

眼镜蛇毒因子的研究进展

吴 歆 顾熊飞(广州 510080 中山医科大学生物化学教研室)

摘要 目的: 介绍眼镜蛇毒因子的性质, 应用现状及发展前景。方法: 参考国内外的文献, 介绍眼镜蛇毒因子的理化性质、分子生物学特性、免疫学作用机制及其临床应用。结果与结论: 眼镜蛇毒因子作为一种强效的补体抑制剂, 具有突出的优点和特异的临床应用范围, 有广阔的开发前景。

关键词 眼镜蛇毒因子; 抗补体蛋白; 免疫; 肿瘤; 异种移植

The research progress of cobra venom factor

Wu Xin(WuX), Gu Xiongfei(GuXF) (The Department of Biochemistry, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences Guangzhou 510080)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To review the characteristics, application and specification of cobra venom factor (CVF). **METHOD:** Consulting the literatures at home and abroad, the characteristics of CVF, the mechanism of its immunological action and clinical application were reviewed. **RESULTS AND CONCLUSION:** CVF is a strong inhibitor of complementary which have excellent virtue and special use in clinic. It is possible for CVF to be as a new drug with wide prospects of application

KEY WORDS cobra venom factor, anticomplementary protein, immunology, tumor, xenotransplantation

眼镜蛇毒因子(Cobra venom factor, CVF), 又称为眼镜蛇抗补体蛋白(Cobra anticomplementary protein), 是眼镜蛇毒中的主要抗补体成分。本世纪初 Flexner 和 Noguchi 即发现眼镜蛇毒具有抗补体作用。到 60 年代, Nelson、Muller 等发现眼镜蛇毒中抗补体的主要成分是 CVF^[1-2]。随后的二十年, 许多实验室用各种方法分离提纯眼镜蛇毒因子^[3-10], 其理化性质、体内代谢动力学、分子生物学特性、免疫学作用才逐渐被阐明。1994 年 Fritzinger 等还克隆得到了 CVF 的 cDNA 序列^[11]。近年来, 由于 CVF 具有长效的脱补体作用, 因此被广泛应用于基础医学的研究, 具有广阔的临床应用前景, 正日益受到人们的关注。本文对 CVF 的理化性质、分子生物学特性、免疫学作用机理、应用现状作一简要综述如下。

1 CVF 的理化性质

CVF 是一种带负电荷较多的球状糖蛋白分子, 由 α 、 β 、 γ 三个亚基通过二硫键及其它非共价键的次级键相互联接而成。在电子显微镜下, CVF 分子呈圆柱形, 一端稍宽($137 \pm 13 \text{ \AA} \times 82 \pm 11 \text{ \AA}$)^[12-13]。它的分子量因各实验室提纯方法、测定分子量的方法及眼镜蛇毒来源的不同而有所差异。全分子 CVF 的分子量为 130000~230000(道尔顿, 以下同), 三个亚基的分子量分别为: α : 66000~87000; β : 47000~75000; γ : 28000~66000^[3-10]。等电点(pI)为 5.2~6.5^[6,9,12]。CVF 对温度有较好的稳定性, 10~65℃ 稳定, 65℃ 以上迅速变性失活^[6,9,14,15]。

CVF 的氨基酸组成没有特殊性, 含有较多的酸性氨基酸, 二级结构以 β 折叠为主, 占 47%; α -螺旋占 11%^[5,7,12]。CVF 经碳水化合物分析发现, 其糖的含量约占 2.8~7.4%, 其中有较多的岩藻糖, 极少有唾液酸。 α 链有 2~3 个糖基化位点, β 链有一个, γ 链则没有。寡糖链主要是双天线复合型, 末端为非还原的 α -半乳糖残基, 以 N-糖苷键与肽链上的天冬酰胺连接, 见图 1。CVF 脱糖基化后, 其二级结构无明显变化, 对其补体激活作用亦没有较大的影响。由此推测 CVF 的寡糖链不是其补体激活作用所必需的, 而可能与 CVF 的热稳定性有关^[15-17]。

