

魷魚皮磷脂質微脂體對 LPS 誘發微膠細胞發炎反應之影響

高翊峰^{1,2*} · 林怡伶² · 李偉毅¹ · 陳億乘²

¹ 行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

² 國立臺灣大學動物科學技術學系

摘要

微膠細胞 (microglia cell) 為在腦部的一種巨噬細胞，在發炎反應過度活化時，會導致腦部神經元損傷。有研究顯示，巨噬細胞吞噬細胞凋亡體 (apoptotic body) 後會啟動抗發炎作用。本研究以魷魚皮磷脂質製備之微脂體來模擬細胞凋亡體，並探討以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 誘導老鼠腦部微膠細胞株 (BV-2) 產生發炎反應下，是否具抗發炎之能力。以 HPLC 分析魷魚皮磷脂質組成分，磷脂酰膽鹼 (phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰絲胺酸 (phosphatidylserine, PS)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI)、溶血磷脂酰膽鹼 (lysophosphatidylcholine, Lyso-PC) 及其他磷脂質，分別佔 46.2、18.4、7.7、3.5、4.9、19.3%，磷脂質中 n-3 系列二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 及二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 分別為 11.8 及 28.7%，製成之魷魚皮微脂體 (SQ-liposome) 大小約為 100 nm。細胞存活率的結果發現濃度 2.5 mg/ml 以下的 SQ-liposome 不會影響 BV-2 的細胞存活率，並且於顯微鏡下可觀察到 BV-2 細胞會吞噬 SQ-liposome。在分析 SQ-liposome 抑制 LPS 所誘導的促發炎細胞激素的結果，發現 0.83 與 2.5 mg/ml 的 SQ-liposome 可顯著抑制 BV-2 分泌介白素-6 (interleukin-6, IL-6)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) ($p < 0.05$)；同時也發現 SQ-liposome 會誘發抗發炎細胞激素，轉化生長因子 (transforming growth factor beta, TGF- β)、介白素-10 (interleukin-10, IL-10) 的分泌 ($p < 0.05$)。另外 LPS 所誘導的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 生成，亦隨預處理 SQ liposome 後隨濃度增加而顯著性下降 ($p < 0.05$)。由上述結果顯示，SQ-liposome 具有抑制 LPS 誘發微膠細胞發炎反應之功效，未來可作為抗腦部發炎相關疾病之應用。

關鍵詞：巨噬細胞、功能性微脂體、擬態細胞凋亡體

前言

微膠細胞 (microglia cell) 的活化是阿茲海默症的病徵之一，抑制微膠細胞活化引起的發炎反應具保護腦部神經元的功能。微膠細胞就如同血液循環系統中的單核球或巨噬細胞，在腦組織的免疫系統中扮演重要角色。當免疫原入侵腦部時，像是細菌、病毒、類澱粉蛋白 (amyloid)、氧化自由基 (free radical and reactive oxygen species)、糖化終產物 (advanced glycation end products,

AGEs)，或是來自系統中的促細胞發炎激素或介質，皆能引起微膠細胞的活化，進而啟動腦部的發炎反應。然而持續或過度性的發炎反應，可能引起腦部神經元細胞的損傷、萎縮，進而導致許多退化性神經元相關疾病的產生，例如：阿茲海默症或老人癡呆症等病徵。近年來研究顯示，緩解腦部微膠細胞所引起的發炎被認為可以降低許多退化性神經疾病的風險 (Kim and Joh, 2006)。

根據漁業署統計，臺灣魷魚平均年產量約 150,000 mt，其中美洲大赤魷 (*Dosidicus gigas*) 為遠洋漁獲中重要的經濟魚種，通常以加工方式製成各式水產加工食品，然而在加工過程中，水產副產物重達總體重之 35%，其中魷魚皮約占 15%。因為魷魚皮堅韌的質地與不易斷裂的咀嚼

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02)2462-2101 ext. 2837 ; FAX: (02) 2462-3306; E-mail: yfkao@mail.tfrin.gov.tw

口感，加工分離可食用部分後的魷魚皮，多被當成低度利用資源，製成廉價魷魚粉作為飼料添加物，或丟棄造成環境惡臭及污染 (Hwang *et al.*, 2011)。過去研究指出，魷魚皮中磷脂質占總脂質含量 80 - 85%，其中魷魚皮磷脂質分子內更富含二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 及二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 等 n-3 多元不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) (Olivas *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2011)。n-3 多元不飽和脂肪酸在發炎反應中會進一步代謝成緩解素 (resolvins)、保護素 (protectins) 及神經保護素 (maresins) 等，為降解發炎反應中重要的機制 (Calder, 2015)。研究顯示，取自牛腦的磷脂酰絲胺酸 (phosphatidylserine, PS) 和蛋黃的磷脂酰膽鹼 (phosphatidylcholine, PC) 加工製成的微脂體，能夠模仿細胞老化、凋亡所產生的細胞凋亡體 (apoptotic bodies)，之後再被吞噬細胞或巨噬細胞吞噬後，經由分泌前列腺素 E2 (prostaglandin E₂, PGE₂) 及轉化生長因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β)，以自我調控或調控鄰近的細胞產生抗發炎反應 (Wu *et al.*, 2011)。另外，微膠細胞處理含有 PS/PC 的微脂體之培養基，能有效抑制腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和超氧根離子 (peroxideion, O²⁻) 生成，進一步抑制 β-類澱粉蛋白 (amyloid β) 和干擾素 (interferon-γ, INF-γ) 表現 (Hashioka *et al.*, 2007)。在長期利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 誘發腦損傷的動物實驗中，顯示大鼠海馬迴會增加介白素 (interleukin-1β, IL-1β) 表現，並且活化 p38、c-Jun N 端激酶 (jun N-terminal kinase, JNK) 蛋白，利用磷脂酰絲胺酸-微脂體 (phosphatidylserine-liposome, PS-liposome) 處理後可誘發介白素 (interleukin-10, IL-10) 生成抗發炎反應，並抑制 LPS 所誘導的微膠細胞活化，進而減少長期發炎所導致的腦損傷 (Nolan *et al.*, 2004)。因此在本研究中，我們提出魷魚皮磷脂質經重組後製成單層的微脂體，促使原本位於細胞膜內側的 PS 裸露於微脂體表面，形成擬態的細胞凋亡體，並討論魷魚皮磷脂質微脂體 (SQ-liposome) 擬態的細胞凋亡體是否具調節 LPS 誘發微膠細胞炎症反應的能力。

材料與方法

一、材料

(一) SQ-liposome 製備

魷魚皮為臺灣大宗水產加工品美洲大赤魷之副產物，由美而好水產股份有限公司所提供，萃取磷脂質係參考 Hwang *et al.* (2011) 及 Akbarzadeh *et al.* (2013) 之方法。

(二) 細胞株

本試驗所使用之 BV-2 老鼠腦部微膠細胞 (mouse, C57BL/6, brain, microglial cells)，係由臺灣大學動物科學技術學系所陳億乘老師提供。

(三) 試藥及試劑組

化學分析藥品購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)，細胞試驗藥品購自 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)，NO 定量試劑組 (Cat. 780001) 購自 Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)，發炎相關細胞激素包含 IL-6、IL-10、TNF-α 及 TGF-β 分析套組則購自 R&D System, Inc. (Minneapolis, MN, USA)。

