

計畫編號： DOH99-DC-2041

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

探討不同佐劑對抗蛇毒血清效價、發炎與免疫反應的影響

研 究 報 告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：鄭雅芬

共同主持人：曹友平

研究人員：楊素鈴

執行期間：99 年 4 月 12 日至 98 年 12 月 31 日

目錄

頁碼

封面

目錄

(1)

全文英文摘要

(2)

中文摘要

(3)

前言

(4)

材料與方法

(6)

結果

(12)

討論與建議

(24)

參考文獻

(26)

全文英文摘要

Aim: Antivenom is an immunotherapeutic agent; its quality is a pivotal determinant for successful treatment of snakebite. Cobratoxin (CTX), a long-chain α -neurotoxin whose influence on antigen-presenting cells (APCs) remains largely unclear. In this study, the influences of CTX and adjuvant on the expressions of interleukins in two types of APCs, dendritic cells and macrophages were investigated.

Methods: Anti-CTX antibody was induced by injection of CTX or CTX with adjuvant including complete Freund's adjuvant (CFA), S6233 and T2684 in B6 mice. The levels of Anti-CTX antibody were determined by ELISA at various times. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (INF), and interleukin-10 (IL-10) levels in serum were determined by ELISA. The expression of IL-10 in APCs was further determined by immunohistochemistry (IHC). Bone marrow-derived DCs and macrophages were used to examine the CTX effects on IL-10 expression and APCs activation.

Results: CFA and S6233 as CTX adjuvant induced higher anti-CTX antibody than venom alone or T2684. CTX subcutaneously injection caused increase in serum levels of TNF- α , INF, and IL-10. CTX treatment alone can also activate DCs by evidence of induction of CD86 and cytosolic calcium-dependent phospholipase A₂ (cPLA₂). CTX induced NF- κ B (p65 subunit) phosphorylation in cultured APCs. CTX induced IL-10 expression in APCs demonstrated in vitro and in vivo. Importantly, the CTX-induced IL-10 was prevented by adjuvant CFA and S6233 as well as NF- κ B inhibitor (SN50).

Conclusion: These observations indicate that CFA and S6233 as CTX adjuvant can induce higher titer of antivenom. These observations also suggest that the action of CTX on IL-10 induction may reduce APCs function and adjuvant that prevents IL-10 induced by CTX is important for producing high quality antivenom.

中文摘要

抗蛇毒血清主要為一有效用於治療毒蛇咬傷之免疫療法試劑。飯匙倩蛇毒為一成份繁雜的蛋白質混合物，目前對於此蛇毒如何影響抗原呈現細胞（APCs）仍未明瞭。本研究主要探討飯匙倩蛇毒與佐劑在樹突細胞（dendritic cell）與巨噬細胞（macrophage）內，如何調控細胞激素的表現與抗原呈現細胞的活化。

皮下注射飯匙倩蛇毒可增強TNF- α , INF, and IL-10的表現。當混合佐劑時能進一步活化CD 86 和cPLA₂ 的表現，使能更有效益的展現抗原呈現細胞的功能。當單獨注射飯匙倩蛇毒即可誘導 NF-kB 磷酸化與 IL-10表現，並以NF-kB inhibitor (SN50)可以有效block IL-10表現。

結果顯示 CFA 和 S6233 可對抗飯匙倩蛇毒產生高的力價血清，其中以 S6233 佐劑更優。進一步發現飯匙倩蛇毒會引發 IL-10 的表現，使降低了抗原呈現細胞的功能，另佐劑則可預防飯匙倩蛇毒產生 IL-10，增強抗原呈現細胞的功能，同時對局部的發炎反應也能降低，未來將進一步應用於製備抗蛇毒血清的過程、技術及研究，使能提供更大的效益。

前言

毒蛇咬傷屬於急症，最有效的治療方式是注射正確的抗蛇毒血清，目前本局以減毒過的蛇毒免疫馬匹後，經採血及硫酸銨鹽沈澱精製等步驟，已完成生產四種抗蛇毒血清產品。

血清之研發應用，使得毒蛇咬傷的總死亡率由 6.2%（1904-1938 年），下降至 4.6%（1965-1971 年）及 2.4%（1986-1994）。因蛇毒蛋白為免疫效果不高的免疫抗原，即不易達到最低採血的標準（中和抗體未達 60TU/mL）【5-6】，因此為提昇免疫效益常利用俱高抗原性的佐劑或提高免疫抗原的劑量，然而傳統的免疫佐劑如 Complete and Incomplete Freund's adjuvants (CFA/IFA)經常會導致局部創傷反應如發炎、肉芽腫及無菌性膿瘍【8-9】。另一方面保育類毒蛇以高劑量的蛇毒作為免疫抗原實為資源上的浪費，同時也加速免疫馬匹器官組織的重創。

近年 Montanide group 已發展出佐劑含有高純度的酯質及具備乳化的有效成份，可降低免疫主成份的黏性及免疫引起的不良反應，並展現優異的高抗原性【10】，其中以 ISA 206 (water-in-oil-water emulsions W/O/W), IMS 3012 (aqueous based) and ISA 25 (oil-in-water emulsions O/W) 在口蹄疫(FMD)及山羊紅球菌感染症(*Rhodococcus equi*)的疫苗已被證實具有優異的效用【11-13】，但這具有高優異性的佐劑尚未應用在抗蛇毒血清的製程量產，因此本計畫目的在評估不同種佐劑與現行免疫佐劑 Freund's

adjuvant 相較，嘗試以低劑量的免疫方式，尋求最高力價的免疫佐劑，同時藉此研究探討蛇毒注射後引發的局部發炎反應、免疫機制上的調控，為日後進行製備抗蛇毒血清的過程、技術及研究提供更大的效益。

材料與方法

(一)、試驗分組

試驗分組：將 50 隻健康小白鼠（已完成免疫前之血液採集）依免疫佐劑的種類分成 4 組，分別為

A 組：為陰性對照組，以不含抗原之生理鹽水進行皮下注射。

B 組：使用抗原為飯匙倩蛇毒抗原及傳統免疫佐劑（Complete Freund's adjuvants）進行蛇毒抗原免疫之作業流程。

C 組：使用抗原為飯匙倩蛇毒抗原及佐劑 S6233 免疫之作業流程。

D 組：使用抗原為飯匙倩蛇毒抗原及佐劑 T2684 免疫之作業流程。

將混合均勻乳劑狀之蛇毒，微量多處注射於老鼠兩側皮下，每隻老鼠免疫 0.2 mL【13】。每二週免疫一次，逐次提高劑量，免疫開始 6 週後，每相隔二週採取少量血清測試其中和抗體力價。

