

正鰹 (*Katsuwonus pelamis*) 頭磷脂質微脂體對脂多醣誘導老鼠肺泡巨噬細胞發炎反應之影響

高翊峰^{1,2*} · 林怡伶² · 陳柏璇¹ · 羅子鈞¹ · 蔡慧君¹

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

肺炎死亡率近年已高居臺灣十大死因第三位，因此，本研究旨在利用水產加工副產物開發肺部保健產品。先前實驗已證實魷魚皮微脂體 (SQ-lip.) 具緩解巨噬細胞及腦部微膠細胞發炎之功效，本研究進一步以正鰹 (*Katsuwonus pelamis*) 頭磷脂質為原料，製備擬態凋亡細胞之正鰹頭微脂體 (SJH-lip.)，並以脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS) 誘導老鼠肺泡巨噬細胞 (MH-S) 發炎，以評估 SJH-lip. 對調節發炎之功效。另外，以自行開發之霧化機產製氣膠態正鰹頭微脂體 (aSJH-lip.)，並模擬肺腔給藥，以評估其功效。結果在 MH-S 細胞上，以 111 - 333 $\mu\text{g/mL}$ SJH-lip. 預處理組，可顯著調降 LPS 誘導促發炎細胞激素 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 之分泌 ($p < 0.05$)；以 0.1 - 1 mg/mL SJH-lip. 預處理後，則可顯著調降 LPS 誘導 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 細胞內 mRNA 表現量 ($p < 0.05$)。模擬肺腔給藥實驗中，以 1 - 3 mg/mL aSJH-lip. 預處理的 MH-S 細胞，能有效抑制 LPS 誘導 IL-6、TNF- α 分泌 ($p < 0.05$)，並增加抗發炎細胞激素 TGF- β 的分泌 ($p < 0.05$)。綜合上述結果顯示，利用正鰹加工副產物萃取磷脂質製成的氣膠態微脂體，有助於預防或調節肺部發炎症狀。

關鍵詞：肺部保健、肺泡巨噬細胞、氣膠態微脂體、擬態細胞凋亡體、魚類加工副產物

前 言

臺灣肺炎死亡率逐年攀升，根據國民健康署統計，已成為國人 108 年十大死因第三名，其死亡率遠高於鄰近的韓國及日本，國人平均餘命因此縮短近 1 歲，相關醫療給付也造成健保的沉重負擔。另外，隨著工業發展以及大陸霾害入侵臺灣，國人的上呼吸道疾病風險逐年增加；還有一些吞嚥功能障礙或長期依靠物理性插管抽痰的慢性病患，也常因為進食時嗆到，導致肺部發炎。

臺灣已邁入高齡化社，據統計，感染肺炎的族群中，超過九成為 65 歲以上的高齡長者 (衛福部, 2018)。因此無論是因應實際需求或保健醫

療，針對上呼吸道炎症和肺部護理保健技術與產品的開發極為重要。

肺泡巨噬細胞 (alveolar macrophage) 分布在動物肺泡表面，是肺腔組織中最大的一群免疫細胞，在健康的肺臟細胞中約佔 3 - 5%，遊走在肺泡表面並且能自由地穿透進入肺腔，是肺組織對抗外來病原的第一道防線 (Laskin *et al.*, 2015)。肺部醫療保健用藥主要有支氣管擴張劑、細胞內磷酸酯二酶抑制劑、抗生素及固醇類等 (William, 2007)，其中吸入性固醇類藥物最常被用來緩解上呼吸道的發炎反應，低劑量的固醇類亦成為肺部保健的處方，然而長期使用吸入型固醇類藥物，除了可能造成口腔念珠菌感染等副作用外，更會增加日後罹患肺炎的機率，因此開發天然、副作用低的製劑及具有明確學理依據的肺部保健產品有其必要性。

利用凋亡細胞體 (apoptotic body) 誘使類巨

*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

噬細胞吞噬後，類巨噬細胞會極化成具有調節發炎能力的巨噬細胞，是近年相當重要的發現 (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018)，也是預防或降低發炎相關慢性病的新策略。Huynh *et al.* (2002) 在動物實驗中，利用 LPS 誘導老鼠肺組織發炎，再灌流 Jurkat T cells 之凋亡細胞體，發現凋亡細胞體能改善肺炎導致的促發炎細胞激素分泌與發炎細胞群聚於肺部組織的現象，而這樣的改善是經由巨噬細胞在吞噬凋亡細胞體後，分泌細胞轉型生長因子 (TGF- β)，因而達到緩解下游發炎的作用。另外，Lee *et al.* (2012) 在肺癌相關研究中指出，以博來黴素 (Bleomycin，抗癌症用藥) 應用於動物實驗中會引發肺部發炎之副作用，而將紫外線照射 (ultraviolet irradiation) 處理 Jurkat T-cells 所產生的凋亡細胞，灌入服用 Bleomycin 的老鼠肺臟中，會刺激肺巨噬細胞分泌肝細胞生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 而緩解發炎，進而降低肺部損傷。

巨噬細胞辨識細胞凋亡過程是透過細胞膜上的特殊磷脂質分子 - 磷脂醯絲胺酸 (phosphatidylserine, PS)，PS 在細胞老化凋亡時，會由細胞膜內頁翻轉至細胞膜表面，並發出 "eat me" 之訊號，供巨噬細胞辨識、吞噬及清除，這過程被稱為胞葬作用 (efferocytosis) (Fadok *et al.*, 1998; Takaoka *et al.*, 2014)。PS 是一種帶負電荷的磷脂質，是真核細胞漿質膜重要組成之一，先前的研究，我們萃取魷魚皮細胞膜磷脂質，製成單層微脂體，致使 PS 顯露至微脂體表面來擬態凋亡細胞，並在細胞 (LPS 誘導肺部巨噬細胞發炎) (高等, 2017) 及動物 (角叉藻誘導動物發炎模式) (Kao *et al.*, 2018) 實驗中，均證實魷魚皮磷脂質微脂體具緩解發炎反應之功效。

本研究利用 LPS 誘導肺泡巨噬細胞 (MH-S) 發炎，評估鯉魚頭磷脂質 (SJH-lip.) 製備之微脂體是否具有調節 MH-S 細胞發炎的功效；並且以自行開發的霧化機，將 SJH-lip. 製備成氣膠態鯉魚頭微脂體 (aSjH-lip.) 來模擬肺腔吸入，再以 LPS 誘導 MH-S 發炎，評估 aSjH-lip. 是否亦具有緩解發炎之功效。

材料與方法

一、材料

(一) 鯉魚頭原料

正鯉 (*Katsuwonus pelamis*) 頭由水產試驗所東部海洋生物研究中心提供。

(二) 細胞株

本試驗使用之細胞株皆購自食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (BCRC)。MH-S 細胞 (BCRC60419) 係自老鼠肺泡上的巨噬細胞分離，經猿猴空泡病毒 40 (SV-40) 感染後轉型的細胞株。

(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)，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)。

(四) 霧化機組裝

將購自惠柏國際有限公司之 DC12V 散熱風扇、驅動晶片散熱板、2.4 MHz 不鏽鋼霧化器、無水感測線、WB-P2424D 驅動模組等材料，加上細胞培養液空瓶組裝為霧化機。利用高頻振盪驅動晶片，在 110 伏特交流轉 24 伏特，0.55 安培直流電源的供應下，產生高達 2.4 MHz 的高頻壓電震盪與水分子產生共振，進而將水分子霧化為約 5 μm 的水霧，同時懸浮於水相中的 SJH-lip. 隨著水霧的蒸發，形成 aSJH-lip.。

二、實驗方法

(一) 水產磷脂質萃取及微脂體製備

磷脂質萃取係參考 Hwang *et al.* (2011) 及 Akbarzadeh *et al.* (2013) 方法。將萃取之 SJH-lip. 濃縮後，分裝保存於 -20°C ，於每次實驗前精秤 12 mg SJH-lip.，加入 4 mL 無血清 DMEM 培養基，以手持式超音波震盪機 (UP-100H hielscher, Teltow, Germany) 於冰上震盪 10 min，