二、實驗方法

(一) SQ-liposome 組成分析

SQ-liposome 的組成係參考 Kaduce *et al.* (1983) 利用高效液相層析系統搭配紫外偵檢器來完成。其中高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 標準品來源包含大豆磷脂質混合物 (Sigma P3817) 及大豆 PC 經轉移絲胺酸殘基的產物 PS (Sigma P0474)，分別精秤 10 mg 後溶於 1 ml 的乙醇溶液及 2 mg PS 溶於 1 ml 溶劑後，再與移動相溶劑 1:1 混和，經 0.22 μm Syringe filter 過濾後，作為標準液，HPLC 系統為 JASCO PU-2089 plus 配合 20 μl 樣品環，檢測器為 Shimadzu SPD-6A 之 UV 偵檢器，分析 202 nm 吸收波長，流速控制在 2 ml/min，幫浦臨界壓力設定為 70 MPa，移動相為乙腈：甲醇：硫酸 = 100:3:0.05，固定相使用分析級 HPLC 管柱為 Kromasil (4.6 × 250 mm)

60-5Si, 分析單一様品時間為 15 - 30 min, 以立行系統收集整合積分訊號。

(二) BV-2 細胞培養

BV-2 細胞, 使用 75T 培養瓶培養於含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 之 DMEM 培養液中, 將 75T 培養瓶置於 37°C 恆溫且含有 5% CO₂ 之培養箱中, 培養至八、九分滿時, 進行細胞的繼代培養。細胞的繼代培養首先將原來培養液抽乾, 以 PBS 沖洗兩次, 將細胞收集於 50 ml 的離心管, 另外於需要繼代培養的 75T 培養瓶中, 加入 14 ml 含有胎牛血清的培養液, 加入細胞液 1 ml 於培養瓶中。剩餘的細胞液於 4°C 溫度下, 以 1200 rpm 轉速離心 10 min。之後加入適量不含胎牛血清的 DMEM 培養液, 計數細胞, 分別培養於 3.5 cm 培養皿中或 96 孔細胞培養盤中。

(三) 添加 SQ-liposome 對 BV-2 細胞存活率之影響

爲了確認 SQ-liposome 對 BV-2 之細胞毒性, 故以 MTT assay 來測量 BV-2 在各種條件處理下的存活率。MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 爲一種 tetrazolium salt, 在活細胞中可藉由粒線體中 succinated-tetrazolium reductase system 將 MTT 的 tetrazolium ring 轉變爲非水溶性呈藍紫色的 formazan, 以 100 μ l DMSO 溶解後, 測於 570 nm 波長下吸光值, 相對細胞活存率的計算, 系爲各實驗組吸光值除以對照組之平均吸光值百分比。

(四) 以 Nile RED 染色觀察 RAW264.7 細胞吞噬 SQ-liposome

Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo [α] phenoxazine-5-one) 爲一脂溶性螢光染劑, 常用於測定堆積在細胞質中的脂質。利用 Nile Red 進行染色, 並觀察細胞吞噬作用的形成。將 2 x 10⁶ cells/ml RAW264.7 細胞, 接種於 6 孔培養盤中, 以含有 10% FBS 之 DMEM 培養基 37°C 培養隔夜, 待細胞貼附後, 精秤並配置成濃度 2.5、0.25 mg/ml 魷魚皮磷脂質, 置放於冰上經超音波

震盪 10 min, 以 0.22 μ m 無菌濾膜過濾 (Millex@GS, Millipore, IE), 得到 SQ-liposome 培養基, 對照組培養基則不含魷魚皮磷脂質; 貼附的細胞吸除培養液後, 分別添加不同濃度微脂體培養液, 培養 6 hr, 待細胞吞噬微脂體後, 吸除微脂體培養液, 以 PBS 浸潤清洗細胞 2 次, 去除未被吞噬的微脂體, 加入 50 ng/ml Nile Red PBS 溶液, 於 37°C 下培養 15 min, 再次以 PBS 浸潤清洗細胞 2 次, 利用螢光顯微鏡觀察 RAW264.7 細胞型態及微脂體蓄積情形。

(五) 細胞發炎物質 NO 濃度測定

Nitrite 分析試劑套組的原理多採用 Griess 轉化生成深紫色的偶氮化合物。實驗將 80 μ l 樣品之上清培養基先添加 10 μ l 硝酸還原酶及 10 μ l 酵素輔因子, 在室溫下作用 1 - 3 hr, 再分別加入 50 μ l 之 Griess 試劑 1 及 Griess 試劑 2, 總體積爲 200 μ l, 避光反應 20 分鐘後, 紫紅色產物以 ELISA reader 讀取 540 nm 之吸光值並與 NaNO₂ 的標準曲線比較, 扣除背景值, 即可換算得知樣品液中所含 Nitrite 之濃度。

(七) 發炎相關細胞激素分析

相關細胞激素 (IL-6、TNF- α 、IL-10、TGF- β) 濃度以酵素免疫分析法測定。將定量稀釋之各細胞激素之 Capture 抗體吸附於 96 孔盤, 抗體吸附隔夜後移除, 以 wash buffer 洗滌三次, 加入 300 μ l Blocking 試劑 (3% BSA) 以填滿未吸附抗體的區域, 作用 1 hr 後移除再以 wash buffer 洗滌三次, 適當稀釋樣品 (細胞上清液), 待測樣品加入 96 孔盤, 作用以 2 hr 後移除樣品液, wash buffer 洗滌三次, 再以 detection 抗體作用 2 hr, 移除未吸附之 detection 抗體, 最後加入受質溶液 tetramethylbenzidine substrate (NeA-Blue, Clinical science products Inc., USA) 進行呈色, 並以 2 M 硫酸終止成色反應, 利用 ELISA reader 偵測 OD 450 nm 吸光值, 搭配各細胞激素標準品以內插標準線性回歸, 求得待測樣品之細胞激素濃度。

(八) 統計

統計分析-試驗以 mean \pm SD 表示, 試驗採

三重複，數據之統計分析採用 Student's test 之統計方法進行差異性分析，顯著水準定為 $p < 0.05$ 。

結果與討論

一、SQ-liposome 組成分析

本研究中所使用的魷魚皮來源為美洲大赤魷，其總脂質含量佔樣品濕重 8.04%，其中磷脂質約佔總脂質含量 57.7%。以 HPLC 分析魷魚皮磷脂質組成與各種磷脂質在魷魚皮微脂體中比例 (Table 1)。結果顯示，PC 的含量為 $46.2 \pm 2.4\%$ ；PE 的含量為 $18.44 \pm 1\%$ ；PS 的含量為 $7.7 \pm 0.7\%$ ；PI 的含量為 $3.5 \pm 1.1\%$ ；Lyso-PC 的含量為 $4.9 \pm 2.4\%$ ；Lyso-PE 的含量為 $6 \pm 0.5\%$ ，中性脂 (Neutral lipid) 的含量為 $10.6 \pm 0.5\%$ ，神經鞘磷脂 (Sphingomyelin, SM) 的含量為 $0.8 \pm 0.1\%$ ，其他的含量為 $4.1 \pm 0.3\%$ 。在魷魚皮磷脂質分子內脂肪酸之組成，其中 EPA 及 DHA 分別佔總脂質含量 11.8 及 28.7%，多元不飽和脂肪酸比例高達 50% (Table 2)。

根據漁業署統計臺灣遠洋魷魚平均年產量約 150,000 mt，而魷魚加工後副產物約佔總產量 35%，其中約有 8 - 13% 為魷魚皮膜組織，由於其組織較為堅韌不易咀嚼，口感略帶苦澀，以往多被製成飼料添加劑使用。然而根據 Deng *et al.* (1998) 報告，赤魷 (*Ommastrephes bartrami*) 的皮膜可以當成含 DHA 結合型磷脂質來源，赤魷總脂質分別佔溼重及乾重皮膜的 2.5 及 14.7%，其中 80 - 85% 為磷脂質含量，主要 EPA 及 DHA 為主成分。另外，鳶烏賊 (*Sthenoteuthis oualaniensis*) 卵中總脂質含量為 6.27%，而磷脂質亦佔總脂質含量 72.1% (Wang *et al.*, 2008)。Saito (2014) 研究顯示，美洲大赤魷的 PUFA 以磷脂質的形態存在於魷魚外套膜、足及生殖腺，其中存在 PE 分子內之 EPA 為 17.2 - 28.8%、DHA 8.8 - 22.6%、花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA) 2.4 - 11.8%，而 PC 分子內則以 DHA 為主 (30.6 - 47.8%)。Calder *et al.* (2012) 研究顯示，無論是在人類或動物，飲食中部分脂肪酸會被代謝並儲存於細胞膜上的磷脂質，在發炎反應時經由生物合成之脂質延伸物調節發炎反應，其中 n-6 系列的 ARA 容易代謝成促發炎物質 (PE₂)，

Table 1 The phospholipid composition of squid integument extraction

Phospholipid classes	%*
Neural lipids	10.6±0.5
Phosphatidylinositol (PI)	3.5±1.1
Phosphatidylserine (PS)	7.7±0.7
Phosphatidylethanolamine (PE)	18.4±1
Phosphatidylcholine (PC)	46.2±2.4
Lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC)	4.9±2.4
Others	8.7±0.9

*data are averaged from three batch of extraction as mean ± SEM (n=3).

