

# 眼镜蛇毒中一个新的抗补体蛋白质的 分离纯化和性质研究

石磊<sup>1), 2), 3) #</sup>, 崔昊<sup>4) #</sup>, 杨付梅<sup>2), 3)</sup>, 路青瑜<sup>2), 3)</sup>,  
李娇<sup>2), 3)</sup>, 孙黔云<sup>1), 2), 3) \*</sup>

(<sup>1)</sup> 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; (<sup>2)</sup> 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室,

贵阳 550014; (<sup>3)</sup> 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014;

(<sup>4)</sup> 贵州中医药大学第一附属医院药物临床试验机构, 贵阳 550001)

**摘要** 免疫性疾病、急性肺损伤、缺血再灌注损伤等病征的发生与补体异常激活密切相关。抗补体药物研究是新药开发的热点之一。本研究旨在从中华眼镜蛇毒中发现并分离纯化获得新的抗补体活性蛋白质, 并对其理化性质和生物学活性加以研究。在抗补体活性追踪的指导下, 采用蛋白质层析技术对眼镜蛇毒进行分离纯化; 利用 MALDI-TOF-MS、SDS-PAGE 和葡聚糖凝胶过滤法测定目标蛋白质的纯度及分子量; 等电聚焦凝胶电泳法测定其等电点; 采用 Edman 降解法测定目标蛋白质的 N-端氨基酸序列; 测定目标蛋白质对补体经典途径和旁路途径的抑制活性以及可能的机制; 采用 MTT 法和 SRB 法检测目标蛋白质对肿瘤细胞的杀伤作用; 测定目标蛋白质对多种来源红细胞的溶血活性; 采用 KB 平板扩散法检测抗菌活性。结果表明, 通过 SP Sephadex C-25 阳离子交换层析和 RP-HPLC C18 反相层析, 从中华眼镜蛇毒中分离纯化获得一个均一的抗补体蛋白质, 将其命名为 CTX-CI。还原性 SDS-PAGE 测得 CTX-CI 的表观分子量为 12.7 kD, 凝胶过滤法测得分子量为 9.7 kD, MALDI-TOF-MS 测得精确分子质量为 7.0 kD; 变性条件下测得 CTX-CI 的等电点为 9.81; N-端氨基酸序列为 LKCH。相关活性测定结果表明, CTX-CI 能有效抑制人血清补体经典途径, 其  $IC_{50}$  为 0.046 g/L, 但对补体旁路途径无明显抑制作用; 机制研究表明, CTX-CI 能抑制补体经典途径 C3 转化酶的形成。同时, CTX-CI 对肿瘤细胞株 A549、K562 和 MCF-7 细胞表现出抑制作用, 其  $IC_{50}$  分别为 0.32 g/L、0.58 g/L、0.63 g/L; 对豚鼠红细胞有轻微的溶血作用; 能抑制枯草芽孢杆菌和藤黄微球菌的生长。综上所述, 本研究从中华眼镜蛇毒中分离纯化出一个新的抗补体蛋白质-CTX-CI, 其理化性质和生物学活性表明其属于细胞毒素, CTX-CI 能明显抑制补体经典途径, 其机制与抑制经典途径 C3 转化酶的形成有关。

**关键词** 眼镜蛇毒; 抗补体蛋白质; 补体; 细胞毒素; C3 转化酶; CTX-CI

**中图分类号** Q71; R967

收稿日期: 2019-02-10; 修回日期: 2019-04-17; 接受日期: 2019-05-10

国家自然科学基金项目 (No. U1812403); 贵州省科技计划及平台人才项目 (黔科合人才[2016]4018、黔科合平台人才[2016]5625、黔科合支撑[2018]2828、黔科合平台人才[2019]5702) 资助

# 共同第一作者

\* 通讯作者 Tel: 0851-83805095; E-mail: sunqy@hotmail.com

Received: February 10, 2019; Revised: April 17, 2019; Accepted: May 10, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. U1812403); Science and Technology Foundation of Guizhou Province (QKHRC[2016]4018, QKHPTRC[2016]5625, QKHZC[2018]2828, QKHPTRC[2019]5702)

# The first two authors contributed equally to this work

\* Corresponding author Tel: 0851-83805095; E-mail: sunqy@hotmail.com

Purification and Characterization of A New Anticomplementary Protein  
in *Naja atra* Venom

SHI Lei<sup>1), 2), 3) #</sup>, CUI Hao<sup>4) #</sup>, YANG Fu-Mei<sup>2), 3)</sup>, LU Qing-Yu<sup>2), 3)</sup>,  
LI Jiao<sup>2), 3)</sup>, SUN Qian-Yun<sup>1), 2), 3) \*</sup>

(<sup>1)</sup> School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;

<sup>2)</sup> State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China;

<sup>3)</sup> Key Laboratory of Chemistry for Natural Products, Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China;

<sup>4)</sup> Drug Clinical Trial Facility, First Affiliated Hospital, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