另外, Vogel 等还报道了 CVF 其它方面的理化性质, 如沉降系数、扩散系数、消光系数、电泳迁移率等^[7]。

2 眼镜蛇毒因子的 cDNA 序列及其延伸的初级结构

1994 年 Fritzinger 等首先报道 CVF 的 cDNA 序列。CVF 的 mRNA 全长 5924 核苷酸(nt), 5' 端前 3nt 和 3' 端的 994nt 不翻译, 中间为 -4962nt 的开放读码框, 可翻译成 1642 个氨基酸的前蛋白原, 如图 2 所示。

CVF 前蛋白原的 N-端 22 个氨基酸残基为信号肽, 富含疏水性氨基酸。信号肽后为 627 个氨基酸残基的 α 链, α 链有 3 个 N-糖苷化位点(131, 136, 187)。 α 链的 C 端连接 4 个精氨酸残基及一个类似 C3a 的 79 氨基酸残基的肽段, 类 C3a 肽段的 640 位有一个糖基化位点。 γ 链始于 711 位氨基酸残基, 但其 C 末端未确定, 可能具有种间特异性。 γ 链 C 末端连接

279 个氨基酸残基的类 C3d 肽段。CVF 的 β 链从 1242 位氨基酸起延伸 379 个氨基酸残基, 在 1324 位有一个 N-糖苷化位点。CVF 的前蛋白原的类 C3a, 类 C3d 肽段在翻译后被切除, 成熟的 CVF 中没有这两个肽段^[11]。

