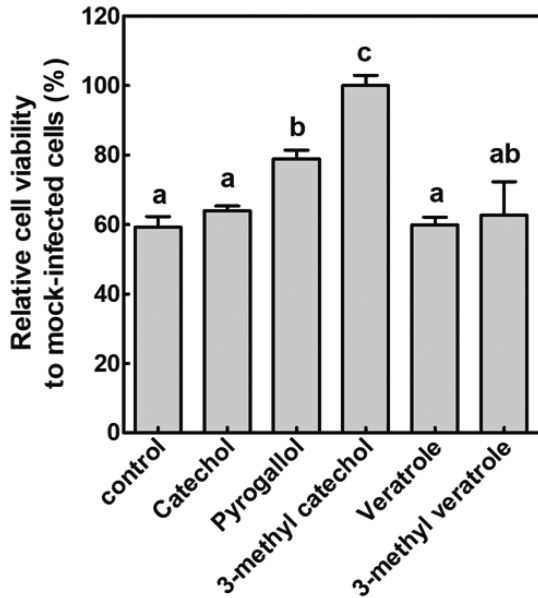


Fig. 3. Evaluation of cell viability against VHSV infection in FHM cells treated with 100 μ M of 5 catechol derivatives using CCK-8 assay. 0.1% of DMSO used as a control. Bars with different lower-case letters (a, b, and c) refer to significant differences (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, $P < 0.05$) among the treatments, where the same letter indicates no significant difference.

VHSV 감염에 의해 세포사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도, 3-methyl catechol 처리와 함께 VHSV 감염군에서 100%의 높은 세포생존율을 나타내었고, pyrogallol은 78.8% 세포생존율을 보였다. Catechol, 3-methyl veratrole 및 veratrole은 양성대조구와 유의적인 차이가 없었다. VHSV 감염에 대한 세포생존에 대한 catechol 유도체의 구조적 관계에서 벤젠 고리는 수산기>메톡실기, 치환기는 메틸기>수산기 순서로 구조-활성 관계가 성립하는 것으로 확인되었다. 방향족(벤젠) 고리에 있는 유리 수산기의 수는 강력한 항 바이러스 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 cinnamic acid 유도체의 항 바이러스 연구를 통해서 보고되었다(Li et al., 2018a). EMCV 감염에 따른 세포생존율 평가에서 페놀성 유도체의 치환기가 메톡실기보다 메틸기에서 높은 항 바이러스 활성을 지니는 것으로 보고되었으나 메틸기의 수를 늘려도 EMCV 바이러스 억제 효과가 증가하지 않은 것으로 보고되었다(Chiang et al., 2002). 우리는 본 연구를 통해 VHSV 바이러스 감염을 억제하기 위한 catechol 유도체에서 방향족 고리에 부착된 유리 수산기의 유무와 치환기의 구조가 항 바이러스 활성에 상당한 영향을 미치는 것을 시사하였다. 또한, DPPH radical 소거능이 높은 catechol 유도체 중 하나인 3-methyl catechol이 VHSV 감염에서도 높은 세포생존율을 나타내어 항산화 효과와 연계된 항 바이러스 활성을 갖

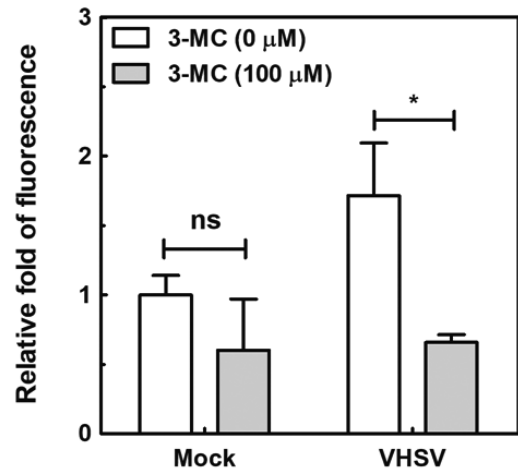


Fig. 4. DCFH-DA assay for detection of intracellular ROS produced in response to VHSV infection in FHM cell line. Cells were pre-treated with 100 μ M of 3-methyl catechol (3-MC) and then infected with VHSV for 2 h. White bars refer to DMSO-treated cells as a control. Values are expressed as fluorescence intensity compared with a Mock-infected cell with non-treated 3-methyl catechol. Asterisk (*) indicates a significant value as determined by Dunnett's multiple comparison test ($P < 0.01$).