再以 0.45 μm 針筒過濾膜 (Merck Millipore, Bedford, MA, USA) 過濾。

(二) 分析磷脂質組成分

參考 Kaduce *et al.* (1983)，利用高效能液相層析系統搭配紫外線偵檢器分析鯉魚頭萃取磷脂質組成分。其中高效液相色譜法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 之標準品來源包含大豆磷脂質混合物 (phospholipid mixture) (Sigma P3817) 及 PS (Sigma P0474)，分別精秤 10 mg 大豆磷脂質溶於 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 針筒過濾器 (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 \times 250 mm) 60-5Si，分析單一標品時間為 15 - 30 min，以立行系統 (EC2000, Analab corporation, Taipei, TW) 收集整合積分訊號。

(三) 測量 aSJH-lip. 粒徑大小

將先前所配製的 SJH-lip. 懸浮液，裝入自製之霧化機，開啟電源後經超音波震盪後生成 aSJH-lip，以矽膠導管回收 aSJH-lip. 後，利用海洋大學頂尖中心提供的粒徑電位測量儀 Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, UK and Zetasizer software 6.30) 進行分析，將回收 aSJH-lip. 懸浮液加入拋棄式樣品分析管中，測定時的溫度設定在 37°C 模擬細胞培養條件，記錄 aSJH-lip. 粒徑大小、粒徑分散程度 (polydispersity index) 及表面電位 (surface zeta potential)。

(四) 細胞培養及實驗設計

將 MH-S 細胞置於 10 cm 培養皿中，以含有 10% (v/v) 胎兒牛血清 DMEM 培養液 (Dulbecco's

Modified Eagle Medium, Gibco, Life technologies, USA) 培養細胞，再將細胞放入細胞培養恆溫箱中 (37°C, 5% CO₂)。細胞實驗前，5 \times 10⁶ cells/mL 接種於 6 或 12 孔細胞培養盤進行細胞貼附 (約 3 hr) 後，移除細胞培養基，置換成含有 0.12 - 1 mg/mL 各實驗微脂體培養基，並於 37°C 培養 3 - 6 hr，待細胞吞噬微脂體後，移除未被吞噬之微脂體培養基，添加含有或不含有 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 之無血清培養基，繼續培養 12 hr 後收集細胞上清液，進行相關發炎細胞激素 (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10 and TGF- β) 濃度測定，下層細胞則加入 MTT 試劑分析細胞存活率或用於測定細胞內活性氧族群生成實驗。

模擬肺腔吸入之細胞實驗，配置 3 mg/mL SJH-lip. 並以自備之霧化機產製 aSJH-lip. 利用 50 mL 離心管回收 aSJH-lip；將 2 \times 10⁶ cells/mL MH-S 細胞接種於 12 孔細胞培養盤，每孔 1 mL，待細胞貼附後，置換成 0.5 mL aSJH-lip. 回收液，再置入培養箱中培養 6 hr (37°C, 5% CO₂) 後，添加 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 之無血清培養基共培養 12 hr，收集細胞上清液，進行相關發炎細胞激素分析。

(五) 細胞存活率分析

收集細胞上清液後，下層細胞加入 MTT 試劑 (100 μL , 0.5 mg/mL) 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (cat no. M5655, Sigma, USA)，以 ELISA reader (ELISA Reader Biotek Instruments, E1x800, USA) 檢測 OD 570nm 吸光值。

(六) 發炎相關細胞激素分析

相關細胞激素 (IL-1 β , TGF- β , IL-10 and TNF- α) 濃度以酵素免疫分析法測定 (Quantikine, R&D System, Minneapolis, MN, USA)。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 μl Blocking 試劑 (1% 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 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

Table 1 Primers used for quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in this study

| Name | Sequence (5' to 3') | Size (mer) | Melt Temp. (°C) | Reference | NCBI ID |
|-----------------|---------------------------------|------------|-----------------|----------------------------|-------------|
| mGAPDH-F | GGG TTC CTA TAA ATA CGG ACT GC | 23 | 55.2 | Niven <i>et al.</i> , 2015 | NM_008084.3 |
| mGAPDH-R | ACC ATT TTG TCT ACG GGA CGA | 21 | 52.3 | | |
| mIL-1 β F | GAA ATG CCA CCT TTT GAC AGT G | 22 | 52.9 | Wei <i>et al.</i> , 2015 | NM_008361.3 |
| mIL-1 β R | TGG ATG CTC TCA TCA GGA CAG | 21 | 54.2 | | |
| mCOX-2 F | TGA GTA CCG CAA ACG CTT CTC | 21 | 54.2 | Wang <i>et al.</i> , 2012 | NM_011198.3 |
| mCOX-2 R | TGG ACG AGG TTT TTC CAC CAG | 21 | 54.2 | | |
| mIL-6 F | TCC AGT TGC CTT CTT GGG AC | 20 | 53.7 | Wang <i>et al.</i> , 2012 | NM_031168.2 |
| mIL-6 R | ATG TGT AAT TAA GCC TCC GAC TTG | 24 | 53.9 | | |
| miNOS F | CAA CAG GAG AAG GGG ACG AAC | 21 | 56.2 | Wang <i>et al.</i> , 2012 | NM_010927.4 |
| miNOS R | CGT TTC GGG ATC TGT ATG TGA | 21 | 52.3 | | |
| mTNF-a F | TCT GTC TAC TGA ACT TCG GGG TG | 23 | 57.0 | Wang <i>et al.</i> , 2012 | NM_013693.3 |
| mTNF-a R | CAG GCT TGT CAC TCG AAT TTT G | 22 | 52.9 | | |

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 2N 硫酸終止呈色反應，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。

(七) 發炎相關基因表現分析

移除細胞上清液後，細胞以 PBS 清洗後，細胞以 RNeasy mini kit (cat. Nos. 74104 and 74106, Qiagen, Hilden, Germany) 萃取細胞 RNA，添加 350 μ L RLT Buffer 溶解細胞，續加入 350 μ L 70% ethanol，均勻混合後，將總共 700 μ L 的核酸萃取液移至核酸萃取管柱匣，以 8,000 rpm 離心 15 sec 後，移除濾液，管柱內續加入 350 μ L RW1 buffer，8,000 rpm 離心 15 sec，移除濾液後，管柱內加入 80 μ L DNaseI buffer (DNase I 10 μ L+RDD Buffer 70 μ L)，室溫下作用 15 min，分解去氧核糖核酸 (DNA)，續加入另外 350 μ L RW1 buffer，8,000 rpm 離心 15 sec，移除濾液，添加 500 μ L RPE Buffer 8,000 rpm 離心 15sec，移除濾液，再次添加 500 μ L RPE Buffer 8000rpm 離心 2 min，移除濾液，管柱匣換製新的下層收集管，離心 2 min 促使管柱乾，管注匣換製 1.5 mL 離新管，管柱內添加 30 μ L RNase free 的 H₂O，8,000 rpm 離心 2 min，添加另外 30 μ L RNase free 的 H₂O，8,000 rpm 離心 2 min 以增加 RNA 回收率。以 Protech MMLV

reverse transcription kit (Sa-RT-KIT, Protech, TW.) 將 mRNA 轉 cDNA，配製逆轉錄 cocktail buffer，分成六管注入試管，每管 10 μ L，添加 10 μ L 樣品 RNA 均勻混合後，關閉上蓋以 PCR machine 進行逆轉錄，25°C 10 min，42°C 60 min，70°C 10 min，20°C 5 min，完成。MH-S 細胞發炎試驗中各實驗細胞之 mRNA 轉錄成 cDNA 後，使用 Topical Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) 並配合 LightCycler FastStart DNA Master SYBR GreenI (Cat. No. 3 003 230, Roach, Sydney, Australia) 之定量 PCR 試劑。PCR 反應總體積為 20 μ L，內含 10 μ M 之各組發炎基因引子對 (Table 1) 各 1 μ L (終濃度為 0.5 μ M)、10 μ L 兩倍稀釋之 FastStart DNA Master SYBR Green Master 以及 8.8 μ L cDNA 模板。反應條件為 (1) Denature：95°C 10 min；(2) Cycling：95°C 10 sec、58°C 30 sec 進行 40 個循環；(3) Melting：95°C 10 sec、65°C 6 sec 後，以每秒升高 1°C 的速率慢慢加溫至 95°C；(4) Cooling：室溫。反應結束後可立刻由電腦分析之 Cp 值與 Tm 曲線 (melting curve) 的頂點溫度 (Tm) 值判定結果，反應總時間約 60 min。

