

맥문동 열수 추출물이 Poly I:C를 처리한 폐암세포주의 사멸 및 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향

강다연^{1#}, 조남준¹, 렌친핸드², 이보희³, 김은미⁴, 남명수^{2*}, 김기광^{1*}

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 충남대학교 동물자원과학부
3 : 충남농업기술원 구기자연연구소, 4 : 안전성평가연구소 예측독성연구본부

Effects of *Liriope muscari* Water Extracts on the Cell Death and Inflammatory Cytokine Expression of Poly I:C-treated Lung Carcinoma Cells

Dayeon Kang¹, Namjoon Cho¹, Gereltuya Renchinkhand², Bo-Hee Lee³, Eun-Mi Kim⁴
Myoung Soo Nam^{2*}, Keekwang Kim^{1*}

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

2 : Division of Animal Resources Science, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

3 : Gogi Berry Research Institute, Chungcheongnam-do Agricultural Research and Extension Services,
Cheongyang-gun 33319, Korea

4 : Department of Predictive Toxicology, Korea Institute of Toxicology, 141 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon
34114, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Virus infection through the respiratory tract causes various inflammatory diseases such as pneumonia, cystic fibrosis, and obstructive pulmonary disease, causing enormous social damage. Therefore, it is very important to develop a treatment and prevention of infectious diseases. In this study, we investigated the effect of water extracts of *Liriope muscari* (WELM), known to improve lung function, on the inflammatory response of lung carcinoma cell line A549 cells induced by the viral double stranded RNA mimetic Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C).

Methods : The cell viability by WELM treatment was analyzed using MTS assay in A549 cells. After inducing an inflammatory response to WELM-treated A549 cells with Poly I:C, the degree of apoptosis was confirmed through bright field microscopy. Interferon beta (IFN- β) mRNA expression level in A549 cells was analyzed by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR).

Results : WELM treatment has no significant effect on cell viability of A549 cells. We confirmed that pre-treatment of WELM effectively reduces the Poly I:C-induced apoptotic cell death in A549 cells. In addition, it was confirmed that the mRNA expression level of IFN- β , a pro-inflammatory cytokine increased by Poly I:C treatment, was significantly suppressed by WELM treatment in A549 cells.

Conclusions : These results provide the evidence that WELM is effective at inhibiting inflammation on respiratory viral infections and suggest that *Liriope muscari* might be a valuable natural substance in the prevention and treatment of infectious diseases.

*Corresponding author : Keekwang Kim, Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-821-5485 · E-mail : kimkk@cnu.ac.kr

Myoung Soo Nam, Division of Animal Resources Science, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-821-5782 · E-mail : namsoo@cnu.ac.kr

#First author : Dayeon Kang, Department of Biochemistry, Chungnam National University.

· E-mail : rrkakssunn@naver.com

· Received : 03 Dec 2020

· Revised : 15 Jan 2021

· Accepted : 25 Jan 2021

Key words : *Liriope muscari*, Poly I:C, A549 cells, Apoptosis, Inflammation, IFN- β

I. 서론

전 세계적으로 심각한 혼란을 야기하고 있는 SARS-CoV-2를 포함한 바이러스성 호흡기 감염이 발생할 경우, 바이러스를 통해 만들어진 viral RNA가 세포에서 발현된 toll-like receptor 3 (TLR3)에 의해 인지되어 염증성 사이토카인의 발현을 유도하게 된다¹⁾. TLR3가 활성화되어 IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , 및 IL-6를 포함한 염증성 사이토카인의 발현이 통제할 수 없이 증가되면 림프구 감소증, 림프구 기능 장애, 과립구 및 단핵구 이상을 유발한다²⁾. 이러한 면역 세포의 이상은 염증성 사이토카인이 비정상적 발현을 촉진하여 결국 사이토카인 폭풍을 유도함으로써 패혈성 쇼크와 심각한 다발성 장기 기능 장애로 인하여 사망으로 이어질 수 있다^{3,4,5,6)}. 뿐만 아니라 현재 유행하는 SARS-CoV-2에 대한 현재 약물 요법은 주로 항혈전 치료와 hydroxychloroquine와 remdesivir 같은 항말라리아 및 항바이러스 약물을 용도 변경하여 사용하고 있으나 현재 바이러스로 인한 사이토카인 폭풍을 억제하는 치료제의 개발이 부족한 실정이다⁷⁾.

