

[研究成果報導]

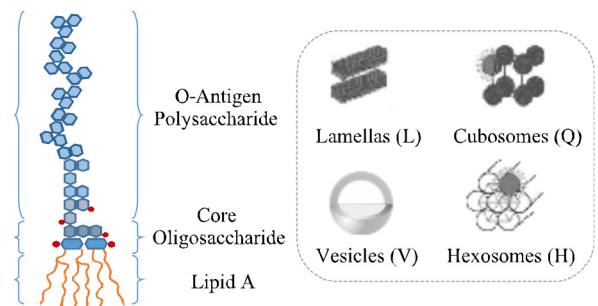
生物超分子自組裝對免疫反應的影響： 殺菌之後真的就沒事了嗎？

國家衛生研究院/生醫工程與奈米醫學研究所 林淑宜

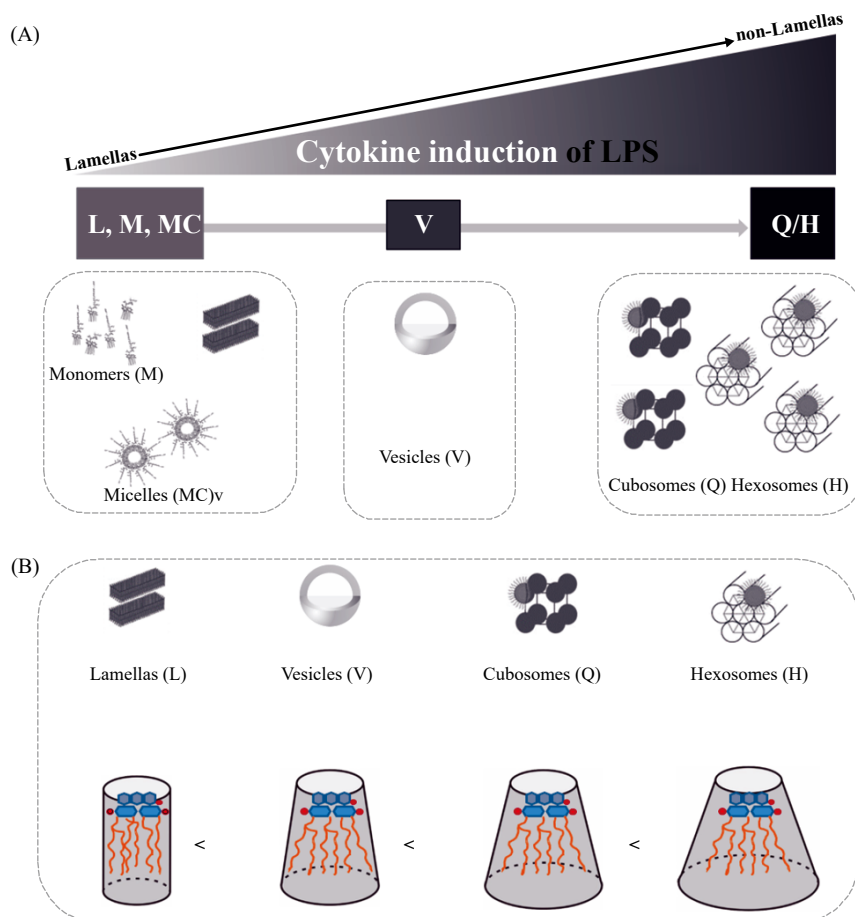
內毒素主要來自於革蘭氏陰性細菌細胞壁，在細菌死亡後大量釋放出來，而內毒素結構中的 lipid A 所在是引發生物毒性的致命區域。有趣的是，若能緊縮 lipid A 的長碳鏈間距，便可降低 lipid A 的生物毒性，然而，這壓縮間距已經到奈米等級以下的差距，若利用小分子藥物的方式處理，開發成本和困難度極高。國衛院林淑宜博士研究團隊新創尺寸小於 1 奈米的金奈米團簇，實驗證實金奈米團簇會吸附內毒素中的 lipid A，成功地縮短 lipid A 長碳鏈的間距，從 4.19 Å 緊縮到 3.54 Å，顯示金奈米團簇可有效鎖住內毒素的 lipid A 的毒性結構，且金奈米團簇單獨存在並不會引起小鼠體內的免疫反應，顯示出金奈米團簇的生物安全性；小鼠體內若有低劑量的內毒素，金奈米團簇可降低血液發炎細胞激素（例如 TNF- α 、IL-6、及 IL-1 β 等）濃度，若能預防性先給予金奈米團簇，則降低內毒素引起的發炎反應之成效更佳。同時，細胞分子機制之探討證實，金奈米團簇和內毒素共同存在時確實會減少促炎症的轉錄因子 NF- κ B 之表現，結果闡明金奈米團簇可鎖住內毒素之毒性，進而減少生物體內產生發炎反應。研究團隊利用內毒素誘導敗血症的小鼠實驗進一步探究，發現金奈米團簇可提高敗血症小鼠的存活時間。未來期望進一步合併抗生素的使用，抗生素可以殺掉格蘭氏陰性細菌，金奈米團簇會吸附在內毒素的 lipid A 結構，將引發敗血性休克的元兇加以清除，研究成果將有助於開發早期預防敗血症的嶄新治療策略。