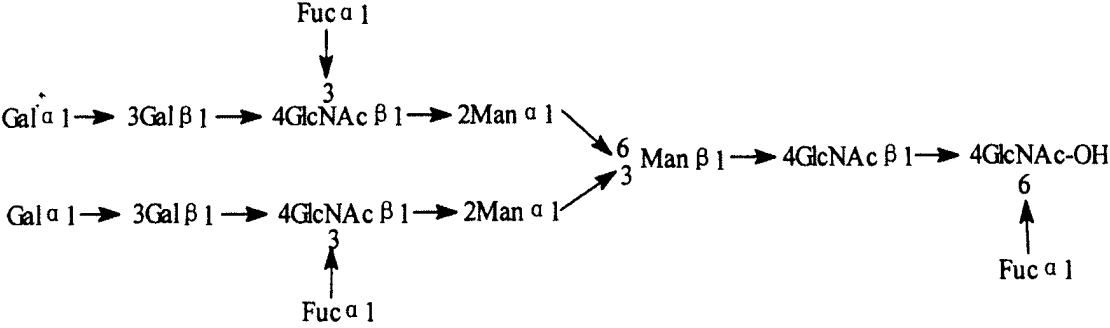


图 1 CVF 主要的糖链结构

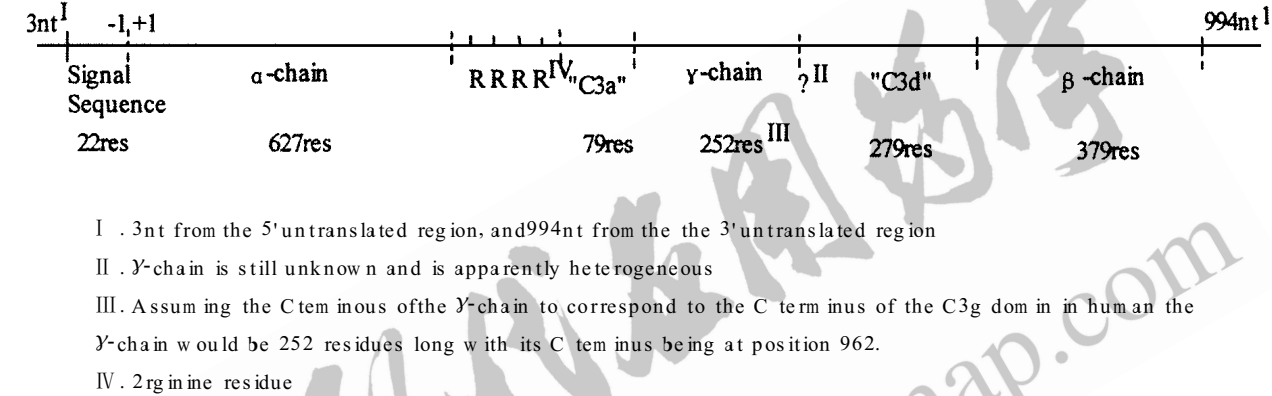


图 2 CVF 的 cDNA 序列及其延伸的氨基酸序列

3 CVF 的免疫学作用

CVF 是一个球形的糖蛋白, 在 Mg^{2+} 存在下, 与 B 因子可逆结合。复合物 CVF-B 随即被血清中的 D 因子水解成两个片段, 小片段 Ba 被释放出来。产物 CVF-Bb 是个补体激活替代途径 (Alternative pathway) 的 C3/C5 转化酶, 具有丝

氨酸蛋白酶活性, 能水解 C3 的 α 链 77 位肽键 (Arg-Ser) 及 C5 的 α 链 74 位肽键 (Arg-Leu), 形成 C3b、C5b, 释放过毒素 C3a、C5a。C3b、C5b 促使膜攻击复合物的形成, 导致细胞膜穿孔、细胞溶解^[1-2]。CVF 的补体激活全过程如图 3 所示。

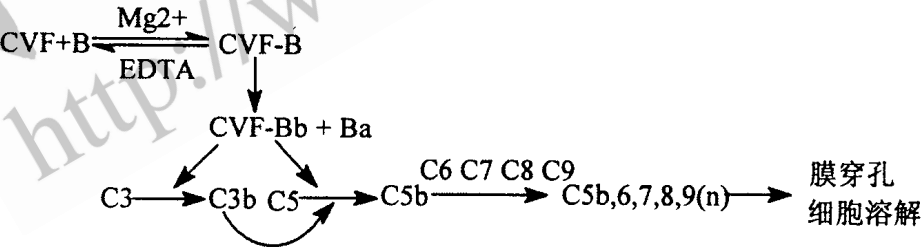


图 3 CVF 对补体激活替代途径的影响

1983 年 Eggersten 等利用免疫印迹技术证实了 CVF 的 α 链与 C3 的 β 链有相同的抗原决定簇, 而 CVF 的 β 、 γ 链与 C3 的抗血清无免疫交叉反应。随后 Vogel 等人从 CVF 与 C3 氨基酸组成、N-末端序列、远紫外、近紫外、圆二色光谱二级结构、等电点及超微结构等方面进行比较分析, 推测 CVF 与 C3 是同一祖先蛋白分子进化而来, 是 C3 存在的另一种选择形式^[12]。比较 CVF 与 C3 的 mRNA, 发现两者相似程度超

过 50%, 蛋白质水平的相似程度更超过 70%, 尤其是 27 个半胱氨酸残基, 形成硫醚键的位点, B 因子的结合位点高度保守^[11,21]。另一方面, CVF 与 C3 中糖的含量与类型有很大的差异。① CVF 的糖含量 (2.8~7.4%) 明显高于人的 C3 (1.7%)。② CVF 的 α 、 β 链的寡糖链为高岩藻糖取代的复合型, 而人类 C3 的 α 、 β 链的寡糖链为高甘露糖型。③ CVF 寡糖链

末端为 α -半乳糖残基,而哺乳动物体内的 α -半乳糖转移酶基因是被抑制的^[13-19]。

CVF与C3的降解产物C3b片段相似,都以1:1的比例可逆地与B因子结合成复合物,经D因子水解活化后,形成C3转化酶,催化膜攻击复合物的形成。

然而, CVF与C3主要有三方面的不同:①CVF-Bb比C3b-Bb更稳定,37℃时CVF-Bb的半衰期为7h,而C3b-Bb的半衰期只有1.5分钟;②与C3b不同, CVF有抗调节蛋白H、I因子的作用,因此CVF-Bb不易被解离,这可能是CVF-Bb有较长半衰期的原因;③CVF-Bb不仅能激活C3,同时也能激活C5,而C3b-Bb只能激活C3,对C5没有激活作用^[1-2,15]。