우리는 본 연구에서 dsRNA virus와 구조적으로 유사한 바이러스 모사체인 Poly I:C를 이용하여 면역 반응을 유도하였다. Poly I:C는 viral RNA와 유사하게 TLR3에 의해 인식되며, 인식 시 Toll-IL-1 receptor, domain-containing adapter pathway를 통해 transcription factor interferon regulatory factor 3를 활성화하여 IFN- β 의 발현을 유도한다. 또한 Poly I:C를 세포가 인식하게 되면 TNF receptor associated factor와 Receptor-interacting serine/threonine kinase가 complex를 구성하게 되어 transcription factors인 NF- κ B 및 AP-1이 활성화되어 염증성 사이토카인들과 chemokine 생성을 유발한다⁸⁾.

폐 기능을 향상하는 것으로 알려진 맥문동은 중국, 대만, 한국에 주로 분포하는 약용 식물로 전통적으로 기침, 가래, 천식 및 신경 퇴행성 질환 치료에 한의학적으로 사용되어왔다⁹⁾. 특히 맥문동으로부터 추출한 spicatoside A를 구강 투여한 천식 마우스 모델의 혈청 및 bay area lupus foundation에서 OVA- 특이적 IgE 및 Th2 사이토카인, IL-4, IL-5 및 IL-13의 생성이 유의하게 감소된 것을 확인한 연구 결과가 보고되었다¹⁰⁾. 또한 맥문동은 LPS로 자극된 RAW 264.7에서 INOS, IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현 억제, endotoxin으로 유도된 대식세포의 염증 억제 및 T 세포 활성 억제에 대한 효능 등 면역 체계에 대한 관련 연구 결과들이 발표되었다¹⁰⁾. 하지만 아직 맥문동 추출물이 바이러스성 폐 질환에 미치는 영향에 대한 기능적 연구는 미비하다.

우리는 본 연구에서 맥문동 열수 추출물 (Water extracts of *Liriope muscari*; WELM)의 lung carcinoma cell line A549 세포의 바이러스성 염증 반응에 대한 영향을 확인하였으며 이를 통해 WELM을 처리할 경우 Poly I:C를 처리하여 유도되는 A549 세포의 세포 사멸을 현저하게 낮출 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라 Poly I:C에 의해 유도되는 IFN- β 의

mRNA 발현이 WELM의 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 우리는 WELM이 폐암세포에서 바이러스 등에 의한 염증성 사이토카인의 과도한 발현을 억제하는 천연 치료제로서의 개발 가능성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 맥문동 열수 추출물 제조

충남농업기술원 구기자연구소에서 재배한 맥문동을 수확 후 건조하였고, mixer기 (Braun, Czech)로 분말로 제조하였다. 분말화된 맥문동을 90°C 열수에 넣고 3시간 동안 유효성분을 2회 반복 추출 후 원심분리기 (Hanil, Korea)로 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 동결건조기 (Ilshin, Korea)로 건조 후 시료로 사용하였다. 동결 건조된 맥문동 열수 추출물을 deionized water에 녹여 농도 100 mg/ml로 조정하여 사용하였다.

2. 세포 배양

폐암 세포주 A549 세포는 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에서, 10% fetal bovine serum (FBS, WELGENE, Korea)과 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (WELGENE, Korea)이 포함된 RPMI 1640 media (WELGENE, Korea)에서 배양하였다.

3. 세포 활성도 측정

WELM이 A549 세포 활성도에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Promega, USA) assay를 수행하였다. A549 세포를 96 well plate에 5000 cells/well로 분주한 뒤 12시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고, WELM을 처리 후 36시간 동안 배양하였다. 그 후 MTS 용액을 각 well에 20 μ l 첨가하고 microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. WELM 처리에 의한 상대적인 세포 활성도를 계산하기 위하여 다음 식을 이용하였다.

세포 활성도 (%)

$$= \{ \text{시료 첨가군의 흡광도} - (\text{시료 자체의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도} \} \times 100$$

4. Poly I:C transfection

6 well plate의 각 well에 A549 세포를 1 \times 10⁵ cells/well로 분주한 뒤 12시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후,

WELM을 처리해주고 36시간 동안 배양하였다. 이후 각 well 당 Poly I:C (SIGMA, USA) 1 μg 을 PolyMag (OZ Biosciences, USA)을 이용하여 transfection하였다. Poly I:C를 처리하여 유도되는 세포의 사멸은 bright field microscope (Canon, Japan)로 이미지 촬영 후 floating phenotype 세포 수를 측정하여 계산하였다.