Table 2 The fatty acid composition in phospholipid extract of squid integument

Fatty Acid	%
Palmitic Acid (C 16:0)	27.2
Margaric Acid (C 17:0)	1.5
Stearic Acid (C 18:0)	8.4
Oleic Acid (C 18:1)	2.6
Gadoleic Acid (C 20:1)	7.7
Arachidonic Acid (C 20:4 ω-6)	4.8
Eicosapentaenoic Acid (EPA) (C 20:5 ω-3)	11.8
Erucic Acid (C 22:1)	1.1
Docosahexaenoic Acid (C 22:6 ω-3)	28.7
Others	6.3
Monounsaturated Fatty Acid	12.5
Polyunsaturated Fatty Acid	47.4
Saturated Fatty Acid	40.1

n-3 系列 (EPA 及 DHA) 則被合成為緩解素、保護素 (Siriwardhana *et al.*, 2012)。另外，在腦部 DHA 則被代謝成神經保護素減緩發炎反應 (Calder, 2015)。本研究在分別分析魷魚皮磷脂質及其脂肪酸組成後，進一步將定量的魷魚皮磷脂質，加入細胞培養液中，並以超音波處理後，製備成微脂體溶液，分析微脂體粒徑約為 100 nm，Fan and Zhang (2013) 的研究指出，一般單層及多層微脂體的粒徑分布分別為 20 - 250 nm 及 1 - 5 μm，因此本文所製備的 SQ-liposome 應屬單層微脂體，當製備成單層微脂體後，原本位於正常細胞膜內頁的 PS 分子，就會被裸露於微脂體的表

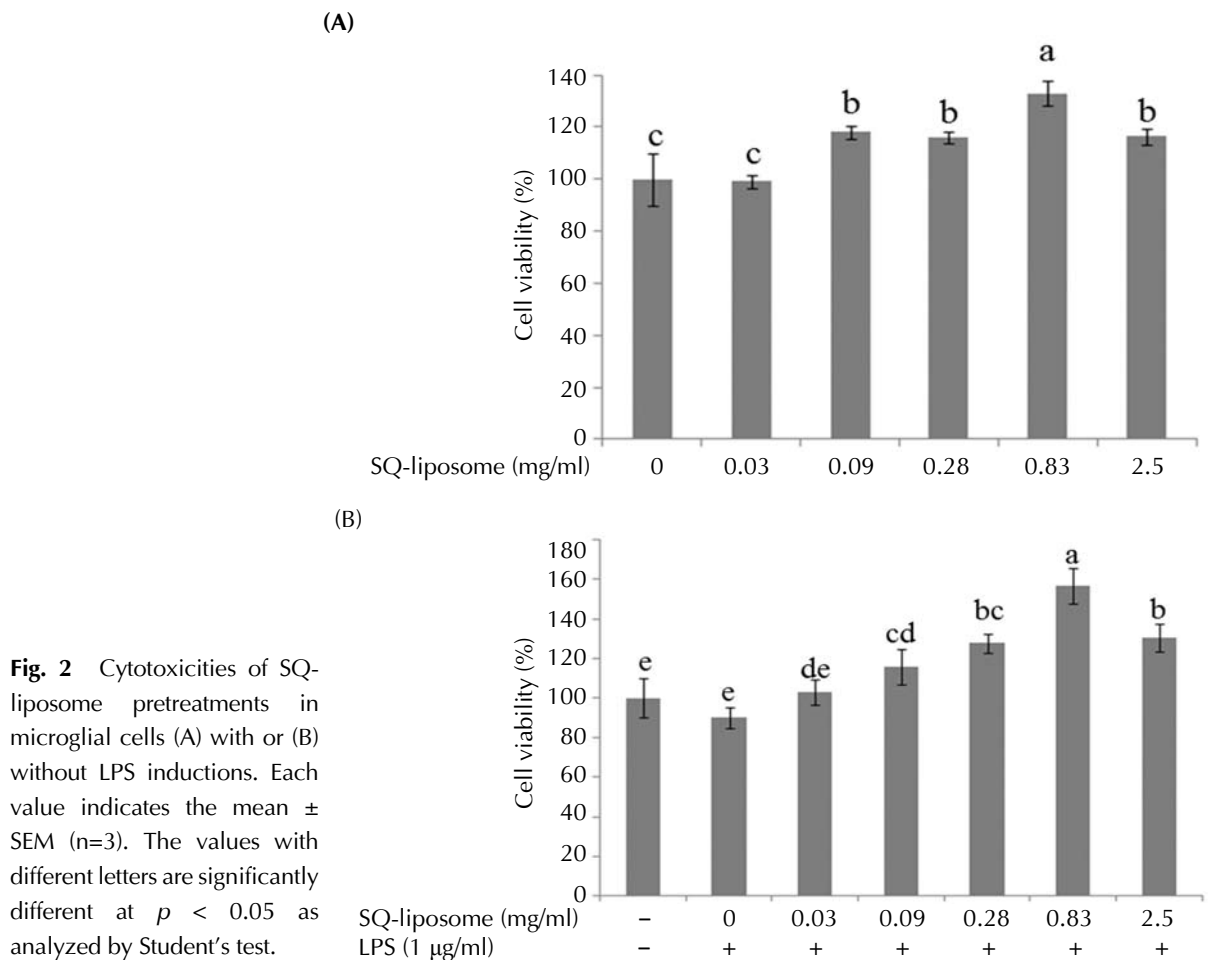


Fig. 2 Cytotoxicities of SQ-liposome pretreatments in microglial cells (A) with or (B) without LPS inductions. Each value indicates the mean \pm SEM ($n=3$). The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Student's test.