**Abstract** A series of diseases such as immune diseases, acute lung injury and ischemia-reperfusion injury are highly relative with abnormal complement activation. Anticomplementary drugs research is one of the focus areas in the development of new drugs. The study aims to discover and purify new anticomplementary protein from *Naja atra* venom, and characterize its physicochemical properties and biological activities. The protein chromatography technology was used to isolate and purify the targeted protein under the guidance of anticomplementary activity. The purity and molecular weight were measured by SDS-PAGE, gel filtration and MALDI-TOF-MS method, and isoelectric focusing electrophoresis method was used to determine its isoelectric point. The N-terminal sequence was determined by the Edman method. The inhibitory activity of the targeted protein on the classical and alternative pathways of the complement and its mechanism were investigated. The anti-cancer activity was evaluated by the MTT or SRB methods. The hemolytic activity of the targeted protein on various erythrocytes was measured. The antibacterial activity was assayed by the KB diffusion method. The results showed that a homogeneous anticomplementary protein was purified by sequential SP-Sephadex C-25 and RP-HPLC C18 from *Naja atra* venom. Its molecular weight was 12.7 kD and 9.7 kD determined by reduced SDS-PAGE and gel filtration methods. Its accurate molecular weight was 7.0 kD by MALDI-TOF-MS. Its isoelectric point was 9.81, and the N-terminal sequence was LKCH. The protein effectively inhibited the complement classical pathway of human serum, and the  $IC_{50}$  value was 0.046 g/L, but no obvious inhibitory activity on the alternative pathway was shown. The study of mechanism showed that the protein significantly inhibited the formation of C3 convertase of the classical pathway. The protein showed obvious activity against the growth of cancer cell lines A549, K562 and MCF-7, and the  $IC_{50}$  value were 0.32 g/L, 0.58 g/L, and 0.63 g/L, respectively. It showed inhibitory activity against the growth of *Bacillus subtilis* and *Sarcina lutea*, and the protein induced slight hemolysis of guinea pig erythrocytes. In conclusion, a new anticomplementary protein was purified and characterized from *Naja atra* venom. Its physicochemical properties and biological activities indicate that it belongs to cytotoxin. The protein can significantly inhibit the complement classical pathway, and its mechanism is related to inhibit the formation of the C3 convertase of the classical pathway.

**Key words** *Naja atra* venom; anticomplementary protein; complement; cytotoxin; C3 convertase; CTX-CI

补体系统是天然免疫系统的重要组成部分<sup>[1]</sup>。补体系统正常激活时能发挥免疫防御功能,但过度激活时则会导致严重组织损伤和炎症反应。补体系统在多种疾病中扮演了重要的角色<sup>[2]</sup>,如免疫性疾病、缺血再灌注损伤、急性肺损伤和脓毒症等<sup>[3-6]</sup>。研究中的抗补体药物有大分子药物和小分子药物,其中 C5 单克隆抗体已成功应用于临床<sup>[7]</sup>,目前可供临床使用的抗补体药物仍十分有限。因此,从天然资源中寻找和发现新型抗补体药物具有重要意义和价值。

天然蛇毒成分复杂,大多为蛋白质和肽类分子,具有血液循环系统、神经系统等毒性,并表现出抗菌、抗肿瘤和镇痛等生物学活性,是现代新药研究的丰富资源库<sup>[8-11]</sup>。迄今为止,从不同眼镜蛇毒中分离纯化获得了多种抗补体蛋白质:眼镜蛇毒因子(cobra venom factor, CVF)<sup>[12]</sup>、CI<sup>[13]</sup>和 Atrase B<sup>[14]</sup>等。本课题组在前期工作中发现,中华眼镜蛇毒中还存在其他抗补体分子,因此本工作旨在从中华眼镜蛇毒中纯化出新的抗补体蛋白质,并进行相应的研究,以评价其潜在的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SP-Sephadex C-25、低分子量标志物、两性电解质 Ampholine(3.5~9.5)均购于美国 GE 公司。绵羊红细胞及实验动物购于贵州医科大学和遵义医学院实验动物中心。人血清由健康志愿者献血制备。胎牛血清和 RPMI 1640 培养基购自 HyClone; MTT 购于 Amresco。中华眼镜蛇毒(*Naja atra* venom)、肿瘤细胞株 K562、A549 和 MCF-7 以及金黄色葡萄球菌(CMCC26112)、枯草芽胞杆菌(CMCC63501)、藤黄微球菌(CMCC28001)、大肠埃希氏菌(CMCC44113)、伤寒沙门氏菌(CMCC57001)、铜绿假单胞菌(CMCC10221)均由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室活性筛选室提供。其他试剂均为进口或国产分析纯。

Agilent 1100 高效液相层析系统(美国 Agilent 公司); AKTA prime 蛋白纯化仪(Amersham Pharmacia Biotech 公司);连续波长酶标仪(美国 MD 公司);FDU-1100 冷冻干燥机(日本东京理化);Forma 3111 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);NIKON 相差显微镜(日本 Nikon 公司);Revoc 超低温冰箱(美国 Thermo 公司);Milli Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)

### 1.2 抗补体蛋白质的分离纯化

2.0 g 中华眼镜蛇毒以 12 mL 醋酸钠缓冲液(0.02 mol/L, pH 5.8)溶解,2 000 r/min 离心 10 min,取上清液上样于已用相同缓冲液平衡的 SP-Sephadex C-25 柱(2.6 cm×40 cm),充分洗脱后,以 0~1 mol/L NaCl 进行线性梯度洗脱。流速为 30 mL/h,每管收集 6 mL。取分离纯化后的样品分别进行抗补体活性筛选,收集有抗补体活性的蛋白质峰,合并后冻干。

取上述有抗补体活性的组分进行透析并冻干,以超纯水溶解后,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)进行分离纯化。色谱柱选用 Hypersil C18 柱(4.6 mm×250 mm);流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸-水,流动相 B 为 0.08% 三氟乙酸-70% 乙腈,波长 235 nm,流速 1 mL/min,柱温 25 °C。洗脱后收集有抗补体活性的洗脱峰,冻干,-20 °C 存放。