(八) 統計

以 mean \pm SD 表示，採用鄧肯氏多變域統計方法 (Duncan's multiple range tests, DMRT) 行差異性分析，顯著水準定為 $p < 0.05$ 。

Table 2 The percentages of different classes of phospholipids among the total phospholipids extracted from skipjack tuna heads

| No. | Phospholipid class | Relative ratio of total phospholipid (%) |
|-----|------------------------------|--|
| 1 | Phosphatidylinositol, PI | 4 |
| 2 | Phosphatidylserine, PS | 14 |
| 3 | Phosphatidylethanolamine, PE | 50 |
| 4 | Phosphatidylcholine, PC | 20 |
| 5 | Others | 12 |

結果與討論

一、SJH-lip. 組成分析

SJH-lip. 萃取後，以 HPLC-UV 分析磷脂質之組成分如 Table 2 所示。標準品通過正相矽膠管柱 PI、PS、PE、PC 及 Lyso-PC 的滯留時間分別為 2.40 - 2.50、3.16 - 3.22、3.95 - 3.98、6.28 - 6.32 及 10.40 - 10.52 min，SJH-lip. 萃取物中 PI、PS、PE、PC 及其他之波峰面積積分後，分別占總磷脂質 4、14、50、20 及 12%。在鯉魚頭萃取的磷脂質中含有 PS 分子，而 PS 分子若呈現在凋亡細胞表面，是誘導 PS 受器啟動巨大胞飲作用 (macropinocytosis) 及清除凋亡細胞殘骸重要的關鍵 (Hoffmann *et al.*, 2001)。更進一步研究顯示：大腦內的巨噬細胞 (又稱微膠細胞) 在吞噬利用 PS 微脂體所模擬的凋亡細胞後，能調降脂多醣、 β 類澱粉蛋白及 γ 干擾素所引起微膠細胞的促發炎細胞激素 (De-Simone *et al.*, 2002; Hashioka *et al.*, 2007)。而我們過去研究 (Kao *et al.*, 2018) 也發現魷魚皮所萃取出來的磷脂質含有 PS 分子，製成魷魚皮微脂體之後，亦能有效的調節脂多醣引發老鼠巨噬細胞株 RAW264.7 的發炎反應。因此推測鯉魚頭微脂體亦可能調節肺部巨噬細胞群的發炎反應。

二、SJH-lip. 在添加或不添加 LPS 共培養條件下對 MH-S 細胞活存率之影響

SJH-lip. 對 MH-S 的細胞毒性如 Fig. 1A 所示，添加 250 ng/mL Dexamethasone，培養 12 hr 後會導致約 25% 的 MH-S 細胞損傷，另外添加 33.3 - 300 μ g/mL 的 SJH-lip. 培養 12 hr 後，MH-S 細胞活存率維持在 93 - 95%。進一步再添加

SJH-lip. 作用 6 hr 後，並共處理 1 μ g/mL LPS 誘導發炎，結果如 Fig. 1B，添加 111 - 333 μ g/mL 的 SJH-lip. 與 LPS 共培養的細胞，相較於單獨添加 1 μ g/mL LPS 誘導發炎細胞組，活存率有顯著增加 ($p < 0.05$)，說明 MH-S 細胞在吞噬清除 SJH-lip. 之後，可能啟動下游的發炎緩解機制，反應在活存率的提升。反觀添加 250 ng/mL Dexamethasone 與 LPS 共培養組，活存率下降了 30%，表示添加 250 ng/mL Dexamethasone 對 MH-S 細胞仍存在些許細胞毒性。肺泡巨噬細胞分布在動物肺泡表面，是肺腔組織中最大的一群免疫細胞，在健康的肺臟細胞中約佔 3 - 5%，是肺組織對抗外來病原的第一道防線 (Laskinet *et al.*, 2015)。先前的研究已證實 SQ-lip. 具有調降 LPS 所誘導 RAW264.7 細胞的發炎反應，並能加速緩解角叉藻膠 (carrageenan) 誘導之鼠爪腫脹 (Kao *et al.*, 2018)，其機制可能來自擬態凋亡細胞引起巨噬細胞執行胞葬作用進而啟動緩解發炎 (Birge *et al.*, 2016; Kumar and Brige, 2016)，在凋亡細胞這樣的清除機制應當廣泛存在於生物體的各種組織中，除了魷魚皮之外其它的物種細胞漿質膜應該也普遍存在 PS 分子。本研究利用老鼠肺泡的巨噬細胞株 MH-S 為平臺，探討 SJH-lip. 是否能幫助緩解 LPS 誘導 MH-S 的發炎，確認鯉魚頭磷脂質所製備的 SJH-lip. 對 LPS 誘導肺泡表面的巨噬細胞 MH-S 亦具有調節發炎之功效。

