

行政院衛生署疾病管制局 九十三年 度科技研究計畫

成果報告

(自 93 年 1 月 至 93 年 12 月止)

計畫名稱：建立赤尾鮎毒蛇之毒腺細胞株

計畫編號：DOH93-DC-1002

研究起訖：(年月日) 93年1月1日至93年12月31日

申請機構：國立台灣大學醫學院微生物學科所

主持人：許翠瑛

職 稱：副教授

聯絡電話：23123456

電子郵件：[tyhsu@ha.mc.ntu.edu.tw](mailto:tyhsu@ha.mc.ntu.edu.tw)

聯 絡 人：許翠瑛

傳 真：23915293

填表日期：92年12月13日

註:請依契約書第十一條之規定時程繳交，一式四份

目 錄

目 錄	頁 碼
一、中文摘要	( )
二、英文摘要	( )
三、前言	( )
四、材料與方法	( )
五、結果	( )
六、討論	( )
七、結論	( )
七、參考文獻	( )

共 ( )頁

## 中文摘要

建立赤尾鮎毒腺細胞株，細胞可繼代培養並能分泌蛇毒，產生的蛇毒具有相當的毒力，以作為抗赤尾鮎血清疫苗及希望同時獲得蛇毒中多種重要的具生物活性蛋白用於疾病治療、診斷的工具及學術研究上的應用是此研究計畫主要的目的，目前已建立組織免疫染色法鑑別毒腺細胞，並應用磁珠的方法將毒腺上皮細胞自組織中分離得到，在最佳的條件下可獲得 1 萬個細胞。在進行數次毒腺細胞培養實驗，發現赤尾鮎初級的毒腺細胞無法在牛皮膠原蛋白、rhodostomin 及蛇皮內側基質分子量在 100Kd 以下的蛋白覆蓋的平盤上附著，只有在覆蓋含分子量 100Kd 以上之蛇皮內側基質蛋白之細胞培養盤才能附著，經細胞螢光免疫染色法證實經過 10 星期的培養，毒腺細胞仍被 pan-keratin 抗體辨識，培養 1 天、3 天及 10 天之毒腺細胞的細胞核 DNA 可被染上 DAPI。初級毒腺細胞可以維持長達 120 天以上，4 次繼代培養依然可以存活，不同濃度 EGF、ACh 及基因轉殖作用下無法改變毒腺細胞的數目，所以必須再嘗試其他的培養條件。分析在含不同濃度的 EGF 及 ACh 培養液存活的毒腺細胞上清液，其總蛋白質質量變化不大。利用 Albumin deplete kit 去除血清蛋白，於赤尾鮎的蛇毒蛋白可去除 96.1% 蛋白，胎牛血清標準品則去除 93.4% 蛋白，細胞培養液去除 95.2% 蛋白。SDS-PAGE 及西方墨點法，毒腺細胞培養直至十四天都未測量到赤尾鮎蛇毒蛋白。成功建立酵素連結免疫吸附檢驗法(ELISA)，以測定不同濃度的赤尾鮎蛇毒蛋白，最適合的抗赤尾鮎及龜殼花抗體的濃度是在 10 $\mu$ g/ml 至 0.1 $\mu$ g/ml，最低偵測底限為 1ng/ml，但在細胞培養液中的蛇毒濃度則需再進一步測量。

## Abstract

Development of venom gland cells from *Trimeresurus gramineus* (Taiwan green habu) to produce venom is important as an additional source to manufacture antivenom and as a source of useful biologically active molecules to become a novel therapeutic agents, diagnosis and research tool. We established the immunohistochemical method to identify venom gland cells and in best result, ten thousand epithelial cells from venom gland obtained by magnetic adsorption method. In our studies, venom gland cell could not attached on culture plate which were precoated with calf skin collagen, rhodostomin or snake skin matrix proteins under 100 Kd. Immunocytochemical staining of primary venom gland cell, 10 weeks in culture after being placed in immunfluorescence slide, using pan-keratin antibodies to recognize epithelial cell venom gland cell are stained positive. After 1, 3 and 10 days in culture, they were stained positively by DAPI. The cultures of venom gland cells can be maintained up to 120 days and 4 passages. The venom gland cells were stimulated with EGF or ACh and total protein in culture medium did not change significantly. Cells could not proliferate even by large T antigen transfection. Albumin depletion kit depleted 96.1% protein of *Trimeresurus gramineus* venom, 93.4% protein of bovine serum albumin and 95.2% protein of cell supernatant. The secretion of venom could not be demonstrated in supernatant of 14-day gland cell culture by SDS-PAGE and Western blotting. A rapid and sensitive ELISA for detecting *Trimeresurus gramineus* venom was successfully established. The optimal concentration of anti-*Trimeresurus gramineus* and *Trimeresurus mucosquamatus* serum was between 10 $\mu$ g/ml to 0.1 $\mu$ g/ml. This ELISA test can detect venom with the lower detection limit of 1ng/ml.