脂多醣（lipopolysaccharide，又稱 LPS）是革蘭士陰性菌外鞘的分子，也是俗稱的內毒素（endotoxin），當細菌死亡時釋放出 LPS 引發細胞激素（cytokines）的分泌，進而啟動免疫反應，然而過量細胞激素，容易造成宿主敗血性休克，甚

至造成死亡[1, 2]。LPS 的化學結構如同圖一所示，是一種同時具有親疏水性質的生物超分子。其中一端是以醣基為主的親水端（又稱 O antigen 及 core carbohydrate），另一端是由四到六條烷基構成的疏水端，又稱 lipid A，由於在水中 LPS 的臨界聚集濃度（critical aggregation concentration）點極低，所以 LPS 會自發性地組裝在一起而形成聚集體，過去文獻中有兩種完全相反的思維，有一派生物學者認為 LPS 聚集體比較起單體更容易引發免疫反應；另一派則認為單體的效果優於聚合體，這樣的爭論一直沒有定論。不過其中的共同點皆論述，啟動免疫反應的主因是來自 LPS 的疏水端（也就是 lipid A），當細胞表面的 toll-like receptor 4 (TLR 4) 辨識 LPS 的 lipid A 時，將會引發細胞下游的訊息傳遞，進而引發免疫反應[3, 4]。不過，早在 1993 年時生物物理學家其實已經發展出 endotoxin principle[5]，他們歸納出來 LPS 聚集型態的差異會直接影響 lipid A 的角度，進而微調了 lipid A 之烷基間排列的疏密程度，雖然這樣的改變僅僅只有幾個埃米，但卻足以影響 lipid A 和 TLR 4 的主客作用關係



圖一 生物超分子脂多醣的化學結構(左)及可能形成的聚集體(右)