(二)、蛇毒抗原之製備

於免疫前一天，以 pH 6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液將飯匙倩蛇毒配製成 1 % 溶液，再以 0.22 μ m 濾膜過濾。不活化方法是以慢慢滴入 2.5% 戊乙醛（glutaraldehyde；GA），使蛇毒含有 GA 之最終濃度為 0.25%，充分混合 1 小時後，呈現乳白色膠狀即可，並放置冰箱 4°C 過夜。

(三)、評估免疫動物之不良反應

依照 Pratanaphon et al. 和 Barnett et al. 的建議參考指標量測局部的免疫

反應【5, 10】，訂為：

-：表面光滑或無症候

+：輕微腫脹

++：中度腫脹、表皮壞死

+++：嚴重腫脹、表皮壞死

(四)、抗體效價測定法

ELISA 試驗

首先將蛇毒固著 (coating) 於 96 孔盤上，以 PBS-T buffer (0.05% Tween 20) 沖洗三次，加入 200 μ l /well 的 blocking buffer (PBS containing 1% BSA)，於 37⁰C 感作 1 小時，將 blocking buffer 移除，再加入以 1:100 稀釋的老鼠抗體 (2 ml mouse serum + 198 ml PBS) 進入有蛇毒固著之 96 孔盤中，於 37⁰C 感作 1 小時，再以 PBS-T buffer 沖洗二次後加入二抗 goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate (diluted in PBS (1:5000), 100 μ l/well)，於 37⁰C 感作 1 小時，再以 PBS-T buffer 沖洗 3-5 分鐘，接著於每孔中加入 100 μ l of Substrate Solution (TMB)，於室溫 (18° to 25°C) 下避光待其感作約 10 分鐘，之後加入 stop solution (1M Phosphoric Acid; H₃PO₄) 以停止作用，最後以 ELISA 吸光儀讀取波長 450 nm 吸光值。

抗體效價測定

(1) 毒力測定

將蛇毒以 0.1M pH6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液稀釋成三種等差稀釋液，每一種稀釋液由皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻，每支 0.2mL。觀察 48 小時，紀錄死亡隻數並求出最低致死劑量(minimal lethal dose, MLD)。

(2) 抗蛇毒血清效價測定

將抗蛇毒血清以 0.1M pH6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液稀釋成三種等差稀釋液，每一種稀釋液取 0.6 mL 與每 0.2 mL 含 4 MLD 之上述蛇毒溶液 0.6 mL 混合，於 37°C 放置 60 分鐘後，以進行中和試驗。再由皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻，每隻 0.2 mL。觀察 48 小時，紀錄死亡隻數及存活隻數，並計算其效價。

(3) 毒力對照

測定抗蛇毒血清中和效價之同時，另以 0.5、1.0 及 1.5 MLD 之蛇毒溶液，由皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻方法與 (1) 同，注射 1.0 及 1.5 MLD 之小白鼠應全部死亡。

(4) 效價計算方式

效價 (U/mL) = 4 MLD / 0.2 mL × 血清稀釋倍數。

(五)、西方墨點法

純化之樣品以 8% 梯度的正十二烷硫酸鈉—聚丙烯醯胺膠體，在電壓 200 伏特之下做電泳分離 90—120 分鐘，之後以 Coomassie blue 染色方式分析蛋白質電泳的情況。

純化之樣品經過蛋白質電泳後，利用 Semi-phor 半乾式轉移槽，將蛋白質樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，加入 5% 脫脂奶粉溶液於纖維膜上，震盪 30 分鐘後以 0.1% Tween20/PBS 清洗之後加入經過適當稀釋的蛇毒抗體於纖維膜上，在 37°C 保溫箱中作用 2 小時，以 0.1% Tween20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之 HRP—

conjugated goat anti—mouse 抗體，在 37°C 保溫箱中作用 1 小時，以 0.1 % Tween20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。將 TMB 置於纖維膜上，震盪 5—10 分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

(六)、監測 cytokines 表現之 ELISA 系統建立

在進行皮下注射 24 小時後，在小鼠血清中由 ELISA 偵測到 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-10 的濃度變化。首先於 96 孔微量滴定盤上，黏覆經黏覆緩衝液適當稀釋之 anti-IL-10 capture mAb (diluted in sterile PBS) 100 μ l with 1:60 dilution 在 4°C 隔夜反應。實驗前使用 ELISA 清洗儀，以 0.05% Tween20 / PBS (PBST20) 清除未黏覆之抗體 5 次，然後以 1% BSA/PBS 進行 Block，37°C 反應半小時，清洗 3 次後，加入以 PBS-T 20 適當稀釋之待測或對照組樣品，放置於 37°C 保溫箱中二小時。清洗 3 次，再加入兔子抗小鼠二次抗體馬山葵過氧化酵素複合體(Rabbit anti-mouse IgG HRP)於 37°C 保溫箱中反應一小時，清洗 3 次。最後，在每孔中加 100ml OPD (o—phenylenediamine dihydrochloride) 酵素受質體，放置於室溫暗處，呈色反應 25 分鐘，以 ELISA 吸光儀讀取波長 450nm 及 650nm 吸收值。

(七)、免疫細胞化學染色

巨噬細胞和樹突細胞是由 B6 小鼠的股骨中所分離取得。使用 isoflurane 麻

醉之小鼠採頸椎脫臼法使其安樂死，取下股骨並剔除其周遭多餘組織。將 DMEM-F12 medium 灌入骨髓腔中。收集骨髓細胞並置於 100 × 15 mm 的 DMEM-F12 培養基中，此培養基主要成分有 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% HEPES and 10 ng/ml recombinant mouse M-CSF for inducing macrophage and (R & D Systems) 10 ng/ml recombinant mouse GM-CSF for inducing dendritic cells，於 5% CO₂、37°C 的條件下培養 7 天。繼代 4 × 10⁵/ml 細胞數至 serum free DMEM-F12 medium 後，則加入蛇毒或其它藥物。巨噬細胞和樹突細胞以 lysis buffer (150 μL/35mm well, 包含 20 mM HEPES (pH 7.4), 1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 5 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium fluoride, 100 μM sodium orthovanadate, 10 μg/mL leupeptin, and 10 μg/mL aprotinin) 中，隨後置於冰上感作 15 分鐘。之後將此細胞裂解液進行 SDS-PAGE 獲得蛋白質產物，再將其轉漬至 PVDF 膠膜上 (Millipore, Bedford, MA, USA)，以便進行西方墨點法。西方墨點法一抗主要選用 CD86 和 cPLA₂ (Santa Cruz Biotechnology), p-p65 Ser536 (1:500 dilution; 93H1; Cell Signaling Technology) and b-actin (Sigma, St. Louis, MO, USA)，二抗選用 IgG-HRP secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology)，而呈色系統則選用 ECL reagent (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)。將樹突細胞於 DMEM-F12 培養基上 24 小時。加入蛇毒後，以 4% 福馬林固定 16 小時，再以 10% 山羊血清與 5% 胎牛血清覆蓋 1 小時，分別加入 IL-10 和 CD 86 或 F4/80 抗體 (Santa Cruz Biotechnology) 進行雙重染色，再以 rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG antibody 和 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology) 於室溫下感作 1 小時，最後以螢光顯微鏡觀察。