Key words: Primary cell culture, venom gland, *Trimeresurus gramineus*

## 前言

台灣地區常見的 6 種毒蛇分別屬於腹蛇科(viperidae)的赤尾鮫、龜殼花、百步蛇、鎖鏈蛇及蝮蝠蛇科(elapidae)的台灣眼鏡蛇與兩傘節，除赤尾鮫外其餘五種已被列為保育類動物[1]。利用蛇毒製造出抗蛇毒血清以治療被毒蛇咬傷的人，另外蛇毒的許多成分已被純化分析出來，有些成分則已應用在臨床治療及基礎醫學研究。為了能有源源不斷的蛇毒來源，且能避免持續捕捉毒蛇破壞生態環境，毒腺細胞株的建立是非常重要的。

毒蛇的毒腺是一種外分泌腺體細胞組成，為製造及儲藏毒液的場所[2,3]。此腺體由三部分構成，分別為(1)主毒腺(main gland)—後端膨大的部分，由結締組織構成，分為許多小葉(lobules)；每一小葉含有甚多單一或複式小管(simple or compound tubules)，每一小管由後向前方中央部集合，開口於毒管之後端，毒管前端開口於毒牙鞘(fang sheath)中。小管內襯以漿液性分泌上皮(mucous epithelium)。其細胞之高度會隨毒液分泌週期不同而改變[4]。(2)毒管(venom duct)，又分為 primary duct 及 secondary duct。(3)副腺體(accessory gland)，包於毒管外，為柱狀漿液性分泌上皮(serous epithelium)構成[2]。

毒蛇的毒液是毒腺細胞之分泌物，其顏色從無色到琥珀色，依據文獻的記載赤尾鮫平均咬物一次排毒液量約在 27.5mg。毒液中大約 80-90%是水，而其他部分則是由酵素、性太、醣蛋白與少量其他物質所組成。蛇毒是由複雜和混合多種蛋白質所構成，就目前所知蛇毒蛋白大約是由 50 種到 60 種成分所構成，有些報告甚至可分離出多達 133 種蛋白質，以神經性蛇毒蛋白主要是由於阻斷神經肌肉之突觸前及後傳導而導致呼吸活動麻痺，出血性蛇毒蛋白則是與凝血系統、kallikrein 或補體作用，而導致血量喪失或是血栓最後導致循環衰竭。蛇毒蛋白主要可分為四類包括毒性物質、無毒性成分、酶及抑制酶的因子 [5,6,7]。赤尾鮫蛇毒已被研究的成分約有 26 種，其中 Trigramin 成分的發現及藥理的研究更與後來新型的抗血栓有重要的關係[8]。

目前自毒蛇培養出初級毒腺細胞總共有三篇報告，一篇是在蘇聯的研究[9]，自 *Vipera berus* 培養出具有分泌能力的上皮細胞，在電子顯微鏡下觀察到毒腺細胞與在活體內一樣呈現複雜的細胞間的連結結構及細胞膜的極性，用組織免疫學法也證實培養的分泌細胞具有合成蛇毒的作用，另外加入 carbochole，此為 M-cholinoreceptor 的作用劑，可以誘發細胞的分泌週期。另一篇是巴西所做的研究[10]，自 American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*)分離培養出毒腺細胞，總計自 65 條的毒蛇組織樣本中得到 23 個細胞株，最好的培養狀況是培養盤先附著一層蛇本身皮膚的膠原蛋白，毒腺細胞培養基為 CMRL 加入 10%的胎牛血清及其他的添加物，於 30°C 溫度下培養，14%會有污染產生，75%可培養出細胞，這些上皮細胞分泌出的蛇毒濃度達到 0.1  $\mu$ g/ml。在英國的報告[11]自 *Bitis gabonica* 的毒腺細胞分離得到，初級細胞可維持 7 個月，形態為柱狀上皮細胞，以 immuno peroxidase 技術證明細胞能合成蛇毒，用 ELISA 的方法分泌蛇毒的量

會達到至少 200ng/ml。赤尾鮫毒蛇初級毒腺細胞培養則未有相關報告。

本研究第一年的工作著重於細胞培養技術及組織免疫學的方法分離鑑別出初級毒腺細胞，改變不同的培養條件或加入不同的刺激物質，配合酵素連結免疫吸附檢驗法偵測及定量毒腺細胞分泌蛇毒的量，以找出培養細胞的最適條件，用免疫轉漬法及高效能液相分析儀比較自蛇取得的蛇毒及毒腺細胞分泌的蛇毒質和量的變化。成果為建立組織免疫染色法鑑別毒腺細胞，並應用磁珠的方法將毒腺上皮細胞自組織中分離得到，在最佳的條件下可獲得1萬個細胞。發現赤尾鮫初級的毒腺細胞必須在有 coating 蛇皮的膠原蛋白之細胞培養盤才能附著，但蛇的腎臟細胞並不用 coating。腎臟細胞則可達5代以上。建立Bio-Rad蛋白質含量分析以定量細胞培養液中蛋白質量的變化、用西方墨點法了解到毒腺細胞培養液、腎臟細胞培養液與對照細胞培養液有不同的分子呈現。酵素連結免疫吸附檢驗法(ELISA)初步的實驗，針對不同天數所收集的細胞培養液分析，有些細胞培養液的數據較對照組高。

本研究建立的赤尾鮫毒蛇初級毒腺細胞，希望以最簡單的方式培養，而能生產出適量的蛇毒為目標。有鑑於在最初幾次的分離毒腺組織取得細胞培養後，經最初的幾代細胞就無法繼代下去，將利用三種方式使毒腺細胞能增殖或是延長壽命，甚至促進分泌週期，分別為(一)加入生長因子例如 EGF[12]。(二)加入 cholinoreceptor 的作用劑例如 ACh[9, 13]。可以誘發細胞的分泌週期。(三)嘗試以細胞轉型的實驗(transfection)建立可以培養代代相傳的毒腺細胞株。這在人類的腺體細胞都有成功例子例如乳腺細胞[14]、唾液腺細胞[15]及皮脂腺細胞[16]，即是將初級細胞利用 simian virus 40 (SV40) 病毒導致細胞轉型，成為株化的細胞。