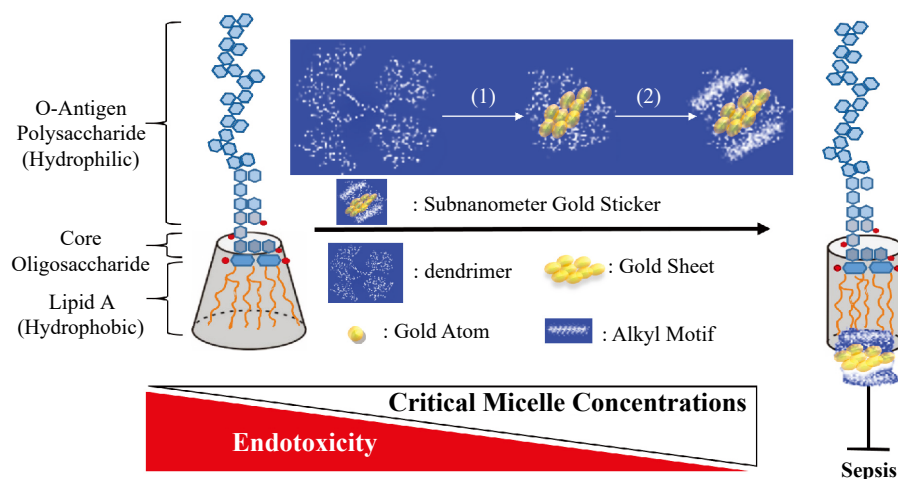


圖二 (A)脂多醣聚集體與免疫強度的關係。(B)脂多醣活性中心(lipid A)的排列疏密度是引發免疫強度的關鍵

(host-guest interaction)[6, 7]，引起不同強度的免疫反應（圖二 A）。有趣的是，生物物理學家認為不同 LPS 聚集體，lipid A 烷基與烷基之間疏密程度也會不同（圖二 B），當 LPS 自組裝成層狀結構(Lamellas)，將會導致 lipid A 的烷基間的隊形相互靠近，形成較為緻密的排列而導致 LPS 活性失效；若是 LPS 自組裝成 cubosomes 及 hexosomes，lipid A 的烷基與烷基的排列也會較為鬆散，而烷基與烷基錯開的角度也會有微小差距，其中以 inverted hexosomes 所含 lipid A 中烷基與烷基錯角最大，其次是 cubosomes，但不論是 cubosomes、hexosomes 都會使 LPS 引發劇烈的免疫反應。然而，在生物體內 LPS 的自組裝過程，不會停在層狀結構(L)，反而會進而水合形成微胞(V)，並會再繼續發展成其它形狀，如 hexosomes (H)和 cubosomes (Q)，更重要的是聚集體的轉變往往是受到溫度、鹽類及二價離子的

調控，目前已經有文獻指出在生物體中最穩定的結構是 cubosomes [8]，這是 lipid A 的烷基之間最放鬆的隊形狀態，也是與 TLR 4 最好的親合力狀態，這就是本文下標所言：殺菌之後真的就沒事了嗎？值得深思來自細菌死亡後遺留的外膜分子所造成的危害，不受控制的聚集狀態會造成脂多醣與 TLR 4 的親合力改變，而引發高強度的免疫活性危害人體健康。

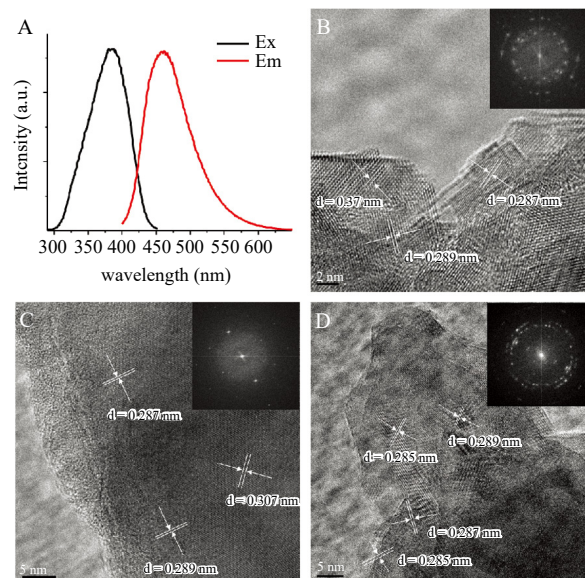
脂多醣在體內會先被初級免疫細胞（例如巨噬細胞等）表面的 TLR 4 辨識而引發促炎症轉錄因子 NF- κ B 路徑之免疫反應，釋放 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等發炎性細胞激素以擴大發炎訊號，形成細胞素風暴[2]。內毒素在臨床上會引發敗血症，嚴重引起敗血性休克和多重器官衰竭，由於病程進展快速且死亡率極高，常讓家屬感到錯愕明明人昨天還好好的，但病程卻急轉直下，目前臨床上並沒有特效藥解決此臨床急症，但是有黃