### 1.3 分子量和等电点的测定

参照 Laemmli<sup>[15]</sup> 的方法进行 SDS-PAGE 还原电泳,并采用考马斯亮蓝 R-250 进行染色。凝胶过滤检测分子量则采用 Sephacryl S-100 凝胶柱(1.0

cm×63.5 cm),以 PBS 充分平衡凝胶柱,流速为 30 mL/h。采用 AKTA prime 蛋白纯化仪分别测定葡聚糖蓝的洗脱体积( $V_e$ )和已知分子量标志以及未知分子量样品的洗脱体积( $V_0$ )。将纯化的蛋白质交由中国人民解放军军事医学科学院生物医学分析中心质谱室进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析。检测仪器为 BRUKER REFLEX III 质谱仪(德国 Bruker 公司)。检测条件: N<sub>2</sub> 激光源,波长 337 nm;以芥子酸为基质进行线性检测。

等电点的测定参照 Robertson 等<sup>[16]</sup> 的方法,绘制 pH 曲线,并计算目标蛋白质的等电点。

### 1.4 N-端氨基酸序列测定

将已纯化的目标蛋白质进行 SDS-PAGE 和膜转移电泳,对 PVDF 膜染色检测后,交由上海基康生物技术有限公司测定 N-端氨基酸序列;采用 Edman 降解法进行检测,检测仪器为 ABI PROOC SETM492cLC。

### 1.5 经典途径抗补体活性检测

经典途径抗补体活性检测:取样品溶液、致敏绵羊红细胞悬液、稀释血清各 100 μL 分别加入试管中,37 °C 孵育 0.5 h,每隔 5 min 振摇 1 次。加入 1 mL 冷生理盐水,终止反应,2 000 r/min 离心 10 min。取上清液于 405 nm 处测定样品吸光值<sup>[17]</sup>。

旁路途径抗补体活性检测:取样品溶液、兔红细胞悬液、正常人血清各 100 μL 加入试管中,37 °C 孵育 30 min 后加入 0.5 mL 冷生理盐水终止反应,2 000 r/min 离心 10 min。取上清液于 405 nm 处测定吸光值<sup>[17]</sup>。

### 1.6 抗肿瘤活性检测

分别将 K562 细胞、A549 细胞和 MCF-7 细胞按  $7.5 \times 10^7$  个/mL 的密度接种于 96 孔板,每孔 90 μL,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。向 K562 细胞中加入样品培养 48 h,参考 Mosmann<sup>[18]</sup> 和 Tada 等<sup>[19]</sup> 的方法,采用 MTT 法检测细胞的存活率。A549 细胞和 MCF-7 细胞则加入样品溶液后,继续培养 72 h,参考 Skehan 等<sup>[20]</sup> 的方法,采用 SRB 法检测细胞的存活率。

### 1.7 溶血活性检测

取绵羊红细胞、豚鼠红细胞(guinea pig erythrocytes, GP erythrocytes)和家兔红细胞,用 Hanks 液制成 3% 的红细胞悬液。向试管内加入 0.24 mL 红细胞悬液后,再加入样品和 Hanks 液至 2 mL(样品终浓度为 90 mg/L)。将混合物于 37 °C 孵育 2 h,2 000 r/min 离心 10 min,540 nm 处测定吸

收值<sup>[21-22]</sup>。

1.8 抗菌活性检测

将 200  $\mu\text{L}$  配好的菌液均匀涂抹于含 20 mL M-H 培养基的培养皿上,打孔,再取样品 40  $\mu\text{L}$  加在纸片上,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养 18~24 h。以庆大霉素为阳性对照。

1.9 抑制补体经典途径 C3 转化酶形成试验

取样品溶液、人血清各 100  $\mu\text{L}$  加入试管中,37 $^{\circ}\text{C}$  水浴孵育 10 min,加入 100  $\mu\text{L}$  致敏绵羊红细胞,37 $^{\circ}\text{C}$  继续孵育 5 min。取 1 mL 生理盐水清洗红细胞,2 000 r/min 离心 10 min,吸去上清后加入 100  $\mu\text{L}$  大鼠血清(以含 0.04 mol/L EDTA 的 GVB 缓冲液 1:5 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$  水浴孵育 30 min,0.9 mL 生理盐水终止反应。2 000 r/min 离心 10 min,取上清于 405 nm 处测吸光度。

1.10 统计学方法

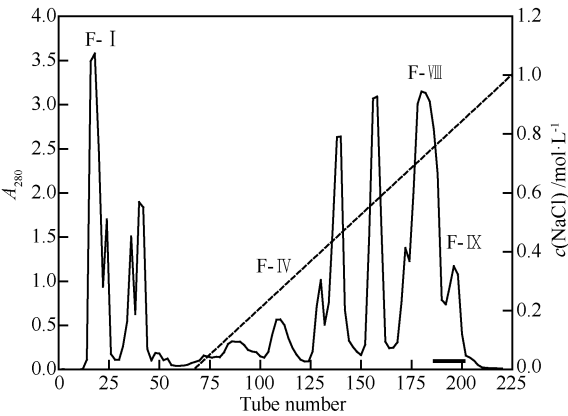
实验数据采用 mean  $\pm$  SD 表示,以 SPSS 22.0 进行单因素方差分析,两组间比较采用 *t*-test,组间多重比较采用 LSD 方法。

2 结果

2.1 CTX-CI 的纯化

眼镜蛇毒经 SP-Sephadex C-25 阳离子交换层析获得 9 个洗脱峰(Fig.1),其中组分 F-I、F-IV、F-IX 具有明显的抗补体活性,收集最后一个活性部位,脱盐后冻干。

离子交换色谱中的混合组分经 RP-HPLC C18 反相色谱进一步纯化获得单一活性峰(Fig.2),收集含有抗补体活性的色谱峰,脱盐后冻干。将该蛋白质命名为 CTX-CI。