本研究將取出赤尾鮫的毒腺，除延續第一年的工作外，將進行腺病毒感染毒蛇的毒腺細胞使成為細胞株的評估工作，並且以酵素連結免疫吸附檢驗法和動物試驗評估毒腺細胞產生的蛇毒的抗蛇毒血清效價。希望建立適合的赤尾鮫毒腺細胞株，細胞可繼代培養並能分泌蛇毒，產生的蛇毒具有相當的毒力，以作為抗赤尾鮫血清疫苗之用，如此提供取得蛇毒的另一來源，除了確保蛇毒的品質外，可免除補蛇及養蛇的工作，日後延伸至其他保育類的毒蛇，更可落實維護生態環境的目的。

## 材料與方法

1. 赤尾鮎的來源向專門的捕蛇人購得。

2. 取毒腺前置作業

赤尾鮎餵食小白鼠 1 隻後，開始禁食 2 週，每週採毒連續 4 週，作為以後毒腺細胞分泌蛇毒比較用。第 5 週再餵食小白鼠 1 隻，再禁止餵食食物 3 至 4 週，此時毒腺就會充滿毒液，以利辨識毒腺。

3. 組織免疫學的方法以鑑定毒腺細胞

(1)細胞螢光免疫染色法(Immunocytochemistry)

將細胞培養在 slide well 中，讓細胞生長 2-3 天，將培養基取出丟棄，用 PBS (-)洗細胞，重複洗細胞 3 次。加入 100ul/well 的 chill(-20°C) Acetone 放置 2 分鐘用，去掉 Acetone 溶液，抽封櫃內吹乾。直接 stain cell 則用 PBS(-) buffer wash 3 次。若無法馬上進行則將 Acetone 固定好的玻片放入-70°C 冰箱。自冰箱取出的玻片，必須放在室溫下，15-30 分鐘回溫。slide 放入 PBS 染缸中，2 分鐘 wash 3 次。使用 slide 上滴上 1 級抗體(Keratin,Pan Ab-3)(使用 10 倍稀釋,100  $\lambda$ /well),negative control 組滴上 serum,37°C，反應 1 小時。slide 放入 PBS 染缸中，每 5 分鐘 wash 1 次，共 3 次。滴入 2 級抗體內含 FITC, 37°C，反應 1 小時。slide 放入 PBS 染缸中，每 5 分鐘 wash 1 次，共 3 次。用 Even's solution 溶液完全浸入，染色。烘乾去除水份,使用 90% glycerol 封片。封片完成後，置於螢光顯微鏡下觀察並拍照。

(2)DAPI 染色步驟 (染細胞 DNA)

毒腺細胞離心後，用少量 PBS 溶液混合均勻，點於 21 孔玻片上。細胞點片後置於空氣中晾乾，使用浸丙酮固定細胞 10 分鐘，用 DAPI 染劑蓋滿玻片 20 秒，用 PBS 清洗 5 分鐘，氣乾，用藍色螢光激發，有細胞者會有藍色光點出現，用可見光和螢光互相比對細胞形態。

4.蛇皮的膠原蛋白製備

取一條蛇皮，剝取內側組織，剪成一小段一小段，懸浮於 10ml 的 0.25% 醋酸溶液中，於 4°C 下攪拌 48 小時，用 1000g 離心 2 小時，取上清液，加到 100k 的 Centriplus YM-100，離心 3000g，200 分鐘，4°C，膜上的液體，用 1ml 的 0.25% 醋酸洗膜，取濾液，加到 50K 的 Centriplus YM-50 中，離心 3000g，75 分鐘，4°C，取留在膜上的蛋白質，用 3ml 的 0.25% 溶出膜上的蛋白質，保存於塑膠小管中。

5.蛋白質含量測定方法

製備蛋白質標準稀釋液：完全解凍 1, 250 ug/mL 的標準液，再以純水將其配製成一系列含 10-125 ug/mL 之標準稀釋液。取 12.5-100 ug/mL 的 5 個濃度之標準稀釋液各 400 uL 置於試管，每個濃度 2 支。檢體稀釋液及純水各取 400 uL 2 支與標準稀釋液同時操作。各加硫酸銅溶液稀釋液 2 mL，振盪均勻，室溫靜置 10 分鐘。各加 Folin 試液稀釋液 0.2 mL，振盪均勻，置於暗處 45 分鐘。於分光光度計波長 650 nm 分別測定其吸光度。依照蛋白質標準曲線及檢體之

稀釋倍數，求出檢體之蛋白質含量

#### 6. 初級毒腺細胞培養

毒蛇用乙醚麻醉後，用中性清潔劑洗淨，再用百分之七十的酒精浸泡 20 分鐘，將蛇放入無菌操作箱中處理。取蛇頭，將頭皮輕輕剝離，取出毒腺，而後毒腺組織在培養基中切成 1mm 片狀，經膠原蛋白酶 (1mg/ml)、hyaluronidase type IV-S (150 U/ml) 及 soybean trypsin inhibitor type I-S (0.1mg/ml) 的處理，細胞即可分離，再將細胞放入 12 或 24 孔培養盤中培養，每星期更換培養基三次，細胞每 2 至 3 星期以 1:2 比例稀釋繼代培養。另外，可用 0.25% trypsin-0.02% Versene 使細胞自培養皿表面脫離。培養盤或瓶需先用赤尾鮭膠原蛋白處理，使細胞附著。另外取蛇的腎臟組織作相同的處理以作為對照組。