面，就像是細胞凋亡體一樣可被巨噬細胞辨識，除了可供巨噬細胞辨識的機能性 PS 外，魷魚皮磷脂質更富含 EPA 及 DHA，因此推論兩者在啟動生物體緩解發炎反應中可能產生協同作用。

二、添加 SQ-liposome 對 BV-2 細胞存活率之影響

SQ-liposome 對 BV-2 細胞毒性之試驗結果顯示，SQ-liposome 添加濃度在 2.5 mg/ml 以下，經 BV-2 細胞吞噬 4 hr 後，細胞存活率皆高於 90% ($p < 0.05$) (Fig. 1 A)。添加濃度提高至 2.5 mg/ml 以上時，則部分細胞會濃縮聚集，形成凋亡細胞樣態。

以 LPS 誘導 BV-2 細胞發炎，探討 SQ-liposome 預處理與否對細胞存活率之影響。以 1 μ g/ml LPS 誘導細胞發炎，結果發現 BV-2 細胞存活率降至約 90% ($p < 0.05$)。預先以 0.03 – 2.5 mg/ml SQ-liposome 作用，再添加 1 μ g/ml LPS

處理，則 BV-2 細胞的存活率隨著 SQ-liposome 的添加濃度而提高 ($p < 0.05$) (Fig. 1 B)。SQ-liposome 主要成分多為 PC、PE 及 PS 等磷脂質。其中海洋產製的 PC 及 PS 經美國食品藥物管理局認定為 GRAS (generally recognized as safe) 營養補充劑 (US FDA, 2007, 2009)；然而，Mayhew et al. (1987) 體外細胞實驗中認為不同的微脂體粒徑及組成可能存在著細胞毒性，像是外層帶有負電荷的 PS 及 PG 微脂體比未帶電荷的微脂體較具毒性。另外，Rustum (1979) 及 Hart (1981) 研究團隊也分別在細胞及動物的實驗中證實 PS 微脂體的細胞毒性。Kobayashi (1991) 更進一步指出，中國倉鼠卵巢細胞提供外源性 PS 時，會經由細胞膜上的胺基磷脂質轉位蛋白將 PS 內化，然而過量的給予外源性 PS 則會引發細胞凋亡 (Uchida et al., 1998)，而這樣的凋亡現象，亦同時提供巨噬細胞“eat me”的訊息，進一步其啟動凋亡細胞的胞葬作用 (efferocytosis)。PS 或 SQ-liposome 在高劑量短時間的作用可能導致細胞膜結構的不穩定，

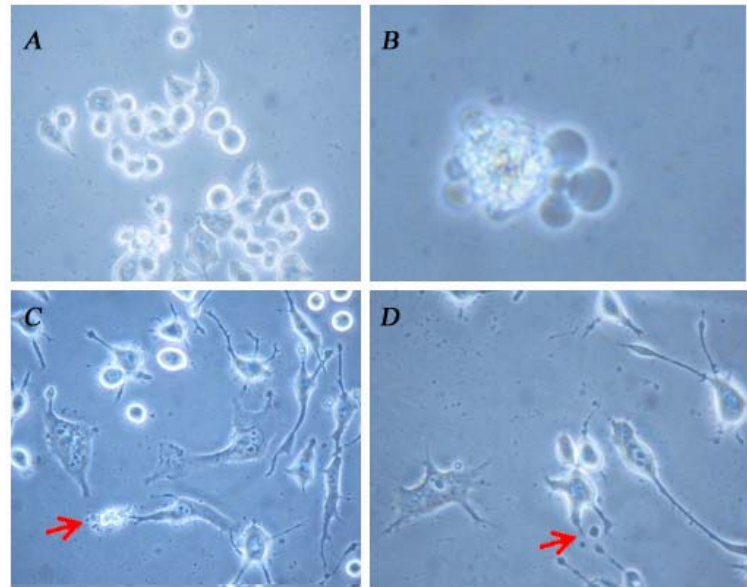


Fig. 2 The microscopic images of (A) BV-2 cell (untreated control), (B) undergoing apoptosis of BV-2, (C) and (D) undergoing efferocytosis of BV-2. The red arrows indicated that the BV-2 cells engulfed and cleaned nearby apoptotic bodies.

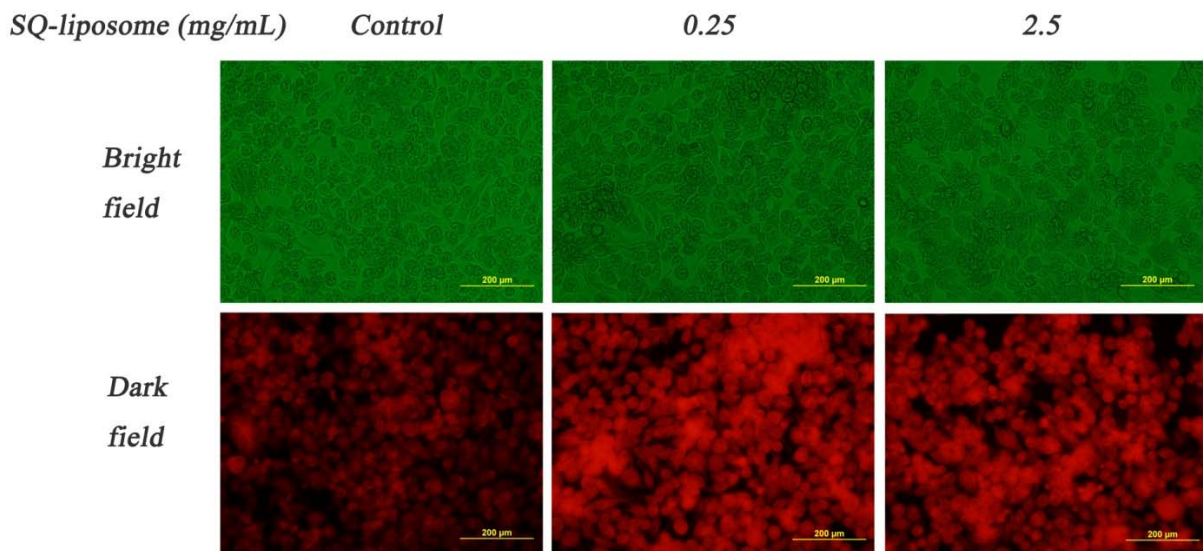


Fig. 3 Engulfment microscopy images of microglial cells by Nile red staining.

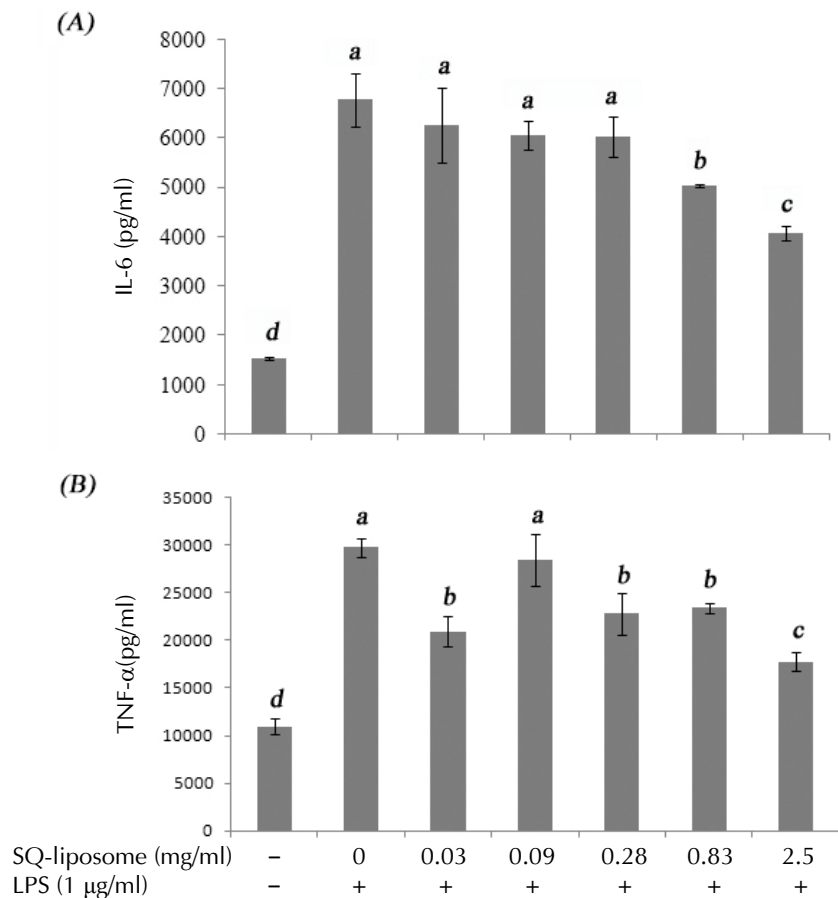
可能誘使細胞加速凋亡；反之，在適當的劑量下則有助於細胞對抗 LPS 所引起的氧化壓力或啟動緩解發炎機制。本實驗結果顯示，預先處理 SQ-liposome 可能降低 LPS 對 BV-2 細胞的細胞毒性，並增加細胞的存活率。

