

· 研究综述 ·

抗补体蛋白对油酸型肺损伤的保护作用<sup>①</sup>黄守坚<sup>1,②</sup> 梁仲培<sup>2</sup> 任先达<sup>3</sup> 朱正光<sup>4</sup> 吴楚坤<sup>1</sup> 孙家钧<sup>1</sup>

(1 中山医科大学药理教研室; 广州, 510089 2 广州医学院病理生理教研室

3 暨南大学医学院药理教研室 4 第一军医大学药理教研室)

**提 要** 本研究改进抗补体蛋白(ACP)柱层析分离技术,用 Bio Gel P200 柱纯化,每次眼镜蛇毒上样量 10g, ACP 回收率高达 1.8%。其电泳特性和抗补体效价均和以往报道一致。ACP 4mg ip 能使油酸的 LD50 从 94.4 $\mu$ g/kg 提高至 279 $\mu$ g/kg,能预防油酸引起家兔血氧分压进行性下降和血二氧化碳分压上升,肺渗出液量和蛋白含量减少。用使补体耗竭 95%以上剂量的 ACP 腹腔注射,能预防油酸引起的麻醉狗肺损伤,包括血气,肺循环,肺动态顺应性和肺病理改变改善。ACP 急性毒性低,小白鼠能耐受 1 次静注 10 $\mu$ g/kg 而不死亡,能耗竭 98%补体剂量 ACP 亦仅引起狗可恢复的肺血管阻力轻度上升,肺组织光镜检查仅有非特异性改变。说明 ACP 耗竭补体可能成为有效而安全防治呼吸窘迫综合征的强有力的手段。

**主题词** 补体激活酶类;眼镜蛇毒液类;色谱法/方法;肺/损伤;呼吸窘迫综合征/药物治疗法;动物,实验  
**中图分类号** R967

抗补体蛋白(ACP, anticomplementary protein),又称眼镜蛇毒因子(cobra venom factor)是来源于眼镜蛇科蛇毒的补体激活酶。在镁离子和 D 因子存在时,它和 B 因子复合而具有激活补体作用。ACP 结构为球状酸性糖蛋白,末端为性质稳定的半乳糖残基,能抵抗 I 因子和 H 因子的灭活作用,其自发解聚半衰期为 7h,远较哺乳动物的补体激活酶稳定(自发解聚半衰期只有 1.5min),因此它能使 C3 和 C5 不断激活,最后耗竭而发挥抗补体作用<sup>[1,2]</sup>。

呼吸窘迫综合征(RDS)是多种原因引起的肺功能失调,主要表现为肺顺应性下降,透明膜形成,血氧分压下降,最终导致多器官功能衰竭。由于迄今为止尚无有效的治疗药物,其死亡率高达 60%以上,现已发现补体激活可能是 RDS 发病的起环节,耗竭补体可能在较高部位阻断 RDS 的起点和症状恶化。业已发现,眼镜蛇毒对 RDS 有明显的保护作用,其保护作用是 ACP 引起的<sup>[3-5]</sup>。由于 ACP 在蛇毒中含量极微,已报道的回收率仅 0.3%~0.5%<sup>[5]</sup>。用常规的分手段难以获得足够量 ACP 供大动物实验之用,以往报道的研究仅局限于离体组织和小动

物。本研究目的是寻找一种简便的实验室制备 ACP 方法,并通过定量呼吸功能记录,确认其对 RDS 的疗效和安全性,为临床应用提供依据。

1 ACP 的分离<sup>[6]</sup>

ACP 为分子量 20 000 以上,等电点 6 左右的酸性糖蛋白。异于分子量 10 000 以下属于碱性多肽类的神经毒素和心脏毒素。已报道的主要分离方法有离子交换柱层析,分子筛柱层析和高效液相层析。但 ACP 在蛇毒中含量微,上述分离法上样量少,或分离剂昂贵,难以获得足够量供药理研究之用。

本研究改进分离程序,首先用 sephadex G75 分子筛柱(2.5cm $\times$ 140cm)初分,收集大分子组分。此柱上样量 10g,并可再生使用,迅速把 ACP 和神经毒素与心脏毒素分开。上述大分子组分再用 DEAE cellulose DE<sub>52</sub>柱(2.5cm $\times$ 32cm)纯化。用 pH 7.5, 0.01mol/L 磷酸缓冲液内含线性梯度 0.1~0.6mol/L NaCl 洗脱,把等电点高的多肽分开。最后,用对糖蛋白有高分离效率的 Bio-gel P200 柱(2.5cm $\times$ 45cm)纯化,获得 ACP(图 1)。上述分离程

