

- Biol, 1995, **12** (1): 121~ 124
- 9 Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z *et al.* Signal transducing molecules and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins from a caveolin rich insoluble complex in MDCK cells. J Cell Biol, 1993, **122** (4): 789~ 807
- 10 Buch K T, Stuart R O, Li S H *et al.* Epithelial inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. J Biol Chem, 1994, **269** (38): 23694~ 23699
- 11 Smart E J, Ying Y S, Anderson K G W *et al.* Hormonal regulation of caveolae internalization. J Cell Biol, 1995, **131** (4): 929~ 938
- 12 Rothberg K G, Heuser J E, Donzell W C *et al.* Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell, 1992, **68** (4): 673~ 682
- 13 Scherer P E, Okamoto T, Chun M *et al.* Identification, sequence and expression of caveolin2 defines a caveolin gene family. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (1): 131~ 135
- 14 Zurzole C, Vant Hof W, Van Meer G V *et al.* VIP21/ caveolin, glycosphingolipid cluster and the sorting of GPI- anchored proteins in epithelial cells. EMBO J, 1994, **13** (1): 42~ 52
- 15 Rothberg K G, Ying Y S, Kamen B A *et al.* Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. J Cell Biol, 1990, **111** (6): 2931~ 2938
- 16 Simionescu N. Prelesional modifications of the vessel wall in hyperlipidemic atherogenesis. Extracellular accumulation of modified and reassembled lipoproteins. Ann N Y Acad Sci, 1990, **598** (Atherosclerosis 2): 1~ 16
- 17 Caldwell R B, Slapnick S M. Freeze fracture and lanthanum studies of the retinal microvasculature in diabetic rats. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, **33** (6): 1610~ 1619

- 18 North A B, Galazkiewicz T, Bayer J *et al.* Complementary distribution of vinculin and dystrophin define two distinct sarcolemma domains in smooth muscle. J Cell Biol, 1993, **120** (5): 1159~ 1167
- 19 Koleske A J, Baltimore D, Lisanti M P. Reduction of caveolae and caveolin in oncogenically transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92** (5): 1381~ 1385

Plasmalemmal Vesicles (caveolae) and Signal Transduction. HUANG Fen (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Caveolae are 50~ 100 nm membrane micro invaginations associated with the plasma membrane of a variety of cells. They were first identified in transmission electron micrographs 40 years ago. Functionally, caveolae are thought to participate in transcellular transport of both small and large molecules across capillary endothelial cells. In addition, caveolae have been postulated to function in potocytosis. More recently, there is growing evidence that caveolae also participate in transmembrane signal transduction.

Key words caveolae, caveolin, G-protein coupling receptor, signal transduction

催化性抗体及其研究进展*

胡昌勤

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 根据过渡态理论, 按特定的化学反应机制确定反应中的可能过渡态结构, 选择和该过渡态结构类似的化合物作为半抗原, 可诱导机体产生具有催化活性的催化性抗体。文章对诱导催化性抗体中半抗原的选择原则、催化性抗体和非催化性抗体间的联系、催化性抗体和酶促催化反应的比较等方面进行了较为全面的综述, 并对催化性抗体在医药科学中的应用前景及限制因素进行了讨论。

关键词 催化性抗体, 抗体, 酶, 过渡态类似物

抗体是机体经抗原刺激由免疫活性细胞产生的一组免疫球蛋白, 通常由两条相同的重链和两条相同的轻链所组成。抗体具有高度的特

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1996-04-28, 修回日期: 1996-12-03

异性，一般只能与相应的抗原起专一的反应，其最基本的生物功能是防御外界物质对机体的侵袭。故早期的研究认为，抗体属于给活性体 (emphore)，即本身不具有催化活性但能特异与配体 (ligant) 结合的蛋白质。但在 1986 年，Lerner 和 Schultz 等^[1,2]首次发现了具有催化活性的抗体——催化性抗体 (catalytic antibody)，并称该类抗体为抗体酶 (abzyme)；之后大量的催化性抗体被相继发现；催化性抗体催化化学反应的复杂程度和反应效率也都大大提高；但抗体酶这一名词并没被广泛采用，目前文献中对具有催化活性的抗体仍普遍称为催化性抗体。

1 过渡态理论与催化性抗体

过渡态理论是催化反应理论中的重要理论之一。该理论的基本观点是“在一个特定的化学反应历程中，反应物历经反应途径中最不稳定的形式——过渡态，形成产物，化学反应速度主要是由反应体系中处于过渡态的反应物的量所决定”。根据过渡态理论，Hammond 假定“在由稳定的反应物生成不稳定的活性中间体的反应中，其反应物过渡态极类似于中间体本身”，首次将过渡态结构与反应中间体、反应物和产物相联系。酶和抗体都可选择性地与特