三、BV-2 細胞吞噬 SQ-liposome

本實驗首先觀察微 BV-2 細胞培養的過程，其中細胞老化後會行凋亡作用 (Fig. 2A & B)，此時細胞本體會分解為多個次單位的細胞凋亡體，

鄰近周遭健康的 BV-2 細胞則行胞葬作用 (efferocytosis) 清除細胞凋亡體 (Fig. 2C & D)。為了進一步確認，BV-2 是否會像吞噬細胞凋亡體一樣吞噬 SQ-liposome，我們將培養在成長期的 BV-2 細胞，添加 0.25 及 2.5 mg/ml SQ-liposome 處理 4 hr，發現細胞質中液泡的數量明顯增加 (Fig. 3, bright field)，進一步以 Nile Red 染色法分析 BV-2 細胞對微脂體蓄積的能力，觀察 BV-2 細胞質內 SQ-liposome 蓄積的趨勢，顯示 BV-2 細胞能吞噬帶有 PS 的 SQ-liposome (Fig. 3, dark field)。巨噬細胞辨識凋亡細胞的過程，主要經由辨識凋

Fig. 4 Effects of SQ liposomes on secretion of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced BV-2 cells inducing (A) IL-6 and (B) TNF- α . Data are given as mean \pm S.D. (n=3). The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Student's test.



亡細胞膜上的 PS。當細胞老化或凋亡時，原本位於細胞膜內側 PS 會轉移到外側，發出類似“eat me”訊號，誘導巨噬細胞進行吞噬作用，此過程稱為胞葬作用 (Cavaillon, 2013; Takaoka *et al.*, 2014; Kumar and Birge, 2016; Birge *et al.*, 2016)。Hoffmann *et al.* (2001) 在凋亡細胞吞噬作用中證明，不管巨噬細胞參與辨識 PS 受體為那種型態，若細胞凋亡體表面沒有顯露 PS，巨噬細胞的吞噬作用則不會發生。Geelen *et al.* (2012) 研究顯示，微脂體中含有 6% PS 就能夠誘使被巨噬細胞辨識並吞噬，然而若 PC-liposome 中未含有 PS，則微脂體僅會附著於巨噬細胞表面並不會被吞噬。發炎反應是一種生物體防禦外來病原的機制，而有效的清除發炎、死亡細胞及其殘骸，是組織由發炎狀態回復正常的重要關鍵，當此過程出現了變化，生理便可能走向慢性發炎的途徑，進而損害各種功能性組織，增加慢性病之發生率。因此，藉由清除因發炎而死亡的細胞及殘骸，成為影響細胞走向促發炎或延緩發炎環境

的關鍵因素 (Korns *et al.*, 2011; Freire and Van Dyke, 2013)。在本研究中，魷魚皮磷脂質組成成分中含有 7.7% PS，重新組合魷魚皮磷脂質成為一單層微脂體，能促使原本為於細胞膜內側 PS 裸露於微脂體表面，進一步被 BV-2 細胞所辨識及吞噬。

四、預處理 SQ-liposome 對“促”發炎細胞激素之影響

BV-2 細胞經 1 μ g/ml LPS 誘導 18 hr 後，相較於對照組，細胞上清液中的 IL-6 濃度明顯上升至 6.8 μ g/ml ($p < 0.05$) (Fig. 4A)；若預先處理含有 0.83 - 2.5 mg/ml SQ-liposome 培養液 4 hr，則細胞上清液中 IL-6 濃度顯著調降至 6.3 - 4.0 μ g/ml ($p < 0.05$)，並具有劑量性。另外，BV-2 細胞經 1 μ g/ml LPS 誘導 18 hr 後，細胞上清液中 IL-6 濃度相較於對照組明顯增加 3 倍 (10.9 μ g/ml \rightarrow 29.7 μ g/ml) ($p < 0.05$) (Fig. 4A)；若預先處理含有

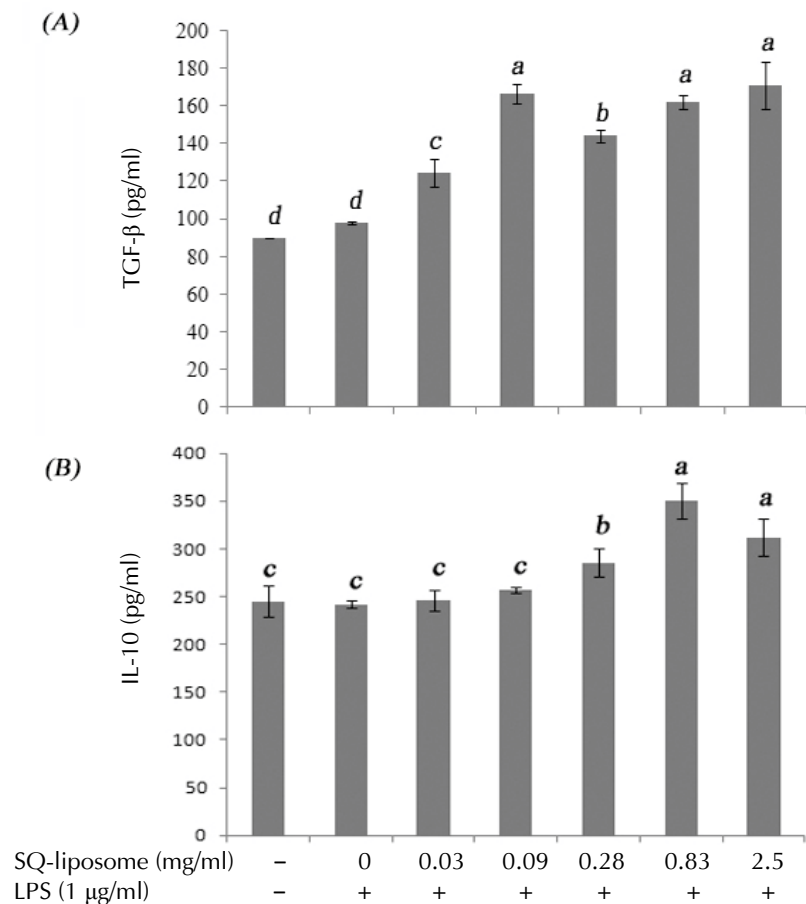
0.2 – 2.5 mg/ml SQ-liposome 培養液，則細胞上清液中 TNF- α 濃度有顯著調降 ($p < 0.05$) (Fig. 4B)，並隨預處理 SQ-liposome 濃度提高，TNF- α 被抑制的效果越佳；尤其是 2.5 mg/ml SQ-liposome 組，細胞上清液中 TNF- α 含量降至 17.8 $\mu\text{g/ml}$ (對照組 29.7 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0.05$) (Fig. 4B)。顯示 BV-2 細胞預處理含 SQ-liposome 的培養基 4 hr，能顯著抑制 LPS 誘導促發炎細胞激素 TNF- α 的表現。在正常情形下，神經系統中的 TNF- α 能夠調節神經元突觸的可塑性、學習與記憶、睡眠、飲食的攝取及穩定星狀細胞的訊息傳導；反之神經損傷下，由微膠細胞所分泌大量的 TNF- α ，負責神經發炎與免疫系統的活化，進而引發各種神經失調相關病變。持續性神經發炎或是神經興奮性毒性 (excitotoxicity) 是造成腦神經退化的主要原因之一，例如：腦部創傷、缺血、阿茲海默症、帕金森氏症及多發性硬化症等疾病中，都發現 TNF- α 異常增加 (Olmos and Lladó, 2014)。TNF- α 的增加會促使血管內皮黏附因子的表現，進而吸引大量的免疫細胞聚集、黏附並穿透微血管進入缺血的大腦區域，造成中性球及巨噬細胞浸潤於組織間隙，引發組織的促發炎反應。藉由抑制 TNF- α 生成或阻斷作用的路徑被認為可以阻止白血球浸潤於缺血性大腦，減少腦組織損壞 (Feuerstein *et al.*, 1994)。同時，中樞神經受到創傷或感染時，神經元細胞 (neuron)、微膠細胞 (microglia)、星狀細胞 (astrocyte) 及內皮細胞 (endothelial cells) 亦會增加 IL-6 表現。在一些病毒性腦膜炎臨床案例、腦炎動物模式老鼠以及急性病毒感染病患的腦脊髓液中，都觀察到 IL-6 大量表現，並參與與調控中樞神經系統發炎相關角色；另外，在一些系統性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus) 及感染愛滋病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 病患的腦脊髓液中，也檢測到高量的 IL-6 (Erta *et al.*, 2012)。在急性發炎反應所引起的發燒現象中，IL-6 輕易穿過血腦屏障，誘發下視丘開始合成 PGE₂，進而改變人體的恆溫。研究人員發現，在阿茲海默症患者大腦類澱粉斑塊週遭及腦脊髓液中，IL-6 的表現量也都有增加 (Hampel *et al.*, 2005)；這些研究結果顯示，IL-6 在腦部發炎反應上扮演重要的角色。另外，在多發性硬化症 (multiple sclerosis) 病