① 国家自然科学基金资助课题;

② 第一作者,1944 年生,男,硕士,副教授

序可在短期内获得较多的 ACP,从 50g 粗毒可或获得 960mg ACP。较大的上样量可提高回收率,分子

筛柱可反复使用,故也是节省的分离手段。

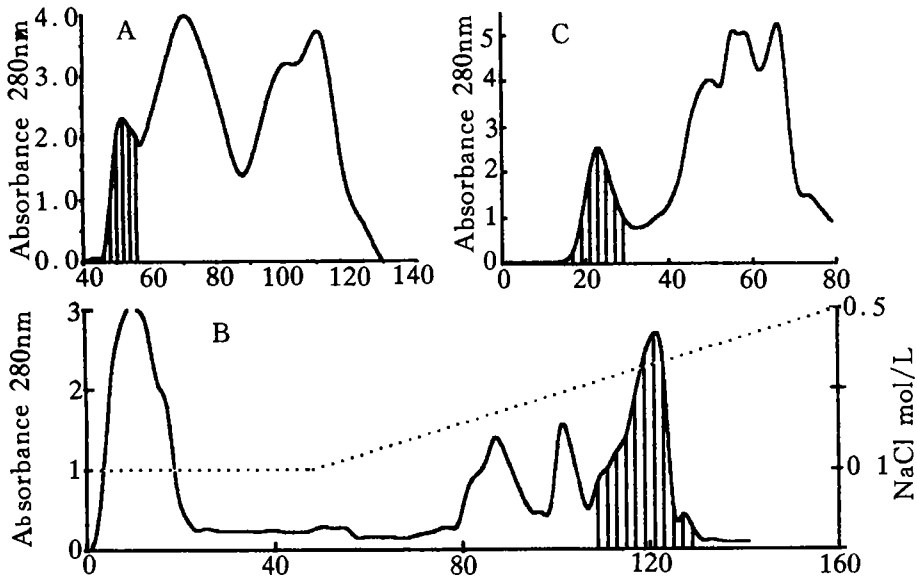


图1 抗补体蛋白层析图谱

眼镜蛇毒上样量 10g。A: 在 Sephadex G75 柱 (2.5cm×140cm)。B: 在 DEAE cellulose DE 52 柱, 用 NaCl 洗脱。C: 在 Bio gel P200 柱。横坐标: 管数, 每管容积 5ml, 纵坐标: 在 280 光吸收。阴影示有抗补体活性组分

上述纯化的 ACP 经 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 1% 琼脂糖免疫电泳呈单一区带。经 SDS-凝胶电泳呈现 3 条区带, 分子量分别约 98 500, 94 000 和 16 800。用绵羊红细胞作补体效价测定, 其 1 个抗补体活性单位为 1.28 $\mu$ g。这些结果和舒雨雁 (1991), G. J. Beradekman (1987) 的报道类似。

## 2 对油酸型肺损伤的保护作用<sup>[7,8]</sup>

最常用的 RDS 病理模型是用油酸引起的, 因其重现性良好, 表现和 RDS 临床表现相似。本研究用 0.06ml/kg 油酸静脉注射 (iv, 下同) 制备的 RDS 模型可见典型的呼吸障碍, 包括呼吸费力, 肺顺应性下降, 肺分流率加大, 血氧分压持续下降。光学显微镜下可见肺血管有透明血栓, 间质水肿, 中性粒细胞浸润, 肺实变和肺透明膜形成等典型的 RDS 表现, 均与文献报道一致。用 ACP 耗竭补体对小白鼠, 家兔和狗等 RDS 模型的保护作用分述如下。

### 2.1 明显提高油酸的致死量<sup>[2]</sup>

油酸 iv, 对小白鼠的 LD<sub>50</sub> 为 94.4 $\mu$ g (95% 可信

限 69.3~129 $\mu$ g/kg)。但 ACP 4 $\mu$ g 腹腔注射 (ip, 下同) 后 20h, 油酸的 LD<sub>50</sub> 升高至 279 $\mu$ g/kg (95% 可信限 206~378 $\mu$ g/kg)。而且油酸引起的病理改变, 包括肺透明血栓、肺间质水肿、中性粒细胞浸润, 肺实变和肺透明膜形成等均明显减少。