(八)、免疫組織化學染色

以福馬林固定，石蠟包埋之小鼠皮下組織切片，首先經由二甲苯脫臘，再以梯度酒精進行回水。接著以 10% 山羊血清覆蓋60 分鐘，加入一抗置於4⁰C 隔夜。接著加入二抗 rhodamine-conjugated或 FITC-conjugated免疫球蛋白（1:500 dilution; Chemicon, Temecula, CA），，再以螢光顯微鏡進行觀察。

(九)、統計分析

所有測量值將以平均值 $\pm$ 標準差取之，比較 ANOVA 和線型回歸，若 P value 小於 0.05 將視為統計上有意義的差異。

結果

(一)、評估免疫動物之不良反應

本次實驗中，免疫動物後均只在局部注射部位有輕微腫脹，並於 24 小時內恢復。而 3 種不同的免疫佐劑對小鼠所產生的副作用並無明顯差異，其結果皆為-/+。

(二)、抗體效價測定法

(1) ELISA (*in vitro*)

在進行免疫第二週的小鼠其蛇毒濃度在 100 ng 之前並無太大的差異，當濃度在 100ng 時可見注射蛇毒混合傳統免疫佐劑的效果較另三者佳，而當蛇毒濃度達 200 ng 以上時，注射蛇毒混合傳統免疫佐劑或混合 S6233 佐劑的效果遠較單獨注射蛇毒、注射蛇毒混合 T2684 佐劑的效果好，差距幾乎可達一倍，其中以佐劑 S6233 的效果又略優於傳統免疫佐劑。

免疫第四週時，當蛇毒濃度在 50 ng 時即產生差異，可見注射蛇毒混合傳統免疫佐劑或佐劑 6233 的效果，較單獨注射蛇毒或注射蛇毒混合 T2684 佐劑高約一倍。在免疫第六週時，可見蛇毒濃度在 25 ng 時即明顯產生顯著差異，注射蛇毒混合 S6233 佐劑效果優於其他方式，當蛇毒濃度一旦達 50 ng 以上時，注射注射蛇毒混合佐劑 S6233 或混合傳統免疫佐劑的效果高於單獨使用蛇毒達約 1 倍，其中以佐劑 S6233 更優，該差距能達 1.5 倍。

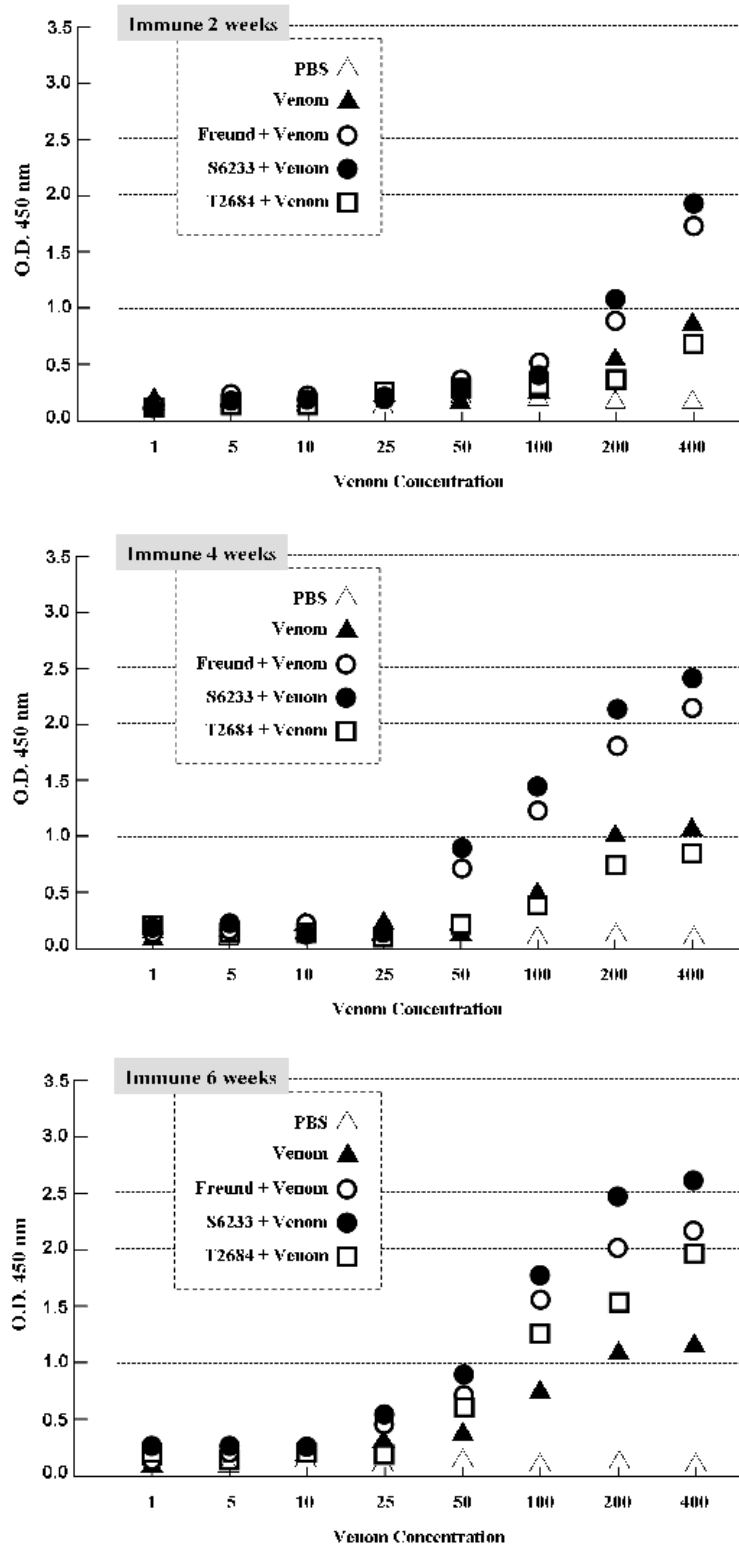


Fig. 1: The reactivity of polyvalent antivenom with the cobratoxin was assessed using ELISA. ELISA representative calibration curve shows that optical densities are correlated to venom concentrations. Optical densities

from three separate assays were combined (n=10).