三、SJH-lip. 對 LPS 誘導 MH-S 細胞分泌發炎相關激素之影響

以不同濃度 SJH-lip. 或 Dexamethasone 處理 MH-S 細胞 6 hr 後，再以 1 μ g/mL LPS 誘導 12 hr

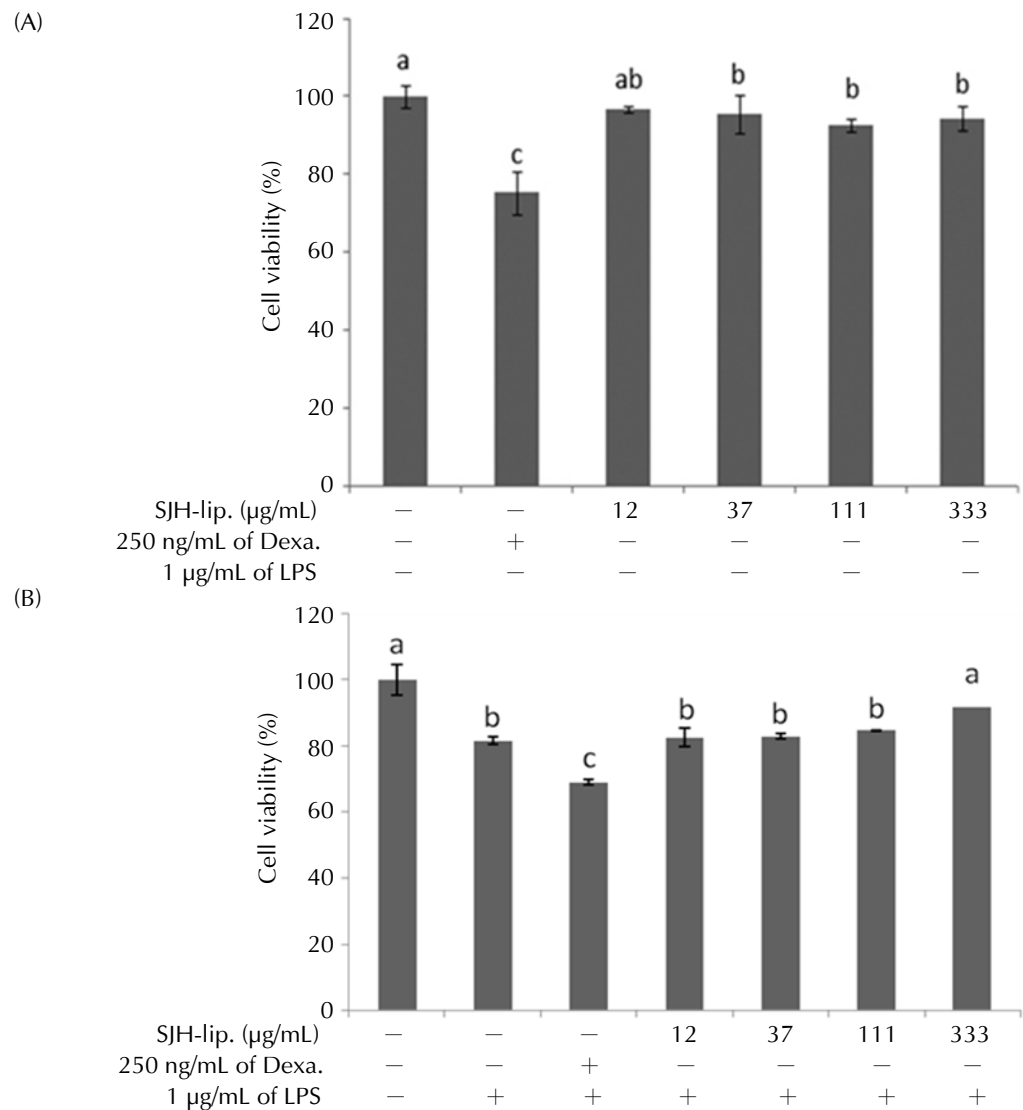


Fig. 1 The cytotoxic effects of SJH-liposome on MH-S cells as indicated by (A) the cell viability of MH-S cells pretreated with SJH-liposome (SJH-lip.) or dexamethasone (Dexa.) and subjected or not subjected to LPS treatment (B). The cells (8×10^5 cells/mL) were incubated with the indicated SJH-lip. for 3 hr, after which they were subjected or not subjected to treatment with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS treatment for 12 hr. The cell viabilities were then assessed using MTT reduction assay. The results are expressed as the percentage of surviving cells over control cells. Each value indicates the mean \pm S.D. ($n=3$). The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test (DMRT).

並收集細胞上清液，分析促發炎細胞激素 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 濃度 (Fig. 2)，結果發現，MH-S 細胞經 LPS 誘導後，細胞中 IL-1 β (Fig. 2A)、IL-6 (Fig. 2B) 及 TNF- α (Fig. 2C) 濃度皆明顯增加；共處理 250 ng/mL 的 Dexamethasone 或 12–333 $\mu\text{g/mL}$ 的 SJH-lip.，則皆能顯著調降細胞中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 三種促發炎細胞激素的濃

度，雖然 SJH-lip. 顯示調降促發炎細胞激素 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的效果不及 250 ng/mL 的 Dexamethasone 用藥，仍足以顯現 SJH-lip 在調節抑制 LPS 誘導 MH-S 細胞發炎的潛力。近年來海洋天然物逐漸被開發利用，Keeler *et al.* (2019) 發現一種藻類的天然化合物成分 (Brevenal) 在肺泡巨噬細胞 (MH-S) 上具有抗發炎的功效，添

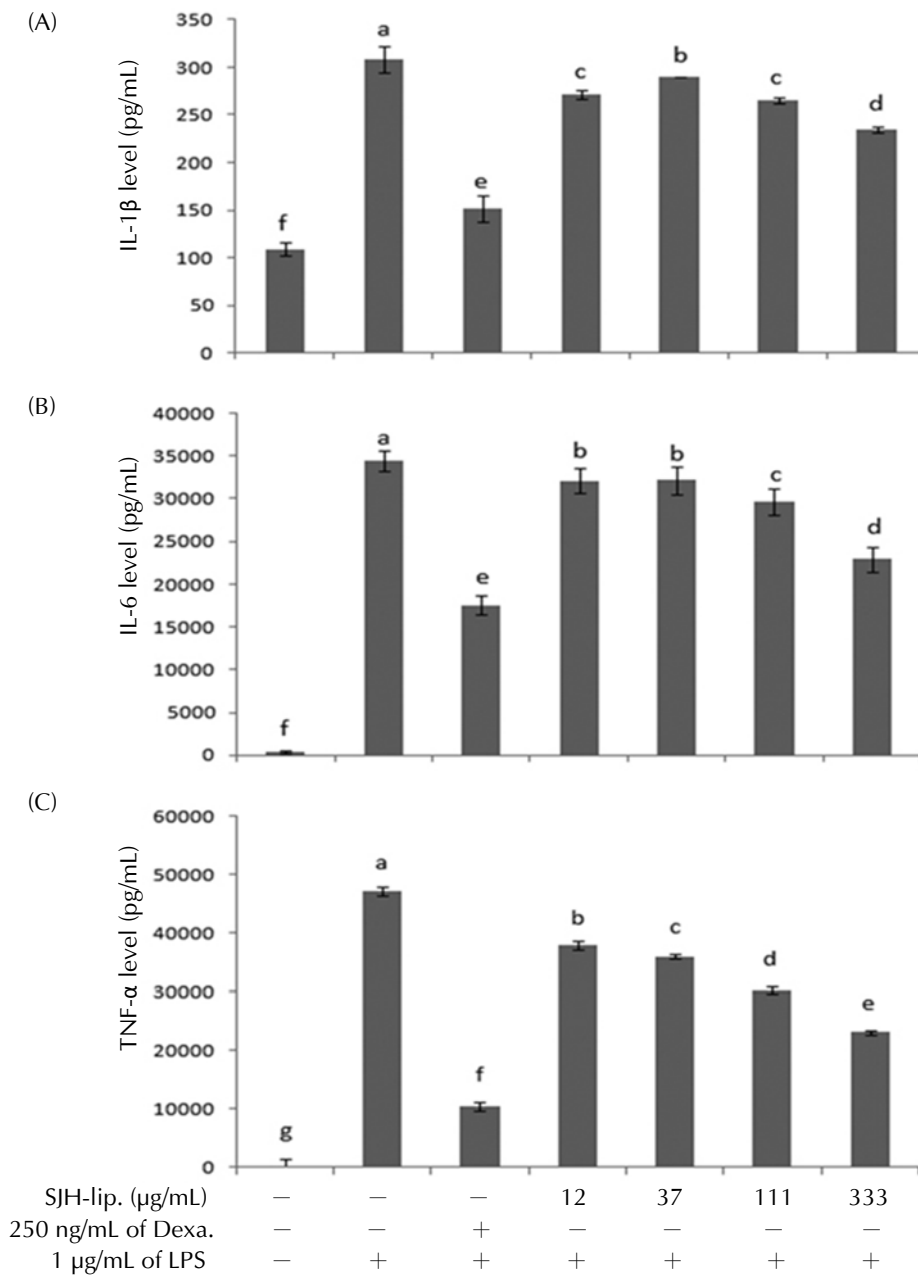


Fig. 2 Effects of pre-treatment with SJH-liposome on the secretion of pro-inflammatory cytokines by LPS-induced MH-S cells. Inflammatory cytokines including IL-1 β (A), IL-6 (B), and TNF- α (C) were analyzed. The levels of all of the cytokines were respectively determined using ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Each value is expressed as mean \pm S.D. (n=3). The values with different letters are significantly different at p<0.05 according to Duncan's multiple range test (DMRT).

加 0.1 nM 的 Brevenal 化合物被證實減少 LPS 誘導 MH-S 細胞分泌 TNF- α 。過去海洋天然物中，n-3 多元不飽和脂肪酸是最被熟知在生物體內能提供細胞產製保護素 (protectin)、緩解素 (resolving) 的消炎原料，因此全球魚油的市場需求不曾下降。SJH-lip. 是利用水產加工副產物資

源，萃取其殘骸細胞中漿質膜上的磷脂質，水產來源的磷脂質分子內還帶有豐富 n-3 不飽和脂肪酸，能提供免疫細胞產製消炎材料。在我們的研究中進一步重組 SJH-lip. 製成單層的微脂體，以模擬生物體內天然 Apoptotic body，其特性在於裸露的 PS 會誘使類巨噬細胞的吞噬及清除，進