眼镜蛇蛇毒中除了CVF,还有另外两种与补体系统相互作用的成分——高分子眼镜蛇蛇毒因子和补体抑制剂。高分子量眼镜蛇毒因子(High molecular weight cobra factor H-CVF)是Ballow等分离CVF时发现的,分子量大于800000,不水解血清中的C3。抗补体活性为眼镜蛇毒总抗体活性的3%,作用于补体激活途径的前几个步骤^[1-2]。补体抑制剂(Cobra Inhibitor, CI),是Von Zaber等在1981年发现的,它是一个小分子(分子量约为26000)、热不稳定的碱性糖蛋白。CI作用于补体影响系统的多个步骤,影响补体激活的经典途径和替代途径^[1-2]。

4 CVF的应用

研究发现CVF的重要靶器官是肝脏;小鼠静脉注射CVF后,其血浆清除半衰期为10h;而腹腔注射后,6h血中CVF的含量达到最大值,血浆清除半衰期是18h^[22]。由于CVF的性质稳定,半衰期长,因此能不断激活补体引起补体的耗竭。据文献报道,大鼠腹腔注射CVF15h后血中的C3的含量降低至正常水平的5%左右;分批注射CVF,则在1~4天内血浆中的C3能降低至正常的5%以下^[1]。豚鼠腹腔注射CVF2天后,角膜的补体水平能降至很低,并能保持6天^[23]。

随着对CVF理化性质和动物体内代谢动力学的研究的不断深入, CVF作为一种有效的脱补体剂,越来越广泛地应用于免疫学基础研究及临床研究。

4.1 免疫学基础研究

70年代, Pepys就发现了CVF能抑制大鼠体内依赖于胸腺的抗体特别是IgG组分的产生^[24]。1986年Bottger等报道CVF能够抑制噬菌体 $\phi\kappa$ 174(T细胞依赖性抗原)在豚鼠体内引起的体液免疫反应^[25]。近年来, CVF多用于诱导补体缺陷的动物模型^[26],或用于处理各种患病动物模型,以研究补体系统在疾病发病机制中的作用。如Pang等发现CVF能抑制维生素D诱导的大鼠动脉硬化^[27];任先达等人发现CVF对家犬呼吸窘迫综合征具有保护作用^[28]。

4.2 临床研究方面

80年代初Vogel等就报道了CVF的一个相当重要应用,即利用CVF与肿瘤相关抗原的单克隆抗体共价结合,选择性地杀伤、消灭肿瘤^[29]。迈入九十年代, CVF-单抗结合物的抗肿瘤作用的研究越来越广泛和深入,针对不同肿瘤的特

异性杀灭方面的研究取得了长足的进展。Juhl等发现CVF-单抗结合物能促进肿瘤细胞特异性地摄入抗癌胚抗原的抗体^[30];不同的CVF-单抗结合物对人神经母细胞瘤有不同的细胞毒性^[31]。Wang等报道CVF-单抗结合物对人鼻咽癌细胞具有选择性的细胞毒作用^[32]。

CVF的另一重要的临床应用研究是利用它可以抑制补体系统,克服异种移植引起的超急排斥反应和急性血管排斥反应,是器官异种移植临床应用中有发展潜力的新型抗排斥药物^[33]。1985年Knechtle等人在比较CVF、环孢霉素、全身淋巴照射在抗超急排斥反应方面的作用时发现,在同种异体大鼠心脏移植前,对超敏状态的大鼠进行全身淋巴照射或合并注射环孢霉素都无法有效延长大鼠的生存期;而用CVF耗竭补体,能使器官存活时间由 20.4 ± 16.6 h(或 35.6 ± 6.2 h)延长至 114.4 ± 31.0 h,从而推测CVF能延迟超急性反应的发生^[34]。近年来,有关这方面的研究更是如火如荼。CVF与环孢菌素联合,应用于仓鼠-大鼠的异种心脏移植^[36];与环孢菌素、IgG EXAC(xenoreactive antibody)合用,应用于小鼠-大鼠的异种心脏移植^[36],单独应用于在猪-狒狒的心脏移植^[37];实验结果均表明CVF能有效抑制超急排斥反应而延长宿主的存活时间。