**Fig. 1 Ion-exchange chromatography of *Naja atra* venom on a SP-Sephadex C-25 column** A total of 2.0 g of *Naja atra* venom was applied to the column (2.6 cm $\times$ 40 cm), and the column was eluted with sodium acetate buffer at a flow rate of 30 mL/hour, and collected 6 mL per tube. Fractions indicated by the bar were pooled for further purification. The solid line indicates absorbance at 280 nm, and the dashed line is the NaCl gradien

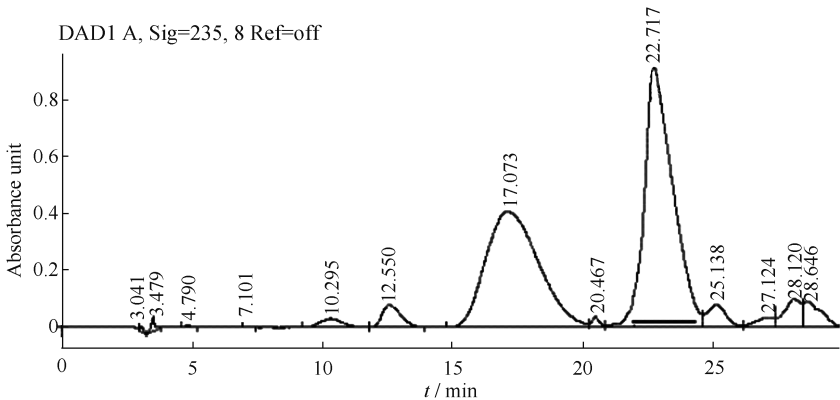
2.2 CTX-CI 的分子量和等电点测定

CTX-CI 经凝胶过滤测定,其分子量为 9.7 kD。经 SDS-PAGE 测定,在还原条件下呈现单一条带,分子量为 12.7 kD(Fig.3A)。等电聚焦电泳测定目标蛋白质的等电点 pI 为 9.81(Fig.3B)。

MALDI-TOF-MS 检测表明,纯化的 CTX-CI 分子量为 7 007.7 D(Fig.4),为信号较强的单一吸收峰。

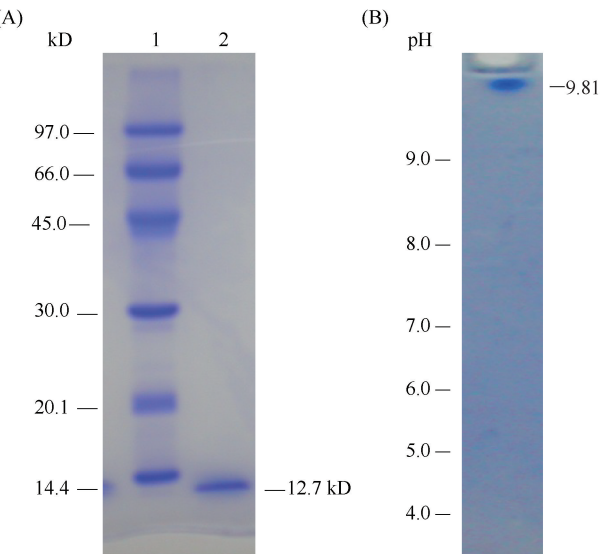
2.3 CTX-CI 的 N-端氨基酸序列分析

Edman 降解法测定 N-端氨基酸序列的结果显示,CTX-CI 的前 4 位氨基酸序列为 LKCH,与目前已报道的蛇毒细胞毒素的 N-端氨基酸序列有较高同源性(Table 1)。

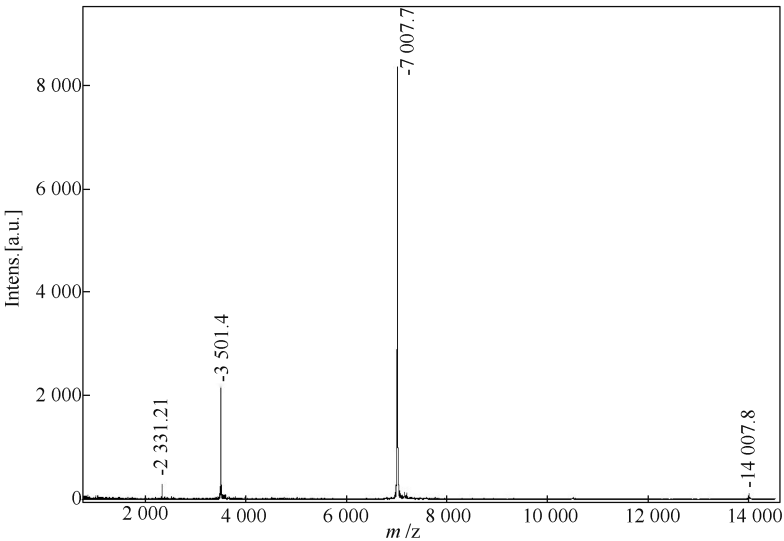


**Fig.2 RP-HPLC C18 chromatography of the pooled fractions from ion-exchange chromatography** The sample was applied to Hypersil C18 column (4.6 mm $\times$ 250 mm), and the column was eluted at a flow rate of 1 mL/minute. Fractions indicated by the bar were pooled





**Fig. 3** Reduced SDS-PAGE and isoelectric focusing electrophoretic analysis of CTX-CI (A) SDS-PAGE analysis in reducing conditions: 1, molecular marker; 2, CTX-CI. (B) Isoelectric focusing of CTX-CI