는 것으로 판단되었다.

VHSV 감염에 의한 세포 내 Reactive Oxygen Species (ROS) 생성 억제 효과

VHSV 감염에 대한 3-methyl catechol의 세포생존율을 향상시키는 기전이 바이러스 감염시 생성되는 세포내 활성산소종(ROS) 억제와 관련성이 있는지를 규명하기 위하여 DCFH-DA를 사용하여 ROS를 측정하였다. 어류 세포인 FHM세포에 3-methyl catechol을 선처리 한 후 VHSV를 감염시킨 후에 DCFH-DA를 사용하여 세포 내에 잔존하는 ROS와 반응시켜 형광도를 측정하였다. 그 결과, VHSV 감염 세포에서는 무감염군 대비 1.7배의 ROS생성이 증가되었고, 이 때, 3-methyl catechol 처리시 ROS 생성이 0.65배로 유의미하게 감소되었다(Fig. 4). HSV-1 바이러스는 U937 세포주에 감염된 즉시 ROS가 증가하는 것으로 보고되었고(Marino-Merlo et al., 2019), 돼지유행설사바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)는 Vero 세포주에서 감염 후 2시간부터 ROS 생산이 증가되며 6시간에 ROS를 최대 생성하는 것으로 보고하였다(Song et al., 2011). 본 연구에서도 VHSV 초기감염인 2시간이 지난 즉시 세포내 활성산소종을 측정하여 DCF-DA 형광신호가 증가하는 것을 확인하였고, 세포 내 바이러스 감염으로 인해 생성된 ROS를 3-methyl catechol에 의해 DCF-DA 형광신호가 감소하는 것을 확인하였다. 바이러스 감염시 생성되는 활성산소종 감소로 인해 세포생존율과 관련이 있음을 다시 한번 확인할

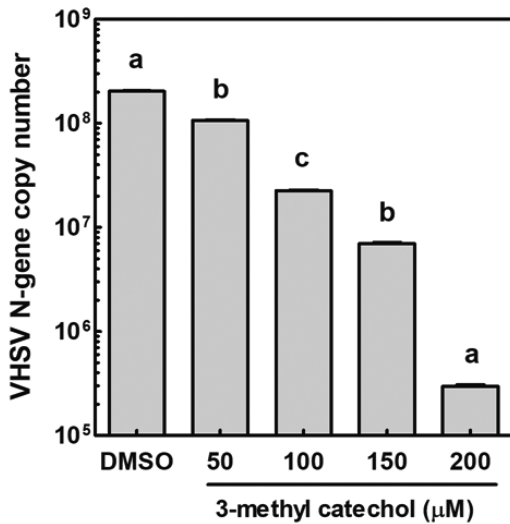


Fig. 5. Absolute viral (VHSV N gene) copy numbers were determined by RT-qPCR. The 3-methyl catechol (3-MC) was pretreated for 12 h prior to viral infection. The FHM cells were infected with VHSV at an MOI of 0.2 for 42 h. 0.1% of DMSO used as a control. Bars with different lower-case letters (a, b, and c) refer to significant differences (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, $P < 0.05$) among the treatments, where the same letter indicates no significant difference.

수 있었다. 반면, Li et al. (2018b)은 L929 세포에서 3-methyl catechol과 같은 catechol 유도체를 처리했을 때 ROS 생성이 증가하는 것이 관찰되었는데, 이는 catechol 유도체의 자동산화로 인해 항바이러스 활성에 중요한 역할을 하는 면역체계 활성을 유도하는 NF- κ B 발현을 촉진한다고 보고하였다. 이와 같이 catechol 유도체의 항바이러스 활성에 대한 ROS의 역할에 대한 두 가지 측면을 고려할 때 향후 많은 연구가 필요할 것으로 판단하였다.