定的配体结合，但其根本区别，Pauling 在 40 年前就指出：“酶选择性地对处于较高能态的化合物过渡态有较强的亲和力，而抗体则选择性地对化合物基态具有较强的亲和力”。在上述理论的指导下，人们设想能否根据特定的化学反应机制来确定化合物过渡态的可能结构，再选择和该过渡态结构相似的类似物作为半抗原，并合成抗原进行免疫，由此得到和酶一样具有选择性地和化合物过渡态具有较高亲和性，并能和酶一样催化特定化学反应的抗体呢？答案是肯定的。以羧酸酯及酰胺的水解反应为例^[3]，根据其反应机理 (图 1)，其可能

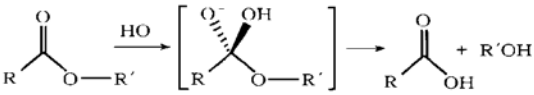


图 1 酯与酰胺的水解反应机制

的过渡态结构为四面体结构，故选用具有四面体结构的高能态中间体类似物作为半抗原 (图 2)，均得到了预期的催化性抗体。立体化学的研究已经证明，催化性抗体不仅和作为半抗原的过渡态类似物具有完全互补的立体结构^[5]，并被认为能稳定催化反应中产生的高能过渡态^[6]。

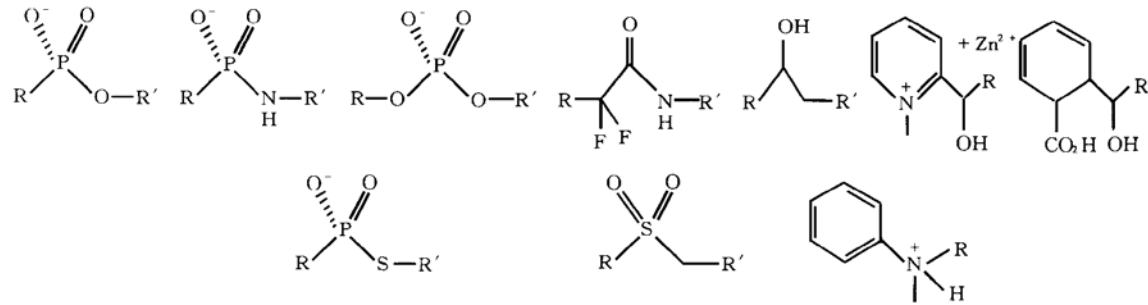


图 2 作为四面体过渡态类似物的半抗原结构

根据上述理论，人们已经有目的地成功地筛选出大量的催化性抗体^[3,4]，其反应类型包括碳酸盐水解 (carbonate hydrolysis)、酯水解 (ester hydrolysis)、酰胺水解 (amide hydrolysis)、Claisen 重排 (claisen rearrangement)、酰

胺化 (amide bond formation)、Diels-Alder (Diels-Alder) 反应、内酯化 (lactonization)、转酯 (transesterification)、光分解 (photo-induced cleavage)、光二聚化 (photo-induced dimerization)、β 消除 (β-elimination)、顺反异

构化 (*cis-trans* isomerization)、脱羧 (decarboxylation)、金属螯合 (metal chelation)、亚胺化 (imine formation)、氧化 (oxidation) 和三苯甲基水解 (trityl hydrolysis) 反应等.

2 半抗原结构与催化性抗体

根据过渡态理论可设计特定的半抗原以达到诱导催化性抗体产生之目的. 在半抗原设计中, 应考虑两方面的因素: a. 产生的抗体能否具有预期的催化活性; b. 能否刺激机体产生免疫应答. Thomas^[3] 在综合大量文献的基础上, 总结出半抗原结构与催化性抗体间的关系:

(1) 半抗原结构中应含有芳香结构. 根据文献统计, 为诱导催化性抗体所设计的半抗原, 如果结构中含有芳香结构, 其平均成功率约 1/3; 相比之下, 不含芳香结构的半抗原, 成功率仅占 1/11. 其原因是因为前者形成的

抗原具有较强的免疫原性, 可使机体产生较强的应答反应, 因而增加了筛选概率.

(2) 对催化性抗体和其半抗原的亲合性, 认为抗体和半抗原的结合常数 $K_i < 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时, 易得到高效率的催化性抗体.

(3) 诱导羧酸酯、酰胺水解的催化性抗体, 可利用具有四面体结构的高能过渡态类似物为半抗原.

(4) 半抗原设计应考虑催化反应的微环境与反应机制. 即所设计的半抗原应能诱导体在其抗原结合部位创造出特定的有利于催化反应的环境. 如诱导脱羧反应的催化性抗体, 图 3 所示的三种半抗原中只有 (a) 是成功的. 其原因是半抗原的芳香环在抗体的抗原结合部位创造出疏水的袋装结构, 有利于脱羧反应中 CO_2 的产生; 而半抗原中的磺酸基则在抗原结合部位诱导出具有互补正电荷的残基 (Lys, Arg), 有助于羧酸的去质子化作用.

