

云南孟加拉种眼镜蛇蛇毒因子在灵长类动物内 应用的免疫原性研究

向莹¹, 陈松¹, 李俊华¹, 钟山¹, 王婉瑜^{2,*}, 熊郁良², 陈实¹, 陈刚^{1,*}

(1. 华中科技大学 同济医学院附属同济医院器官移植研究所, 湖北 武汉 430032;

2. 中国科学院昆明动物研究所 动物毒素实验室, 云南 昆明 650223)

摘要: 眼镜蛇蛇毒因子 (CVF) 能特异性清除机体循环中的补体C3, 从而可能在防治补体介导的损伤或疾病中发挥重要的治疗作用。云南孟加拉种眼镜蛇蛇毒因子 (Y-CVF) 较文献报道的其他各种CVF具有更高的活性和较少的用量。为探讨Y-CVF静脉使用是否诱导灵长类动物体内产生特异性中和抗体和异种天然抗体, 给2只正常食蟹猴每两周静脉注射一次治疗剂量 (0.05 mg/kg) 的Y-CVF, 共4次, 检测注射前后不同时间点血清内补体C3水平、总补体活性 (CH50)、抗Y-CVF抗体和抗猪内皮细胞异种抗体的变化。结果显示, 前2次注射Y-CVF后均有良好的清除补体效果, 第3次注射Y-CVF后补体仅被部分灭活, 第4次注射Y-CVF后则基本无效。免疫印迹和酶联免疫吸附试验均证实特异性抗Y-CVF抗体产生, 且其滴度随着Y-CVF注射次数增加而递增。多次注射Y-CVF后, 并没有在血清内检测到明显的抗猪内皮细胞抗体的变化。因此, 多次静脉注射Y-CVF能诱导灵长类动物产生特异性抗体, 从而导致Y-CVF失效, 但未发现抗 α -Gal异种天然抗体明显增加。

关键词: 食蟹猴; 眼镜蛇蛇毒因子; 免疫原性

中图分类号: Q959.848 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)05-0511-07

Immunogenicity of Yunnan-cobra Venom Factor in Non-human Primates

XIANG Ying¹, CHEN Song¹, LI Jun-hua¹, ZHONG Shan¹, WANG Wan-yu^{2,*},
XIONG Yu-liang², CHEN Shi¹, CHEN Gang^{1,*}

(1. Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

2. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: Cobra venom factor (CVF) depletes complement C3 and may therefore be important in preventing the complement-mediated damage and disease. In comparison with various CVF reported previously, Yunnan-cobra venom factor (Y-CVF) has higher anticomplement activity. The goal for this research is to investigate whether Y-CVF could induce the specific neutralized anti-Y-CVF antibody and xenoantibodies in non-human primates. Thus two cynomolgus monkeys were intravenously injected with Y-CVF (0.05 mg/kg) every two weeks for totally four times. The serum C3, CH50, anti-Y-CVF antibody and xenoantibody levels were measured at different time points before and after Y-CVF injection. The results revealed that, complement C3 was effectively depleted during the first two injections, and incompletely depleted during the third injection, but almost not depleted during the last injection. The results of Western blot and ELISA confirmed the production of anti-Y-CVF antibody, and its titer increased with the injection. Additionally no significant changes of anti-porcine endothelial cell xenoantibodies were found measured by flow cytometry. We concluded that multiple injection of Y-CVF stimulated anti-Y-CVF antibody production in monkeys, which resulted in the invalid of Y-CVF. The induction of anti- α -Gal xenoantibody by Y-CVF in primates was not observed.

Key words: Monkey; Cobra venom factor; Immunogenicity

收稿日期: 2008-07-01; 接受日期: 2008-07-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500470)

*通讯作者 (Corresponding authors), 陈刚, Tel: 027-83662655, Email: gchen@tjh.tjmu.edu.cn; 王婉瑜, Tel: 0871-5192476, Email: wangwy@mail.kiz.ac.cn