### 2.2 动脉血气改善<sup>[7]</sup>

油酸 iv, 使家兔引起 RDS, PaO<sub>2</sub> 在 1, 2h 和 3h 从注射前 10.7 $\pm$ 0.9kPa 分别下降至 8.6 $\pm$ 1.1, 7.1 $\pm$ 1.6 和 4.3 $\pm$ 3.1kPa ( $\bar{x}\pm s$ , n=6, P<0.05)。而用 ACP 0.25mg/kg ip. 24h 以后, 同等剂量的油酸引起的 PaO<sub>2</sub> 的改变, 从注射前 10.2 $\pm$ 0.9kPa 分别仅下降至 8.1 $\pm$ 1.3, 7.9 $\pm$ 1.7 和 7.8 $\pm$ 1.5kPa ( $\bar{x}\pm s$ , n=6, P>0.05)。说明耗竭补体能防止 PaO<sub>2</sub> 的进一步下降。同步记录的 PaCO<sub>2</sub> 在油酸对照组 iv 后 2h 内改变不明显, 但 3h 后从注射以前 3.78 $\pm$ 0.30kPa 升高到 6.3 $\pm$ 2.0kPa ( $\bar{x}\pm s$ , n=6, P<0.05), 而用 ACP 0.25mg/kg ip, 24h 后, 同等剂量的油酸引起的 PaCO<sub>2</sub> 的改变, 从注射前 3.78 $\pm$ 0.30kPa 仅改变至 3.2 $\pm$ 1.0kPa ( $\bar{x}\pm s$ , n=6, P<0.05), 说明耗竭补体也能防止 PaCO<sub>2</sub> 的进一步上升。

2.3 肺蛋白渗出减少<sup>[7]</sup>

油酸 iv 3h 后,家兔肺蛋白渗出量  $555 \pm 24\text{mg}$ , 而用 ACP 0.25 mg/kg ip, 24h 后再静注油酸,肺蛋白渗出量为  $241 \pm 97\text{mg}$  ( $\bar{x} \pm s, n=6, P<0.01$ )。两组间有非常显著差异。

2.4 呼吸功能改善<sup>[7,8]</sup>

油酸 0.06ml/kg iv 引起 RDS, 利用呼吸流量计和 Swan-Gamz 漂浮导管连续监测麻醉狗的潮气量,胸内压,肺动脉血压和肺血流量;用质谱仪连续监测  $\text{PaO}_2$  和  $\text{PaCO}_2$  的动态改变。结果表明:油酸能引起明显 RDS 表现,包括  $\text{PaO}_2$  下降,从基础值  $12.3 \pm 0.4\text{kPa}$  下降至  $8.7 \pm 1.8\text{kPa}$ ;  $\text{P(A-a)}_2\text{O}_2$  上升,从基础值  $1.0 \pm 0.3\text{kPa}$  上升至  $5.3 \pm 1.1\text{kPa}$ , 肺分流率加大,从基础值  $5 \pm 1\%$  上升至  $26 \pm 14\%$ ;肺动态顺应性下降,从基础值  $0.061 \pm 0.016 \text{L/kPa}$  下降至  $0.039 \pm 0.015\text{L/kPa}$ ;气道阻力上升,从基础值  $1.99 \pm 0.77\text{kPa}\cdot\text{s/L}$  上升至  $3.02 \pm 0.95\text{kPa}\cdot\text{s/L}$ 。然而, ACP ip, 50U 以后 20h 以后重复以上实验,上述由油酸引起的呼吸功能障碍明显减轻(图 2)。

2.5 病理形态改善<sup>[8]</sup>

在上述油酸引起狗的 RDS 模型,两组动物均在注射油酸 2h 后杀死。取出肺标本,HE 染色,用光学显微镜检查,结果发现,油酸能引起肺间质水肿,肺水肿,肺泡出血,肺透明膜形成,肺炎改变,肺动脉血栓形成,肺梗塞,肺气肿和白细胞浸润。用 ACP 耗