5. Quantitative real-time PCR

A549 세포의 배양액을 제거한 뒤 PBS로 세척 후 Hybrid-R RNA extraction kit (GeneAll, Korea)를 이용해 total RNA를 추출하였다. Total RNA 500 ng을 DEPC-treated water와 섞어 8 μl 로 부피를 만들어준 후 dNTP mix (10 mM) 1 μl 와 random hexamer (100 pmol/ μl) 1 μl 를 각각 넣어주었다. 65°C water bath에서 5분간 반응시킨 뒤 즉시 on ice에서 5분 동안 냉각시킨 후 sample에 DEPC-treated water 4 μl , M-MLV RT reaction buffer 4 μl , M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) 1 μl , RNase inhibitor (Enzymomics, Korea) 1 μl 를 추가로 첨가하였다. 50°C water bath에서 1시간 동안 cDNA를 합성한 뒤, 증류수를 추가하여 1/10로 희석하여 정량에 사용하였다. 2X Prime Q-mater Mix (GENETBIO, Korea) 10 μl 와 희석한 cDNA 3 μl , 증류수 4 μl , 10 pmol/ μl 농도의 forward primer 1.5 μl 와 reverse primer 1.5 μl 를 혼합한 뒤 AriaMx (Agilent, USA)를 이용해 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 수행하였다. Primer는 다음과 같이 제작하였다: IFN- β , Forward 5'-AGG ACA GGA TGA ACT TTG AC-3', Reverse 5'-TGA TAG ACA TTA GCC AGG AG-3', β -actin, Forward 5'-ATCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG-3', Reverse 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG-3'.

6. Renilla reporter assay

A549 세포를 6 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하고 12시간 동안 배양한 뒤, WELM을 처리 후 36시간 동안 배양하였다. 그 후 pRL-TK vector 1 μg 을 PolyMag을 이용하여 transfection 한 뒤 24시간 동안 배양하였다. WELM 처리에 따른 transfection의 효율을 확인하기 위해 dual luciferase assay kit (Promega, USA) 및 luminometer (Thermo Fisher scientific, USA)를 사용하여 renilla reporter assay를 수행하였다. 모든 결과는 각 well의 단백질 농도를 Bradford assay (SIGMA, USA)로 정량한 후 보정하였다.

7. 자료 분석 및 통계 처리

대조군에 대해 실험군의 유의성을 student's t-test로 계산해서 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

1. WELM 처리에 의한 A549 세포의 활성도

A549 세포의 활성도에 WELM이 미치는 영향을 확인하기 위하여 다양한 농도로 (0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml) 24시간 처리한 뒤, MTS assay를 실시하였다. 그 결과 모든 농도에서 세포 활성도에 영향을 주지 않은 것이 확인되었다 (Fig. 1). 또한 현미경으로 관찰한 세포의 형태에도 WELM의 처리가 큰 변화를 주지 않았다. 이러한 결과들을 통하여 이후 A549 세포에 처리하게 되는 WELM의 처리 농도를 최고 2 mg/ml로 설정하였다.

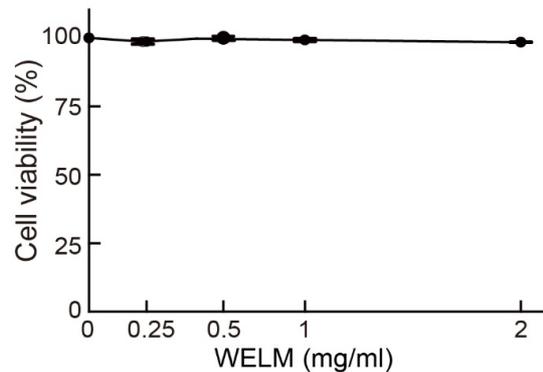


Fig. 1. Cell viability of the A549 cells by water extract of *Liriope muscari* (WELM) treatment. Cells were treated with indicated concentrations of WELM and cell viability was measured by MTS assay.