#### 7. 分離毒腺細胞

毒蛇用乙醚(50-100ml)麻醉，用止血鉗夾住嘴巴，用中性清潔劑洗淨 10 分鐘，百分之七十的酒精浸泡 10 至 15 分鐘，將蛇放入無菌操作箱中處理，用剪刀將蛇頭與蛇身分離，取出毒腺在 5ml 含分解媒的培養基(CHS medium)中切成 1mm 片狀，於室溫下，消化 45 分鐘，用 100um BD Falcon Cell strainer (細胞篩子)，取過濾液 1000g 離心 7 分鐘，取沉澱細胞，用 5ml 的 0.1%BSA-PBS 溶液將細胞打散，1000g 離心 7 分鐘，取沉澱細胞，用 5ml 的 0.1%BSA-PBS 溶液將細胞打散，1000g 離心 7 分鐘，取沉澱細胞，用 2ml 的 0.1%BSA-PBS 溶液將細胞打散，計算細胞數。加入已 coating 好的 dynal beads (beads:cell 為 5:1)，將細胞懸浮液與 dynal beads 混合液放入細胞培養管中(約 1.5ml)，於 2-8°C(將 tube 放在冰上)，輕微轉動 30 分鐘，將細胞懸浮液與 dynal beads 混合液，改放於 1.5ml 微量離心管，貼於磁座，3 分鐘後，將沒有吸附的物質放入另一個 tube(B)中，另外培養。懸浮 bead/cell rosettes 於 1.0ml PBS/0.1%BSA。1.5ml 微量離心管，貼於磁座，3 分鐘後，將沒有吸附放入 tube(B)中，另外培養。最後一次將細胞懸浮於 300ul 的 CMRL/1%FCS 中，取出 25ul bead/cell rosettes 於正立的顯微鏡下觀察 beads 與細胞結合的情形。加入 200U(4ul) releasing buffer 到 bead/cell rosettes solution。將細胞懸浮液與 dynal beads 混合液，於室溫下，輕微轉動 15 分鐘。將 pipetment 轉到 150ul，進行 pipette 8 次以上。將 1.5ml 微量離心管，貼於磁座，而後將液體吸出，放入已事先 coating 好含 10%FCS 的 CMRL1066 培養液中。剩餘的 bead/cell rosettes 再加入 200ul CMRL/1%FCS，pipette 5 次以上，貼於磁座，將細胞吸出，加入已 coating 好含 10%FCS 的培養液中。計算細胞數目。將細胞 seeding 在 24 well plate 中，每個 well 的量是 1ml。

#### 8. 吸附抗體的磁珠的效能試驗

培養 NmuMG 細胞株，所用的培養液為 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)內含有 4.5 g/L glucose、10 mcg/ml insulin 及 10% 胎牛血清，用細胞株取代毒腺細胞，測試吸附抗體的磁珠的效能。將磁珠分為有吸附抗體及沒有吸附抗體二種，分別與 NmuMG 細胞結合作用，按照分離毒腺細胞的步驟進



行，而後將細胞置於顯微鏡下觀察。

## 9. 細胞的修飾作用

### (1) EGF 的刺激

將分離所得的毒腺初級細胞培養一星期，而後在培養液中加入 EGF，分為 4 組實驗，即是對照組-未加 EGF，實驗組為 1ng、10ng 及 100ngEGF，連續作用二星期，每週並收集 3 次細胞培養液，每日觀察毒腺細胞的變化，及將所收集的細胞培養液測定蛋白質濃度，並用 ELISA 方法及 SDS-PAGE 測量蛇毒蛋白的量及定性的表現。

### (2) ACh 的刺激

將分離所得的毒腺初級細胞培養一星期，而後在培養液中加入 ACh，分為 4 組實驗，即是對照組-未加 ACh，實驗組為  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  及  $10^{-5}$ M，連續作用 40 天，每週並收集 3 次細胞培養液，每日觀察毒腺細胞的變化，及將所收集的細胞培養液測定蛋白質濃度，並用 ELISA 方法及 SDS-PAGE 測量蛇毒蛋白的量及定性的表現。

(3)基因轉殖：取  $0.5 \mu\text{l}$  lipofectamine 加  $24.5 \mu\text{l}$  blank CMRL1066 Medium，稀釋 plasmid ( $0.7 \mu\text{l}/\mu\text{l}$ ) ( $1 \mu\text{l}$  plasmid +  $6 \mu\text{l}$  blank CMRL1066 Medium)，取  $2 \mu\text{l}$  稀釋後的 plasmid 加  $23 \mu\text{l}$  blank CMRL1066 Medium (plasmid 濃度  $0.2 \mu\text{l}/\mu\text{l}$ )，兩管靜置 5 分鐘，再混合均勻，室溫下反應 20 分鐘，欲進行實驗之細胞抽去上清，用 blank CMRL1066 Medium 輕微 wash 後再抽去，各 well 放  $50 \mu\text{l}$ ，均勻搖晃一下，放入 incubator  $37^\circ\text{C}$ ，4 小時，4 小時後再放入 complete CMRL Medium  $50 \mu\text{l}$ ，觀察細胞之生長情況 (2-4 週)。