3-methyl catechol의 항바이러스 활성 평가

3-methyl catechol의 VHSV 복제 저해효과를 확인하기 위하여 실시간 유전자증폭기를 활용하여 바이러스 복제수를 측정하였다. 어류 세포인 FHM세포에 3-methyl catechol을 농도별로 선처리 한 후 VHSV를 감염시킨 후 42시간이 지난 상층액을 회수하여 VHSV N-gene의 복제수를 측정하였다. 그 결과, 0.1% DMSO처리와 함께 VHSV를 접종한 양성대조구에서 8.31 log copies/mL로 측정되었으며, 농도의존적으로 VHSV N-gene 유전자의 복제가 감소되어 200 μ M의 3-methyl catechol 처리구에서는 2.86 log copies/mL 만큼 감소하여 5.45 log copies/mL로 측정되었다(Fig. 5). 화합물 구조에 따른 EMCV 감염 저해 활성에서 catechol, 3-methyl catechol, 4-methyl catechol, 및 4-ethyl catechol에서 항바이러스 효과를 나타내었고, 특히

이들 catechol 유도체를 세포에 선 처리하고 바이러스를 감염했을 때 항바이러스 효과가 우수한 것으로 보고되었다(Li et al., 2018b). VHSV 연구에서도 3-methyl catechol 선처리는 바이러스 유전자 복제를 저해하여 바이러스 감염을 예방할 것으로 판단되었다.

3-methyl catechol의 selectivity index 평가

3-methyl catechol의 selectivity index (SI)를 확인하기 위해, 세포독성평가와 VHSV 감염에 대한 세포 생존율 평가를 수행하였다. 세포 독성의 지표가 되는 CC_{50} 은 886.02 μ M으로 확인되었고, 물질의 항바이러스 활성 지표가 되는 EC_{50} 은 25.05 μ M으로 확인되어 VHSV에 대한 3-methyl catechol의 SI는 35.37임을 확인하였다(Table 1). 옷나무 껍질에서 추출한 80% MeOH 분획층, *n*-Hexane 분획층, 및 $CHCl_3$ 분획층에서 VHSV에 대한 SI값이 각각 19.1, 6.7 및 31.7으로 보고되었다(Kang et al., 2012). 또한, 퀘르세틴의 VHSV에 대한 SI값은 9.96 이상으로 보고된 바가 있다(Choi, 2014). 기준에 보고된 항바이러스 물질 대비 VHSV에 대한 3-methyl catechol의 안전성 및 효율성이 높은 물질임을 시사하였다. 한편, 마우스 지방조직의 섬유아세포에서 EMCV에 대한 3-methyl catechol의 CC_{50} 은 0.33 mg/mL (26.5 mM)이며, EMCV에 대한 바이러스 감염을 50% 억제하는 농도(IC_{50})는 0.41 mg/mL (3.3 mM) 미만으로 보고되었고(Li et al., 2018b), EMCV에 대한 3-methyl catechol의 SI값은 8.03으로 SI값이 35.37인 VHSV 보다 낮은 수준으로 비교 분석되었다. 이는 세포 및 바이러스 종류에 따라 3-methyl catechol 활성 효율이 다르게 발현될 수 있음을 시사하였다. 본 연구결과로부터, 3-methyl catechol은 기준에 보고된 다른 화합물에 비해 독성이 낮고, VHSV 증식을 효과적으로 억제할 수 있는 우수한 항바이러스 물질임을 확인할 수 있었다. 이는, VHSV 감염으로 인한 바이러스 증식과 세포사멸을 예방할 수 있는 소재로 활용이 가능하며, 양식어류 사료의 첨가제로 잠재적인 활용 가치가 있을 것으로 사료된다.

사 사

Table 1. Cytotoxicity and protective effect of 3-methyl catechol against VHSV

Compound	CC_{50} ^a (μ M)	EC_{50} ^b (μ M)	SI ^c
3-methyl catechol	886.02±39.56	25.05±1.97	35.37

^a CC_{50} , The CC_{50} represents the concentration of compound required to reduce cell viability by 50% relative to the control well without test compound. ^b EC_{50} , The EC_{50} represents the concentration of compound required to reduce virus infectivity by 50% relative to the control well without test compound. ^cSI, Selectivity index (SI) is the ratio of CC_{50} to EC_{50} . The concentrations are average value of triplicate determinations and are expressed as mean±standard deviations.