**Fig.4** MALDI-TOF mass spectrometry analysis of CTX-CI The accurate molecular weight of CTX-CI was determined by the BRUKER REFLEX III mass spectrometer with N2 laser source, wavelength of 337 nm, and erucic acid as the matrix

**Table 1** Comparison of N-terminal amino acid sequences of various cytotoxins from cobra venoms

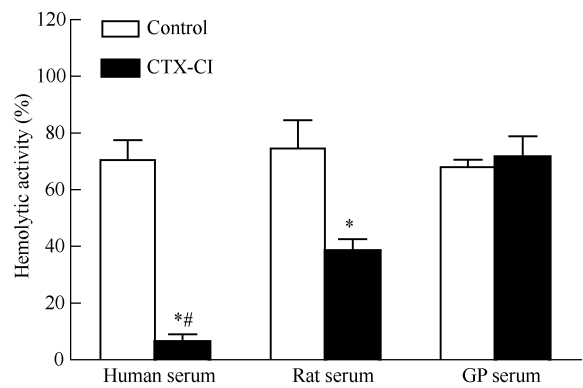
Snake venom	Protein names	N-terminal sequence
Cobra venom from Hunan	CTX-CI	LKCH
	CTX-analogue I <sup>[23]</sup>	LKC NKLIPIA
	CTX-analogue II <sup>[24]</sup>	LKC NKLVPLF
Cobra venom from Taiwan	CTX-analogue III <sup>[25-26]</sup>	LKC NKLVPLF
	CTX-analogue IV <sup>[25]</sup>	RKC NKLVPLF
	CTX-analogue V <sup>[27]</sup>	LKCHNTQLPF
	CTX-X	LKC NKLIPIA
	CTX-XI	LKC NKLVPLF
<i>Naja atra</i> from Fujian <sup>[28]</sup>	CTX-XII	LKC NKLVPLF
	CTX-XIII	RKLNKLVPLF

2.4 CTX-CI 抑制人血清补体经典途径

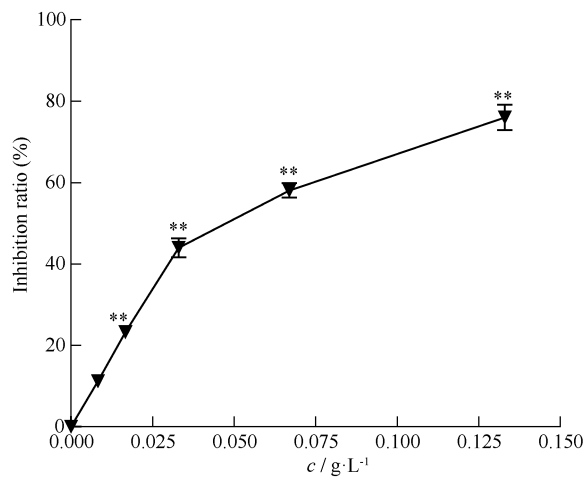
本研究采用人血清、大鼠血清和豚鼠血清 (guinea pig serum, GP serum) 检测 CTX-CI 对补体经典途径的抑制作用。结果表明,CTX-CI 对上述 3 种血清补体经典途径的抑制作用存在较大差异。其中,对人血清补体的抑制作用最为明显,溶血率为 6.22%±0.03% ( $P<0.05$ ),其次是大鼠血清,溶血率为 38.89%±0.04% ( $P<0.05$ ),而对豚鼠血清补体基本无抑制作用 (Fig.5)。

同时,实验结果显示,CTX-CI 对人血清补体经典途径的抑制作用表现出良好的量效关系,其  $IC_{50}$  为 0.046 g/L (Fig.6)。

为了证实这种抑制作用是否具有时效性,进一步开展了时效实验。结果显示,预孵加样品组与预孵未加样品组的溶血活性基本是平行的,这表明 CTX-CI 对补体经典途径的抑制作用不具有时效性 (Fig.7)。



**Fig.5 Effect of CTX-CI on the complement classical pathway of sera** After CTX-CI was incubated with three types of sera, respectively, the inhibitory activity against the hemolysis was assayed. Significant difference was calculated by one-way ANOVA with LSD post-test, \*  $P < 0.05$ , compared with the control group, #  $P < 0.05$ , compared with the rat serum group ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )

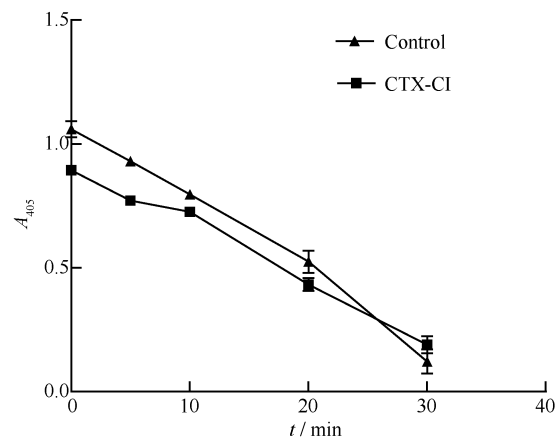


**Fig.6 Effect of CTX-CI on inhibiting the complement classical pathway of human serum** Different concentrations of CTX-CI were incubated with human serum, respectively, then sheep red blood cells were added to detect the hemolytic activity. Significant difference was calculated by  $t$ -test. \*\*  $P < 0.01$ , compared with the lower dosage group ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )