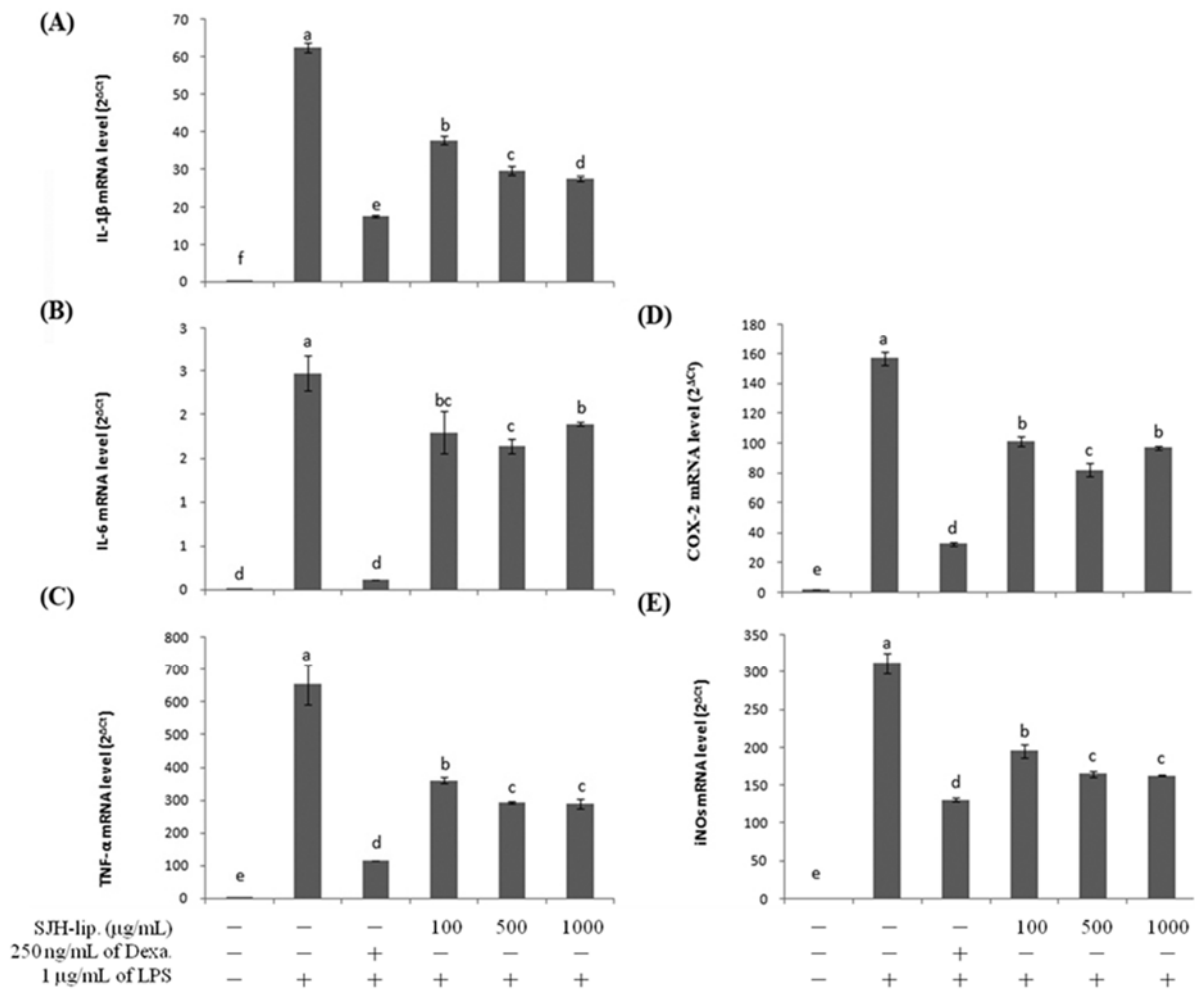


Fig. 3 Effects of pre-treatment with SJH-liposome on the inflammatory gene expression in LPS-induced MH-S cells. MH-S cells were pre-treated with the indicated concentrations of SJH-liposome (SJH-lip.) or dexamethansone (Dexa.) for 6h and then induced with 1μg/mL of LPS for an additional 12h. The mRNA expression levels of IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C), COX-2 (D), and iNOS (E) were analyzed by real-time PCR. Data represent mean±S.D. (n=3). The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test (DMRT).

而啟動緩解發炎的程序。Stokes *et al.* (2016) 在研究人類鼻病毒 (human-rhinovirus) 引起發炎反應中，就指出含有 PS 的微脂體有助於於緩解鼻病毒所導致呼吸道發炎現象，因此當富含 n3-不飽和脂肪酸的 SJH-lip. 被加工製成擬態凋亡細胞的單層微脂體之後，誘使類巨噬細胞的吞噬及啟動發炎緩解程序是可以被期待的協同效應。

四、預處理鱈魚頭微脂體 SJH-lip. 對 LPS 誘導肺泡巨噬細胞發炎相關基因表現之影響

進一步利用核酸即時定量系統分析在 mRNA

層級，來探討 SJH-lip. 是否經由抑制發炎相關 mRNA 的表現來調降促發炎細胞激素，結果顯示，IL-1β (Fig. 3A)、IL-6 (Fig. 3B)、TNF-α (Fig. 3C)、COX-2 (Fig. 3D) 及 iNOS (Fig. 3E) mRNA 核酸的表現量，在 LPS 誘導後皆顯著增加 ($p < 0.05$)，預處理 250 ng/mL 的參考藥物 Dexamethansone 或 0.1 – 1 mg/mL 的 SJH-lip.，則皆能顯著調降此 IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA 表現 ($p < 0.05$)，與分析細胞上清液中促發炎蛋白結果一致。過去評估肺部抗發炎標的時，亦常以 LPS 誘導肺泡巨噬細胞的相關發炎基因表現來評估天然物的抗發炎功效，Chen *et al.* (2007) 指出，當 MH-S 肺泡巨噬細胞受 LPS 刺激後，會促使 TNF-α，IL-6，iNOS 和

COX-2 等促發炎 mRNA 表現，而木犀草素 (luteolin) 或沙棘嫩葉萃取物 (seabuckthorn leaves) 等植化素具有調降肺泡巨噬細胞促發炎 mRNA 表現之功效 (Jayashankar *et al.*, 2012)。另外，Meng *et al.* (2015) 發現固醇類藥物 Dexamethansone 或 p38 蛋白酶抑制劑能夠顯著調降 LPS 誘導 MH-S 細胞表現 TNF- α ，Dexamethansone 的仿單藥物說明，在細胞試驗上的有效劑量約為 1 - 500 ng/mL，因此在我們實驗中亦添加 250 ng/mL 的 Dexamethansone 做為本研究的參考藥物。綜合上述實驗結果，我們在 LPS 誘導 MH-S 發炎的平台，發現無論是參考藥物 Dexamethansone 或 SJH-lip. 皆能調降 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 促發炎細胞激素的分泌與 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS 及 COX-2 促發炎細胞相關基因的表現，顯示 SJH-lip. 應具有作為緩解肺部發炎功效物質的潛力。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 SJH-lip. 能調降 LPS 所誘導 MH-S 細胞表現 IL-6 及 TNF- α 。

五、氣膠態微脂體特性分析

肺泡巨噬細胞主要存在肺腔內肺泡的表面，為了了解 SJH-lip. 是否可能經由呼吸道進入肺腔中，被肺泡巨噬細胞所吞噬，進一步調節發炎反應，我們先利用 SJH-lip. 製備成微脂體溶液經實驗室自行組裝之霧化機 (Fig. 4A) 震盪後，以矽膠管回收 aSJH-lip.，分析其粒徑大小 (Fig. 4B)，主要有 94.8% 微脂體分布粒徑為 125.9 ± 57.1 nm，粒徑的分散係數 Pdi (polydispersity index) 為 0.240，回收的 aSJH-lip. 表面電位 (surface zeta potential) 為 -31.1 ± 2.6 mV。aSJH-lip. 為奈米級的微脂體，其中 Pdi 表示粒徑分布範圍，當其值越接近於 0 則表示粒徑呈現單一粒徑分佈，範圍在 0 - 0.3 間，表示粒徑分布範圍非常小，其值大於 0.3 以上表示粒徑範圍較廣；另外，由於 PS 唯