2. Poly I:C로 유도되는 세포 사멸에 WELM의 처리가 미치는 효능

Poly I:C를 세포 내로 주입할 경우 세포는 바이러스가 침입했다는 상황으로 인지하여 면역반응이 유도되어 염증성 사이토카인이 발현되고 결국 apoptotic cell death가 유도된다. Poly I:C를 A549 세포에 transfection 후 24시간 배양한 결과 50% 이상의 세포에서 cell death가 유발됨을 bright field microscope를 통해 확인하였다 (Fig. 2A). 하지만 WELM을 2 mg/ml 농도로 36시간 미리 처리한 A549 세포는 Poly I:C로 24시간 염증 반응을 유도하여도 cell death가 유도되는 세포의 비율이 20% 이하로 현저하게 감소함을 확인하였다 (Fig. 2B). 이러한 결과들을 통하여 WELM의 처리는 바이러스로 인해 유도되는 폐 세포의 cell death를 억제할 수 있는 가능성을 지닌 천연물질임을 확인하였다.

3. Poly I:C로 유도한 IFN- β mRNA 발현에 WELM의 처리가 미치는 영향

앞선 실험에서 WELM의 처리는 Poly I:C로 유도되는 A549 세포의 cell death를 억제하는 것이 확인되어 우리는 추가적으로 WELM가 처리된 A549 세포에서 Poly I:C를 처리 후 사이토카인 폭풍을 유도하는 대표적인 염증성 사이토카인인 IFN- β 의 발현을 확인하였다 (Fig. 3). WELM을 36시간 처

리한 A549 세포에 Poly I:C를 transfection한 후 24시간 동안 배양했을 때 유도되는 IFN-β의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 확인한 결과 Poly I:C 처리를 통해 3000배 이상 발현이 증가한 IFN-β의 mRNA 발현이 WELM 2 mg/ml 농도가 처리된 A549 세포에서는 현저하게 억제되어 있음을 확인하였다. 이를 통해 WELM은 바이러스로 인해 폐에서 유도되는 염증성 사이토카인을 억제 할 수 있는 물질로의 적용 가능성을 확인하였다.

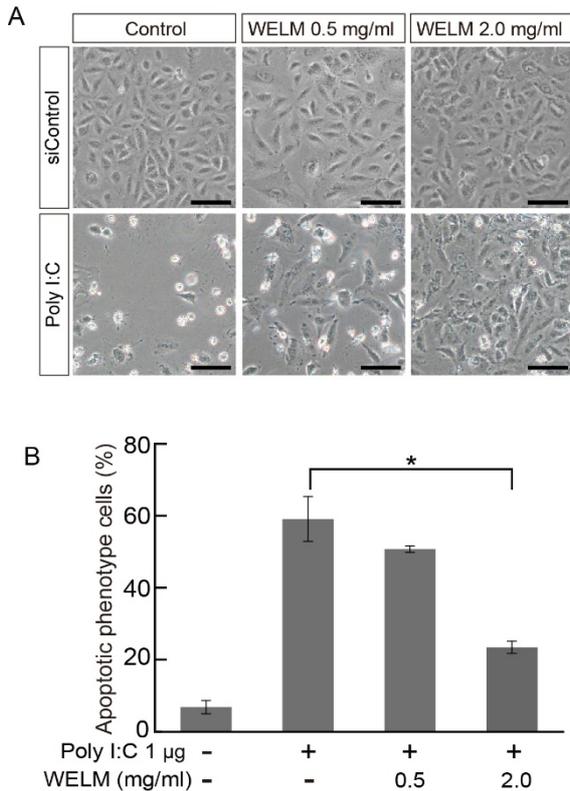


Fig. 2. Reduction of Poly I:C-induced apoptotic cell death phenotype in A549 cells by 2.0 mg/ml WELM treatment. (A) Representative images of WELM and Poly I:C treated A549 cells (B) Percentage of apoptotic cell death phenotype cells by Poly I:C or WELM treatment. * < 0.05 versus control.

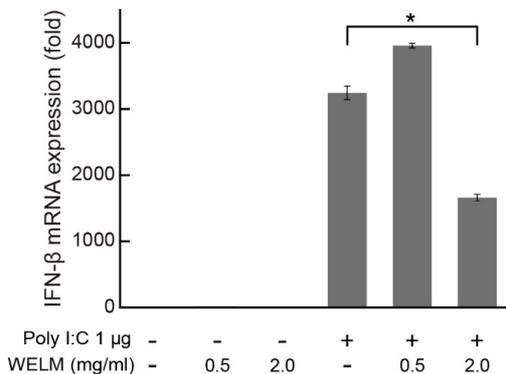


Fig. 3. Poly I:C-induced IFN-β mRNA expression in WELM-treated A549 cells. IFN-β mRNA expression level was measured by qRT-PCR. * < 0.05, versus control.