10. SDS 將 Running gel 先行配置，利用 BIO-RAD 配膠系統，之後凝結後，再將上層膠 stacking gel 倒入凝集，形成一片完整的膠，樣品先以 60 度溫度加熱 5 分鐘，加入 sample loading dye，之後將此混合物 loading 到膠的孔洞內，內有加入 TANK Buffer，使可加電流 100v 跑電泳，之後，以 Coomassie blue 染色 30 分鐘，destain solution I 30 分鐘，destain solution II 整晚，觀察後始可封膠。

## 11. 西方墨點分析法(Western blotting)

取下已經跑完電泳的膠，接下來取出電泳夾，黑色面為負級，依序放入 2 張泡棉，濾紙，膜，濾紙，2 張泡棉。放入電泳槽內，還要加放冰在裡面，25mA 通電跑電泳，進行 Transfer 1 小時完後，取出膜，其他可以不要，加入 Amino Black stain solution 觀察直到 band 出現為止。用乾淨的水沖洗乾淨加入 5% milk block 膜 1 小時。取出膜放入已經剪好的塑膠袋，加入經過之 5% milk 稀釋過的 1 級抗體，overnight。取出膜經過 TBST 洗三次每次 10 分鐘。

12. 純化蛇毒蛋白：用 Albumin depletion kit，使用平衡用的緩衝液將赤尾鮫蛇毒、胎牛血清及細胞上清液稀釋至  $200 \mu\text{l}$ ，做法是樣品  $20 \mu\text{l}$  加入平衡用的緩衝液  $180 \mu\text{l}$ 。管柱的平衡作用：將  $400 \mu\text{l}$  平衡用的緩衝液加入管柱中，2000rpm 離心 2 分鐘，丟棄濾液。去掉 Albumin 的作用：加入  $200 \mu\text{l}$  稀釋過的樣品，

2000rpm 離心 2 分鐘，回收濾液，再加回管柱，重複二次。清洗管柱：加 200  $\mu$ l 清洗液到管柱中，2000rpm 離心 2 分鐘，重覆一次，收集濾液，與去掉 Albumin 的作用後收集的濾液，共計約 600  $\mu$ l，此濾液即是去除 albumin 之樣品。沖出與管柱內物質結合的蛋白：更換一個新的收集管，加入 400  $\mu$ l stripping buffer，2000rpm 離心二分鐘，收集濾液，測蛋白質濃度。

### 13. 酵素連結免疫吸附檢驗法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)[17, 18, 19]

ELISA 的方法敘如下，用 coating buffer 稀釋赤尾鮫蛇毒 (0.001-100ug/ml)，50ul 蛇毒蛋白加入 96 平盤，放置 4°C 冰箱一晚，使用已 coating 好的平盤，先用清洗緩衝液清洗 4 次，每次清洗停 30sec 到 1min，加入 100ul 2% skim milk diluent，1°Ab 用 2% skim milk diluent，在 96 孔的平底微滴定盤加入同稀釋濃度的 1Ab，每孔 50ul，37°C 下作用 1 小時，用清洗緩衝液清洗 4 次，每次清洗停 30sec 到 1min，2°Ab 用 2% skim milk diluent 稀釋成不同倍數，加入 100ul diluted 2°Ab，37°C 作用 1 小時，用清洗緩衝液 250ul 清洗 4 次，每次清洗停 30sec 到 min，加入 100ul TMB 室溫下置於暗處作用 30min，加入 50ul 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，450nm 下讀值。

## 結果

### 自赤尾鮫蛇皮的內側組織製備供毒腺細胞附著的基質

蛇皮的內側組織溶於 0.25% 醋酸，經離心去除無法溶解的雜質，所得的上清液稱為原液，取部分液體中和後，經 SDS-page 分析，見圖一的 lane 1 主要有 4 條 band 分子量大約分別是在 130Kd、85-124 Kd 之間，接近 51Kd 及 39Kd。原液經過 Centriplus YM-100 濃縮管(分子量超過 100Kd 會通過濃縮管內的濾膜)，圖一的 lane 2 為留在 Centriplus YM-100 濾膜上層的液體，依舊為 4 條 band，但將 Centriplus YM-100 濾膜切出，用 0.25% 醋酸溶出濾膜內的蛋白質，電泳結果顯示一條主要 130Kd 的 band (lane 5)，另外把通過 Centriplus YM-100 的濾液並無任何 band 呈現(lane 3)，但是再經 Centriplus YM-50(分子量超過 50Kd 會通過濃縮管內的濾膜，分子量介於 100Kd 與 50Kd 之間則留在濾膜的上層)的步驟，電泳分析在 51Kd 有一條 band。於電泳的實驗皆會用牛皮的膠原蛋白第一型(分子量為 130Kd)及胎牛血清(分子量為 67Kd)作為對照標準。

因赤尾鮫毒腺細胞需要赤尾鮫蛇皮蛋白才能貼附，為取代蛇皮膠原蛋白的獲得採取二種措施，一是將自 *Calloselasma rhodostoma* 蛇毒分離出的 rhodostomin，依研究報告血小板完全展平於已有 rhodostomin 附著的細胞平盤上，感謝羅時成教授提供 GST-rhodostomin 質體，在我們實驗室經由 E. Coli 大量繁殖，純化，得到 rhodostomin，以 0.1 $\mu$ g/mm<sup>2</sup> 附著於細胞平盤，將毒腺細胞培養於此平盤中，細胞無法貼附，見圖二。二是簡化蛇皮蛋白的純化步驟，將蛇皮取下後，用藥勺輕刮內皮組織，浸泡於 0.25% 醋酸，4°C 攪拌 48 小時，1000g 離心 2 小時，取上清，用濃縮管(Centriplus YM-100)將蛇皮蛋白濃縮 3.5 倍，即可