竭补体后,上述病理改变得到不同程度的改善(附表)。

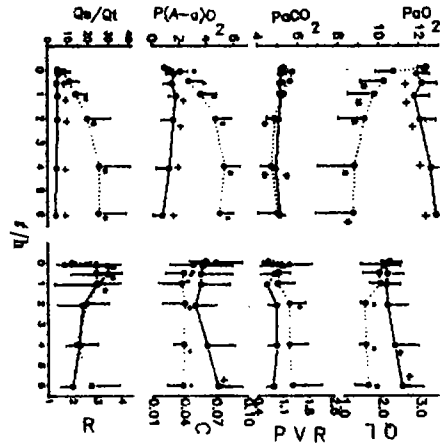


图 2 抗补体蛋白对狗油酸型肺损伤的保护作用

静注油酸 0.06ml/kg 后测定值的均数和标准差(·): 对照组。(·)实验组,在给油酸前 20 小时腹腔注射 50 单位抗补体因子。 $\text{PaO}_2$ :动脉血氧分压,单位 kPa;  $\text{PaCO}_2$ :动脉血二氧化碳分压,单位 kPa;  $\text{P(A-a)}_2\text{O}_2$ :肺泡气和动脉血氧分压差,单位 kPa;  $\text{Qs/Qt}$ :分流率,单位%;  $\text{QL}$ :肺血流量单位 L/min;  $\text{PVR}$ :肺血管阻力,单位  $\text{kPa}/(\text{L} \cdot \text{min})$ ;  $\text{C}$ :肺动态顺应性,单位  $\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ ;  $\text{R}$ :气道阻力,单位  $\text{cmH}_2\text{O}$ 。\* 和给油酸前比较  $P<0.05$ , + 和对照组比较  $P<0.05, n=5$

附表 肺组织光学显微镜检查发现

	对照组			ACP 组		
	+	++	+++	+	++	+++
间质水肿	4	1	0	4	0	1
肺泡水肿	3	1	1	4	1	0
肺泡出血 <sup>1)</sup>	3	1	1	1	0	0
透明膜形成 <sup>1)</sup>	3	2	0	2	0	0
肺炎	1	3	1	2	1	2
局灶性坏死	1	0	0	0	0	0
肺动脉血栓 <sup>1)</sup>	1	4	0	4	1	0
肺梗死	0	0	0	0	0	0
肺不张	1	2	0	1	2	0
肺气肿	4	0	0	5	0	0
白细胞浸润	0	3	2	0	4	1

1) 两组比较 Ridit 分析  $P<0.05, n=5$

### 3 安全性试验<sup>[2]</sup>

#### 3.1 急性毒性试验

ACP 急性毒性低微,用 10mg/kg(相当于 1408 抗补体单位/kg) iv, 20 只小白鼠无一死亡。饲养一周均存活。体重从实验前  $19.9 \pm 1.1\text{g}$  增加至  $21.3 \pm 0.9\text{g}$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=20$ )。在观察期间,动物清醒,活动,进食,行为和大便均无异常发现。

#### 3.2 对麻醉狗肺功能无明显毒性

用上述方法同步记录血气,呼吸动力学和肺循环的指标。观察给 ACP 0.4mg/kg ip. 350min 内的改变(相当于 56.3 抗补体单位/kg)主要结果包括:  
 ① 静脉血溶血补体呈指数下降。 $y = 73.84e^{-0.0108t}$  ( $y$ : 溶血补体活性,  $e$ : 自然对数底,  $t$ : 时间),  $t_{1/2}$  为 63.8min。320min 时,血溶血补体活性仅为给药前的 2.28% ( $n=7$ )。② 外周血白细胞计数上升,最大值为给药前的 2 倍。③ 血气测定结果  $\text{PaO}_2$  和  $\text{PaCO}_2$  均在正常范围。④ 肺换气功能无明显改变,表现在  $\dot{V}_{(A-Q)}\text{O}_2$  和  $Q_s/Q_t$  值均保持恒定。潮气量,呼吸流速,胸内压和肺顺应性均无明显改变。尽管呼吸频率,每分钟通气量和呼吸道阻力缓慢轻度的上升。说明 ACP 激活补体至耗竭过程对呼吸动力学干扰不大。⑤ 对肺循环有一过性影响,表现为肺动脉压上升,从基础值  $1.94 \pm 0.28\text{kPa}$  B 上升到最大值  $2.5 \pm 0.5\text{kPa}$ ,肺血流量减少,从基础值  $2.07 \pm 0.52\text{L}/\text{min}$  降低至  $1.52 \pm 0.52\text{L}/\text{min}$ ,肺血管阻力上升,从基础值  $0.70 \pm 0.09\text{kPa min}/\text{L}$  上升至  $1.42 \pm 0.64\text{kPa}$ 。以上作用在 1min 左右到达峰值,在 320min 可恢复。⑥ 肺组织病理改变不严重,实验后把狗杀死,取出肺中叶组织,固定,HE 染色,光学显微镜检查仅发现轻度肺小血管和毛细血管扩张,淤血,肺间隔加宽,大量中性粒细胞浸润,个别肺泡有浆液渗出,支气管形态正常。