圖三 金奈米團簇可以有效鎖住脂多醣的 lipid A，中和內毒素的毒性[9]

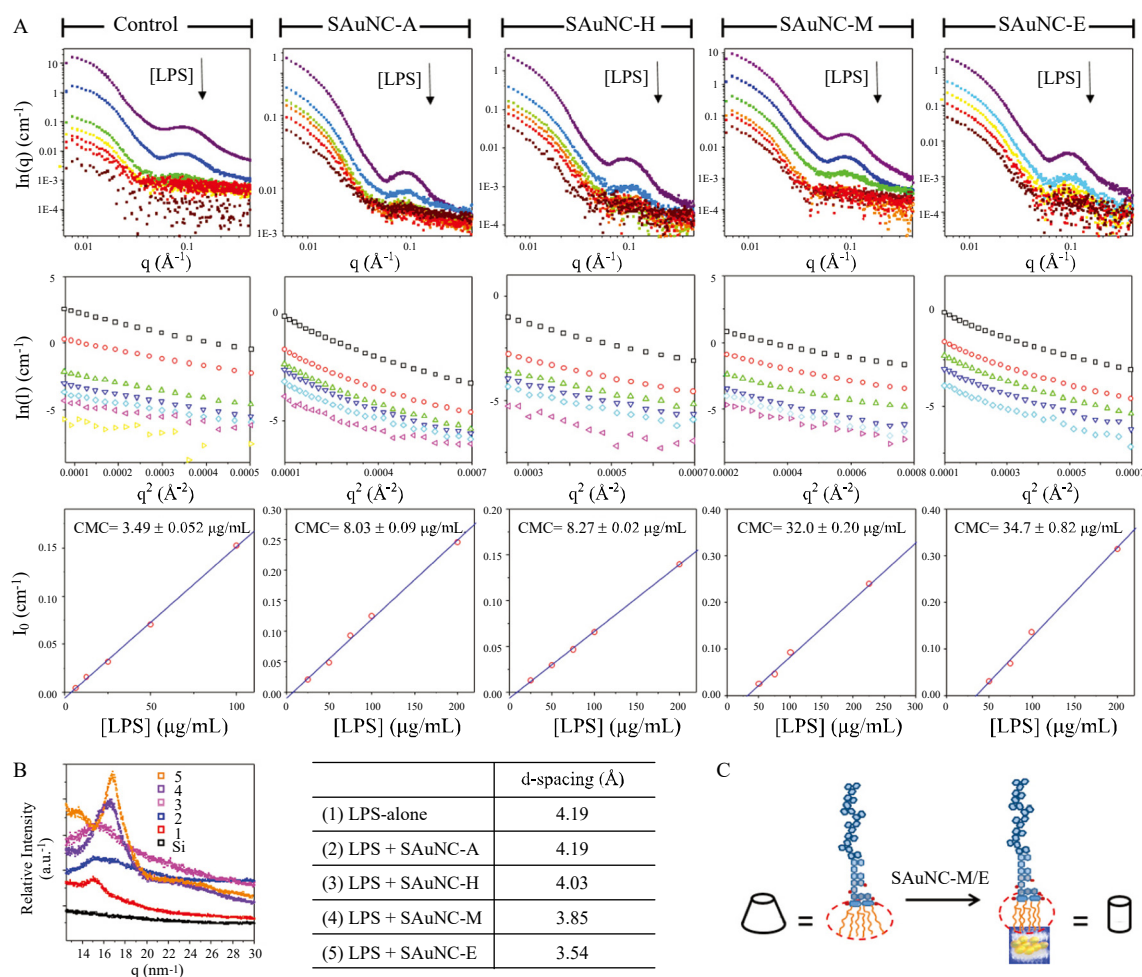
金治療時間的敗血症急救指南方針，針對症狀採取急救措施，並給予抗生素殺掉革蘭氏陰性細菌，常使用的多黏菌素類抗生素（例如：polymyxin B 和 colistin），然而這類抗生素具有腎毒性和神經毒性，並且已經有抗藥性菌株存在。本研究團隊新創金奈米團簇[9]，其尺寸小於 1 奈米，實驗證實金奈米團簇會吸附內毒素的 lipid A，成功地縮窄 lipid A 的烷基與烷基於奈米尺度下的間距（圖三），從 4.19 Å 緊縮到 3.54 Å，減少 lipid A 生物毒性之活性，證實金奈米團簇可有效鎖住內毒素的 lipid A 毒性結構，金奈米團簇在血液循環時間長，可伺機而動將引發敗血性休克的元兇之一加以清除，且金奈米團簇單獨存在並不會引起體內的免疫反應，顯示出金奈米團簇的生物安全性。