4. WELM 처리에 의한 A549 세포의 transfection 효율 확인

Poly I:C의 transfection은 PolyMag reagent를 사용하여 진행하였으며, 이는 형성된 nucleic acid와 PolyMag complex가 endocytosis를 통해 세포로 유입되는 방식을 이용한다. 우리는 Poly I:C의 transfection으로 유도되는 세포 사멸 및 IFN-β mRNA expression 축진이 WELM을 처리했을 경우 억제되는 이유를 규명하기 위하여 WELM이 처리된 A549 세포의 transfection 효율을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 renilla reporter vector 1 μg을 Poly I:C 처리와 동일한 방법으로 PolyMag을 이용하여 transfection 한 뒤 24시간 후 과 발현된 renilla의 activity를 확인하였다 (Fig. 4). 그 결과 WELM의 처리 농도가 높아질수록 renilla activity가 낮아지는 것을 확인하여 이를 통해 WELM이 처리된 A549 세포에서는 PolyMag을 이용한 transfection의 효율이 감소하여 있음을 확인하였다. 따라서 transfection 효율의 감소는 WELM 처리로 인하여 세포의 endocytosis 작용이 억제되어 나타났을 것으로 추측하며 이는 endocytosis를 통해 폐 세포에 침입하는 다양한 바이러스의 감염률 또한 WELM에 의해 억제될 수 있음을 추측할 수 있다.

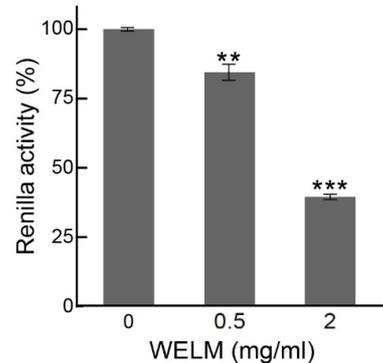


Fig. 4. Renilla activity in WELM-treated A549 cells. WELM treatment decreases the renilla activity. ** < 0.005, *** < 0.001 versus control.

IV. 고찰

현재 COVID-19 뿐만 아니라 바이러스 매개 질병으로 인한 막대한 피해가 발생하고 있어 이에 대한 치료제의 개발이 매우 필요한 실정이다. 우리는 본 연구를 통해 바이러스 매개 질병의 주요 사망원인인 염증성 사이토카인을 억제 할 수 있는 가능성을 지닌 WELM의 효능을 확인하였다. WELM을 처리할 경우 A549 세포에 Poly I:C를 처리하여 유도되는 IFN-β mRNA 발현 및 세포 사멸이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. 또한 우리는 PolyMag에 의한 Poly I:C의 endocytosis 효율을 확인해 보고자 renilla reporter assay를 진행하였다. 그 결과 WELM의 처리 농도가 높아질수록 renilla activity가 낮아지는 것을 확인하여 이를 통해 WELM이 처리된 A549 세포에서는 PolyMag을 이용한 transfection의 효율이 감소되어 있음을 확인하여 세포의 endocytosis activity가 억제되었을 가능성을 확인하였다.

본 연구에서 우리는 사이토카인 폭풍의 예방을 위한 천연물 탐구 연구를 진행하고자 Poly I:C를 이용하였다. Poly I:C의 transfection은 바이러스가 감염된 상황을 모방한다. 그로 인해 세포는 면역계를 활성화하여 염증성 사이토카인 발현을 촉진한다¹¹⁾. 최근 인플루엔자 환자로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 사용하여 COVID-19의 질병 진행을 유도하는 사이토카인을 확인한 연구에서 밝혀진 바에 의하면 중증 COVID-19 환자의 PBMC에서 I 형 IFN 반응은 TNF / IL-1 β 에 의한 염증과 공존했으며, 이는 초기 COVID-19 환자에서는 나타나지 않았다⁴⁾. 이를 통해 I 형 IFN 반응이 중증 COVID-19에서 염증을 악화시키는 데 중추적인 역할을 한다고 밝혀진 결과를 토대로 우리는 본 연구에서 대표적인 1 형 IFN인 IFN- β 를 타겟으로 연구를 진행하였다. 우리의 결과를 통해 WELM이 염증성 사이토카인인 IFN- β 발현 조절을 함으로써 바이러스 감염으로 인해 유도되는 사이토카인 폭풍을 예방할 수 있을 가능성을 확인할 수 있었다.