이 논문은 2019년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(No. 2019R1A6A3A01096228).

References

- Basurco B and Benmansour A. 1995. Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* 212, 741-745. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1534>.
- Bizzarri BM, Botta L, Capecchi E, Celestino I, Checconi P, Palamara AT, Nencioni L and Saladino R. 2017. Regioselective IBX-mediated synthesis of coumarin derivatives with antioxidant and anti-influenza activities. *J Nat Prod* 80, 3247-3254. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00665>.
- Bortolomeazzi R, Sebastianutto N, Toniolo R and Pizzariello A. 2007. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem* 100, 1481-1489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.039>.
- Braicu C, Ladomery MR, Chedea VS, Irimie A and Neagoe IB. 2013. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chem* 141, 3282-3289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.122>.
- Callizot N, Warter JM and Poindron P. 2001. Pyridoxine-induced neuropathy in rats: a sensory neuropathy that responds to 4-methylcatechol. *Neurobiol Dis* 8, 626-635. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0408>.
- Cano I, Collet B, Pereira C, Paley R, van Aerle R, Stone D and Taylor NG. 2016. *In vivo* virulence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* correlates inversely with *in vitro* Mx gene expression. *Vet Microbiol* 187, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.012>.
- Chávez JH, Leal PC, Yunes RA, Nunes RJ, Barardi CR, Pinto AR, Simões CM and Zanetti CR. 2006. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. *Vet Microbiol* 116, 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.019>.
- Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT and Lin CC. 2002. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. *Antivir Res* 55, 53-62. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00007-4](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00007-4).
- Chobot V, Huber C, Trettenhahn G and Hadacek F. 2009. (±)-Catechin: chemical weapon, antioxidant, or stress regulator?. *J Chem Ecol* 35, 980-996. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9681-x>.
- Choi JA. 2014. Elucidation of antiviral effect of quercetin against viral hemorrhagic septicemia virus using proteomic analysis. M.S. Thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea.
- Ciriolo MR, Palamara AT, Incerpi S, Lafavia E, Buè MC, De Vito P, Garaci E and Rotilio G. 1997. Loss of GSH, oxidative stress, and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection. *J Biol Chem* 272, 2700-2708. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.5.2700>.
- Dikalov SI and Harrison DG. 2014. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 20, 372-382. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4886>.
- Gülçin İ. 2011. Antioxidant activity of eugenol: A structure-activity relationship study. *J Med Food* 14, 975-985. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0197>.
- Gülçin İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86, 345-391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>.
- Gülçin İ and Beydemir S. 2013. Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 13, 408-430. <https://doi.org/10.2174/138955713804999874>.
- Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13, 572-584. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(02)00208-5).
- Hüsken LE, Oomes M, Schroën K, Tramper J, de Bont JA and Beftink R. 2002. Membrane-facilitated bioproduction of 3-methylcatechol in an octanol/water two-phase system. *J Biotechnol* 96, 281-289. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00045-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00045-7).
- Kang SY, Kang JY and Oh MJ. 2012. Antiviral activities of flavonoids isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes against fish pathogenic viruses *In Vitro*. *J Microbiol* 50, 293-300. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2068-7>.
- Kauffman ME, Keener WK, Clingenpeel SR, Watwood ME, Reed DW, Fujita Y and Lehman RM. 2003. Use of 3-hydroxyphenylacetylene for activity-dependent, fluorescent labeling of bacteria that degrade toluene via 3-methylcatechol. *J Microbiol Methods* 55, 801-805. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.07.001>.
- Kim HJ and Chong MS. 2018. Antiviral activities of mulberry *Morus alba* juice and seed against influenza viruses. *Evid Based Complement Altern Med* 2018, 2606583. <https://doi.org/10.1155/2018/2606583>.
- Kim WS, Kim SR, Kim D, Kim JO, Park MA, Kitamura SI, Kim HY, Kim DH, Han HJ, Jung SJ and Oh MJ. 2009. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture* 296, 165-168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.019>.
- Kim YH. 2009. Effect of reactive oxygen species on hepatitis B virus replication and gene expression. M.S. thesis. Korea University, Seoul, Korea.