做為赤尾鮫毒腺細胞附著基質，圖三為不同濃度蛇皮內側的基質蛋白的電泳圖譜。另外由蛇皮蛋白的經 SDS-page 分析，主要有 4 條 band 分子量大約分別是在 130Kd、85-124 Kd 之間，接近 51Kd 及 39Kd，嘗試用 4 種濃縮管(Centriplus YM-100、YM-50、YM30 及 YM10)，將蛇皮內側的基質蛋白分為四類分子量範圍的蛋白，依次是 100Kd 以下、50Kd 以下、30Kd 以下及 10Kd 以下，所得的蛋白質溶液，測完濃度，再分別以  $0.1\mu\text{g}/\text{mm}^2$  附著於細胞平盤，並將毒腺細胞培養於此平盤中，初步結果發現 100Kd 以下的蛇皮內側的基質蛋白無法做為毒腺細胞的附著基質。圖四為濃縮步驟中蛋白質的變化。

### 磁珠吸附細胞的效能測定

NmuMG 細胞株為小鼠的乳腺細胞，也是與毒腺細胞相同為上皮細胞，為了解磁珠 coating 好後，是否具有與細胞有結合的能力，因此進行這項實驗，結果發現沒有經過抗體 coating 的磁珠，與細胞結合的能力很低，見圖五，coating 過的磁珠會與細胞結合外，在顯微鏡下也觀察到，有 coating 磁珠的量明顯多於無 coating 磁珠，見圖五(D)。另外相同的細胞數( $2 \times 10^6$ )及磁珠數( $8 \times 10^6$ )，有 coating keratin 抗體的磁珠比無 coating 的磁珠抓到的細胞量有 7 倍之多。

### 毒腺細胞培養的情形

取過 33 條毒蛇的毒腺，平均取出  $2.91 \pm 2.76 \times 10^5$  個細胞，經過磁珠的分離出上皮細胞，最長可存活 120 天，經過 4 次繼代培養依然可以存活，但細胞數目減少，細胞有些變形，而且細胞無法增殖。圖六是不同的天數培養的毒腺細胞形態。圖七經細胞螢光免疫染色法證實經過 10 星期(約 70 天)的培養，毒腺細胞仍被 pan-keratin 抗體辨識，屬於上皮細胞。另外用 DAPI 染毒腺細胞的細胞核內的 DNA，證實培養 1 天、3 天及 10 天的毒腺細胞都可被染上 DAPI，見圖八。

### EGF 對毒腺細胞的影響

赤尾鮫毒腺細胞，培養液中分別加入 1ng/ml、10ng/ml 及 100ng/ml 的 EGF，連續觀察二星期察細胞的變化，並再第一、三、五、八、十及十一天取出上清液，測定總蛋白質濃度的變化及內含蛇毒蛋白量的情形，結果總蛋白質量在對照組及加有 EGF 的實驗組並無明顯差異，見圖九。細胞形態也經二星期的觀察也無明顯變化。

### ACh 對毒腺細胞的影響

毒腺細胞，培養液中分別加入  $10^{-3}\text{M}$ 、 $10^{-4}\text{M}$  及  $10^{-5}\text{M}$  的 ACh，連續觀察 40 天，每週並收集 3 次細胞培養液，測定總蛋白質濃度的變化及內含蛇毒蛋白量的情形，結果總蛋白質量在對照組及加有 ACh 的實驗組並無明顯差異，見圖十。細胞形態的觀察雖無明顯變化，但細胞背景有些微小的顆粒出現。

### 基因轉殖

將 large T antigen 以 liposome 的方式 transfect 到毒腺細胞內，第一次實驗是用培養 52 天的毒腺細胞，第二次試驗用培養 10 天的毒腺細胞，持續觀察細胞中。

### 毒腺細胞分泌物質以 SDS-page 及西方轉漬法分析

赤尾鮫蛇毒蛋白的分子量在 85Kd 以下居多，而分析不同時間收集的赤尾鮫

毒腺細胞培養液，對照細胞培養液，分子量 81 至 51Kd 的蛋白質最多，細胞培養液中含有大量的胎牛血清蛋白質，分析第 4、8、10、12 及 14 天所收集的毒腺細胞培養液，發現照細胞培養液蛋白質分子的呈現無明顯差異。但在培養至第 5 天的腎臟細胞培養液分子量 51Kd 以下有一明顯的 band。

圖十二應用西方轉漬法分析毒腺細胞培養液，發現細胞培養液可被製備自馬抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒多株抗血清(經 150 倍的稀釋)部分辨認。疾病管制局製造的抗赤尾鮎與龜殼花蛇毒血清在圖十二中顯示有辨識赤尾鮎蛇毒的作用。第 5 天的腎臟細胞培養液分子量 51Kd 以下有明顯的 band，確無法被抗赤尾鮎與龜殼花蛇毒血清所辨識，可能不屬於蛇毒蛋白。