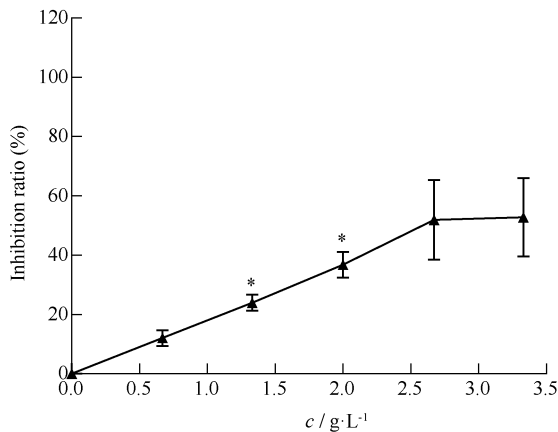
采用人血清补体检测 CTX-CI 对补体旁路途径的抑制作用。结果显示,CTX-CI 对补体旁路途径的抑制作用较弱,在终浓度达到 3.33 g/L 时,抑制率仅为 52.5%(Fig.8)。

### 2.5 CTX-CI 抑制肿瘤细胞生长

采用 A549、K562 和 MCF-7 细胞株检测 CTX-CI 的抗肿瘤活性。结果显示,CTX-CI 对 A549 细胞、K562 细胞和 MCF-7 细胞均有抑制作用,且呈剂量依赖性,其  $IC_{50}$  分别为 0.32 g/L、0.58 g/L、0.63 g/L (Fig.9)。



**Fig.7 Effect of different pre-incubation time on inhibiting the complement classical pathway by CTX-CI** The CTX-CI was pre-incubated with human serum for different times, then sheep red blood cells were added, and the absorbance was measured at 405 nm ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )



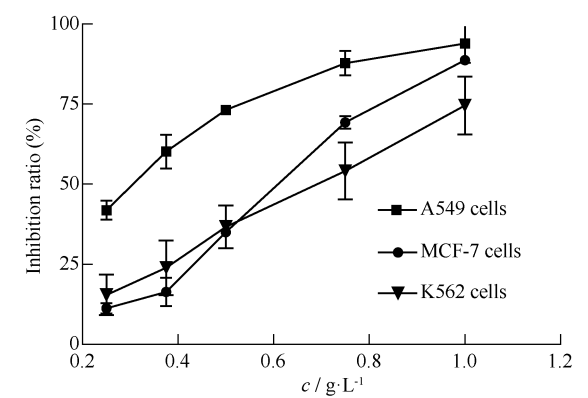
**Fig.8 The Inhibitory effect of CTX-CI on hemolytic activity of the complement alternative pathway** CTX-CI was incubated with human serum, and then rabbit red blood cells were added to detect the inhibitory effect on complement alternative pathway. Significant difference was calculated by  $t$ -test, \*  $P < 0.05$ , compared with lower dosage group ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )

### 2.6 CTX-CI 引起豚鼠红细胞轻度溶血

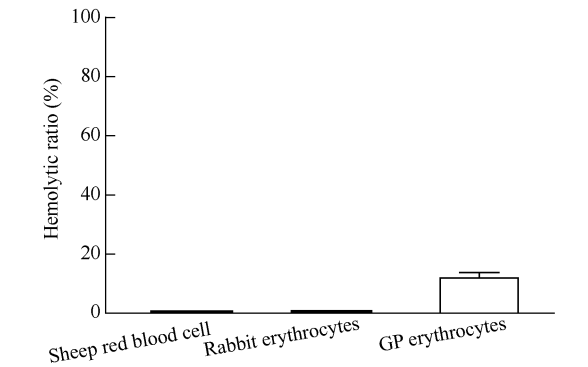
溶血功能实验表明,CTX-CI 对绵羊红细胞和兔红细胞均无溶血作用;但对豚鼠红细胞有轻微的溶血作用(Fig.10)。

### 2.7 CTX-CI 抑制枯草芽孢杆菌和藤黄微球菌生长

KB 平板测定结果表明,CTX-CI 对枯草芽孢杆菌和藤黄微球菌有抑制作用,抑菌圈直径分别为 11.99 mm 和 8.86 mm;但对大肠埃希氏菌、伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均无抑制作用。



**Fig.9 The inhibitory effect of CTX-CI on different cancer cells** After cancer cells were exposed to CTX-CI for a certain time, the cell viability was assayed by the MTT method (K562) or SRB method (A549 and MCF-7) ( $n = 6, \bar{x} \pm SD$ )



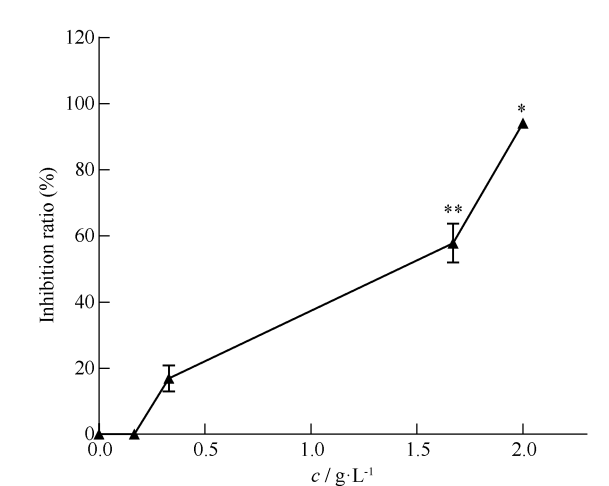
**Fig.10 Effect of CTX-CI on hemolysis of different red blood cells** CTX-CI was incubated with red blood cells for 2 hours at 37℃, and the hemolytic activity was measured ( $n = 6, \bar{x} \pm SD$ )