眼镜蛇蛇毒中的抗补体因子(anticomplement factor)又称为眼镜蛇蛇毒因子(cobra venom factor, CVF),具有特异性清除补体 C3 的生物活性,从而能有效抑制补体依赖的体液性免疫损伤,有可能在器官移植,尤其是异种移植的体液性排斥防治方面发挥重要的作用。但是 CVF 毕竟是来源于蛇类的异种蛋白,与人类存在巨大的种属差异性,多次体内注射 CVF 可能会诱导产生特异性抗 CVF 抗体和种属差异性异种抗体(例如抗 α -Gal 抗体),从而导致继续注射 CVF 无效和增强异种移植的排斥反应(Taniguchi et al, 1996)。研究 CVF 的免疫原性对 CVF 的未来临床应用意义重大。

Y-CVF (Yunnan-cobra venom factor)是从我国云南南部产的孟加拉种眼镜蛇蛇毒中分离出的一个高活性的抗补体因子(Chen et al, 2004)。经过 MALDI-TOF-MS (Bruker, Reflex III)测定, Y-CVF 的确切分子量为 147 234.22 Da (未发表资料)。与其他来源的 CVF 相比, Y-CVF 的抗补体活性要高 5—20 倍,用药剂量要低 5—10 倍(Sun et al, 2001; Sun et al, 2003),已在大鼠、猴及狒狒的移植实验中显示了良好的抑制补体活性的作用,但其在机体内的免疫原性强弱尚不清楚。本实验在接近于人类的灵长类动物体内多次注射足量的 Y-CVF,以观察抗 Y-CVF 抗体和种属差异性异种抗体的产生情况及 Y-CVF 的药效变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及样本采集

正常健康食蟹猴 2 只,编号为 06cy01 和 07cy10,分别来自中国科学院昆明动物研究所实验动物中心和广州蓝岛生物技术有限公司华南灵长类研究开发中心,体重为 5.0kg 和 4.5kg,均为雄性。

血清标本采集:用促凝管采血 3mL,室温静置 30min 后在 4℃冰箱内静置 1h,然后 3800r/min 离心 10min (德国 Eppendorf 离心机,型号:5810),获得血清,分装后置 -80℃冰箱冻存。

1.2 Y-CVF 的来源及使用方案

Y-CVF 冻干粉剂由中国科学院昆明动物研究所动物毒素实验室研制,用去离子水配制成了 0.3 mg/mL 浓度后,0.22 μ m 无菌过滤分装, -20℃冰箱冻存。

Y-CVF 的单次使用剂量为 0.05 mg/kg,分别在用药开始的第 0、14、28 和 42 天静脉注射,共 4

次。留取第 0 (注射前)、1、2、3、7、14、15、16、21、28、29、35、42、43 和 44 天血清, -80℃冰箱冻存备用。

1.3 血清补体 C3 水平的测定

各个时间点的血清内补体 C3 水平的检测由华中科技大学同济医学院检验科完成,采用免疫散射比浊法,所用仪器为德国 Dade Behring BN II 全自动血浆蛋白分析系统。

1.4 血清总补体活性(CH50)的测定

所用试剂和仪器:绵羊红细胞溶血素(浙江省玉环县南方试剂厂,使用效价 1:4000);2%绵羊红细胞悬液(湖北省疾病控制中心);pH7.4 巴比妥缓冲液(Evans et al, 1981);全自动酶标仪(BioTek Synergy 2)。

用改良试管法(Mayer et al, 1961)检测血清总补体活性(CH50):①致敏绵羊红细胞:将溶血素用 pH7.4 巴比妥缓冲液稀释至 2U。取 2%绵羊红细胞悬液与等体积 2U 溶血素混合,于 37℃水浴 30 min,并不时振摇。②制备标准管:2%绵羊红细胞 2mL 加蒸馏水 8mL 混合即为全溶血管,取 2mL 全溶血管液体加 pH7.4 巴比妥缓冲液 2mL,即为 50%溶血标准管。③加样:取待测血清 0.2mL,加入 pH7.4 巴比妥缓冲液 3.8mL,配制成稀释度为 1:20 的稀释血清。在 1—10 管中按表 1 添加成份,混匀后 37℃水浴 30min,并不时摇晃使细胞保持悬浮状,然后 2500 r/min 离心 5min。④比色:用全自动酶标仪测量 1—10 管液体及 50%溶血管在 542nm 波长的吸光度(OD_{542}),吸光度最接近 50%溶血管吸光度的一管即为溶血终点管。⑤计算总补体溶血活性:总补体溶血活性(U/mL)=溶血终点管血清体积(mL)×血清稀释倍数(1/20)。