#### **純化毒腺細胞培養液中的蛇毒蛋白**

因為細胞培養液中含有大量血清蛋白，會干擾蛇毒蛋白的分析，嘗試用 Albumin deplete kit 已去除血清蛋白，初步結果如圖十三。在赤尾鮎的蛇毒蛋白可去除 96.1% 蛋白，胎牛血清標準品則去除 93.4% 蛋白，細胞培養液去除 95.2% 蛋白。

#### **毒腺細胞分泌物質以酵素連結免疫吸附檢驗法分析**

圖十四為不同濃度的赤尾鮎粗蛇毒 10 $\mu$ g/ml 至 10<sup>-5</sup> $\mu$ g/ml，於不同濃度的之馬抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒多株血清 100 $\mu$ g/ml 以 10 倍連續稀釋至 10<sup>-4</sup> $\mu$ g/ml 情形下，和 4000 倍之 peroxidase 之 antihorse (Fab)2 的 IgG(2Ab) 的反應。測定不同濃度的赤尾鮎蛇毒蛋白，最適合的的抗赤尾鮎及龜殼花抗體的濃度是在 10 $\mu$ g/ml 至 0.1 $\mu$ g/ml，最低偵測底限為 1ng/ml，但在細胞培養液中的蛇毒濃度則需再進一步測量。

## 討論

依據文獻記載[9], 毒蛇毒腺的細胞培養條件, 最好是用蛇皮所純化而得的膠原蛋白作為 coating 於細胞培養盤的基質, 較為適合毒腺細胞附著, 主要是取得蛇類的膠原蛋白第一型為 coating 物質, 我們嘗試用牛皮純化的膠原蛋白第一型與 rhodostomin 取, 結果是毒腺細胞不能吸附。進一步發現利用濃縮管將蛇皮的基質蛋白腎臟細胞根本不需要 coating 細胞就能貼上細胞培養瓶平盤。事實上, 剝離自蛇皮內之基質蛋白質是由 4 種大小不同的分子組成, 由圖一可見, 依照目前由濃縮管的分離出膠原蛋白第一型的方法在一批蛇皮內基質蛋白質原液大約可獲得十分之一量的蛇膠原蛋白。由於所獲得的膠原蛋白純度還不夠, 因此在培養毒腺細胞直接是用原液, 離心, 經濃縮管, 取上清液, 測蛋白質含量, 每 1mm<sup>2</sup> 細胞培養瓶平盤覆蓋 0.1ug 蛋白質。

毒腺組織是由不同的細胞所組成, 依據 Duarte 氏的報告[10]來自 *C. d. terrificus* 毒腺組織片直接培養可發現 6 種不同形態的細胞, 其中大約有 30% 是具有分泌能力的上皮細胞, 這些細胞在幾次繼代培養後會被類似纖維母細胞所入侵而消失。在我們初次實驗將赤尾鮫的毒腺組織片, 經酵素處理使細胞分離, 在培養時間也發現細胞也被類似纖維母細胞所入侵而消失; 對照實驗於腎臟細胞也有類似的情形。但是經由免疫磁珠分離所得的毒腺細胞培養至今並無此現象。

細胞形狀的維持主要是靠三種 cytoplasmic filament, 亦即為 actin filaments、microtubules 及 intermediate filament, 其中 intermediate filament 具有組織專一性, 像上皮細胞的 intermediate filament 就被稱為 keratin filament, 而肌肉細胞則稱為 desmin filament[16]。Keratin 家族最先是由 Moll 氏所分類[20], 目前已有 20 多種 keratin 被發現[21], 為了確認毒腺上皮細胞, 因此用能辨識 keratin 的抗體以分離出具有分泌能力的上皮細胞, 經由傳統 H&E 染色及組織免疫染色法證實 keratin 的抗體會與毒腺細胞結合, 圖二即是呈現這樣的結果。我們並將此 keratin 的抗體吸附於磁珠上, 圖三顯示與組織內的毒腺細胞結合的情形良好, 另外與分離而得的毒腺細胞也能結合。

至目前為止總計進行 13 次毒腺細胞培養的試驗, 進行到細胞有四次為用牛皮膠原蛋白第一型 coating 的細胞平盤培養, 毒腺細胞無法附著。另四次用有 coating keratin 抗體的磁珠分離細胞, 其中二次分別培養 12 天及 30 天因污染而結束實驗, 目前還有二批毒腺細胞依舊維持, 細胞雖無法增殖, 但持續收集細胞培養液, 以作進一步分析。所觀察到細胞的型態呈現在圖四, 與 Duarte 氏所呈現的細胞相似的有三種包括三角形細胞、類似上皮細胞及及空泡狀細胞 (vascuolated cell)。三次用磁珠分離細胞出在最好的情形可獲得到約 10000 上皮細胞, 而目前有一批細胞已維持 45 天以上。

在細胞分泌蛋白的測定方面, 在定性的結果赤尾鮫蛇毒蛋白的分子量在 85Kd 以下居多, 隨者濃度的不同, band 的強度也不同, 在細胞培養液的電泳圖呈現 51Kd 以下有數種蛋白質表現, 85Kd 至 51Kd 的蛇毒分子可能被胎牛血清蛋白給遮蔽, 而在西方轉漬法的結果發現用市售的抗赤尾鮫與龜殼花蛇毒血清為辨識蛇

毒蛋白的抗體發現赤尾鮎 30ng 就可被辨識，細胞培養液的部分在 175Kd 有明顯的 band，但是 51Kd 以下卻無 band，可能的原因可能適(1)用於西方轉漬法分析之細胞培養液的蛋白質量太少，圖六用於測量的蛋白質量是圖七的 5 倍。(2)這次的上清液是來自未經磁珠分離的細胞，細胞太雜，相對分泌性的上皮細胞少，可測得的蛇毒蛋白就更少。(3)細胞上清液的血清蛋白含量高，不利於蛇毒蛋白分子的移動。