以上结果提示,用耗竭补体剂量 ACP iv, 尽管可见外周血白细胞计数上升,肺有大量中性粒细胞浸润,肺循环阻力上升,肺血流量下降等改变,但不足以改变肺的换气功能,血气张力保持稳定。提示 ACP 对麻醉狗的安全性。

### 4 结 语

以 Bio-gel P200 柱层析为纯化手段的改良分离 ACP 方法能经济地获得大量的 ACP,为 ACP 深入研究提供物质基础。

来源于眼镜蛇毒的 ACP 通过耗竭补体,能预防油酸引起的肺损伤,因其急性毒性低,而可能成为有效的抗补体药物和有效的预防呼吸窘迫综合征的手段。

### 参 考 文 献

- 1 任先达. 眼镜蛇毒因子. 暨南大学学报, 1993; 14(4): 132
- 2 朱正光, 黄守坚. 中华眼镜蛇毒因子对麻醉狗呼吸功能的影响. 中国高级生理杂志, 1994, 10(6): 654
- 3 萧正伦, 梁仲培, 黄守坚. 眼镜蛇毒对油酸型呼吸窘迫综合征的作用. 中华结核和呼吸杂志, 1992, 15(6): 373
- 4 梁仲培, 萧正伦, 黄守坚. 眼镜蛇毒对油酸型呼吸窘迫综合征的保护作用. 广州医学院学报, 1991, 19(3): 26
- 5 梁仲培, 麦景璇, 黄守坚, 等. 中华眼镜蛇毒四个分离组分对呼吸窘迫综合征影响的实验研究. 广州医学院学报, 1992, 20(3): 18
- 6 Ren XD, Huang SJ, Wu CK, Sun JJ. An economical method for fractionation and purification of cobra venom factor from the venom of *Naja naja atra*. Chin J Pharmacol Toxicol, 1994, 8(4): 71
- 7 梁仲培, 黄守坚, 麦景璇, 等. 中华眼镜蛇毒四个分离组分对呼吸窘迫综合征影响的实验研究. 中国病理生理杂志, 1994, 10(6): 654
- 8 Ren XD, Huang SJ, Sun JJ, et al. Protective effect of cobra venom factor on pulmonary injury induced by oleic acid. Int J Immunopharmac, 1994, 16(11): 969

(1995-04-25 收稿 1995-08-13 修回)

## THE PROTECTIVE EFFECT OF ANTICOMPLEMENTARY PROTEIN ON OLEIC ACID-INDUCED LUNG INJURY

Huang Shoujian<sup>1</sup> Liang Zhongpei<sup>2</sup> Ren Xianda<sup>3</sup> Zhu Zhengguang<sup>4</sup> Wu Chukun<sup>1</sup> Sun Jiajun<sup>1</sup>

(1 Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089;

2 Department of Pathophysiology, Guangzhou Medical College;

3 Department of Pharmacology, Medical College of Ji Nan University;

4 Department of Pharmacology, The 1st Military Medical University)

The anticomplementary protein (ACP) was separated and purified from the venom of *Naja naja atra* by improved chromatography on sephadex G75, DEAE cellulose DE52, and Bio gel P200 columns. The final yield reached 1.8% at each loading amount of 10g crude venom. Its electrophoresis features and anticomplement activity were determined to be close to those reported previously. The protective effects of ACP on oleic acid-induced lung injury manifested in: 1. Increase in LD50 of oleic acid in mice previously given ACP ip to 279 (95% confidence limits 206~378)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , as compared with 94.4 (95% confidence limits 69.5~129)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in control mice. 2. Prevention of hypoxemia and hypercapnea induced by oleic acid in rabbits. 3. Decrease in amount of and protein content in pulmonary exudate. 4. Improvement of respiratory distress symptoms including changes in blood gas tensions, increase in venoarterial shunt and depression in dynamic compliance in dogs. 5. Attenuation in pathological findings including hyaline membrane formation, alveolar hemorrhage and pulmonary arteriolar thrombosis. The acute toxicity of ACP was very low. Mice tolerated 10 mg/kg ACP for iv injection, ACP at dosage depleting 98% complements only induced slight change in pulmonary vascular resistance in dogs. The above results suggested that depleting complements by ACP might be an effective and safe measure for prevention and to treatment of respiratory distress syndrome.

**Subject headings** complement activating enzymes; cobra venoms; chromatography/methods; lung/injuries; respiratory distress syndrome/drug therapy; animal, laboratory