(2) 抗體效價測定 (*in vivo*)

以生理食鹽水稀釋為不同濃度後與 4MLD 之蛇毒液混和均勻後，置於 37°C 恆溫箱內反應，靜置作用 1 小時，再以皮下注射體重 12~14 克之 ICR 小鼠，觀察 48 小時，並紀錄動物死亡數目，計算抗體效價。

Venom alone : <40 u/mL Freund + venom : 60 u/mL

S6233 + venom : 60 u/mL T2684 + venom : <40 u/mL

發現蛇毒混合佐劑 S6233 或蛇毒混合傳統佐劑效價能有較高 (60 u/mL) 的結果。

(三)、西方墨點法

在此先使用 10 mg 之蛇毒先進行 SDS-PAGE，接著將其轉漬至硝化纖維膜上。將免疫四週小鼠之血清 (稀釋倍數 1:5000) 與二抗呈色系統偵測。實驗結果發現抗體所辨認蛋白質以蛇毒混合佐劑 S623 較優，此結果與再次測定 ELISA 之結果相吻合。

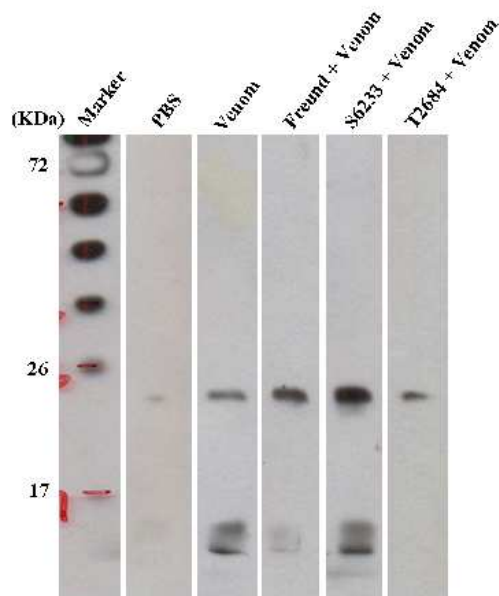


Fig. 2: The reactivity of polyvalent antivenom with the cobra toxin was assessed using immunoblotting. Immunoblot analysis of the immunological reactivity of anti-venom antibody to cobra toxin. Venom samples (10 mg) were fractionated by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes and incubated with anti-venom antibody from mice immunized for 4 wks (dilution 1:5000). The protein patterns were developed using horseradish peroxidase rabbit conjugate (dilution 1:5000) and ECL reagent.

(四)、以 ELISA 系統監測 cytokines 表現

選擇免疫第四週之小鼠血清進 ELISA 測定其血清中 IFN- γ 、TNF- α 與 IL10 之濃度。結果發現，IFN- γ 與 TNF- α 之濃度順序依序為蛇毒混合佐劑 S6233 > 蛇毒混合傳統免疫佐劑 > 蛇毒混合佐劑 T2684 (Fig. 3 和 Fig. 4) > 單獨注射蛇毒。而 IL-10 之濃度則正好與前兩者相反 (Fig. 5)。

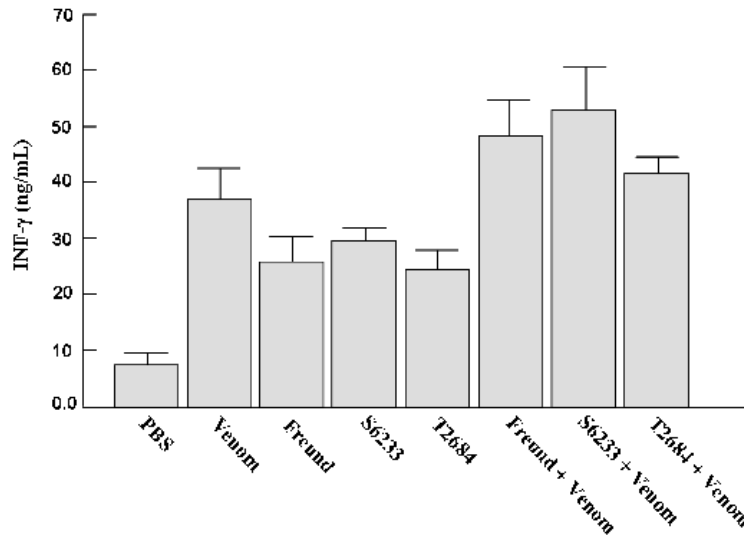


Fig. 3: IFN- γ levels in the serum of B6 mice. Mice were S.C. injection with cobra toxin or cobra toxin combining with various adjuvants for 4 wks performed as immune schedule. The concentrations of IFN-g in serum were determined with ELISA kits. Data represent the mean $\pm$ SD ($n=10$).

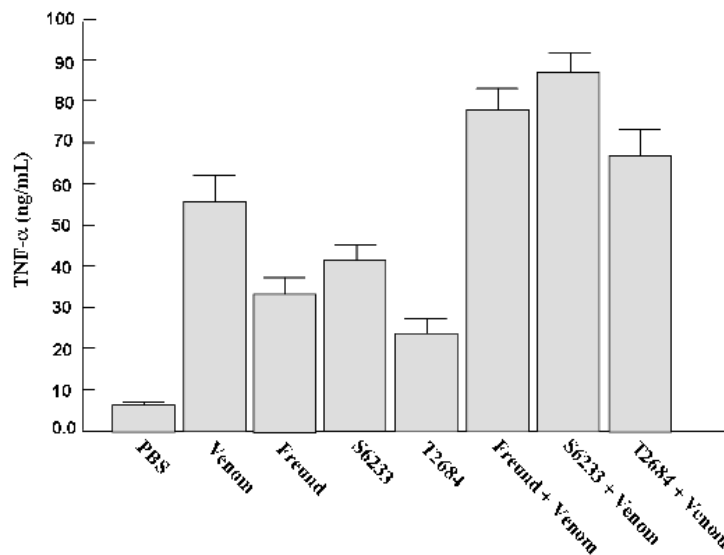


Fig. 4: TNF- α levels in the serum of B6 mice. Mice were S.C. injection with cobra toxin or cobra toxin combining with various adjuvants for 4 wks performed as immune schedule. The concentrations of TNF-a in serum were determined with ELISA kits. Data represent the mean $\pm$ SD ($n=10$).