5 CVF的研究展望

迄今为止,对CVF的理化性质、代谢动力学、基因组结构已有比较明确的认识,其作用于补体系统的机制也有了进一步的了解。CVF在抗肿瘤与异种移植两方面的应用研究仍然是目前研究的热点。

随着CVF研究的日益深入,其突出的优点和特异的临床应用范围受到人们的广泛关注。但是作为从眼镜蛇毒中提取的蛋白有其本身的抗原性,其寡糖链的非还原性 α -半乳糖可导致抗CVF的 α -半乳糖抗体的快速产生,从而减弱CVF的作用^[38];另外CVF耗竭补体是全身作用,靶向性差,也限制了其在临床的实际应用。通过对CVF结构的修饰,包括切除末端 α -半乳糖基^[38],改善其抗原性;通过各种双功能交联剂将CVF与单克隆抗体结合,增加其靶向性,同时降低全身毒性^[40-41],有助于上述问题的解决,也是今后研究的方向之一。

总之,眼镜蛇毒因子作为一种强效的补体抑制剂,具有广阔的应用前景,有待于进一步深入研究和开发。

参考文献

- 1 陈川. 眼镜蛇蛇毒因子. 广西医学院学报, 1989, (2): 75.
- 2 Vogt W. Factors in cobra venoms affecting the complement system. Toxicon, 1982, 20(1): 299.
- 3 Muller-Eberhard HJ. Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. J Immunol, 1971, 107: 1666.
- 4 Pepys MB. An improved method for the isolation from Naja naja venom of cobra factor free of phospholipase A. J Immunol Methods, 1979, 30: 105.
- 5 Eggertsen G, Lind P, Sjoquist J. Molecular characterization of

the complement activating protein in the venom of the Indian cobra(*Naja N. siamensis*). *Mol Immunol*, 1981, 18(2): 125.

- 6 Takahashi H, Hayashi K. Purification and characterization of anticomplement factor(cobra venom factor) from the *Naja naja atra* venom. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 701(1): 102.
- 7 Vogel CW, Muller-Eberhard H J. Cobra venom factor: improved method for purification and biochemical characterization. *J Immunol Methods*, 1984, 73(1): 203.
- 8 Beukelman CJ, Aerts PC; Van-Dijk H, et al. A one step isolation procedure for phospholipase A2 free cobra venom factor by fast protein liquid chromatography. *J Immunol Methods*, 1987, 97(1): 119.
- 9 舒雨雁, 陈川, 庄茂辛, 等. 中华眼镜蛇蛇毒因子的分离、纯化及性质的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1991, 23(1): 32.
- 10 任先达, 黄守坚, 吴楚坤, 等. 分离纯化眼镜蛇蛇毒因子的一种经济方法. *中国药理学与毒理学杂志*, 1994, 8(4): 271.
- 11 Fritzinger DC, Bredehorst R, Vogel CW. Molecular cloning and derived primary structure of cobra venom factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(26): 12775.
- 12 Vogel CW, Smith CA, Muller-Eberhard H J. Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. *J Immunol*, 1984, 133(6): 3235.
- 13 Smith CA, Vogel CW, Muller-Eberhard H J. Ultrastructure of Cobra venom factor-dependent C3/C5 convertase and its zymogen, factor B of human complement, *J Biol Chem*, 1982, 257(17): 9879.
- 14 Hensley P, O'Keefe MC, Spangler CJ, et al. The effects of metal ion and temperature on the interaction of cobra venom factor and human complement factor B. *J Biol Chem*, 1986, 261(24): 11038.
- 15 Vogel CW, Muller-Eberhard H J. The cobra venom factor-dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. *J Biol Chem*, 1982, 257(14): 8292.
- 16 Grier AH, Vogel CW. The oligosaccharide chains of cobra venom factor are required for complement activation. *Mol Immunol*, 1989, 26(6): 563.
- 17 Gowda DC, Schultz M, Bredehorst R, et al. Structure of the oligosaccharide of cobra venom factor. *Mol Immunol*, 1992, 29(3): 335.
- 18 Gowda DC, Petrella EC, Raj TT, et al. Immunoreactivity and function of oligosaccharides in cobra venom factor. *J Immunol*, 1994, 152(6): 2977.
- 19 Gowda DC. Modification at C6 of the terminal galactosyl residues of cobra venom factor abolishes anti- α -Gal antibody immunoreactivity without affecting functional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245(1): 28.
- 20 Eggertsen G, Lundwall A, Hellman U, et al. Antigenic relationships between human and cobra complement factors C3 and cobra venom factor from the Indian cobra(*Naja naja*). *J Immunol*, 1983, 131(4): 1920.
- 21 Fritzinger DC, Petrella EC, Connelly MB, et al. Primary

structure of cobra venom component C3. *J Immunol*, 1992, 149(11): 3554.