1.5 免疫印迹法(Western blot)检测血清内抗 Y-CVF 抗体

用 Y-CVF 作为靶蛋白,每泳道上样量为 20 μ L (含 Y-CVF 6 μ g),分离胶浓度为 12%,在含十二烷基硫酸钠(SDS)的还原条件下电泳。不同时间点的血清为一抗(1:2000 稀释),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (PIERCE 分装,1:5000 稀释)。其他步骤为常规 Western Blot 步骤。

1.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清内抗 Y-CVF 抗体滴度

96 孔 ELISA 酶标板按每孔 1 μ g Y-CVF 抗原量进行包被(4℃过夜)。一抗为 1:100—1:204800 共

12 个倍比稀释梯度的血清（37℃孵育 60 min）。二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG（PIERCE分装，1：8000 稀释，37℃孵育 30 min）。显色底物为四甲基联苯胺（TMB）（武汉凌飞科技，37℃显色 10min）。显色后，2mol/L H₂SO₄终止液终止显色，

读取 450 nm波长的吸光值（OD₄₅₀）。在同一个稀释比下，OD值越高，血清内抗Y-CVF的滴度越高；在相同的OD值下，稀释比越大，血清内抗Y-CVF的滴度越高。

表 1 CH50 测定
Tab.1 CH50 Assay

成分 Constituents (mL)	试管号 Tube No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1：20 血清 Serum	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0
巴比妥缓冲液 Barbitone buffer	1.4	1.35	1.3	1.25	1.2	1.15	1.1	1.05	1.0	1.5
致敏红细胞 Sensitized red cell	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1.7 流式细胞仪检测血清内种属差异性异种抗体
为了研究 Y-CVF 能否诱导产生种属差异性异种抗体（主要是抗 α-Gal 抗体），本实验采用猪血管内皮细胞作为靶细胞（SV40-猪血管内皮细胞系，瑞典 Karolinska 学院 J. Holgersson 教授馈赠），不同时间点的血清（1：20 稀释）作为一抗，PE 标记的羊抗人 IgG（美国 Jackson 公司）作为二抗，检测猪内皮细胞表面结合抗体后的几何平均荧光强度（geometric mean florescence intensity, G-Mean）来显示抗猪内皮抗体的产生及滴度（Chen et al, 2005），以单纯二抗作用的猪内皮细胞作为阴性对照。

后仅回升到注射前基础水平的 2/3 左右；第 2 次注射 Y-CVF（第 1 次注射后 14 天）后 24h 内补体 C3 仍然可以降到很低水平（<0.15 g/L 左右），但是回升速度明显较第 1 次注射后快；第 3 次注射 Y-CVF 后（第 1 次注射后 28 天），C3 水平仅有较小幅度降低；第 4 次注射 Y-CVF（第 1 次注射后 42 天）后，C3 水平变化不大（图 1）。

两只猴不同时间点血清的总补体活性（CH50）和补体 C3 水平的变化规律基本相似。第 1 次和第 2 次注射 Y-CVF，均可以使血清总补体活性降到 0U，但第 3 次及第 4 次注射 Y-CVF 后血清总补体活性则仅见轻微变化（图 2）。

2 结 果

2.1 血清内 C3 水平和 CH50 变化

两只猴血清内的补体 C3 水平均在第一次注射 Y-CVF 后 24h 内降到最低水平（<0.05 g/L），14 天

2.2 血清内抗 Y-CVF 抗体的变化

Western Blot 结果显示：猴 07cy10 在第 3 次注射 Y-CVF 时（第 28 天）可检测出明显的抗 Y-CVF 抗体条带，第 4 次注射 Y-CVF 时（第 42 天），血清内抗 Y-CVF 的抗体进一步增高；猴 06cy01 则在第

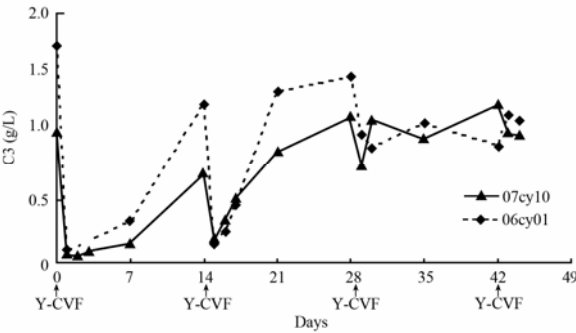


图 1 注射 Y-CVF 前后食蟹猴的血清 C3 水平变化
Fig. 1 The changes in the serum C3 level in cynomolgus monkeys after Y-CVF injection