患，IL-6 顯示會誘導 T 細胞增生，並藉由調升血管內皮細胞黏附因子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 的表現，促使 T 細胞及單核球浸潤於中樞神經 (Erta *et al.*, 2012)。Hashioka (2007) 研究顯示，微膠細胞預處理 PS-liposome 會調降類澱粉蛋白/干擾素 (A β /IFN- γ) 所誘導微膠細胞 TNF- α 的生成，並指出 PS-liposome 作用在微膠細胞上，兼具抗發炎及抗氧化特性。雖然，誘導微膠細胞發炎的物質略有不同，但預處理擬態凋亡細胞的 PS-liposome 或是 SQ-liposome，皆能調降 TNF- α 的生成，與本實驗結果相似，預處理 SQ-liposome 能調降 LPS 所誘導 BV-2 細胞表現 IL-6 及 TNF- α 。

五、預處理 SQ-liposome 對"抗"發炎細胞激素之影響

BV-2 細胞單獨處理 LPS 18 hr，細胞上清液中 TGF- β (Fig. 5A) 及 IL-10 (Fig. 5B) 與對照組相比並沒有顯著性差異 ($p > 0.05$)。0.03 – 2.5 mg/ml 之 SQ-liposome BV-2 細胞預處理 4 hr，再以 LPS 誘導發炎 18 hr，細胞上清液中 TGF- β 相較於單獨處理 LPS 組顯著增加 1.3 – 1.7 倍 ($p > 0.05$)。BV-2 細胞預處理 0.28 – 2.5 mg/ml 之 SQ-liposome 4 hr，再以 LPS 誘導發炎 18 hr，細胞上清液中，IL-10 相較於單獨處理 LPS 組顯著增加 1.2 – 1.5 倍 ($p > 0.05$)。Di Santo *et al.* (1995) 將 IL-10 (75 ng) 注射入小鼠顱內，顯示 IL-10 會抑制 LPS 誘導腦部產生 TNF- α 及 IL-1 β 。Szczepanik *et al.* (2001) 指出，IL-10 能抑制大腦中微膠細胞促發炎細胞激素的生成。Bachis *et al.* (2001) 則證實 IL-10 能避免大鼠小腦顆粒細胞的死亡，可見 IL-10 在 LPS 所誘導的腦部發炎中，似乎扮演抗發炎的角色。另外，巨噬細胞在吞噬凋亡細胞 (apoptotic cell) 之後，會啟動下游延緩發炎一系列反應，例如：在體外細胞實驗中，人類單核球所分化的巨噬細胞或老鼠的巨噬細胞 (J774) 在吞噬凋亡細胞後能調降促發炎介質的表現，並誘導巨噬細胞走向抗發炎途徑 (Fadok *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1999)。Chen *et al.* (2001) 發現，利用 T 細胞餵食巨噬細胞後所分泌的 TGF- β ，在 LPS 誘導發炎的巨噬細胞上會抑制 TNF- α

Fig. 5 Effects of SQ liposomes on secretion of anti-inflammatory cytokines in LPS-induced BV-2 cells inducing (A) TGF- β and (B) IL-10. Data are given as mean \pm S.D. (n=3). The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Student's test.



的生成。Huynh *et al.* (2002) 研究顯示，當巨噬細胞吞噬凋亡細胞後，抗發炎細胞激素 TGF- β 1 表現量增加，而達到緩解發炎反應的效果。利用 PS-liposome 模擬凋亡細胞，餵食老鼠腹腔中的單核球或腦部微膠細胞，證實 PS-liposome 具有抗細胞發炎的效果 (Zhang *et al.*, 2006; Hashioka *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011)，並經由增加 TGF- β 的表現 (Otsuka *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Otsuka *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011)，抑制 NO、IL-1 β 及 TNF- α 分泌 (Simone *et al.*, 2004; Ajmone-Catetal. *et al.*, 2003)。Hashioka (2007) 也證實 PS-liposome 作用在微膠細胞上兼具抗發炎及抗氧化特性。在 BV-2 細胞預處理 SQ-liposome 能提升 TGF- β 及 IL-10 的表現與 Huynh *et al.* (2002) 結果相似，而 TGF- β 及 IL-10 的調升，進而抑制腦部發炎所導致促發炎細胞激素的分泌，亦與前述預處理 SQ liposome 調降 IL-6 及 TNF- α 表現的結果一致。

六、預處理 SQ-liposome 對一氧化氮合成之影響

BV-2 細胞經 1 μ g/ml LPS 誘導發炎 24 hr，細胞上清液中一氧化氮的濃度相較於對照組增加 1.7 倍 ($p < 0.05$) (Fig. 6)；若預先給予 0.03 – 2.5 mg/ml SQ liposome 處理 4 hr 後，再以 LPS 誘導發炎 24 hr，則抑制 NO 的效果會隨著 SQ-liposome 的添加濃度而顯著增加 ($p < 0.05$)。Aramaki *et al.* (1996) 利用老鼠巨噬細胞，探討不同成分微脂體對 LPS 誘導促發炎介質 NO 生成之影響，指出帶有負電荷的磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 微脂體 (PA-liposome) 及 PS-liposome，均能抑制 NO 的生成，且具有劑量依存關係，PC-liposome 則不具有抑制效果。Aramaki *et al.* (2001) 進一步證實 PS-liposome 是經由抑制 p38/MAPK 途徑，影響 NO 合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) mRNA 表現進而減少 NO 合成。Freire-de-Lima *et al.* (2006) 研究指