- Li R, Narita R, Nishimura H, Marumoto S, Yamamoto SP, Ouda R, Yatagai M, Fujita T and Watanabe T. 2018a. Antiviral activity of phenolic derivatives in pyroligneous acid from hardwood, softwood, and bamboo. *ACS Sustainable Chem Eng* 6, 119-126. <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.7B01265>.
- Li R, Narita R, Ouda R, Kimura C, Nishimura H, Yatagai M, Fujita T and Watanabe T. 2018b. Structure-dependent antiviral activity of catechol derivatives in pyroligneous acid against the encephalomyocarditis virus. *R Soc Chem Adv* 8, 35888-35896. <https://doi.org/10.1039/C8RA07096B>.
- Lorenzo JM and Munekata PE. 2016. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pac J Trop Biomed* 6, 709-719. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.010>.
- Marino-Merlo F, Papaiani E, Frezza C, Pedatella S, De Nisco M, Macchi B, Grelli S and Mastino A. 2019. NF- κ B-dependent production of ROS and restriction of HSV-1 infection in U937 monocytic cells. *Viruses* 11, 428. <https://doi.org/10.3390/v11050428>.
- Nguyen TL, Lim YJ, Kim DH and Austin B. 2016. Development of real-time PCR for detection and quantification of *Streptococcus parauberis*. *J Fish Dis* 39, 31-39. <https://doi.org/10.1111/jfd.12322>.
- Peña-Morán OA, Villarreal ML, Ivarex-Berber L, Meneses-Acosta A and Rodriguez-Lpez. 2016. Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast cancer cell lines. *Molecules* 21, 1013. <https://doi.org/10.3390/molecules21081013>.
- Perlemuter G, Lettéron P, Carnot F, Zavala F, Pessayre D, Nalpas B and Bréchet C. 2003. Alcohol and hepatitis C virus core protein additively increase lipid peroxidation and synergistically trigger hepatic cytokine expression in a transgenic mouse model. *J Hepatol* 39, 1020-1027. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(03\)00414-8](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(03)00414-8).
- Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganag G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).
- Robbins RJ. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 51, 2866-2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>.
- Saha RK, Takahashi T, Kurebayashi Y, Fukushima K, Minami A, Kinbara N, Ichitani M, Sagesaka YM and Suzuki T. 2010. Antiviral effect of strictinin on influenza virus replication. *Antivir Res* 88, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.06.008>.
- Srinivasan K. 2014. Antioxidant potential of spices and their active constituents. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54, 352-372. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.585525>.
- Shirai K. 1986. Screening of microorganisms for catechol production from benzene. *Agric Biol Chem* 50, 2875-2880. <https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867845>.
- Song JH, Shim JK and Choi HJ. 2011. Quercetin 7-rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral induced reactive oxygen species. *Virology* 460, 460. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-460>.
- Sun YG, Cui H, Li YH and Lin XQ. 2000. Determination of some catechol derivatives by a flow injection electrochemiluminescent inhibition method. *Talanta* 53, 661-666. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00550-6](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00550-6).
- Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K and Watanabe M. 1999. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Commun* 36, 47-50. <https://doi.org/10.1039/A809656B>.
- Ulomskiy EN, Ivanova AV, Gorbunov EB, Esaulkova IL, Slita AV, Sinegubova EO, Voinkov EK, Drokin RA, Butorin II, Gazizullina ER, Gerasimova EL, Zarubaev VV and Rusinov VL. 2020. Synthesis and biological evaluation of 6-nitro-1,2,4-riazoloazines containing polyphenol fragments possessing antioxidant and antiviral activity. *Bioorg Med Chem Lett* 30, 127216. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127216>.
- Xie J and Schaich KM. 2014. Re-evaluation of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 62, 4251-4260. <https://doi.org/10.1021/jf500180u>.
- Xu J, Xu Z and Zheng W. 2017. A review of the antiviral role of green tea catechins. *Molecules* 22, 1337. <https://doi.org/10.3390/molecules22081337>.