- 22 Fu Q, Satyaswaroop PG, Gowda DC. Tissue targeting and plasma clearance of cobra venom factor in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(2): 316.
- 23 Pleyer U, Mondino BJ, Summer H J. The effect of systemic decompensation with cobra venom factor on corneal complement levels in guinea pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33(7): 2212.
- 24 Pepys MB. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. *J Exp Med*, 1974, 140(1): 126.
- 25 Bottger EC, Hoffmann T, Metzger S, et al. The role and mechanism of cobra venom factor-induced suppression of the humoral immune response in guinea pigs. *J Immunol*, 1986, 137(4): 1280.
- 26 Frank MM. Animal models for complement deficiencies. *J Clin Immunol*, 1995, 15(6 Suppl): 113s.
- 27 Pang AS, Minta JQ. Inhibition of vitamin D2-induced arteriosclerosis in rats by depletion of complement with cobra venom factor. *Artery*, 1980, 7(2): 109.
- 28 任先达, 黄守坚, 孙家钧, 等. 眼镜蛇毒因子对实验性家犬呼吸窘迫综合症的保护作用. *中国临床药理学与治疗学杂志*, 1998, 3(1): 5.
- 29 Vogel CW, Muller-Eberhard H J. 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(12): 7707.
- 30 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-carinoembryonic antigen antibody by a two-step approach. *Cancer Res*, 1995, 55(23 suppl): 5749s.
- 31 Juhl H, Petrella EC, Cheung NK, et al. Additive cytotoxicity of different monoclonal antibody-cobra venom factor conjugates for human neuroblastoma cells. *Immunobiology*, 1997, 197(5): 444.
- 32 Wang XM, Huang SJ. The selective cytotoxicity of cobra venom factor immunocjugate on cultured human nasopharyngeal carcinoma cell line, 1999, 18(2): 71.
- 33 Lambrechts D, Sachs DH, Cooper DK. Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation*, 1998, 66(5): 547.
- 34 Knechtle SJ, Halperin EC, Murphy CE, et al. The effect of cyclosporine, total lymphoid, and cobra venom factor on hyperacute rejection. *J Heart Transplant*, 1985, 4(5): 541.
- 35 Van - den - Bogaerde J, Aspinall R, Aspinall R, et al. Induction of long term survival of hamster heart xenografts in rats. *Transplantation*, 1991, 52(1): 15.
- 36 Koyamada N, Miyatake T, Candinas D, et al. Transient

- complement inhibition plus T - cell immunosuppression induces long - term survival of mouse - to - rat cardiac xenografts. *Transplantation*, 1998, 65(9): 1210.
- 37 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(9): 1255.
- 38 Taniguchi S, Kobayashi T, Neethling FA, et al. Cobra venom factor stimulates anti - alpha galactose antibody production in baboon. Implications for pig - to - human xenotransplantation. *Transplantation*, 1996, 62(5): 678.
- 39 Fu Q, McPhie P, Gowda DC. Methionine modification impairs the C5 - Cleavage function of cobra venom factor - dependent C3/C5 convertase. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, 45(1): 133.
- 40 Petrella EC, Wilkie SD, Smith CA, et al. Antibody conjugates with cobra venom factor. Synthesis and biochemical characterization. *J Immunol Methods*, 1987, 104(1—2): 159.
- 41 Zara J, Pomato N, McCabe RP, et al. Cobra venom factor immunoconjugates: effects of carbohydrate - directed versus amino group - directed conjugation. *Bioconj Chem*, 1995, 6(4): 367

收稿日期: 2000- 03- 22