

DOI: 10.13376/j.cblls/2016003

文章编号: 1004-0374(2016)01-0022-05



孙黔云, 博士, 研究员, 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室药理与活性筛选中心主任, 贵州省优秀青年科技人才和省管专家, 《中国药理学通报》编委, 国务院特殊津贴专家。主持设计和构建了贵州省针对新药发现的综合性的生物活性筛选平台, 现有以分子和细胞为主的筛选模型 90 余个, 涉及肿瘤、神经退行性疾病、心血管、感染、免疫、代谢性疾病等。课题组的主要方向: 一是依托活性筛选平台和贵州省丰富的药用资源, 以多种形式较系统地开展针对重大疾病防治的生物活性物质筛选发现和活性评价, 为新药创制提供依据和可能的物质基础; 二是以补体系统和心血管系统为靶标的蛇毒活性蛋白的结构与功能及应用, 主要聚焦于补体激活导致的炎症损伤及抗补体的策略和活性物质, 为深入认识蛇毒毒性机理、蛇伤临床治疗策略和相关新药研究提供有价值的参考和潜在的候选药物分子。

眼镜蛇毒因子在生命科学中的应用

孙黔云

(贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室药理与活性筛选中心, 贵阳 550002)

摘要: 补体是免疫系统的重要组成部分, 在机体的天然防御和免疫调控中发挥重要作用。补体的过度激活会引起炎症和组织损伤, 尤其是补体旁路途径的过度激活在一系列疾病和病征的发生发展中扮演了重要角色。从眼镜蛇毒中分离获得的补体旁路特异激活蛋白——眼镜蛇毒因子在补体相关研究中发挥了重要作用。现就眼镜蛇毒因子在生命科学中的应用情况做一综述。

关键词: 眼镜蛇毒因子; 补体; 补体旁路; 内皮细胞; 炎症

中图分类号: R392.11; R979.5 **文献标志码:** A

Application of cobra venom factor in life sciences

SUN Qian-Yun

(Center for Pharmacology and Drug Screening, The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: The complement system is an important part of the immune system. It plays an important role in innate and adaptive immunity. Excessive activation of the complement system may cause inflammation and tissue injury. Especially, uncontrolled activation of the alternative complement pathway is deeply involved in the pathogenesis of many diseases. As a specific activator of the alternative complement pathway, cobra venom factor isolated from cobra venom is important in the complement-related research. In this paper, application of cobra venom factor in life sciences is reviewed.

Key words: cobra venom factor; complement; complement alternative pathway; endothelial cell; inflammation

收稿日期: 2014-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30560035, 31060124, 81260494); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(黔省专合字[2012]9号)

通信作者: E-mail: sunqy@hotmail.com

补体是免疫系统的重要组成部分，在机体的天然防御和免疫调控中发挥重要作用^[1-2]。补体系统是由30余种蛋白质成分组成的有限蛋白质分解系统，其激活有3条途径：经典途径、旁路途径和凝集素途径。补体的正常激活有助于发挥其生理功能，但过度激活会引发炎症和组织损伤^[2-4]，尤其是补体旁路途径的过度激活在一系列疾病和病征的发展中扮演了重要角色^[5-6]。在探索和揭示补体旁路活化的调控机制以及补体在相关病征和病理损伤中的病理学作用研究中，一种来源于眼镜蛇毒的蛋白分子发挥了极为重要的作用。

早在20世纪初就已发现眼镜蛇毒能抑制血清补体，直到20世纪60年代后，才从眼镜蛇毒中分离出了具有抗补体活性的眼镜蛇毒因子(cobra venom factor, CVF)^[7-8]。在随后30多年间，从分布在不同地域的眼镜蛇的毒液中陆续分离得到了高度类似的蛋白质分子，均采用了CVF这一名称^[9-14]。对不同来源的CVF的理化性质以及结构的研究表明^[15]，CVF是由3条多肽链共价结合而成的酸性糖蛋白分子，相对分子质量一般在 $1.4 \times 10^5 \sim 1.56 \times 10^5$ 之间，其中 α 链约为 6.85×10^4 ， β 链约为 4.85×10^4 ， γ 链约为 3.2×10^4 。某些来源的CVF的 γ 链在SDS电泳中表现出微观不均一性，可呈现出3~5条非常接近的条带，可能是由于C端不均一造成的。CVF与补体成分C3在结构与功能上高度同源^[16]。CVF在血清中能与补体B因子结合，形成复合物CVFB，其中的B因子被D因子所识别和酶切，形成CVFBb。CVFBb具有C3/C5转化酶的活性，并且与内源性C3/C5转化酶相比，CVFBb非常稳定，能抵抗补体旁路调控蛋白H因子和I因子的灭活，因此，具有较长的半衰期，从而能持续激活C3和C5，最终导致补体旁路途径活性的耗竭^[16]。