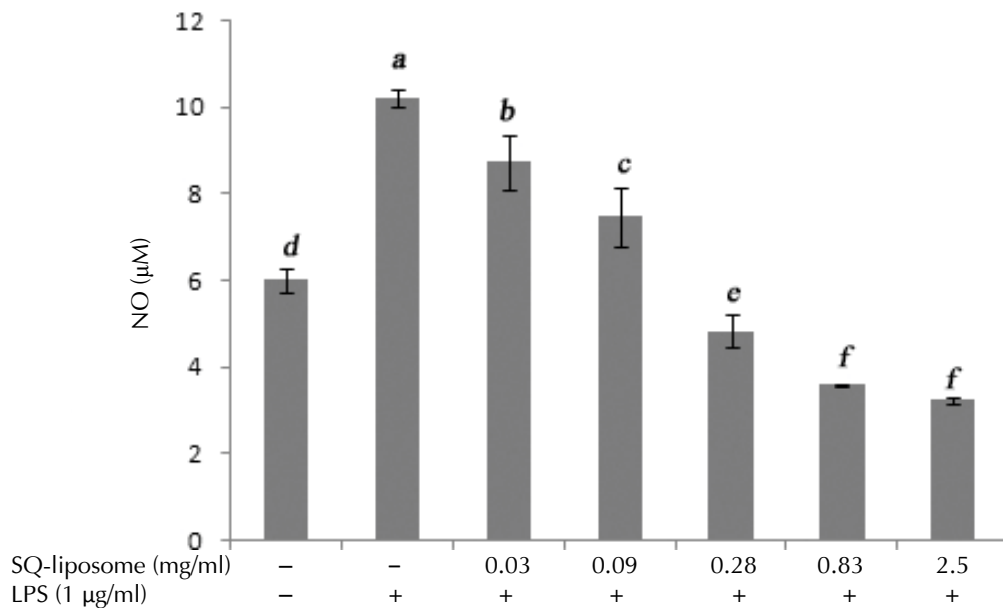


Fig. 6 Effects of SQ liposomes on secretion of inflammatory mediator NO in LPS-induced BV-2 cells. Data are given as mean \pm S.D. (n=3). The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Student's test.

出，巨噬細胞藉由辨識凋亡細胞表面的 PS，吞噬清除凋亡細胞，並活化 TGF- β 的表現，且經由抑制 NO 合成酶，促進精胺酸酶的活性，來抑制下游發炎介質 NO 的合成。上述研究與本研究結果一致，顯示魷魚皮磷脂質經重組後的 SQ-liposome 與凋亡細胞或擬態凋亡細胞的 PS-liposome 相似，皆能在被巨噬細胞吞噬後進一步調降 LPS 所誘導的 NO 合成，達到調節發炎的作用。

結 論

魷魚皮是水產加工的副產物，本研究結果顯示，自魷魚皮萃取的磷脂質，經重組製成約 100 nm 單層的微脂體，可促使 PS 分子裸露在微脂體表面，如同 PS 裸露的細胞凋亡體能誘使巨噬細胞進行胞葬作用。利用 LPS 誘導 BV-2 細胞發炎的實驗中，證實預處理 SQ-liposome 可以調降 LPS 所誘導 BV-2 細胞“促”發炎細胞激素（如 IL-6、TNF- α ）分泌，並且有助於增加細胞上清液中“抗”發炎細胞激素（如 TGF- β 、IL-10）表現，進一步降低發炎介質（NO）合成；亦即本研究利用魷魚皮再生資源萃取磷脂質，製備擬態細胞凋亡

體的 SQ-liposome，此 SQ-liposome 具有抑制 LPS 誘發 BV-2 細胞發炎反應之功效，期待未來能利用於延緩腦部發炎所導致的神經病變。

謝 辭

本研究特別感謝行政院農業委員會科技計畫編號 104AS-11.4.1-AI-A1 及 105AS-11.4.1-AI-A1 在研究經費的贊助；另外要感謝國立台灣海洋大學海洋中心提供研究所需之儀器設備的借用，特此致謝。

參考文獻

- Akbarzadeh, A., R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi and K. Nejati-Koshki (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.*, 8(1): 102-110.
- Ajmone-Cat, M. A., R. D. Simone, A. Nicolini and L. Minghetti (2003) Effects of phosphatidylserine on p38 mitogen activated protein kinase, cyclic AMP responding element binding protein and nuclear factor- κ B activation in resting and activated microglial cells. *J. Neurochem.*, 84(2): 413-416.

- Aramaki, Y., R. Matsuno and S. Tsuchiya (2001) Involvement of p38 MAP Kinase in the inhibitory effects of phosphatidylserine liposomes on nitric oxide production from macrophages stimulated with LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280(4): 982-987.
- Aramaki, Y., F. Nitta, R. Matsuno, Y. Morimura and S. Tsuchiya (1996) Inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 220(1): 1-6.
- Birge, R. B., S. Boeltz, S. Kumar, J. Carlson, J. Wanderley, D. Calianese, M. Barcinski, R. A. Brekken, X. Huang, J. T. Hutchins, B. Freimark, C. Empig, J. Mercer, A. J. Schroit, G. Schett and M. Herrmann (2016) Phosphatidylserine is global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.*, 23(6): 962-978.
- Calder, P. C. (2012) Mechanism of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.*, 142(3): 592-599.
- Calder, P. C. (2015) Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1851(4): 469-484.
- Cavaillon, J. M. (2013) Sir Marc Armand Ruffer and Giulio Bizzozero: the first reports on efferocytosis. *J. Leukoc. Biol.*, 93(1): 39-43.
- Chen, W., M. E. Frank, W. Jin and S. M. Washl (2001) TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*, 14(6): 715-25.
- Di Santo, E., M. Sironi, P. Pozzi, P. Gnocchi, A. M. Isetta, A. Delvaux, M. Goldman, A. Marchant and P. Ghezzi (1995) Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin-1 beta production in brain without affecting the activation of hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*, 2(3): 149-154.
- Deng, C., K. Watanabe, K. Yazawab and S. Wad (1998) Potential for utilization of the lipid and DHA-rich fatty acid of integument of squid *Ommastrephes bartrami*. *Food Res. Int.*, 31(10): 697-701.
- Erta, M., A. Quintana and J. Hidalgo (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int. J. Biol. Sci.*, 8(9): 1254-1266.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott and P. M. Henson (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.*, 101(4): 890-898.
- Fan, Y. and Q. Zhang (2013) Development of liposomal formulations: from concept to clinical investigations. *Asian J. Pharm. Sci.*, 8(2): 81-87.
- Feuerstein, G. Z., T. Liu and F. C. Barone (1994) Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 6(4): 341-360.
- Freire, M. O. and T. E. Van Dyke (2013) Natural resolution of inflammation. *Periodontol.* 2000, 63(1): 149-164.
- Freire-de-Lima, C. G., Y. Q. Xiao, S. J. Gardai, D. L. Bratton, W. P. Schieman and P. M. Henson (2006) Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J. Biol. Chem.*, 281(50): 38376-38384.
- Geelen, T., S. Y. Yeo, L. E. M. Pulis, L. W. E. Starmans, K. Nicolay and G. J. Strijkers (2012) Internalization of paramagnetic phosphatidylserine-containing liposomes by macrophages. *J. Nanobiotechnology*, 10: 37.
- Hampel, H., A. Haslinger, M. Scheloske, F. Padberg, P. Fischer, J. Unger, S. J. Teipel, M. Neumann, C. Rosenberg, R. Oshida, C. Hulette, D. Pongratz, M. Ewers, H. A. Kretzschmar and H. J. Möller (2005) Pattern of interleukin-6 receptor complex immunoreactivity between cortical regions of rapid autopsy normal and Alzheimer's disease brain. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 255(4): 269-278.
- Hart, I. R., W. E. Fogler, G. Poste and I. J. Fidler (1981) Toxicity studies of liposome-encapsulated immunomodulators administered intravenously to dogs and mice. *Cancer Immunol. Immunother.*, 10(2-3): 157-166.
- Hashioka, S., Y. H. Han, S. Fujii, T. Kato, A. Monji, H. Utsumi, M. Sawada, H. Nakanishi and S. Kanba (2007) Phosphatidylserine and phosphatidylcholine-containing liposomes inhibit amyloid beta and interferon-gamma-induced microglial activation. *Free Radic. Biol. Med.*, 42(7): 945-54.
- Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, C. A. Ogden, Y. Leverrier, D. L. Bratton, D. L. Daleke, A. J.