整體實驗的發想來自一張電子顯微鏡圖（圖四），由這張圖可以回答，這個金奈米團簇被設計成為內毒素抑制劑的獨特處，關鍵在於如此小的尺寸下，通常都只能藉由螢光波長判斷其特性（圖四 A），不過在偶然的機會下，筆者發現此金奈米團簇會堆積成片狀物（圖四 B~D），並且有些區域會呈現金原子整齊的排列，尺寸小於 1 nm 時，我們無法觀察到其單一微粒的型態，但藉由片狀物的形成，大致可以推測這個金奈米團簇可能是平面結構，而要能夠與內毒素的 lipid A 作用，又要能調控烷基與烷基的間距，具有平面結構的金奈米團簇將會是很好的候選材料，若是使用大尺寸或含有曲面的奈米材料，反而可能會加速脂多醣自身的聚集。另外，為了讓 lipid A 能夠



圖四 金奈米團簇的螢光特性及可能的結構探討[9]

容易黏附在金奈米團簇表面，我們注意到不論金奈米團簇表面的親疏水性質為何（圖五 A 標示為 SAuNC-H 和 SAuNC-A），都會改變脂多醣自身的臨界聚集濃度，但只有較疏水的金奈米團簇 (SAuNC-H) 對 lipid A 有明顯的影響（圖五 B），其實這一個現象我們在 2015 年 Nano Letters 的文章中，也提到過，有可能是金奈米團簇表面的疏水官能基比較容易和 lipid A 作用，因此我們特意修飾了一層甲基(methyl)或乙基(ethyl)官能基（圖五 A 分別標示為 SAuNC-M 和 SAuNC-E）作為黏著劑，有趣地發現這兩種金奈米團簇

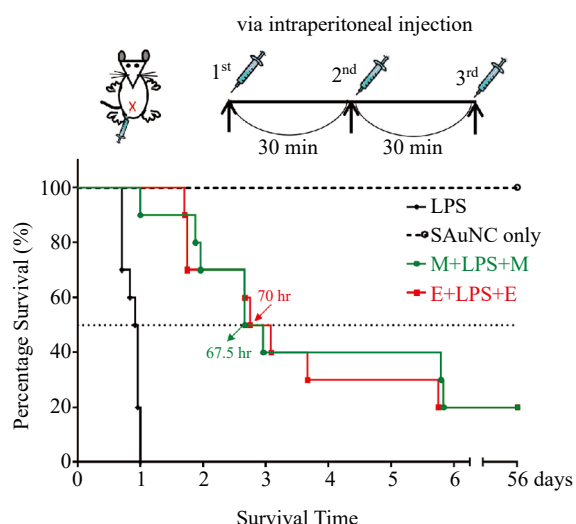


圖五 金奈米團簇影響脂多醣自身的臨界聚集濃度及改變 lipid A 的烷基的間距[9]