一淨電荷帶負電的分子，在經過超音波震盪重組後，原本位於活細胞雙層磷脂質內頁的 PS，經重組成單層的微脂體，因此 PS 自然的裸露於微脂體表面，因此在微脂體表面便帶有負電荷。在體外實驗中我們將 aSJH-lip. 的氣膠液回收，添加入 MH-S 細胞模擬肺腔吸收，經 6 hr 後，於顯微鏡下觀察相較於對照組 (Fig. 4C) 可明顯發現 MH-S 細胞吞噬 aSJH-lip. (Fig. 4D)，並蓄積於細胞質中。Muralidhran *et al.* (2014) 指出，依據空氣動力學推論直徑小於 5 μ m 的氣膠顆粒可以有效地進入肺腔和較小的氣管中，當氣膠顆粒小於 2 μ m 的則可以到達支氣管及肺泡表面，相反的大於 5 μ m 的顆粒可能會沉積在口腔和咽喉區域，而無法有效的作用於肺部。在本研究中，自製霧化機在 110 伏特交流轉 24 伏特，0.55 安培直流電源的趨動下產生高達 2.4 MHz 的高頻壓電震盪，作用於 aSJH-lip. 培養液形成平均 2 μ m 之氣膠，回收氣膠測得氣膠懸浮液中 aSJH-lip. 粒徑為 125.9 ± 57.1 nm，推測應能有效進到肺腔體。Stokes *et al.* (2016) 在研究人類鼻病毒引起發炎反應中，指出含有 PS 的微脂體是一種天然無毒的物質，其粒徑小於 5 μ m，非常適合以霧化的方式應用於呼吸道，在他們的研究結果顯示：空心的 PS 微脂體具有抗發炎之功效，而當 PS 微脂體包覆干擾素時，還有助於對抗鼻病毒的增生，未來可能應用於緩解病毒所導致呼吸道發炎。

六、處理 aSJH-lip. 對 LPS 誘導 MH-S 細胞分泌發炎相關細胞激素之影響

經 aSJH-lip. 預處理的 MH-S 細胞，再經 1 μ g/mL LPS 誘導 12 hr 後，細胞存活率如 Fig. 5A 所示。相較於未處理之對照組 (LPS-, aSJH-lip.-)，添加 3 mg/mL aSJH-lip. 對照組、單獨以 1 μ g/mL LPS 誘導發炎組及共處理 LPS 與 1 或 3 mg/mL aSJH-lip. 的各實驗組，再處理 12 hr 後，細胞存活率皆介於 110 - 116% 之間，顯示單獨處理 LPS 或 LPS 與 1 - 3 mg/mL aSJH-lip. 共處理，並不會造成細胞毒性。進一步單獨收集各組實驗組細胞上清液，分析促發炎細胞激素濃度，結果顯示：其中 MH-S 細胞在 LPS 處理後，細胞上清液中

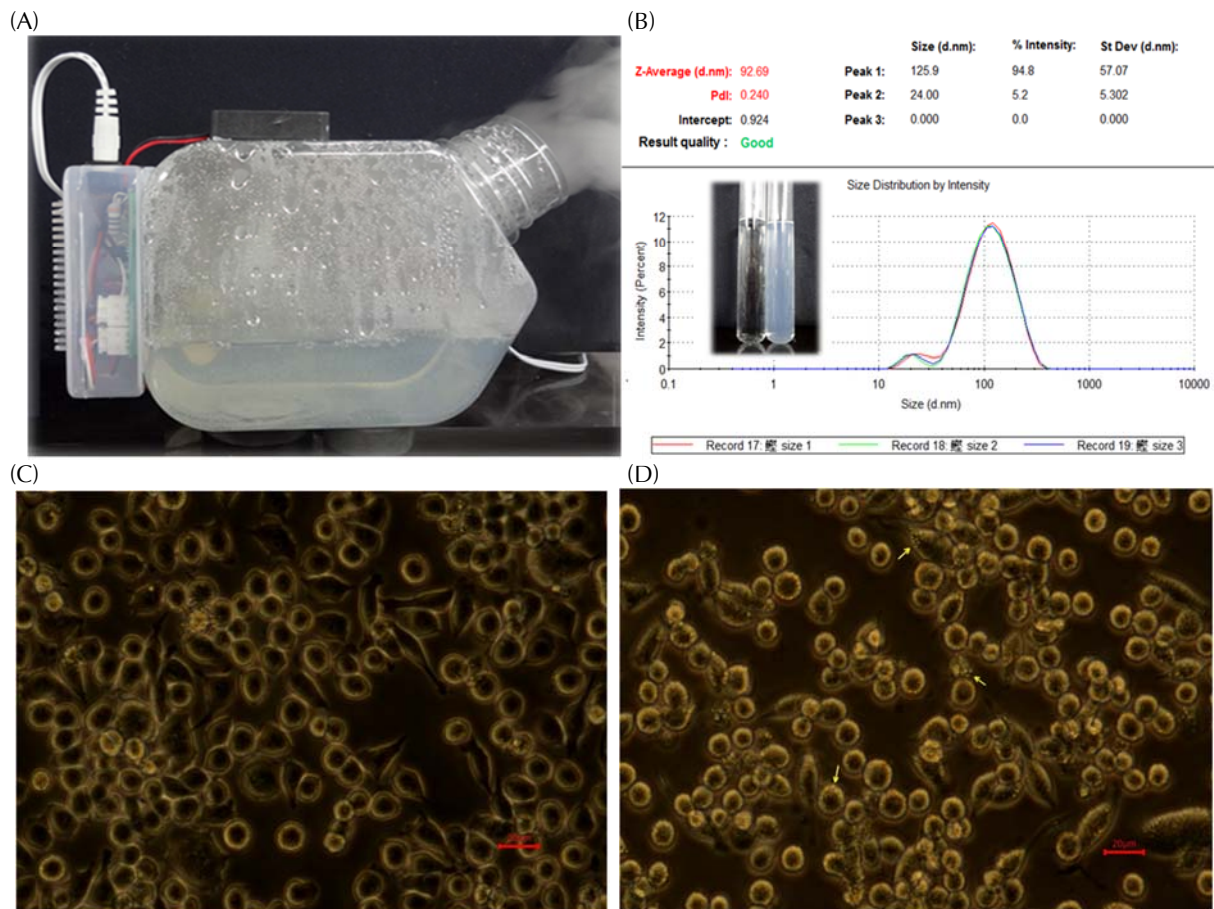


Fig. 4 The in-house fabricated ultrasonic nebulizer is an aerosol generator (A) that was used to produce a stable aSJH-liposome. The size distribution of the aSJH-liposome in recovered aerosol liquid in terms of Z-average diameter was measured at 92.7 nm by the Zetasizer (B). The microscope photos show that the MH-S cells engulfed the aSJH-liposome. The control group (C) and experimental group (D) were absent or present, respectively, in 3 mg/mL of aSJH-liposome. The arrows point to the increased accumulation of the liposome in cytoplasm. Scale bar = 20 μ m.

IL-6 (Fig. 5B) 及 TNF- α (Fig. 5C) 濃度明顯增加 ($p < 0.05$)，若共處理含有 1 - 3 mg/mL aSJH-lip.，則細胞上清液中促發炎細胞激素濃度顯著調降 ($p < 0.05$)。相反的，在分析抗發炎細胞激素的分泌，其中 MH-S 細胞 TGF- β (Fig. 5D)，單獨添加 3 mg/mL aSJH-lip. 培養 12 hr 後，上清液中 TGF- β 濃度相較於未處理組顯著由 19.1 pg/mL 增加至 84.3 pg/mL ($p < 0.05$)，單獨以 LPS 誘導則 TGF- β 濃度不無顯著增加，然而共處理 LPS 與 1 或 3 mg/mL aSJH-lip. 組，細胞上清液中 TGF- β 分別為 68.7 及 89.1 pg/mL，相較於單獨 LPS 誘導發炎組亦顯著增加 TGF- β 表現 ($p < 0.05$)。

Huynh *et al.* (2002) 研究，利用兩種凋亡的細胞，第一種人類的 Jurkat 淋巴球細胞在凋亡時，細胞膜表面會露出 PS 分子，第二種為細胞凋亡