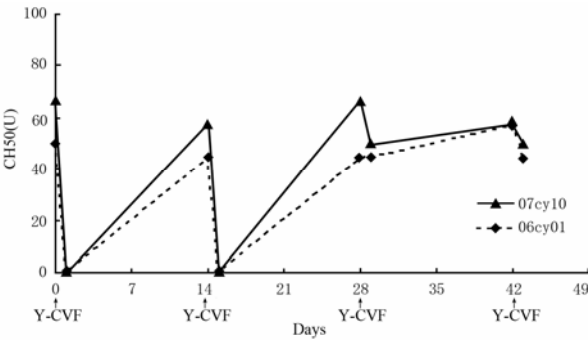


图 2 注射 Y-CVF 前后食蟹猴的血清总补体活性（CH50）变化
Fig. 2 The changes in total serum complement activity (CH50 Assay) in cynomolgus monkeys after Y-CVF injection

2 次注射 Y-CVF 时（第 14 天）即可检测出较弱的抗 Y-CVF 抗体条带，第 3 次和第 4 次注射 Y-CVF 时，血清内抗 Y-CVF 的抗体逐渐增多（图 3）。

ELISA 结果显示：猴 07cy10 在第 2 次注射 Y-CVF 时，血清内即可检测出较低滴度的抗 Y-CVF 抗体；第 3 次和第 4 次注射 Y-CVF 时，抗体滴度已上升到很高水平；在相同的 OD 值下，第 3 次和第 4 次注射时的血清稀释比是第 2 次注射时血清稀释比的 32 倍。猴 06cy01 在未注射 Y-CVF 时即可检测出预存的低滴度抗 Y-CVF 抗体；在后续的 3 次注射时，血清内抗 Y-CVF 抗体的滴度逐步升高；在相同的 OD 值下，第 2 次、第 3 次、第 4 次注射时的血

清稀释比分别是第一次注射时血清稀释比的 6、32、64 倍（图 4）。

2.3 血清内抗猪内皮细胞异种抗体的变化

流式检测结果显示：猴 06cy01 血清内抗猪内皮细胞 IgG 滴度在第 14 天及 28 天较第 1 次注射前的基础值无上升，反而小幅度的下降，在第 42 天也并未见明显升高，仅恢复到接近基础值水平。猴 07cy10 血清内抗猪内皮细胞 IgG 滴度水平仅在第 14 天有小幅上升，第 28 及 42 天与注射 Y-CVF 前的基础值水平相当，未见明显升高。两例猴体内的抗猪内皮细胞 IgM 抗体均无明显变化（图 5）。

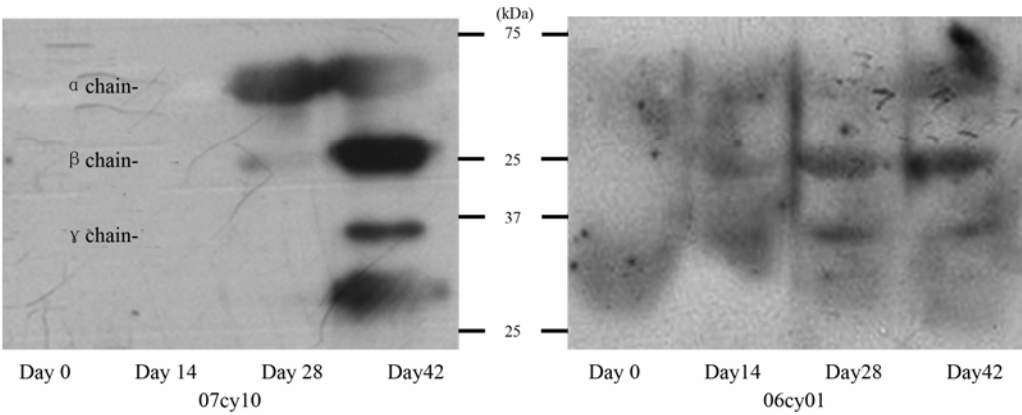


图 3 Western blot 显示注射 Y-CVF 后食蟹猴血清内抗 Y-CVF 抗体的变化
Fig. 3 Western Blot displayed the presence of anti-Y-CVF antibodies in cynomolgus monkey's sera after Y-CVF injection