正是基于CVF激活补体旁路的特异性和高效性以及与病理或生理条件下补体旁路激活途径的高度一致性，决定了CVF在生命科学相关研究中作为工具试剂的重要性。

1 CVF在补体旁路途径调控机制研究中的应用

补体旁路途径是补体3条激活途径中最为古老的途径^[17]，其在抵抗外来病原入侵方面发挥着极为重要的作用，但在补体系统的研究历史上，对旁路途径的认识和阐明晚于经典途径。而在这一认知过程中，CVF发挥了重要作用。补体旁路C3/C5转化酶的形成对于该路径功能至关重要。借助于CVF，

得以对旁路途径C3/C5转化酶的结构生物学及酶学性质有了较为深入的认识^[18-19]。而进一步开展CVFB(CVFBb)和内源性C3/C5转化酶的功能结构域和酶学性质的比较研究，不仅能加深对补体旁路激活调控机制的认识和理解，而且将有可能为补体调控干预和抗补体新药研究提供新的策略和有效靶标。

2 CVF在补体相关疾病病理研究中的应用

补体是免疫系统的重要组成部分，能被抗原抗体复合物或者微生物激活，通过溶胞、调理、吞噬以及活化炎症反应，清除免疫复合物，表现出补体的生物学功能^[1-4]。但近年来随着生命科学研究的深入，越来越多的证据表明，补体在一系列疾病和病征中扮演了重要的角色^[2,5-6,20-23]。自身免疫性疾病、炎症、缺血再灌注损伤、急性肺损伤、血液系统异常、神经退行性疾病、感染、肿瘤、动脉粥样硬化等均与补体的过度激活有密切关系^[24]。

基于CVF特异激活补体旁路，可以利用CVF制备去除补体的动物模型，开展相关病理机理的研究^[16]。在这类动物模型中，补体成分C3、C5和攻膜复合物形成后续成分C6~C9被激活所消耗。通过采用这种去补体模型，成功地开展了一系列补体与相关疾病和病征的关联性研究，揭示了补体在特定病征和病理损伤中的作用^[16]。随着对补体病理生理作用的研究和认识的深入，作为一种成功的、高度专一的研究工具，CVF将继续在这类研究中发挥重要作用。

另一方面，可以利用CVF特异激活补体旁路，研究补体旁路活化产物对相关靶细胞和靶组织所产生的作用和影响。利用该策略，成功地展示了补体旁路活化产物所导致的微血管内皮细胞和血小板的炎性活化以及对小鼠体内相关炎症、血小板、凝血功能等多方面的影响^[25-30]。基于补体旁路活化在诸多病征中所扮演的重要角色，以CVF作为补体旁路激活剂开展炎症反应、凝血纤溶功能调控等相关研究对于进一步认识炎症等发生和发展的机制有重要的意义和价值。

3 CVF在器官移植研究中的应用

器官移植是挽救器官功能衰竭患者生命的有效手段，但日益突出的供体短缺的矛盾严重阻碍了器官移植的开展，致使许多患者在等待中死去。基于这种状况，在20世纪90年代后掀起了异种器官移

植研究的热潮。而异种器官移植由于供体和受体间的种属差异大,在器官移植后会发生超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)。这种 HAR 是由预存天然抗体和补体介导的抗异种血管内皮细胞的免疫排斥反应,通常在移植后几分钟或数小时内就会发生,造成移植物一系列不可逆的组织病理损伤和功能丧失^[31-32]。因此,要成功开展异种器官移植,首先就必须克服 HAR。在这一研究过程中,正是由于 CVF 特异作用补体并消耗补体的特点,使其成为克服 HAR 的有力工具,使异种器官移植研究取得了令人鼓舞的进展^[33-36]。同时,通过对克服 HAR 后发生的延迟性异种移植排斥的研究,显著地促进了异种器官移植免疫学的发展。也正是 CVF 在异种器官移植研究中的应用,促进了基于抑制补体激活的异种转基因器官移植研究,使异种器官移植离实际应用越来越近。

随着器官移植的日益广泛和对移植免疫学的不断深入研究,近年来发现补体的活化产物通过作用内皮细胞和调控血小板、粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的定位、激活和效应作用而广泛参与了同种器官移植后的急性排斥反应和慢性排斥反应^[37-38]。而通过对补体的调控,诱导免疫耐受,能减轻排斥反应及继发的炎症损伤,减轻移植物的损伤,延长移植物的存活^[39-40]。基于这样的研究策略使得 CVF 能在同种器官移植研究中发挥重要作用。