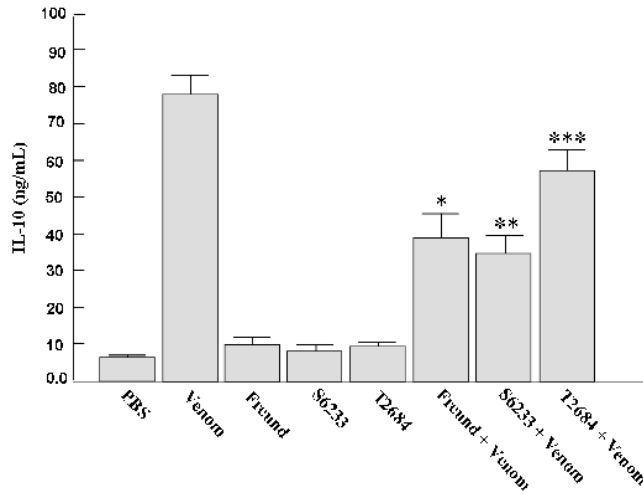


Fig. 5: IL-10 levels in the serum of B6 mice. Mice were S.C. injection with cobratoxin or cobratoxin combining with various adjuvants for 4 wks performed as immune schedule. The concentrations of IL-10 in serum were determined with ELISA kits. Data represent the mean $\pm$ SD ($n=10$). * $P < 0.01$ versus venom alone. ** $P < 0.05$ versus venom alone. *** $P < 0.001$ versus venom alone.

(五)、以西方墨點法及細胞化學染色偵測抗原呈現細胞的活化

以 CD 86 作為抗原呈現細胞活化的標記，以西方墨點法發現在樹突細胞上，使用不同濃度的蛇毒有 dose-dependent manner 的表現；但在巨噬細胞上，則無此項結果（因 CD 86 為樹突細胞特異性活化的標記），當蛇毒給予至 50 ng/ml 時即可 detect 到 CD 86 有顯著表現（Fig. 6）。

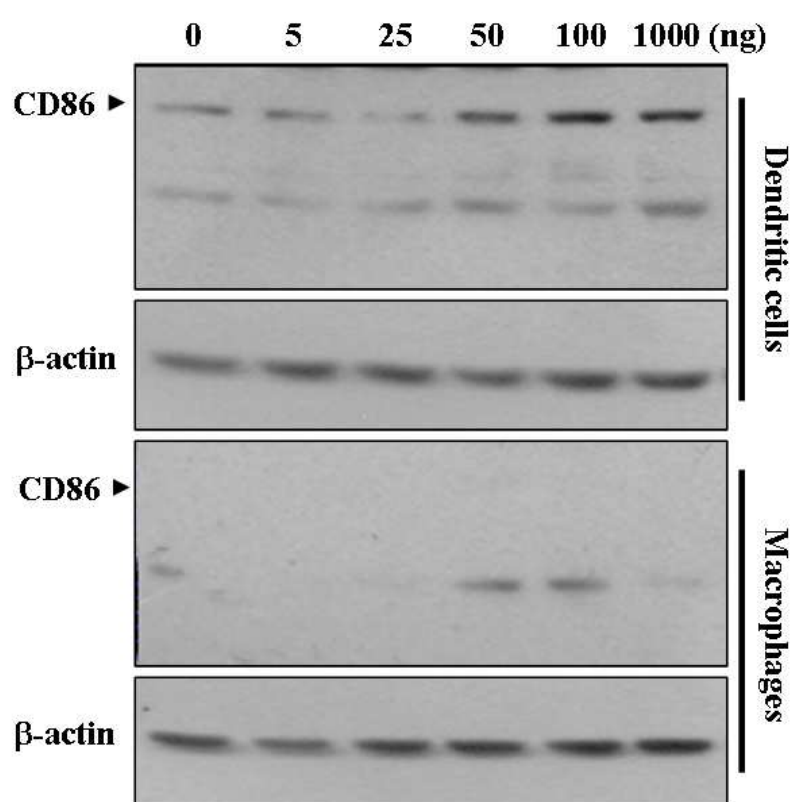


Fig. 6: Cobra venom dose-dependently enhances the levels of dendritic activation marker, CD86. Cells were treated with different doses of cobra venom as indicated for 24 h. Immunoblot results are from a representative experiment performed in triplicate with β -actin as loading control. To examine the specificity of CD86 induction observed in dendritic cells, macrophages was treated by different dosages of venom and had no such effect.

圖七是以免疫化學染色法偵測 CD 86 與 cPLA₂ 表現。結果顯示加入蛇毒時，樹突細胞內 CD 86 與 cPLA₂ 表現量皆較與未處理之樹突細胞有顯著增加，此結果與之前所進行之西方墨點法結果相符合。推斷當免疫蛇毒 alone 即可使樹突細胞活化 (Fig. 7)。