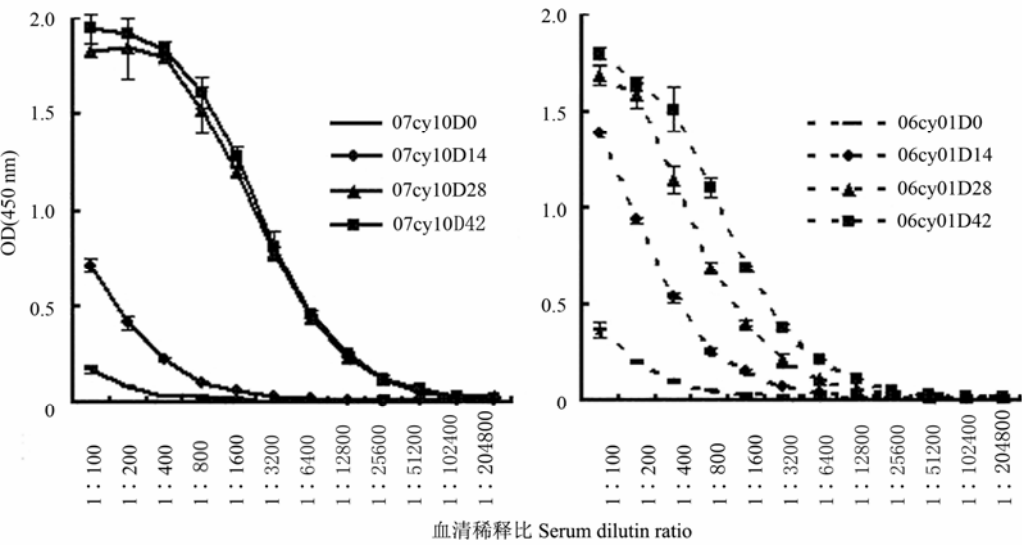


图 4 ELISA 显示注射 Y-CVF 后食蟹猴血清内抗 Y-CVF 抗体的变化
Fig. 4 ELISA displayed the changes of anti-Y-CVF antibodies in cynomolgus monkey's sera after Y-CVF injection