### 2.8 CTX-CI 抑制补体经典途径 C3 转化酶的形成

CTX-CI 对补体经典途径有明显的抑制作用,而对补体旁路途径未表现出抑制活性。本研究采用补体经典途径 C3 转化酶形成实验对其抑制作用进行检测。CTX-CI 与致敏绵羊红细胞以及人血清混合孵育以形成 C3 转化酶,通过洗涤红细胞并加入含有 EDTA 的大鼠血清以启动经典途径的溶血反应。结果表明,补体经典途径 C3 转化酶的形成被明显抑制,且该抑制作用呈现一定的剂量依赖性(Fig.11)。

### 3 讨论

本研究通过 SP-Sephadex C-25 阳离子交换层析和 RP-HPLC C18 反相层析,从中华眼镜蛇毒中分离纯化获得一个单链、碱性、精确分子质量为 7 kD 的抗补体蛋白质。其理化性质表明,该蛋白质属于眼镜蛇毒细胞毒素家族成员。迄今为止,从不同眼镜蛇毒中发现的细胞毒素大约 60 种,这些细胞毒素均



**Fig.11 Effect of CTX-CI on the formation of C3 convertase of the complement classical pathway** Different concentrations of CTX-CI incubated with human serum and sheep red blood cells for 5 minutes, after sheep red blood cells were washed, rat serum containing 0.04 mol/L EDTA was added to initiation hemolysis. The absorbance was measured at 405 nm. Significant difference was calculated by *t*-test, \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ , compared with lower dosage group( $n = 6, \bar{x} \pm SD$ )

为强碱性的小分子单链多肽,由 15~17 种氨基酸约 60~62 个残基组成,分子质量 6~7 kD<sup>[29]</sup>。已报道的细胞毒素具有溶血、抗肿瘤和抗菌活性。本研究发现,CTX-CI 能有效抑制补体经典途径,对豚鼠血细胞有一定溶血作用,对 K562 细胞、A549 细胞和 MCF-7 细胞均有抑制作用,并能抑制枯草芽孢杆菌和藤黄微球菌。

CTX-CI 对人血清补体经典途径有明显抑制作用,而对补体旁路途径抑制作用不明显,基于该结果本研究对其可能的作用机制进行了研究。采用补体经典途径 C3 转化酶形成实验对其抑制作用进行检测。该实验的原理是样品、致敏绵羊红细胞和人血清混合孵育一定时间以便能在细胞膜上形成 C3 转化酶,然后洗涤红细胞,加入含有 0.04 mol/L EDTA 的大鼠血清补体与其反应,由于含有 EDTA 的血清不能再生成新的 C3 转化酶,只有之前已形成的 C3 转化酶才能激发补体经典途径的溶血反应,且溶血程度与 C3 转化酶的数量呈正相关,因此,通过该功能实验即能证明 CTX-CI 是否影响了 C3 转化酶的形成。

目前,已从国产眼镜蛇毒中获得的抗补体蛋白有 2 种:CVF<sup>[30-31]</sup> 和 Atrase B<sup>[14]</sup>。其中,CVF 是通过过度激活补体旁路途径使得补体被耗竭而产生抗补体作用<sup>[30-31]</sup>,Atrase B 则是通过酶切 B 因子和 C6 达到抑制补体作用<sup>[14]</sup>。本工作中的 CTX-CI 能抑制补

体经典途径。其中,对人血清补体经典途径的抑制作用明显,且呈量效关系,但未表现出时间依赖性,提示该蛋白质是以非酶解的方式作用于补体系统。机制研究表明,CTX-CI 能抑制补体经典途径 C3 转化酶的形成,但其抑制作用是通过作用于参与补体经典途径 C3 转化酶形成的补体成分,还是通过影响细胞膜的结构进而干扰 C3 转化酶在细胞膜上的形成尚待进一步研究。眼镜蛇毒中含有多种细胞毒素分子,筛选结果表明,仅目标蛋白质表现出抗补体活性。因此,对其进行深入研究将有助于进一步认识细胞毒素结构与功能的关系。

综上所述,本研究从国产眼镜蛇毒中分离纯化获得一个新的抗补体蛋白,该蛋白质能明显抑制补体经典途径,其机制与抑制经典途径 C3 转化酶的形成有关。对其结构与功能的进一步研究,将有可能为新型抗补体药物的设计提供有益的参考。

参考文献 (References)

[ 1 ] Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. Complement in disease: a defence system turning offensive[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, **12** (7): 383-401

[ 2 ] Reichhardt MP, Meri S. Intracellular complement activation-An alarm raising mechanism? [J]. Semin Immunol, 2018, **38**(3): 54-62

[ 3 ] Lung T, Risch L, Risch M, *et al.* The utility of complement assays in clinical immunology: A comprehensive review [J]. J Autoimmun, 2018, **95**: 191-200

[ 4 ] Lin CJ, Hu ZG, Yuan GD, *et al.* Complements are involved in alcoholic fatty liver disease, hepatitis and fibrosis [J]. World J Hepatol, 2018, **10**(10):662-669

[ 5 ] 郭静, 李娇, 张霖, 等. 淫羊藿苷对补体旁路激活诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报 (Guo J, Li J, Zhang L, *et al.* Effects of icariin on acute lung injury in mice induced by activation of the complement alternative pathway [J]. Chin Pharmacol Bull), 2018, **34**(7): 988-993

[ 6 ] 李敏, 路青瑜, 李亚男, 等. 补体旁路激活致内皮细胞纤溶凝血功能的改变及干预研究 [J]. 中国药理学通报 (Li M, Lu QY, Li YN, *et al.* Abnormality of coagulation and fibrinolysis functions of endothelial cells induced by activated complement alternative pathway and intervention [J]. Chin Pharmacol Bull), 2017, **33**(10):1430-1435