時細胞膜表面缺乏 PS 分子的骨髓細胞 (PLB-985)，將這兩種凋亡細胞給巨噬細胞吞噬後，僅有吞噬 Jurkat 凋亡淋巴細胞的巨噬細胞會分泌 TGF- β ，吞噬 PLB-985 細胞的則否，若將 PS 分子直接移轉到 PLB-985 凋亡細胞膜表面，巨噬細胞吞噬後又會分泌 TGF- β ，說明巨噬細胞辨識 PS 分子是分泌 TGF- β 的關鍵；Otsuka *et al.* (2007) 則發現，巨噬細胞吞噬含有 PS 的微脂體之後會經由 phosphatidylinositol-3-kinase 及 ERK 細胞訊息途徑增加 TGF- β 表現；Xiong *et al.* (2013) 也指出凋亡細胞經由 CD36 這個巨噬細胞的清運受器來驅動 TGF- β 的合成，足見清除凋亡細胞是緩解的重要關鍵。Huynh *et al.* (2002) 在動物實驗中，先利用細菌之多醣 LPS 誘導老鼠肺部發炎，再慢慢地灌流給予凋亡細胞的殘骸，結果發現支

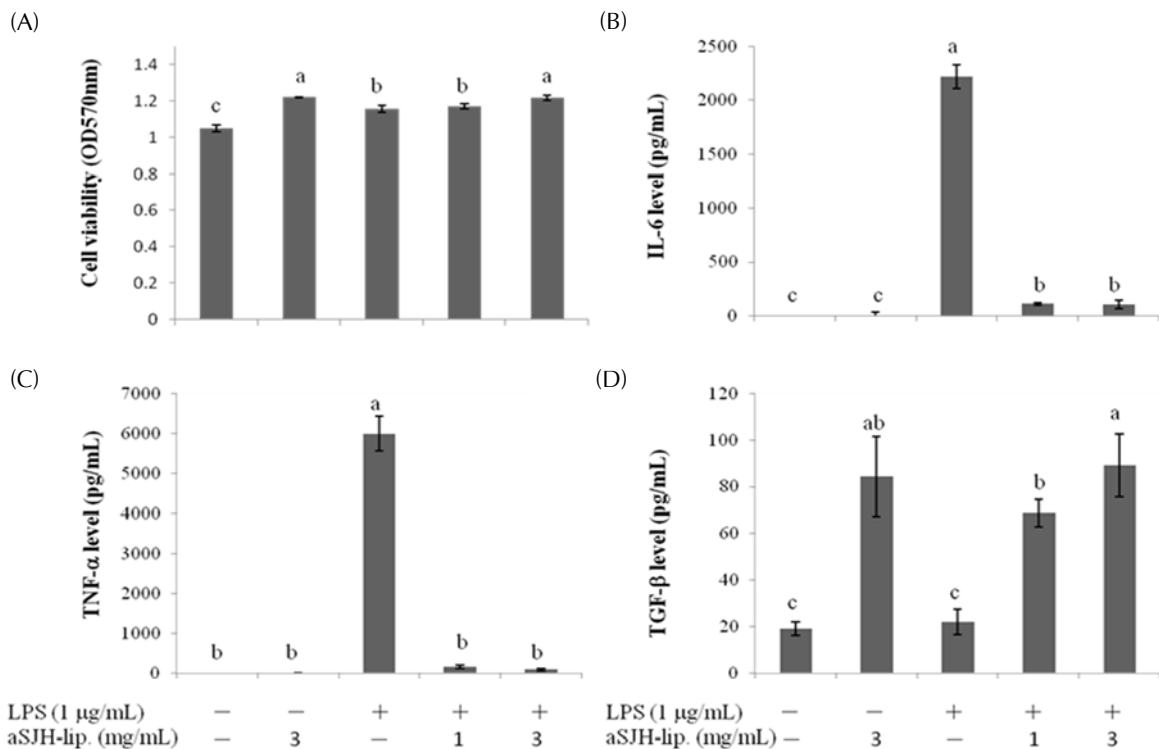


Fig. 5 Effects of aerosol SJH-lip. (aSJH-lip.) on the secretion of inflammation-related cytokines in LPS-induced MHS cells. The cell viability results show that no significant cytotoxic effects were observed in the MH-S cells treated with the indicated conditions (A) for 12 h. The levels of inflammation-related cytokines in each group were analyzed, including the levels of IL-6 (B), TNF- α (C), and TGF- β (D). Each value is expressed as mean \pm S.D. (n=3). The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test (DMRT).

氣管肺泡灌洗液中促發炎細胞激素的濃度明顯下降，另外在給予凋亡細胞灌流處理後的 1 - 5 天，灌洗液中發炎細胞的數目亦明顯減少，若再給予 TGF- β 的專一性抗體中和，則這些改善的現象就會消失。這說明了巨噬細胞吞噬凋亡細胞後，可能經由分泌 TGF- β 來開啟緩解發炎的程序。在我們共處理 LPS 與 aSJH-lip. 的 MH-S 細胞中，亦發現 TGF- β 的增加，與上述文獻一致，推測 MH-S 細胞吞噬 aSJH-lip. 後可能會調降促發炎細胞激素，像是 IL-6 及 TNF- α 或增加抗發炎細胞激素，例如 TGF- β 來調降 LPS 所誘導 MH-S 細胞的發炎反應，在緩解發炎的機制上雖然仍有許多需深入探討的問題，整體而言 MH-S 細胞在共處理 aSJH-lip. 後確實調降了 LPS 所誘導的發炎反應。Stokes *et al.* (2016) 針對鼻病毒所引發的呼吸道發炎研究指出，利用空心的 PS 微脂體有助於緩解呼吸道上皮細胞的發炎反應，未來可能應用於氣喘或慢性肺阻塞疾病的臨床研究。

結 論

肺是氧氣交換之樞紐，維持生命不可或缺的臟器，然而當我們恣意呼吸的同時，卻往往忽略它的保健。根據衛生福利部公布 2016 年最新國人十大死因統計結果，肺炎由去年的第四位躍昇至今年的第三位，且其中有九成為 65 歲以上年長者，老化的同時也象徵著生理機能的退化，隨著消化系統功能下降後，年長者對肺部免疫調節物質的吸收，若仍需經由消化、代謝及循環等漫長的過程才能抵達肺臟，往往是緩不濟急，因此經由呼吸道給予免疫調節物質可能是一種可行的方式。過去幾年我們的研究聚焦在利用魷魚加工的副產物，萃取含有 PS 的磷脂質，製備成擬態細胞 Apoptotic body 的微脂體 (SQ-lip.)，並已在 RAW264.7 細胞及角叉藻膠誘導的鼠爪腫脹動物實驗中，確認其緩解發炎之功效。在本研究中，我們進一步利用鯉魚頭磷脂質製備 SJH-lip.，並以

LPS 誘導老鼠肺泡巨噬細胞株 MH-S 的發炎反應，評估 SJH-lip. 是否亦能緩解發炎，結果 SJH-lip. 無論是在抑制促發炎細胞激素 (IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α) 的分泌或是抑制促發炎基因 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS 及 COX-2) 表現，都顯示具有緩解肺泡巨噬細胞發炎能力。為了解 SJH-lip. 是否在形成氣膠態微脂體後仍然具有被肺泡上的巨噬細胞吞噬及調節肺部的發炎反應的功效，我們以實驗室自行組裝的超音波震盪系統，將 SJH-lip. 霧化成奈米的氣膠，並在回收 aSJH-lip. 之後，以 LPS 誘導 MH-S 的細胞試驗確認了 aSJH-lip. 的抗發炎功效。盤點目前吸入性肺部保健的市場，仍多為低劑量的固醇類製劑，長期使用可能潛藏副作用的風險因子。雖然多方面評估生物製劑之原料來源、製程及醫藥法規等面向，在臺灣的市場機制中，短期間或許並不有利於 SJH-lip. 發展成藥物，然而本研究取自天然素材的磷脂質萃取物，在明確的仿生學、細胞生理學及免疫學基礎上，SJH-lip. 不僅可以發展各類型食品、飲品或保養品，本研究更提供一種氣膠態的魚油微脂體，能提供未來肺部保健的一種新選擇。