在定量方面用 ELISA 的方法，圖八、圖九及圖十顯示抗赤尾鮎與龜殼花蛇毒血清與蛇毒蛋白結合不好，專一性不夠，不論是用赤尾鮎蛇毒蛋白或是抗赤尾鮎與龜殼花蛇毒血清 coating ELISA 平盤都無法找出很好的線性關係。勉強用固定的抗赤尾鮎與龜殼花蛇毒血清抗及 peroxidase 之 antihorse (Fab)2 的 IgG，測得不同濃度的赤尾鮎蛇毒蛋白與吸光度才呈自然對數的變化，見圖十一。將一批毒腺細胞的培養液用 ELISA 方法分析則連續培養 20 天後，赤尾鮎蛇毒蛋白似乎才有增加的情形。在對照組腎臟細胞培養液則是隨培養天數，赤尾鮎蛇毒蛋白呈不規則的變化。在這 ELISA 的方法穩定性不夠，辨識赤尾鮎蛇毒蛋白專一性不夠，加上只測試一批毒腺細胞的培養液，還要作更多的實驗才能確定自毒腺分離出的初級細胞是否具分泌蛇毒蛋白的能力。

## 結論

綜合目前的結果確定培養平盤 coating 赤尾鮫蛇皮內層的基質蛋白是毒腺細胞需要的條件，藉由免疫磁珠法的方法可以有效的分離出具有分泌能力的毒腺上皮細胞，雖然這些初級細胞無法增殖，但由 SDS-page 與西方轉漬法分析培養毒腺細胞培養液，與對照培養液比較有些不同的蛋白質呈現，但與真正的蛇毒蛋白相似的比例有多少，必需進一步實驗。另外 ELISA 實驗中辨識蛇毒蛋白的抗體的專一性也需要再改進，以增加對毒腺細胞分泌蛇毒蛋白在量化的數據上能更清楚表現。

## 參考文獻

- 1、動植物保育法
2. 郭耀文、林有啟、張曾源和劉鴻文 蛇毒蛋白之分泌及其可能-毒腺細胞之細胞株學說。醫學研究 1996; 16(6):355-363.
3. Brown RS, Brown MB, Bdolah A, Kochva E. Accumulation of some secretory enzymes in venom glands of *Vopera palaestinae*. 1975; 229(6):1675-1679.
4. Kochva E The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* 1987; 5(1):65-106.
5. Francis SMJ. Snake venoms. *Drugs* 1997;54 suppl 3:1-10.
6. Theakston RDG and Kamiguti A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon* 2002;40:579-651.
7. Tu AT Overview of snake venom chemistry. *Nature Toxin* 1996;37-62.
8. Ouyang C, Teng CM and Huang TF Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* 1992;30(9):945-966.
9. Golubkov VS, Lezhnev EI, Bezgina EN, Moshkov DA. Primary culture of epithelial secretory cells from venom gland of common adder *Vipera berus*. [Russian] *Tsitologiya* 2001; 43(5):453-461.
10. Duarte MM, Montes de Oca, Diniz CR, Fortes-Dias CL Primary culture of venom gland cells from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*. 1999; 37(12):1673-82.
11. Sells PG, Hommel M, Theakston RD. Venom production in snake venom gland cells cultured in vitro. *Toxicon*. 1989; 27(11):1245-9.
12. Zheng C, Hoffman MP, McMillan T, Kleinman HK, O'Connell BC. **Growth factor** regulation of the amylase promoter in a differentiating salivary acinar cell line. *J of Cellular Physiol*. 1998;177(4):628-35.
13. Nakahari T, Ito S, Yoshida H, Furuya E, Imai Y. Accumulation of cAMP evoked by acetylcholine stimulation in rat submandibular acinar cells: observation of exocytosis, fluid secretion and  $[Ca^{2+}]_i$ . *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000 Dec;225(3):211-20.

14. Bartek J, Bartkova J, Kyprianou N, Lalani EN, Staskova Z, Shearer M, Chang S, Taylor-papadimitriou J. Efficient immortalization of luminal epithelial cells from human mammary gland by introduction of simian virus 40 large tumor antigen with a recombinant retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88:3520-3524.
15. Soltoff SP, Grubman SA, Jefferson DM. Development of salivary gland cell lines for studies of signaling and physiology. *Annals New York Academy of Science* 1998; 842:100-107.
16. Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE. Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *The society for investigative dermatology.* 1999; 113(6):1011-1020.
17. Selvanayagam ZE and Gopalakrishnakone P Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies:review on recent trends (1987-1997). *Toxicon* 1999;37:565-586.
18. Labrousse H, Nishikawa AK, Bon C and Avrameas S. Development of rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring venom antigens after an experimental snake bite. *Toxicon* 1988;26(12):1157-1167.
19. Theakston RDG, Jane Lloyd-Jones M and Reid HA. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *Nature* 1977;24:639-641.
20. Hudson DL. Keratins as markers of epithelial cells. *Methods in Molecular biology* 2001;188:157-169.
21. Moll R, Franke WW, Schiller DL et. al. The catalog of human keratins: patterns of expression in normal epithelia, tumor and cultured cells. *Cell.* 1982;31:11-24.