4 CVF在抗肿瘤研究中的应用

越来越多的证据表明补体与肿瘤间存在复杂的关系,补体在肿瘤的发生发展中表现出双刃性^[2,41-43]。而基于补体介导细胞毒作用的肿瘤杀伤策略还存在不确定性^[44],因此,进一步研究和揭示补体在肿瘤发生发展中的作用及机制将有助于制定新的抗肿瘤策略和新型抗肿瘤药物的研发。作为补体旁路特异的激活剂,CVF 的应用可能主要在于两方面,一是用于研究病理生理条件下补体对肿瘤发生发展微环境机制的影响^[45-46];二是基于补体介导的细胞毒作用,将 CVF 与针对特定肿瘤的单克隆抗体交联结合,通过单克隆抗体的靶向引导,将 CVF 定位于特定的肿瘤细胞表面,利用 CVF 形成的 C3/C5 转化酶 CVFb 持续激活补体旁路,产生大量膜攻击复合物(MAC),从而对肿瘤细胞造成破坏^[47-48]。这一策略的成功与否与肿瘤靶细胞膜表面表达补体调控蛋白 CD46、CD55、CD59 的情况有关。此外,在肿瘤组织表面或附近的补体旁路激活可能会引起炎症

启动和放大,有助于免疫杀伤细胞对实体瘤组织的浸润或促进药物在瘤体内的扩散,从而可能为肿瘤治疗带来益处,但鉴于补体激活效应的双刃性,这种可能的益处尚需要谨慎地评估。

5 CVF作为分子探针在诊断或检测中的应用

CVF 特异激活补体旁路的特点使其能够作为相关诊断或检测用的高特异性和高灵敏度的分子探针。

阵发性睡眠性血红蛋白尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)是一种后天获得的、由造血干细胞基因突变引起的溶血性疾病^[49]。患者由于造血干细胞 PIG-A 基因突变,导致锚链蛋白合成缺陷,造成包括补体调控蛋白 CD55 和 CD59 在内的细胞膜蛋白的缺失,从而使血细胞表现出对补体活化的敏感性^[50]。临床上一一般采用 Ham 试验、糖水试验、蛇毒因子溶血试验和微量补体敏感试验作为 PNH 诊断的特异性补体溶血检查项目^[51]。近年来流式细胞术成为检测 PNH 的主流方法,并且随着方法的改进,其检测的灵敏度和准确度显著提高^[52],但其检测费用也相应较高。采用 CVF 激活补体的 PNH 溶血试验有较高的特异性,其靶标为缺失 CD59 的红细胞,检测费用较低,对仪器设备要求不高。基于 CVF 开发的 PNH 诊断试剂盒在基层医院或欠发达地区仍有较大的推广使用价值。

利用 CVF 与 B 因子特异结合的特点,在特定的实验体系中可以用于检测补体 B 因子和 D 因子的活性。小鼠是常用的实验动物,但在采用标准的补体溶血实验测定其血清补体旁路途径活性时,其溶血效率较低,需要的血清用量较大,使得在以小鼠为实验材料的相关研究中基本上无法测定补体活性^[53]。而利用 CVF 可以较好地实现对小鼠血清补体旁路活性的测定。对 KM、BALB/c、C57BL/6 3 个常用品系小鼠的血清补体旁路测定表明,利用 CVF 可以明显提高补体旁路途径活性测定的灵敏度,显著减少血清的用量,使测定小鼠血清补体旁路活性的变化成为现实,从而能克服以往只能依靠 ELISA 测定小鼠血清补体成分含量而无法测定活性的局限^[53]。

6 CVF作为抗补体药物开发的前景

补体的激活是把双刃剑,其过度激活可能直接或间接对机体形成潜在危险性。补体旁路的活化在炎症的启动、放大和效应阶段扮演了重要的角色。

补体活化产物会激活内皮细胞、血小板、中性粒细胞、巨噬细胞等与炎症密切关联的细胞, 产生重要的炎症效应^[2], 并与凝血、纤溶系统功能的异常密切相关^[4,29-30]。