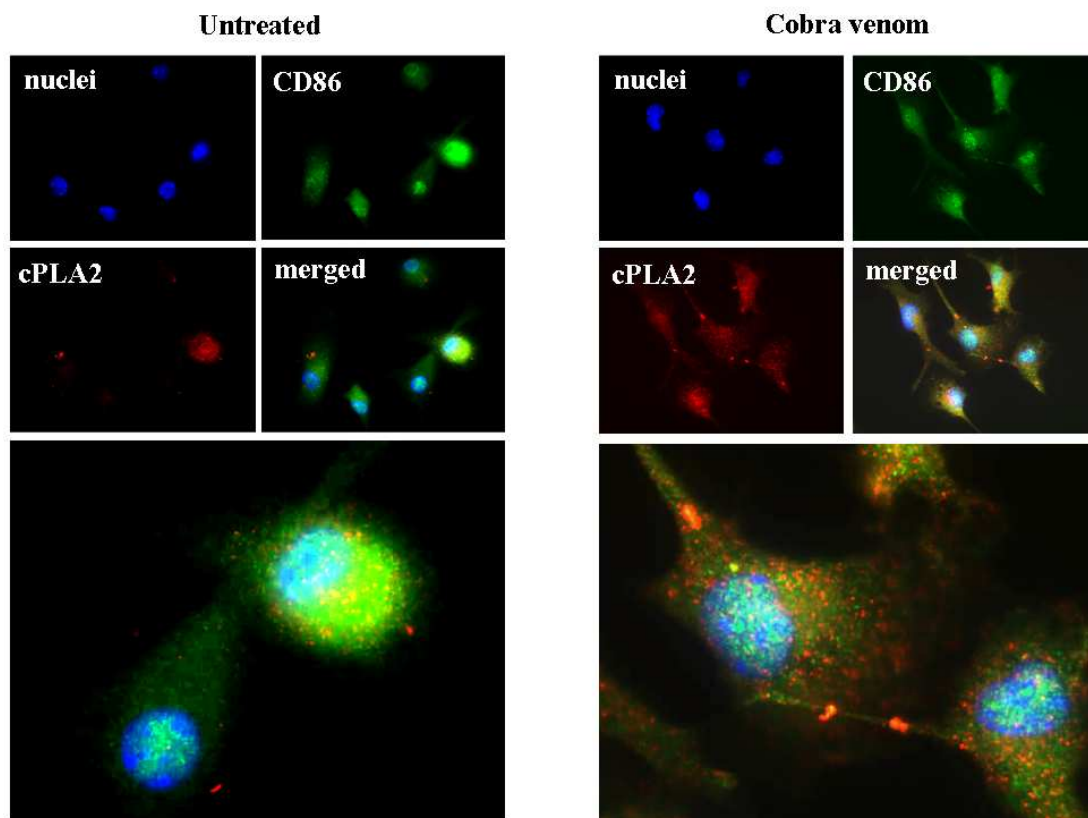


Fig. 7: Cobra venom enhances the levels of CD86 and cPLA2 in dendritic cells. Cells were plated on coverslips and then left untreated (left) or incubated with 50 ng/ml venom (right) for 24h. CD86 (FITC) and cPLA2 (rhodamine) were detected by immunofluorescence microscopy. DNA was visualized with DAPI stain. Up-panels; original magnification, 400 X. lower panels; original magnification, 1000 X. The immunocytochemistry results confirmed immunoblotting data (Fig. 6) and

showed that cobra venom can activate cultured dendritic cells.

圖八是以西方墨點法分析 NF- κ B (p65) 的表現，發現樹突細胞與巨噬細胞中 p65 蛋白質隨著 venom conc. 有 dose-dependent manner 顯著的活化 (Fig. 8)。

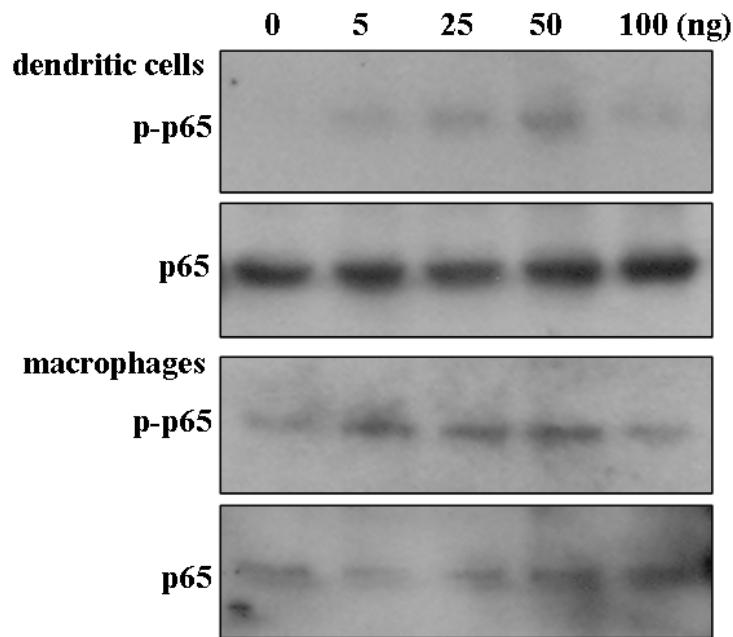


Fig. 8: Cobra venom dose-dependently induces the phosphorylation of NF- κ B subunit (p65) in dendritic cells and macrophages. Cells were treated with different doses of cobra venom as indicated for 2 hr. Immunoblot results are from a representative experiment performed in triplicate with b-actin as loading control.

圖九是左邊 panel 為未處理之樹狀細胞 (UT)，中間 panel 為加入 50 ng/ml 蛇毒作用 24 小時之樹狀細胞(Cobra venom)，右邊 panel 為 pretreat NF-kB 之抑制劑 (10 mM SN 50, 1 h) 再加入 50 ng/ml 蛇毒作用 24 小時之樹狀細胞。發現未處理之樹狀細胞表現少量 IL-10；當加入 50 ng/ml 蛇毒後，樹突細胞表現大量 IL-10；並發現當加入 NF-kB 之抑制劑(SN 50,)，僅偵測到少量的 IL-10 (Fig. 9)。結果顯示，蛇毒可能藉由 NF-kB 的活化，來誘導 IL-10 表現。

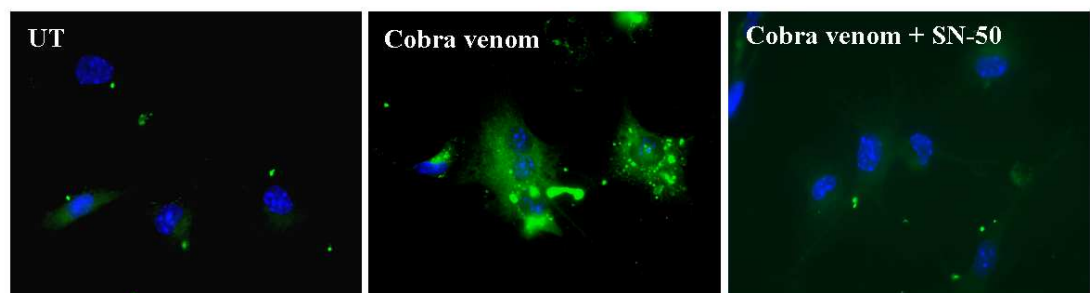


Fig. 9: Cobra venom induces the expression of IL-10 in dendritic cells.