[ 7 ] Dhillon S, Eculizumab; A Review in Generalized Myasthenia Gravis [J]. Drugs, 2018, **78**(3): 367-376

[ 8 ] Reeks TA, Fry BG, Alewood PF. Privileged frameworks from snake venom [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, **72**(10):1939-1958

[ 9 ] Rima M, AlaviNaini SM, KaramM, *et al.* Vipers of the Middle East: A Rich Source of Bioactive Molecules [J]. Molecules, 2018, **23**(10).pii:E 2721

[ 10 ] Liu CC, Yang H, Zhang LL, *et al.* Biotoxins for cancer therapy [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, **15**(12):4753 - 4758

[ 11 ] 孙黔云. 眼镜蛇毒因子在生命科学中的应用 [J]. 生命科学 (Sun QY. Application of cobra venom factor in life sciences [J]. Chin Bull Life Sci), 2016, **28**(1): 22-26

[ 12 ] Ballow M, Cochrane CG. Two anticomplementary factors in cobra venom: hemolysis of guinea pig erythrocytes by one of them [J]. J Immunol, 1969, **103**(5): 944-952

[ 13 ] Von Zabern I, Przyklenk H, Damerau B, *et al.* Isolation and properties of a complement inhibitor from *Naja haje* venom, distinct from known anticomplementary factors in cobra venom

[J]. Scand J Immunol, 1981, **14**(2):109-120

[ 14 ] Sun QY, Bao J. Purification, cloning and characterization of a metalloproteinase from *Naja atra* venom [J]. Toxicon, 2010, **56** (8): 1459-1469

[ 15 ] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, **227** (5259): 680-685

[ 16 ] Robertson EF, Dannelly HK, Malloy PJ, *et al.* Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system [J]. Anal Biochem, 1987, **167**(2): 290-294

[ 17 ] 汪晗, 孙黔云. 尖吻蝾蛇毒中一种具有抗补体活性金属蛋白酶的分离纯化及部分性质鉴定 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Wang H, Sun QY. Purification and partial characterizaion of a metalloproteinase with anticomplementary activity from *Aglkistrodon acutus* venom [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2010, **26**(11): 1036-1043

[ 18 ] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, **65**(1-2): 55-63

[ 19 ] Tada H, Shiho O, Kuroshima K, *et al.* An improved colorimetric assay for interleukin 2 [J]. J Immunol Methods, 1986, **93**(2): 157-165

[ 20 ] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, **82**(13): 1107-1112

[ 21 ] 朱芳娟, 侯灵莉, 孙黔云, 等. 叶下珠抗补体活性研究 [J]. 中国药理学通报 (Zhu FJ, Hou LL, Sun QY, *et al.* Anticomplementary activity and constituents of *Phyllanthusurinaria* [J]. Chin Pharmacol Bull), 2018, **34**(5): 686-690

[ 22 ] 孙黔云, 叶巧玲, 闫根萍. 小鼠血清补体替代途径溶血活性测定的新方法 [J]. 中国药理学通报 (Sun QY, Ye QL, Yan YP. A new method for measurement of the alternative pathway activity of mouse serum complement [J]. Chin Pharmacol Bull), 2011, **27**(11): 1619-1622

[ 23 ] Hayashid K, Takechi M, Sasaki T, *et al.* Amino acid sequence of cardiotoxin-analogue I from the venom of *Naja naja atra* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1975, **64**(1): 360-366

[ 24 ] Kaneda N, Sasaki T, Hayashi K. Amino acid sequence of cardiotoxin-analogue II from the venom of *Naja naja atra* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1976, **72**(4): 1450-1455

[ 25 ] Kaneda N, Sasaki T, Hayashi K. Amino acid sequence of cardiotoxin-analogue IV from the venom of *Naja naja atra* [J]. FEBS Lett, 1976, **70**(1): 217-222

[ 26 ] Narita K, Lee CY. The amino acid sequence of cardiotoxin from Formosan cobra (*Naja naja atra*) venom [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1970, **41**(2): 339-343

[ 27 ] Chang LS, Lin J, Wu PF. cDNA sequence analysis and expression of cardioxin V and a new cardiotoxin VII from *Naja naja atra* (Taiwan cobra) [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, **1295**(1): 1-3

[ 28 ] Konshina AG, Dubovskii PV, Efremov RG. Structure and dynamics of cardiotoxins [J]. Curr Protein Pept Sci, 2012, **13** (6): 570-584

[ 29 ] 张明芳, 许云禄, 刘广芬. 福建产舟山眼镜蛇毒细胞毒素的快速分离纯化及鉴定 [J]. 福建医科大学学报 (Zhang MF, Xu YL, Liu GF. Purification and identification of cytotoxin isoforms from the venom of *Naja atra* [J]. J Fujian Med Univ), 2004, **38** (1): 1-4

[ 30 ] 孙黔云, 吕秋敏, 王婉瑜, 等. 一个高活性的孟加拉眼镜蛇毒抗补体因子 (英文) [J]. 生物化学与生物物理学报 (Sun QY, Lv QM, Wang WY, *et al.* A highly active anticomplement factor from the venom of *Naja kaouthia* [J]. Acta Biochim Biophys Sin), 2001, **33**(5): 483-488

[ 31 ] 陈川, 舒雨雁, 庄茂辛, 等. 中华眼镜蛇蛇毒因子 (CVF) 对补体系统的作用及与人补体 C3 和其他蛇毒抗原性关系 [J]. 动物学研究 (Chen C, Shu YY, Zhuang MX, *et al.* Action of CVF on the complement-system and the antigenic relationship of CVF with human C3 and other kinds of snake venom [J]. Zool Res), 1991, **12**(4): 367-374