PolyMag을 이용하여 transfection을 진행할 경우 DNA 혹은 RNA가 세포의 endocytosis 작용을 통해 세포 내로 들어간다. 폴리오바이러스, C형 간염 바이러스, 구제역 바이러스 등 폐에 감염되는 다양한 바이러스 또한 endocytosis의 방법으로 세포 내로 침입한다¹²⁾. 이러한 사실을 바탕으로 WELM의 처리 농도 의존적으로 A549 세포에서 Poly I:C transfection level이 감소했다는 것은 WELM 처리는 폐 세포에 endocytosis를 억제하여 바이러스의 유입을 저해할 수 있다는 가능성을 제시한다.

본 연구결과를 통해 WELM은 중증 COVID-19 환자에게서 과발현되는 INF- β 를 효과적으로 억제 할 수 있을 것이라 기대된다. 다만 WELM이 A549 세포에서 IFN- β mRNA 발현을 억제하는 작용 기전과 세포의 endocytosis inhibition mechanism을 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 *in vivo*와 lung organoid 등에서 WELM의 염증 억제 효능을 규명하고 다양한 염증성 질환 마커들의 추가적인 분석을 하는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이상의 결과를 통해 WELM이 endocytosis를 통해 폐 세포에 침입하는 다양한 바이러스의 감염을 억제할 수 있는 가능성을 확인하여 WELM은 사이토카인 폭풍과 같은 염증성 질환을 예방 할 수 있는 천연물질로의 새로운 바이러스 치료제로 개발할 수 있는 가능성을 검증하였다.

V. 결 론

WELM이 Poly I:C를 처리한 폐암세포의 사멸 및 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. WELM을 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml로 A549 세포에 처리 하였을 때 세포 활성에 영향을 미치지 않았다.
2. WELM를 처리한 A549 세포는 Poly I:C로 유도한 apoptosis를 효과적으로 억제하였다.

3. A549 세포에 WELM의 처리는 Poly I:C를 transfection 하여 증가된 IFN- β 의 mRNA 발현량을 효과적으로 억제하였다.

4. A549 세포에 WELM의 처리는 PolyMag을 이용한 transfection의 efficiency를 감소시킨다.

이상의 결과들을 통해 WELM은 Poly I:C에 의해 유도되는 세포 사멸 및 염증성 사이토카인 IFN- β 의 발현을 억제하는 효능이 있음을 확인하였다.

감사의 글

This work was supported by Research Scholarship of Chungnam National University and Korea Environment Industry & Technology Institute (KEITI) through the Environment Health Action Program, funded by Korea Ministry of Environment (MOE) (2018001360003).

References

1. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):128.
2. Pearce L, Davidson SM, Yellon DM. The cytokine storm of COVID-19: a spotlight on prevention and protection. *Expert Opin Ther Targets.* 2020;24(8):723-30.
3. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect.* 2020;80(6):607-13.
4. Lee JS, Park S, Jeong HW, Ahn JY, Choi SJ, Lee H, et al. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. *Sci Immunol.* 2020;5(49).
5. D'Elia RV, Harrison K, Oyston PC, Lukaszewski RA, Clark GC. Targeting the "cytokine storm" for therapeutic benefit. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(3):319-27.
6. Han Y, Duan X, Yang L, Nilsson-Payant BE, Wang P, Duan F, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids. *Nature.* 2020.
7. Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(1):3-10.
8. Bianchi F, Pretto S, Tagliabue E, Balsari A, Sfondrini L. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis.

- Cancer Biol Ther. 2017;18(10):747–56.
9. Tsai YC, Hsu CC, El-Shazly M, Chiang SY, Wu CC, Wu CC, et al. Phytochemicals and Estrogen–Receptor Agonists from the Aerial Parts of *Liriope platyphylla*. *Molecules*. 2015;20(4):6844–55.
 10. Kim MJ, Yoo YC, Sung NY, Lee J, Park SR, Shon EJ, et al. Anti–Inflammatory Effects of *Liriope platyphylla* in LPS–Stimulated Macrophages and Endotoxemic Mice. *Am J Chin Med*. 2016;44(6): 1127–43.
 11. Harris P, Sridhar S, Peng R, Phillips JE, Cohn RG, Burns L, et al. Double–stranded RNA induces molecular and inflammatory signatures that are directly relevant to COPD. *Mucosal Immunol*. 2013;6(3):474–84.
 12. Hinze C, Boucrot E. Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. *J Cell Sci*. 2018;131(23).