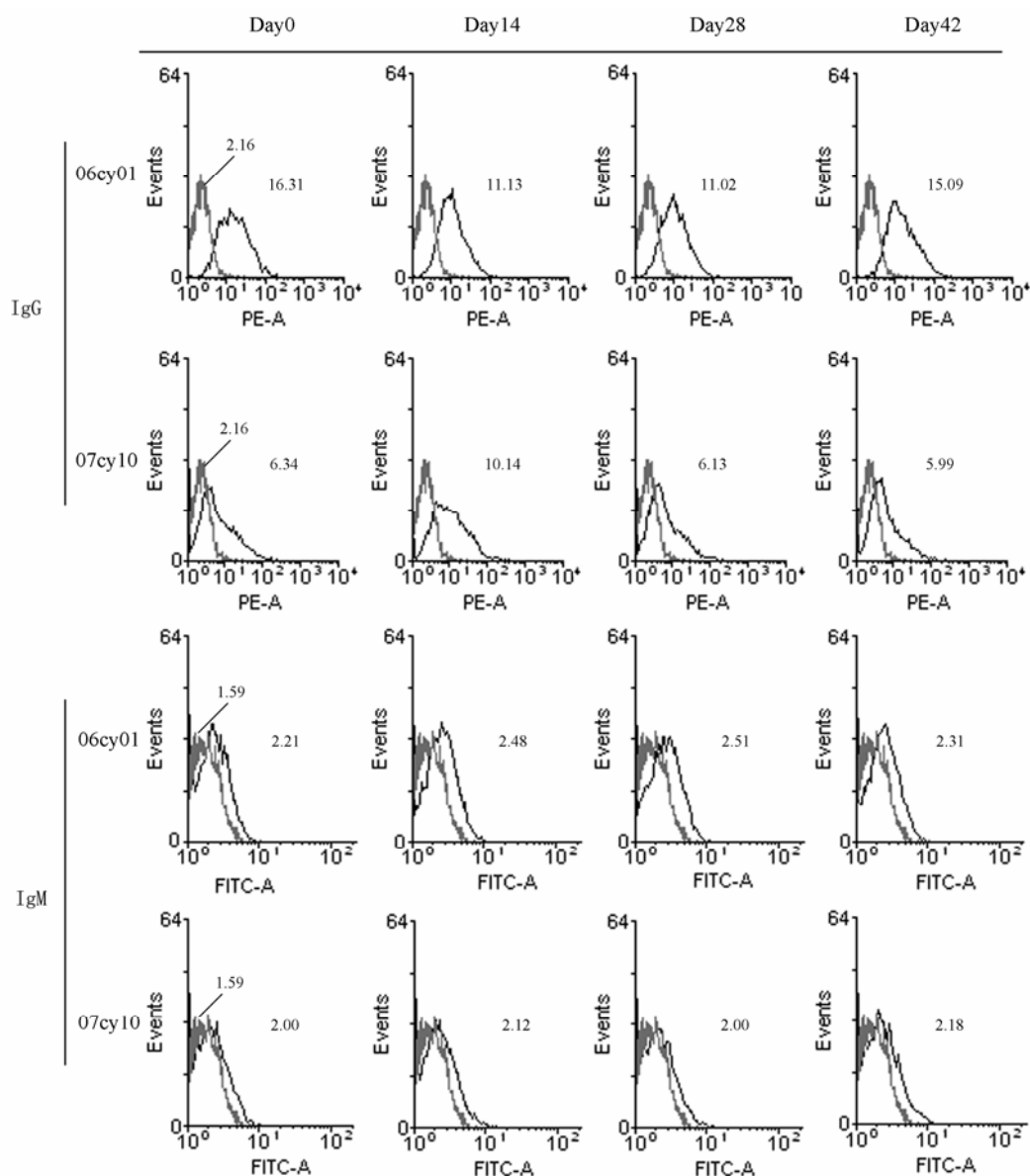


图 5 流式细胞技术检测不同时间点食蟹猴血清内抗猪内皮细胞 IgG 及 IgM (以几何平均荧光度表示, 单纯二抗作用的猪内皮细胞作为阴性对照)

Fig. 5 Anti-porcine endothelial cell IgG and IgM in cynomolgus monkey's sera of different time points measured by flow cytometry (data shown as geometric mean fluorescence, porcine endothelial cells only reacted with secondary antibody served as negative control)

3 讨论

CVF是从眼镜蛇的蛇毒中分离纯化出的一种酸性糖蛋白,能与血清中的B因子结合,被D因子酶解后形成CVFBb,具有稳定的C3 转化酶活性,可激活补体替代途径,不断消耗补体成分,直至耗竭,从而抑制补体的活性。所报道的CVF分子量主要因眼镜蛇蛇毒来源的不同而有所差异。因CVF对补体有特异性的耗竭作用,使其在器官移植的超急性排斥及急性体液性排斥的防治方面可能极具研究

价值和药用价值。但由于CVF是来源于蛇类的异种蛋白,可能具有免疫原性,已有研究表明其所用的CVF单独应用会诱导狒狒产生抗CVF中和抗体,从而导致CVF失效(Taniguchi et al, 1996; Vogel et al, 2007)。