由于 CVF 的抗补体作用是通过激活旁路途径后消耗补体来实现的, 这一本质特点决定了其作为临床治疗药物使用的高风险性。因此, 国外学者设计了一种人补体 C3 和 CVF 的杂交分子, 通过基因工程表达获得的这种人源化的杂交分子被命名为 HC3-1496, 其显著特点在于可以激活 C3, 同时不会作用于 C5, 从而避免了 C5 及后续成分激活的效应^[54]。这一分子的抗补体作用经过了多种动物模型的验证, 结果表明是安全和有效的^[55]。HC3-1496 的设计策略为基于 CVF 开发新型抗补体药物提供了新的思路。

综上所述, CVF 的结构与功能决定了其重要的应用价值, 近半个世纪来围绕或基于 CVF 开展的相关研究对生命科学相关领域产生了深远的影响, 而随着对补体系统与人类相关疾病发病机制内在联系的认识不断加深和拓展, 高特异性的补体旁路激活蛋白 CVF 必将有越来越广泛而重要的应用。

[参 考 文 献]

- [1] Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 2010, 20: 34-50
- [2] Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, et al. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol*, 2015, 6: 257
- [3] Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 43-56
- [4] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 2010, 11: 785-97
- [5] Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*, 2006, 176: 1305-10
- [6] Holers VM. The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases. *Immunol Rev*, 2008, 223: 300-16
- [7] Ballow M, Cochrane CG. Two anticomplement factors in cobra venom: hemolysis of guinea pig erythrocytes by one of them. *J Immunol*, 1969, 103: 944-52
- [8] Müller-Eberhard HJ, Fjellstrom KE. Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. *J Immunol*, 1971, 107: 1666-72
- [9] Pepys MB, Tompkins C, Smith AD. An improved method for the isolation from *Naja naja* venom of cobra factor (CoF) free of phospholipase A. *J Immunol Methods*, 1979, 30: 105-17
- [10] von Zabern I, Hinsch B, Przyklenk H, et al. Comparison of *Naja n. naja* and *Naja h. haje* cobra-venom factors: correlation between binding affinity for the fifth component of complement and mediation of its cleavage. *Immunobiology*, 1980, 157: 499-514
- [11] Eggertsen G, Lind P, Sjöquist J. Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of the indian cobra (*Naja n. siamensis*). *Mol Immunol*, 1981, 18: 125-33
- [12] Takahashi H, Hayashi K. Purification and characterization of anticomplement factor (cobra venom factor) from the *Naja naja atra* venom. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 701: 102-10
- [13] Vogel CW, Müller-Eberhard HJ. Cobra venom factor: improved method for purification and biochemical characterization. *J Immunol Methods*, 1984, 73: 203-20
- [14] Sun QY, Lu QM, Wang WY, et al. A highly active anticomplement factor from the venom of *Naja kaouthia*. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2001, 33: 483-8
- [15] Vogel CW, Bredehorst R, Fritzing DC, et al. Structure and function of cobra venom factor, the complement-activating protein in cobra venom. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 391: 97-114
- [16] Vogel CW, Fritzing DC. Cobra venom factor: structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. *Toxicon*, 2010, 56: 1198-222
- [17] Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, et al. Control of the complement system. *Adv Immunol*, 1996, 61: 201-83
- [18] Janssen BJ, Gomes L, Koning RI, et al. Insights into complement convertase formation based on the structure of the factor B-cobra venom factor complex. *EMBO J*, 2009, 28: 2469-78
- [19] Laursen NS, Andersen KR, Braren I, et al. Substrate recognition by complement convertases revealed in the C5-cobra venom factor complex. *EMBO J*, 2011, 30: 606-16
- [20] Botto M, Kirschfink M, Macor P, et al. Complement in human diseases: lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol*, 2009, 46: 2774-83
- [21] Takano T, Elimam H, Cybulsky AV. Complement-mediated cellular injury. *Semin Nephrol*, 2013, 33: 586-601
- [22] Meri S. Complement activation in diseases presenting with thrombotic microangiopathy. *Eur J Intern Med*, 2013, 24: 496-502
- [23] Song WC. Crosstalk between complement and toll-like receptors. *Toxicol Pathol*, 2012, 40: 174-82
- [24] Ricklin D, Lambris JD. Progress and trends in complement therapeutics. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 735: 1-22
- [25] 王彩娥, 孙黔云, 李敏, 等. 蛇毒抗补体蛋白 atrase B 抑制补体激活诱导的血小板聚集. *中国药理学通报*, 2009, 25: 1205-9
- [26] 李敏, 沈良贤, 张湘燕, 等. 两种抗补体蛋白对脂多糖致急性肺损伤的保护作用比较研究. *中国药理学通报*, 2012, 28: 521-6
- [27] 孙黔云, 李敏, 叶巧玲, 等. 补体旁路激活导致内皮细胞