The effect is blocked by NF-kB inhibitor. Cells were plated on coverslips and then left untreated or incubated with 50 ng/ml venom for 24hr or pretreated with inhibitors of NF-kB (10 mM SN50, 1 h) before exposure to 50 ng/ml venom for further 24 hr. IL-10 (FITC) was detected by immunofluorescence microscopy. DNA was visualized with DAPI stain. Original magnification, 400 X. The immunocytochemistry results suggest that cobra venom induces IL-10 expression by activation of transcription factor NF-kB.

圖十及圖十一為樹突細胞及巨噬細胞進行免疫化學染色之結果。A 為 saline 對照組，B 為僅單獨注射蛇毒，樹突細胞與巨噬細胞能表現大量 IL-10。另於 C（注射蛇毒混合傳統免疫佐劑）、D（注射蛇毒混合 S6233）樹突細胞與巨噬細胞中的 IL-10 的表現顯著減少，而在 E（注射蛇毒混合佐劑 T2684）其樹突細胞與巨噬細胞內的 IL-10 減少的現象並不顯著。

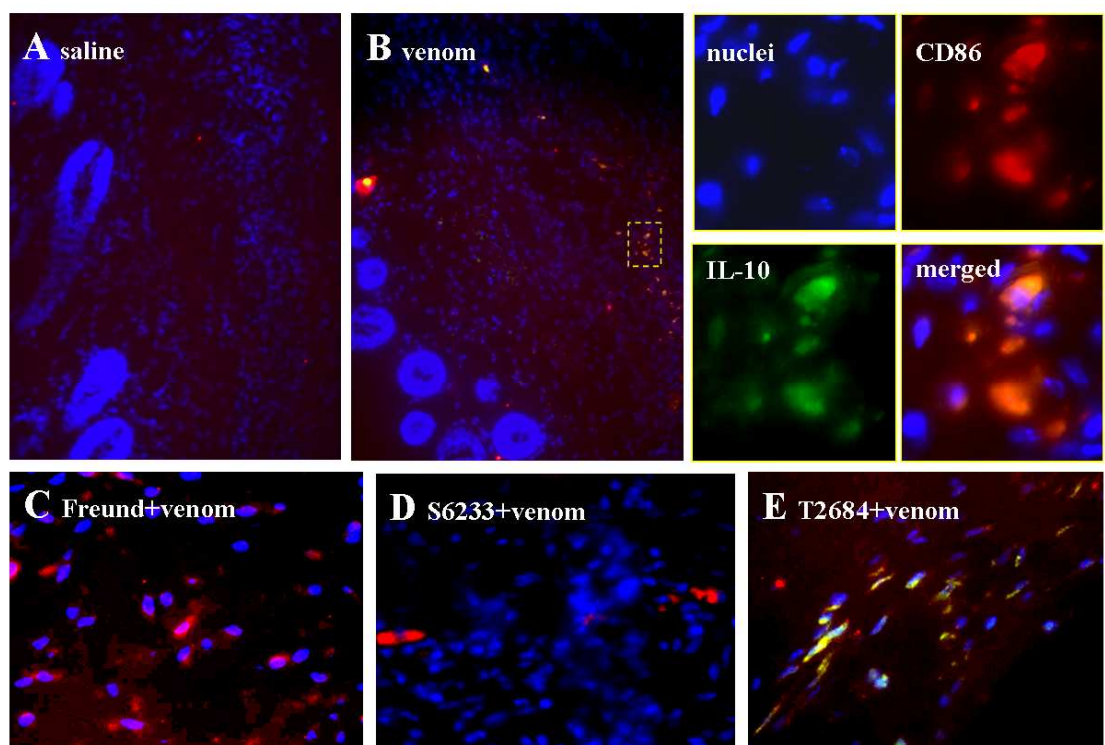


Fig. 10: Cobra venom induces IL-10 expression in dendritic cells in vivo. The effect on induction of IL-10 is markedly prevented by Freund incomplete adjuvant and S6233, but not by T2684. B6 mice were S.C. injection with cobratoxin or cobratoxin combining with various adjuvants for 6 wks performed as immune schedule. Subcutaneous tissues were assayed by dual-immunofluorescence staining for CD86 (dendritic cell marker; red) and IL-10 (green). Nuclei were stained by Hoechst 33258 (shown in blue). Representative images are from three independent experiments. Inset

in Fig. B is also showed at right panels that are superimpositions of nucleus, CD86 and IL-10 (original magnification, 1000X). Figs. A and B (original magnification, 200X), Figs. C-E (original magnification, 400X).