3.1 Y-CVF 是一种具有更高抑制补体活性的蛇毒因子

本实验所采用的 Y-CVF 来源于我国云南孟加拉种眼镜蛇蛇毒,并经过进一步的提纯处理,其抗补体活力显著高于文献报道的其他来源 CVF,且所

需用药剂量也明显减少。在体外实验中, Y-CVF 的抗补体活性为 1515 U/mg (Sun et al, 2001), 近期实验显示其体外抗补体活性更高, 甚至高达 2 000—3 000 U/mg (未发表资料), 比不同文献报道的各种来源的 CVF 抗补体活性均高, 如来源于印度眼镜蛇 (*Naja naja*) 的 CVF 抗补体活性为 200—250 U/mg (Ballow et al, 1969)、500—1 000 U/mg (Pepys et al, 1979), 来源于中华眼镜蛇(现称为舟山种眼镜蛇, *Naja atra*)的 CVF 抗补体活性为 78.62 U/mg (Shu et al, 1991)、250 U/mg (Takahashi et al, 1982)。在体内实验中, Y-CVF 在猕猴体内抑制补体的治疗剂量一般为 30 U/kg 或 0.02 mg/kg (Sun et al, 2001), 也显著低于文献报道的其他 CVF 使用剂量, 如来源于印度眼镜蛇的 CVF 在狒狒 (baboon) 体内所需的用药剂量为 60 U/kg (Leventhal et al, 1993), 来源于孟加拉种眼镜蛇 (*Naja kaouthia*) 的 CVF 在狒狒体内所需的用药剂量为 0.25—0.5 mg/kg (Kobayashi et al, 1997; Taniguchi et al, 1996)。在纯度更高, 剂量更小的情况, 间断多次静脉使用治疗剂量的 Y-CVF 是否可以诱导特异性中和抗体的产生而致失效, 其在灵长类动物体内的免疫原性如何, 是在 Y-CVF 的继续研发过程中非常值得注意的问题。

3.2 Y-CVF 能诱导灵长类动物产生中和抗体, 从而导致 Y-CVF 失效

本实验结果显示, 多次注射足量 Y-CVF (0.05 mg/kg) 的灭活补体效果呈递减趋势, 第 1 次和第 2 次注射 Y-CVF 后的补体灭活效果最好, 第 3 次注射时仅有轻微效果, 第 4 次注射时则基本无效, 其有效时间在 2 周以上, 但比文献报道的其他来源的 CVF 效果好。Taniguchi et al (1996) 报道, CVF 在第 2 次注射时 (第 14 天) 就无灭活补体的作用。Taniguchi 所用的 CVF 也是来源于孟加拉种眼镜蛇类, 但是抗补体活性较 Y-CVF 低, 需要的使用剂量也较大 (0.25 mg/kg)。虽然 Y-CVF 的失效时间较文献报道的晚, 但仍然存在继续使用失效的问题。失效的原因仍然可能是诱导产生了特异性抗 Y-CVF 抗体。本实验通过 Western Blot 和 ELISA 也证实, 每 2 周注射一次 Y-CVF, 在不使用其他免疫抑制剂的情况下, 灵长类动物体内能产生特异性抗 Y-CVF 抗体,

且其滴度随着 Y-CVF 注射次数增加而递增。这就表明, 虽然 Y-CVF 经过了进一步的提纯处理, 用药剂量也得到了大幅度的减少, 但是仍然具有一定的免疫原性。因目前在移植领域采用的抑制补体治疗方案多为短期, 一般小于 2 周, 因此 Y-CVF 仍有一定的应用前景。而且在移植领域多联合使用其他免疫抑制剂抗排斥, 这些免疫抑制治疗可能在一定程度抑制中和抗体的产生, 从而延长 Y-CVF 使用的有效时限。另外, 将 CVF 行人源化改造以减少其免疫原性, 以期可以长期、多次反复使用, 也是开发 CVF 临床应用有希望的策略之一。

3.3 Y-CVF 未诱导抗猪抗体 (含抗 α -Gal 抗体) 的水平升高

Gowda et al (1992) 报道其所研究的 CVF 的主要寡糖结构中有 α -Gal 残留结构。Taniguchi et al (1996) 报道, CVF 可诱导灵长类动物体内产生抗 α -Gal 抗体, 可能会增强异种移植的排斥反应, 该现象也是 Y-CVF 在异种移植领域应用中值得注意的问题。猪血管内皮细胞上的主要异种抗原是 α -Gal, 但也表达相对次要的非 α -Gal 异种抗原 (Chen et al, 2005)。如果 Y-CVF 诱导产生抗 α -Gal 抗体, 则与猪内皮细胞上的 α -Gal 抗原特异性结合, 使结合的抗猪抗体水平增加。故本实验采用条件比较一致的猪内皮细胞系作为靶细胞, 检测待测猴不同时间点血清内的抗猪抗体, 以间接评价 Y-CVF 诱导抗 α -Gal 抗体的产生情况。结果显示, 在反复多次注射 Y-CVF 后, 虽然 Western Blot 和 ELISA 均证实第 28 天、第 42 天产生明显的抗 Y-CVF 中和抗体, 但灵长类动物体内的抗猪内皮细胞 IgG 和 IgM 水平并未显著增加, 提示 Y-CVF 诱导产生的中和抗体可能不是抗 α -Gal 抗体。这种发现与文献报道 (Taniguchi et al, 1996) 不符, 其原因可能为: 1) Y-CVF 糖基结构中可能不含或含极少量的 α -Gal 抗原决定簇; 2) Y-CVF 由于具有更高的抗补体活性, 用药剂量大量减少, 以致其 α -Gal 等种属差异性蛋白结构对免疫系统的刺激较弱, 不足以产生大量的抗体; 3) 也存在检测方法特异性不够高的可能性。其确切的机制仍需进一步的研究探讨。