- 活化和损伤. 中国药理学通报, 2012, 28: 925-9
- [28] 李红玲, 孙黔云, 李敏, 等. 补体旁路激活产物刺激内皮细胞NF- κ B、p38MAPK、JAK2通路活化及抑制剂的干预研究. 中国细胞生物学学报, 2013, 35: 836-41
- [29] 李敏, 孙黔云, 赵琼, 等. 补体旁路过度激活影响体内凝血功能. 中国药理学通报, 2014, 30: 39-44
- [30] 路青瑜, 李敏, 孙黔云. 补体旁路激活致内皮细胞纤溶凝血相关分子表达变化及干预研究. 中国药理学通报, 2015, 31: 1142-6
- [31] O'Connell PJ, Cunningham A, d'Apice AJ. Xenotransplantation: its problems and potential as a clinical procedure. *Transplant Rev*, 2000, 14: 18-40
- [32] Cooper DK, Eksler B, Tector AJ. Immunobiological barriers to xenotransplantation. *Int J Surg*, 2015 [Epub ahead of print]
- [33] Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, et al. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation*, 1993, 55: 857-65
- [34] Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, et al. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation*, 1997, 64: 1255-61
- [35] Sun QY, Chen G, Guo H, et al. Prolonged cardiac xenograft survival in guinea pig-to-rat model by a highly active cobra venom factor. *Toxicon*, 2003, 42: 257-62
- [36] Chen G, Sun QY, Wang XM, et al. Improved suppression of circulation complement dose not block acute vascular rejection of pig-to-rhesus monkey cardiac transplants. *Xenotransplantation*, 2004, 11: 123-32
- [37] Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, 2012, 93: 1-10
- [38] Valenzuela NM, McNamara JT, Reed EF. Antibody-mediated graft injury: complement-dependent and complement-independent mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant*, 2014, 19: 33-40
- [39] Baldwin III WM, Samaniego M, Qian ZP, et al. Complement as a mediator of allograft injury: an inflammatory view. *Transplant Rev*, 2000, 14: 41-51
- [40] Chen S, Zhong S, Xiang Y, et al. Complement inhibition enables renal allograft accommodation and long-term engraftment in presensitized nonhuman primates. *Am J Transplant*, 2011, 11: 2057-66
- [41] Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, et al. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res*, 2010, 8: 1453-65
- [42] Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol*, 2013, 190: 3831-8
- [43] Markiewski MM, Lambris JD. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol*, 2009, 30: 286-92
- [44] Stevenson GT. Three major uncertainties in the antibody therapy of cancer. *Haematologica*, 2014, 99: 1538-46
- [45] Nitta H, Murakami Y, Wada Y, et al. Cancer cells release anaphylatoxin C5a from C5 by serine protease to enhance invasiveness. *Oncol Rep*, 2014, 32: 1715-9
- [46] Downs-Canner S, Magge D, Ravindranathan R, et al. Complement inhibition: a novel form of immunotherapy for colon cancer. *Ann Surg Oncol*, 2015 [Epub ahead of print]
- [47] Vogel CW, Müller-Eberhard HJ. Induction of immune cytolysis: tumor-cell killing by complement is initiated by covalent complex of monoclonal antibody and stable C3/C5 convertase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 7707-11
- [48] Juhl H, Sievers M, Baltzer K, et al. A monoclonal antibody-cobra venom factor conjugate increases the tumor-specific uptake of a ^{99m}Tc -labeled anti-carcinoembryonic antigen antibody by a two-step approach. *Cancer Res*, 1995, 55: 5749s-55s
- [49] Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 2014, 124: 2804-11
- [50] DeZern AE, Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a complement-mediated hemolytic anemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2015, 29: 479-94
- [51] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症诊断及治疗中国专家共识. *中华血液学杂志*, 2013, 34: 276-9
- [52] Preis M, Lowrey CH. Laboratory tests for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*, 2014, 89: 339-41
- [53] 孙黔云, 叶巧玲, 闫银萍. 小鼠血清补体替代途径溶血活性测定的新方法. *中国药理学通报*, 2011, 27: 1619-22
- [54] Vogel CW, Finnegan PW, Fritzinger DC. Humanized cobra venom factor: structure, activity, and therapeutic efficacy in preclinical disease models. *Mol Immunol*, 2014, 61: 191-203
- [55] Vogel CW, Fritzinger DC, Gorsuch WB, et al. Complement depletion with humanised cobra venom factor: efficacy in preclinical models of vascular diseases. *Thromb Haemost*, 2015, 113: 548-52