- Ridley, V. A. Fadok and P. M. Henson (2001) Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance and apoptotic cells. *J. Cell Biol.*, 155(4): 649-659.
- Huynh, M. L., V. A. Fadok and P. M. Henson (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.*, 109(1): 41-50.
- Hwang, P. A., Y. G. Tsai, S.Y. Gau, Y. L. Hung and C. C. Fan (2011) Neuroprotective effects of the lipidic extract from integument of squid (*Dosidicus Gigas*). *J. Mar. Sci. Tech.*, 19(1): 101-106.
- Kaduce, T. L., K. C. Norton and A. A. Spector (1983) A rapid, isocratic method for phospholipid separation by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.*, 24(10): 1398-1403.
- Kim, Y. S. and T. H. Joh (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp. Mol. Med.*, 38(4): 333-347.
- Kobayashi, T. and Y. Arakawa (1991) Transport of exogenous fluorescent phosphatidylserine analogous to the Golgi apparatus in cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 113(2): 235-248.
- Korns, D., S. C. Frasch, R. Fernandez-Boyanapalli, P. M. Henson and D. L. Bratton (2011) Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front. Immunol.*, 2: 57-67.
- Kumar, S. and R. B. Birge (2016) Efferocytosis. *Curr. Biol.*, 26(13): R559-559.
- Mayhew, E., M. Ito and R. Lazo (1987) Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells. *Exp. Cell Res.* 171(1): 195-202.
- McDonald, P. P., V. A. Fadok, D. Bratton and P. M. Henson (1999) Transcriptional and Translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF- β in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J. Immunol.*, 163(11): 6164-6172.
- Nolan, Y., D. Martin, V. A. Campbell and M. A. Lynch (2004) Evidence of a protective effect of phosphatidylserine-containing liposomes on lipopolysaccharide-induced impairment of long-term potentiation in the rat hippocampus. *J. Neuroimmunol.*, 151(1-2): 12-23.
- Olmos G. and J. Lladó (2014) Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators inflamm.*, 214: Article ID 861231, 12.
- Rustum, Y. M., C. Dave, E. Mayhew and D. Papahadjopoulos (1979) Role of liposome type and route of administration in the antitumor activity of liposome-entrapped 1- β -D-arabinofuranosylcytosine against mouse L1210 leukemia. *Cancer Res.*, 39(4): 1390-1395.
- Olmos, G. and J. Lladó (2014) Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators inflamm.*, doi: 10.1155/2014/861231.
- Olivas, R. R., O. R. Sández, N. F. Haard, R. P. Aguilar and J. M. E. Brauer (2004) Changes in firmness and thermal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Eur. Food Res. and Technol.*, 219(4): 312-315.
- Otsuka, M., K. Goto, S. Tsuchiya and Y. Aramaki (2005) Phosphatidylserine-Specific Receptor Contributes to TGF- β Production in Macrophages through a MAP Kinase, ERK. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(9): 1707-1710.
- Otsuka, M., Y. Negishi and Y. Aramaki (2007) Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase and ERK pathways in the production of TGF- β 1 by macrophages treated with liposomes composed of phosphatidylserine. *FEBS Lett.*, 581(2): 325-330.
- Saito, H., M. Sakai and T. Wakabayashi (2014) Characteristics of the lipid and fatty acid compositions of Humboldt squid, *Dosidicus gigas*: The trophic relationship between the squid and its prey. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 116(3): 360-366.
- Siriwardhana, N., N. S. Kalupahana and N. Moustaid-Moussa (2012) Health benefits on n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv. Food Nutr. Res.*, 65: 211-222.
- Simone, R. D., M. A. Ajmone-Cat and L. Minghetti (2004) Atypical antiinflammatory activation of microglia induced by apoptotic neurons. *Mol. Neurobiol.*, 29(2): 197-212.
- Szczepanik, A. M., S. Funes, W. Petko and G. E. Ringheim (2001) IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A β (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J. Neuroimmunol.*, 113(1): 49-62.
- Takaoka, Y., S. Goto, T. Nakano, H. P. Tseng, S. M. Yang, S. Kawamamoto, K. Ono and C. L. Chen (2014)

- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced, sepsis-related severe acute lung injury in mice. *Sci. Rep.*, 4: 5024.
- Uchida, K., K. Emoto, D. L. Daleke, K. Inoue and M. Umeda (1998) Induction of apoptosis by phosphatidylserine. *J. Biochem.*, 123(6): 1073-1078.
- US FDA. (2007) Generally recognized as safe (GRAS) notice for Lecithin derived from krill. GRAS noted GRN No. 226. Available from <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=226>> Accessed on 05.31.2007
- US FDA. (2009) Generally recognized as safe (GRAS) notice for Phosphatidylserine derived from fish. GRAS noted GRN No. 279. Available from <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=279>> Accessed on 01.30.2009.
- Wang, Q., C. Xue, Z. Li and J. Xu (2008) Analysis of DHA-rich phospholipids from egg of squid. *J. Food Compos. Anal.*, 21(4): 356–359.
- Wu, Z. and H. Nakanishi (2011) Phosphatidylserine-containing liposomes: potential pharmacological interventions against inflammatory and immune diseases through the production of prostaglandin E2 after uptake by myeloid derived phagocytes. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 59(3): 195-201.
- Zhang, J., S. Fujii, Z. Wu, S. Hashioka, S. Y. Tanaka, A. Shiratsuchi, Y. Nakanishi and H. Nakanishi (2006) Involvement of COX-1 and up-regulated prostaglandin E synthases in phosphatidylserine liposome-induced prostaglandin E2 production by microglia. *J. Neuroimmunol.*, 172(1-2): 112-120.

The Effects of Phospholipid Liposome Prepared from Squid Skin on LPS Induced Microglial Cell Inflammation

Yi-Feng Kao^{1,2*}, Yi-Ling Lin², Wei-Yi Li¹ and Yi-Chen Chen²

¹Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

²Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University

ABSTRACT

Microglial cell is a macrophage that resides in brain. However, overactive microglial cells may result in brain neuron damage or inflammation. Recent studies show that the initiation of anti-inflammatory is triggered by macrophage engulfed apoptotic bodies. In this study, the liposome (SQ-liposome) was made from phospholipids extracted from squid skin, and used to mimic apoptotic body. The anti-inflammatory effects of SQ-liposome were then evaluated on the lipopolysaccharide (LPS) induced mouse microglial cell line (BV-2). The major phospholipid constituents in the squid skin extract was including 46.2% of phosphatidylcholine, 18.4% of phosphatidylethanolamine, 7.7% of phosphatidylserine, 3.5% of phosphatidylinositol, 4.9% of Lysophosphatidylcholine, and 19.3% of other phospholipids in HPLC-UV analysis. An approximately 100 nm of SQ-liposome was prepared by ultrasonication. There was no cytotoxicity to BV-2 as the concentration of SQ-liposome was less than 2.5 mg/ml after microglial cells engulfed SQ-liposome. The LPS induced pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), were significantly suppressed ($p < 0.05$) by pretreated 0.83~2.5mg/ml SQ liposome. Oppositely, the anti-inflammatory cytokines transforming growth factor-beta (TGF- β) and interleukin-10 (IL-10) secretion were enhanced ($p < 0.05$). The results suggested that SQ-liposome possess anti-inflammatory properties on BV-2 and may be a good strategy for against neuro-inflammatory disease.

Key words: anti-neuroinflammation, macrophage, functional liposome, apoptotic mimicry

*Correspondence: 199 Hou-lh Road, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2462-2101 ext. 2837 ; FAX: (02)2462-3306; E-mail: yfkao@mail.tfrin.gov.tw