很明顯地窄化了 lipid A 烷基間的間距，可能是發生了如圖五 C 的有趣現象。

就實用性而言，我們直接挑戰動物實驗，為此需要先解決三個重要問題：一、金奈米團簇是否會被生物體內免疫系統辨識為外來物？如果會，小鼠實驗就形同胎死腹中宣告結束。因為免疫系統係由免疫器官和免疫細胞來建構生物體內抵抗外來物之防禦系統，具有辨識(recognition)和反應(response)之重要功能，外來物亦可稱為抗原(antigen)，可能是細菌、病毒、寄生蟲、及外來蛋白質等，會被免疫細胞所辨識進而啟動免疫反應將其消滅。此時，金奈米團簇若是透過小鼠實驗經常使用的血液注射途徑(intravenous injection)或腹腔注射(intraperitoneal injection)進入到小鼠體內，金奈米團簇會接觸到很多細胞（例如：血球、血小板、內皮細胞等）、血漿蛋白

質及免疫細胞等如此複雜的環境，預測結果判讀會難以釐清金奈米團簇和免疫細胞的因果關係，並誤解為金奈米團簇會引發免疫反應。因此，將使用免疫學實驗會使用的方法，將抗原直接經由淋巴系統爾後進入血液循環，讓首次接觸金奈米團簇的是免疫細胞群，以測量血液中指標性細胞激素，因為免疫細胞啟動反應後（釋放細胞激素），當訊號(細胞激素濃度)達到高峰值便會逐漸降低。接著要考慮的是劑量的問題，依據金奈米團簇結構來假設一莫耳金奈米團簇可以捕捉多少莫耳 LPS？若是金奈米團簇的劑量不足以捕捉 LPS，也會以為金奈米團簇進入到生物體內失活了。最後，再根據敗血症小鼠模式所需要注射的 LPS 劑量反過來推敲需要多少劑量的金奈米團簇進行治療，當然劑量是否超過小鼠體內的最大耐受量。上述的問題點一一釐清後，著手策畫



圖六 金奈米團簇吸附脂多醣 lipid A 可防止內毒素誘導的敗血症，提升小鼠的存活時間 [9]

小鼠敗血症模式，結果也獲得證實（圖六），金奈米團簇透過吸附脂多醣的 lipid A 可防止內毒素誘導的敗血症，提升小鼠三倍的存活時間。此研究成果價值展現出金奈米團簇極具潛力將可開發為治療敗血症的新型奈米醫療藥物，未來期望進一步合併抗生素的使用，金奈米團簇從病症的初期鎖住內毒素之毒性，拓展奈米醫藥研究成果對臨床敗血症之嶄新醫療應用性。

參考文獻

- [1] R. S. Hotchkiss and E. R. Sherwood, *Science* **2015**, 347, 1201-1202.
- [2] R. S. Hotchkiss, L. L. Moldawer, S. M. Opal, K. Reinhart, I. R. Turnbull and J. L. Vincent, *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, 2.
- [3] P. J. Q. Xiaoyuan Wang, *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Dordrecht New York: Springer **2010**; Vol. 53.
- [4] B. S. Park and J. O. Lee, *Exp. Mol. Med.* **2013**, 45.
- [5] K. Brandenburg, S. S. Funari, M. H. J. Koch and U. Seydel, *J. Struct. Biol.* **1999**, 128, 175-186.
- [6] K. Brandenburg, H. Mayer, M. H. J. Koch, J. Weckesser, E. T. Rietschel and U. Seydel, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 555-563.
- [7] U. Seydel, L. Hawkins, A. B. Schromm, H. Heine, O. Scheel, M. H. J. Koch and K. Brandenburg, *Eur. J. Immunol.* **2003**, 33, 1586-1592.
- [8] K. Brandenburg, M. H. J. Koch and U. Seydel, *J. Struct. Biol.* **1990**, 105, 11-21.
- [9] F.-H. Liao, T.-H. Wu, Y.-T. Huang, W.-J. Lin, C.-J. Su, U.-S. Jen, S.-C. Kuo and S.-Y. Lin, *Nano Lett.* **2018**, 18, 2864-2869.