参考文献:

- Ballou M, Cochrane CG. 1969. Two anticomplementary factors in cobra venom: Hemolysis of guinea pig erythrocytes by one of them[J]. *J Immunol*, **103** (5): 944-952.
- Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, Wise Y, Liu Y, Xiang Y, Copeman L, Liu W, Jevnikar A, Wall W, Cooper DK, Murase N, Dai Y, Wang W, Xiong Y, White DJ, Zhong R. 2005. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys[J]. *Nat Med*, **11**(12):1295-1298.
- Chen G, Sun QY, Wang XM, Shen SQ, Guo H, Wang H, Wu Y, Wang WY, Xiong YL, Chen S. 2004. Improved suppression of circulating complement does not block acute vascular rejection of pig-to-rhesus monkey cardiac transplants[J]. *Xenotransplantation*, **11**(2): 123-132.
- Gowda DC, Schultz M, Bredehorst R, Vogel CW. 1992. Structure of the major oligosaccharide of cobra venom factor[J]. *Mol Immunol*, **29**: 335.
- Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, Rose AG, Hancock WW, Ye Y, Niekrasz M, Kosanke S, Wright LJ, White DJ, Cooper DK. 1997. Delayed xenograft rejection of pig to baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy[J]. *Transplantation*, **64**(9): 1255-1261.
- Leventhal JR, Dalmasso AP, Cromwe JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RM, Matas AJ. 1993. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement[J]. *Transplantation*, **55**(4): 857-866.
- Mayer MM. 1961. Experimental Immunochemistry Complement and Complement Fixation. 2nd ed [M]. Springfield Illinois: Charles C Thomas, 133.
- Pepys MB, Tompkins C, Smith AD. 1979. An improved method for the isolation from *Naja naja* venom of cobra factor (CVF) free of phospholipase A[J]. *J Immunol Med*, **30**: 105-117.
- Shu YY, Cheng C, Zhuang MX, Tang SX. 1991. Purification and characterization of cobra venom factor from Chinese cobra (*Naja naja atra*) [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **23**(1):32-39.
- Sun QY, LU QM, WANG WY, XIONG YL. 2001. A highly active anticomplement factor from the venom of *Naja kaouthia*[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **33**(5): 483-488.
- Sun Qy, Wang WY, Xiong YL. 2003. *In vitro* hemolysis of a highly active anticomplement factor from the venom of *Naja kaouthia*[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, **19**(8): 909-913.[孙黔云, 王婉瑜, 熊郁良. 2003. 眼镜蛇蛇毒高活性抗补体因子的体外溶血活性研究. 中国药理学通报. **19**(8): 909-913.]
- Takahashi H, Hayashi K. 1982. Purification and characterization of anticomplement factor (cobra venom factor) from the *Naja naja atra* venom[J]. *Biochim Biophys Acta*, **701**: 102-110.
- Taniguchi S, Kobayashi T, Neethling FA, Ye Y, Niekrasz M, White DJ, Cooper DK. 1996. Cobra venom factor stimulates anti-alpha-galactose antibody production in baboons. Implications for pig-to-human xenotransplantation[J]. *Transplantation*, Sep 15; **62**(5): 678-681.
- Vogel CW, Fritzinger DC. 2007. Humanized cobra venom factor: Experimental therapeutics for targeted complement activation and complement depletion[J]. *Curr Pharm Des*, **13**(28): 2916-2926.