謝 辭

本研究特別感謝行政院農業委員會科技計畫編號 106AS-10.4.1-AI-A1 及 107AS-15.4.2-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

- 高翊峰, 林怡伶, 李偉毅, 陳億乘 (2017) 魷魚皮磷脂質微脂體對 LPS 誘導微膠細胞發炎反應之影響. 水產研究, 25(2): 69-82
- 衛生福利部統計處 (2018) 107 年國人死因統計結果. <https://www.mohw.gov.tw/cp-4256-48057-1.html>
- 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.
- 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 a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell. Death. Differ.*, 23: 962-978.
- Chen, S. and K. W. Li (2007) Mass spectrometric identification of molecular species of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine extracted from shark liver. *J. Agric. Food Chem.*, 55(23): 9670-9677.
- De-Simone, R., M. A. Ajmone-Cat, A. Nicolini and L. Minghetti (2002) Expression of phosphatidylserine receptor and down-regulation of pro-inflammatory molecule production by its natural ligand in rat microglial cultures. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 61: 237-244.
- 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 pro-inflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.*, 101: 890-898.
- Fadok, V. A., P. P. McDonald, D. L. Bratton and P. M. Henson (1998) Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochem. Soc. Trans.*, 26: 653-656.
- 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 β and interferon- γ -induced microglial activation. *Free Radic. Biol. Med.*, 42: 945-954.
- Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, C. A. Ogden, Y. Leverrier, D. L. Daleke, A. J. Ridley, V. A. Fadok and P. M. Henson (2001) Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of 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-beta1 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. Taiw.*, 19(1): 101-106.
- Jayashankar, B., K. P. Mishra, M. S. Kumar, K. Udayasankar, K. Misra, L. Ganju and S. B. Singh (2012) A supercritical CO₂ extract from

- seabuckthorn leaves inhibits pro-inflammatory mediators via inhibition of mitogen activated protein kinase p38 and transcription factor nuclear factor- κ B. *Int. Immunopharmacol.*, 13(4):461-7. doi: 10.1016/j.intimp.2012.05.011. Epub2012 Jun 1.
- Kaduce, T. L., K. C. Norton and A. A. Spwctor (1983) A rapid, isocratic method for phospholipid separation by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.*, 24(10):1398-1403.
- Kao, Y. F., Y. H Samuel-Wu, C. H. Chou, S. G. Fu, C. W. Liu, H. J. Chai and Y. C. Chen (2018) Manufacture and characterization of anti-inflammatory liposomes from jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) skin phospholipid extraction. *Food Funct.*, 9: 3986-3996.
- Keeler, D. M., M. K. Grandal, and J. R. McCall (2019) Brevenal, a marine natural product, is anti-inflammatory and an immunomodulator of macrophage anflumg epithelial cells. *Mar. Drug*, 17(3):184; <https://doi.org/10.3390/md17030184>
- Kumar, S. and R. B. Brige (2016) Efferocytosis. *Curr. Boil.*, 26: 558-559.
- Laskin, D. L., R. Malaviya and J. D. Laskin (2015) Pulmonary macrophages. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition).*, 32: 629-649.
- Lee, Y. J., C. Moon, S. H. Lee, H. J. Park, J. Y. Seoh, M. S. Cho and J. L. Kang (2012) Apoptotic cell instillation after bleomycin attenuates lung injury through hepatocyte growth factor induction. *Eur. Respir. J.*, 40(2): 424-435.
- Meng, A., B. Wang, X. Zhang, N. Qi, D. Liu and J. Wu (2015) Additive suppression of LPS-induced IL-10 and TNF- α by pre-treatment of Dexamethasone and SB203580 in a murine alveolar macrophage cell line (MH-S). *Inflammation*, 38(3): 1260-1266.
- Muralidhran, P., E. Mallory, M. Malapit, D. H. Jr and H. M. Mansour (2014) Inhalable PEGylated phospholipid nanocarriers and PEGylated therapeutics for respiratory delivery as aerosolized colloidal dispersions and dry powder inhalers. *Pharmaceutics*, 6(2):333-353.
- Niven, J., J. Hoare, D. McGowan, G. Devarajan, S. Itohara, M. Gannagé, P. Teismann and I. Crane (2015) S100B up-regulates macrophage production of IL-1 β and CCL22 and influences severity of retinal inflammation. *PLoS One.*, 10(7): e0132688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132688>
- 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: 325-330.
- Shapouri - Moghaddam, A., S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S. A. Esmaeili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J. T. Afshari and A. Sahebkar (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.*, 233(9): 6425-6440.
- Stokes, C. A., R. Kaur, M. R. Edwards, M. Mondhe, D. Robinson, E. C. Prestwich, R. D. Hume, C. A. Marshall, Y. Perrie, V. B. O'Donnell, J. L. Harwood, I. Sabroe and L. C. Parker (2016). Human rhinovirus-induced inflammatory responses are inhibited by phosphatidylserine containing liposomes. *Mucosal. Immunol.* 9(5): 1303-1316
- 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.
- Wang, Q. S., Y. Xiang, Y. L. Cui, K. M. Lin and X. F. Zhang (2012) Dietary Blue Pigments Derived from Genipin, Attenuate Inflammation by Inhibiting LPS-Induced iNOS and COX-2 Expression via the NF- κ B Inactivation. *PLoS One.*, 7(3): e34122. doi: 10.1371/journal.pone.0034122
- Wei, J., X. Zhang, Y. Bi, R. Miao, Z. Zhang and H. Su (2015) Anti-Inflammatory Effects of Cumin Essential Oil by Blocking JNK, ERK, and NF- κ B Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2015: 474509.
- Willian, M. B. (2007) Treating COPD with PDE4 inhibitors. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2(4): 517-533
- Xiong, W., S. C. Frasch, S. M. Thomas, D. L. Bratton and P. M. Henson (2013) Induction of TGF- β 1 Synthesis by Macrophages in Response to Apoptotic Cells Requires Activation of the Scavenger Receptor CD36. *PLoS One.*, 8(8): e72772, doi: 10.1371/journal.pone.0072772.

Effects of Phospholipid Liposomes from Bonito (*Katsuwonus pelamis*) Heads on LPS-induced Murine Alveolar Macrophage Inflammation

Yi-Feng Kao^{1,2*}, Yi-Ling Lin², Po-Hsuan Chen¹, Tzu-Chun Lo¹ and Huey-Jine Chai¹

¹Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

²Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University

ABSTRACT

Pneumonia is the third most common cause of death in Taiwan, therefore, it is important to develop healthcare products that can better support lung health. In a previous study, we derived an apoptosis-mimicking liposome from squid skin called SQ-liposome, and found that it had anti-inflammatory effects on RAW264.7 macrophage and BV-2 microglia cells. In this study, another liposome derived from bonito (*Katsuwonus pelamis*) head phospholipids called SJH-liposome was prepared, and the anti-inflammatory effects of this SJH-liposome on murine alveolar macrophages were validated. Furthermore, a novel aerosol form of this SJH-liposome (aSJH-liposome) was manufactured using an in-house fabricated aerosol generator. In order to investigate whether the anti-inflammatory effects still existed after nebulization of the SJH-liposome, the effects of the aSJH-liposome were also tested. According to the results, pretreatment with 111 – 333 $\mu\text{g/mL}$ of SJH-liposome significantly suppressed LPS-induced pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) secretion in MH-S cells ($p < 0.05$), while pretreatment with 100 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ of SJH-liposome also showed remarkable down-regulation of inflammation-related mRNA expression levels, including the expression levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α ($p < 0.05$). In experiments mimicking lung absorption, after being treated with 3 mg/mL of aSJH-liposome, MH-S cells exhibited effective decreases in the secretion of LPS-induced pro-inflammatory cytokines, including IL-6 and TNF- α ($p < 0.05$), and a marked increase in the secretion of the anti-inflammatory cytokine TGF- β ($p < 0.05$). Based on these results, we concluded that the aerosolized liposome that we prepared from a phospholipid extract of skip tuna heads can act as a novel biomedical product supporting for lung health.

Key words: lung health care, alveolarmacrophage, aerosol liposome, apoptotic mimicry, fish processing byproducts

*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