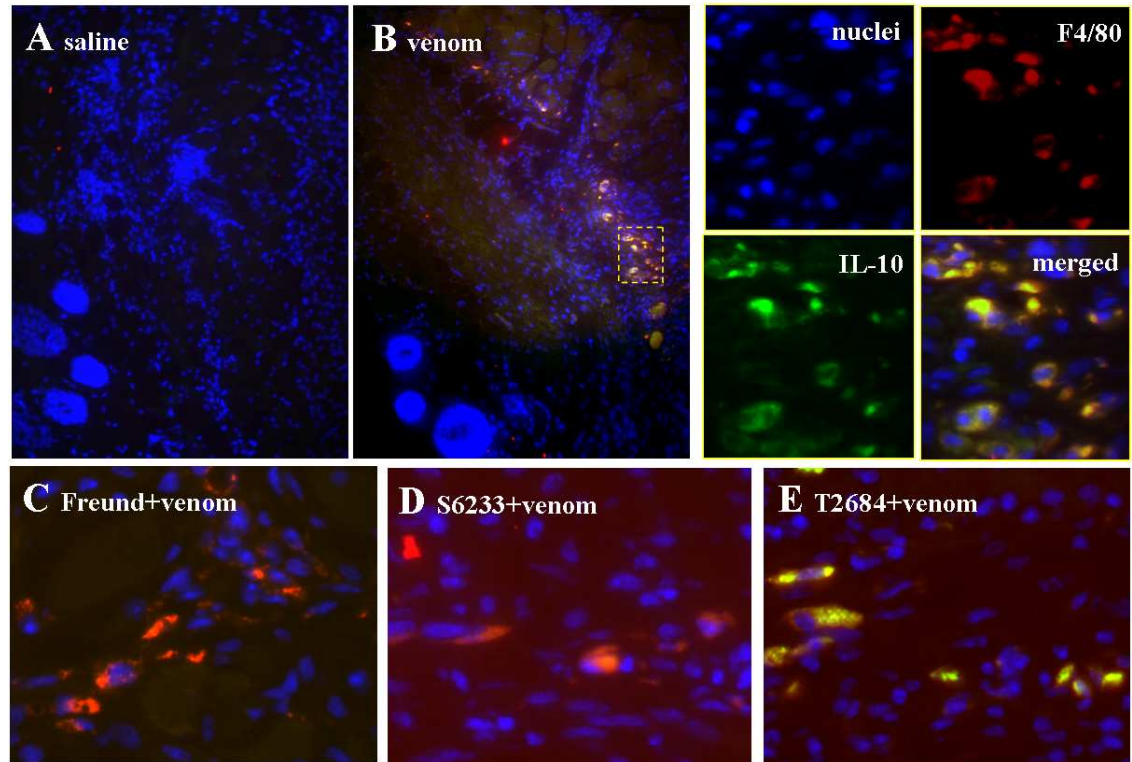


Fig. 11: Cobra venom induces IL-10 expression in macrophages in vivo. The effect on induction of IL-10 is partially inhibited by Freund incomplete adjuvant and S6233, but not by T2684. B6 mice were S.C. injection with cobra toxin or cobra toxin combining with various adjuvants for 6 wks performed as immune schedule. Subcutaneous tissues were assayed by dual-immunofluorescence staining for F4/80 (macrophage marker; *red*) and IL-10 (*green*). Nuclei were stained by Hoechst 33258 (shown in blue). Representative images are from three independent experiments. Inset in Fig. B is also showed at right panels that are superimpositions of nucleus, F4/80 and IL-10 (original magnification, 1000X). Figs. A and B (original magnification, 200X), Figs. C-E (original magnification, 400X).

討論與建議

抗飯匙倩抗體表現以ELISA在不同的時段測量得知，無論是在免疫第二、四或六週皆會隨著免疫蛇毒濃度的上升而增加，當蛇毒混和佐劑（S6233）所產生的抗體較高。

另以 ELISA 監測 cytokines 的表現，在免疫第四週之小鼠，取得血清測定其 IFN- γ , TNF- α 與 IL10 之濃度，結果發現，IFN- γ 與 TNF- α 之濃度順序依序為蛇毒混和佐劑 S6233 > 蛇毒混和傳統免疫佐劑 > 蛇毒混和佐劑 T2684 > 單獨注射蛇毒。有趣的是 IL-10 之濃度則正好與前兩者相反。IFN- γ 主要作用為活化巨噬細胞，而 TNF- α 則主要為巨噬細胞所分泌之 cytokine，發現蛇毒 alone 或混和不同的佐劑均可誘導此兩種 cytokines 的分泌，表示促進抗原呈現細胞的活化，將有助於對抗蛇毒產生抗蛇毒血清。另 IL-10 為一抗發炎的細胞激素，因會抑制其抗原呈現細胞等的活化，故其濃度正好與前兩者相反。以組織化學染色法進一步的確認，發現飯匙倩蛇毒會誘導 IL-10 的表現，當加入佐劑後會明顯抑制其表現量。

飯匙倩蛇毒可增加 CD 86,和 cPLA₂ 表現，表示單獨注射飯匙倩蛇毒（不加入佐劑）即可活化樹突細胞，另飯匙倩蛇毒能誘使 NF-kB 進一步被活化，藉由加入其抑制劑可明顯 block IL 10 的表現，顯示由蛇毒誘導 IL-10 的表現，可能是藉由誘發活化 NF-kB 所造成。

綜論本計畫在 in vivo 及 in vitro condition 皆證實飯匙倩蛇毒即具有活化

IFN- γ , TNF- α 與 IL10 的表現，當混以 S6233 佐劑能降低 IL10 的表現，使提高抗原呈現細胞的功能，促進抗體力價的提昇，未來可擇其作為飯匙倩的最佳免疫佐劑，將進一步應用於免疫產程，以製造更高品質、高力價的抗蛇毒血清。

参考文献

1. ArunWaghmare, R.L. Deopurkarb, Nitin Salvi a, Milind Khadilkara, Milind Kalolikara, S.K. Gadea Comparison of Montanide adjuvants, IMS 3012 (Nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (Emulsion based) alongwith incomplete Freund's adjuvant for hyperimmunization of equines used for production of polyvalent snake antivenom Vaccine 27 (2009) 1067–1072.
2. Barnett PV, Pullens L, Williams L, Doel TR. International bank for foot-andmouth disease vaccine assessment of Montanide ISA25 and ISA206, two commercially available oil adjuvants. Vaccine 1996; 14 (13): 1187 – 98.
3. Patil PK, Bary J, Ramkrishnan C, Hugar B, Mishra LD, Natarajan C. Immuno response of goats against foot and mouth disease quadravalent vaccine: comparison of double oil emulsion and aluminium hydroxide gel vaccines ineliciting immunity. Vaccine 2002; 20: 2781 – 9.
4. Cauchard J, Sevin C, Ballet J, Taouji S. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a proactive VapA candidate vaccine. Vet Microbiol 2004; 104: 73 – 81.
5. Pratanaphon R, Akesowan S, KhawO, Sriprapat S, Ratanabanangkoon K. Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (*Naja kaouthia*). Vaccine 1997; 15 (14) : 1523 – 8.
6. Carey JE, Wright EA. The toxicity & immunological properties of some sea snake venoms with particulars reference to that of *Enhydrina schistosa*. Trans Roy soc, trop Med Hyg 1960; 4: 50 – 67.
7. Christensen PA. Production and standardization of antivenin. In: Lee CY, editor. Snake venoms. Berlin: Springer; 1979. p. 825 – 46.

8. Jadhav SS, Kapre SV. Antivenom production in India. In: Tu TA, editor. Handbook of natural toxins, 5. New York: Marcel Dekker; 1991. p. 583 – 610
9. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine 2001; 19: 2666 – 72.
10. Barnett PV, Pullens L, Williams L, Doel TR. International bank for foot-and-mouth disease vaccine assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. Vaccine 1996; 14 (13): 1187 – 98.
11. Patil PK, Bary J, Ramkrishnan C, Hugar B, Mishra LD, Natarajan C. Immuno response of goats against foot and mouth disease quadravalent vaccine: comparison of double oil emulsion and aluminium hydroxide gel vaccines in eliciting immunity. Vaccine 2002; 20: 2781 – 9.
12. Cauchard J, Sevin C, Ballet J, Taouji S. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a proactive VapA candidate vaccine. Vet Microbiol 2004; 104: 73 – 81.