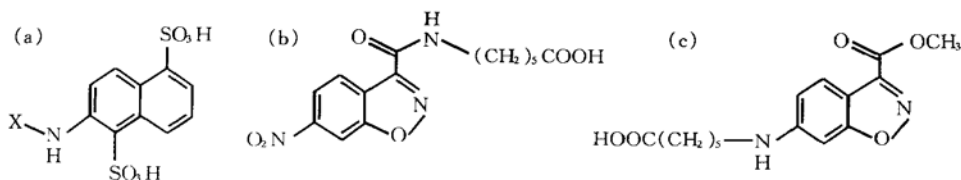


图 3 诱导脱羧反应催化性抗体的成功和不成功半抗原结构

诱导机体产生催化性抗体的另一方法是利用抗独特型抗体 (anti-idiotypic antibody) 技术^[3]. 其基本原理为首先设法诱导机体产生抗体, 并使该抗体的抗原结合部位结构与催化性抗体催化活性部位的结构互补, 再利用该抗体继续免疫, 诱导产生的抗独特型抗体即可能具有催化活性. 利用该方法的优点是可直接利用酶诱导机体产生抗体, 进而产生与酶具有相同活性部位的抗独特型抗体; 如果对酶的结构预先进行修饰, 还有望诱导产生底物特异性与酶不同的催化性抗体.

3 催化性抗体和非催化性抗体

利用过渡态类似物诱导催化性抗体的同

时, 可产生大量不具有催化活性的抗体. Miyashita 等^[7] 利用聚类分析的方法, 分析相同半抗原产生的催化性抗体和非催化性抗体的氨基酸序列, 发现催化性抗体的轻链和重链的可变区分别显示出 89%~95% 及 74%~84% 的高度同源性; 而非催化性抗体之间及催化性抗体和非催化性抗体之间没发现同源性; 提示所有的催化性抗体起源于同一可变区基因.

利用定点突变技术, 发现催化性抗体抗原结合部位关键点氨基酸的点突变, 如水解羧酸酯、酰胺的催化性抗体可变区的 Arg、His 等的突变, 可导致催化活性的丧失或催化活性严重失活, 但并不影响抗体与半抗原的结合^[4,5,8~10], 此时催化性抗体抗原结合部位的

立体结构和失活前相似^[10]；而其他非关键位点的点突变，如 Tyr 等对抗体的催化活性影响不大^[9]。

抗体的产生具有高度的不均一性，既使用单一的抗原免疫，也能导致机体产生多种不同的抗体；这些抗体虽然都能和该抗原结合，但其可变区的氨基酸序列不同。故由过渡态类似物免疫产生的抗体，只有当可变区序列满足特定的要求时，抗体才具有催化活性，否则只能产生非催化性抗体。由此可见，诱导催化性抗体具有极大的偶然性。

4 催化性抗体和酶

催化性抗体与之相应的酶相比较，二者通常具有相似的催化反应机制。Guo 等^[10]报道，水解氨基酸酯的催化性抗体 17E8，其活性中心具有和丝氨酸蛋白酶催化中心 Ser-His-Asp 结构相似的 Ser-His 结构；通过对其催化机理的研究，推测该类催化性抗体和丝氨酸蛋白酶一样，在反应中形成共价结合的酰基-酶中间体^[10]。该假设后来由 Krebs 等^[11]利用电子喷雾质谱 (electrospray mass spectrometry) 检测到反应中酰基-抗体中间体的存在而进一步证明。

和酶促反应的催化效率相比较，催化性抗体的反应效率较酶促反应效率低，具体为酶反应的 K_{cat}/K_m 通常为 $10^9 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ，而催化性抗体水解反应的 K_{cat}/K_m 通常在 $10^3 \sim 10^6 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内^[3]。一个重要的原因是诱导催化性抗体的过渡态类似物毕竟不是过渡态本身，故由此诱导出的催化性抗体为反应所提供的微环境不如酶那样完美^[4]，而这种微环境对抗体的催化活性又是十分重要的^[12]。

利用机体免疫系统能迅速对外来物产生应答反应这一特点，可筛选出催化特性和酶完全不同的催化性抗体，进而实现酶所不能实现的化学反应。如，外环反应 (pericyclic reactions) 是有机化学中一类重要的化学反应，但自然界中仅分枝酸变位酶 (chorismate mutase)

催化的外环重排 (pericyclic rearrangement) 反应-Claisen 重排属该类反应^[13]，利用催化性抗体技术，不仅诱导出了可催化 Claisen 重排的催化性抗体^[6]，且诱导出了可催化其他类型外环反应，如 Diels-Alder 反应^[6,13]、Cope 重排 (Cope rearrangement) 反应^[13]的催化性抗体。此外，催化性抗体还可能利用普通化合物替代酶促反应中的辅酶：如硫化物的氧合反应 (oxygenation)，通常单加氧酶催化该类反应需要以 NADPH 为辅酶，但在催化性抗体催化的该类反应中，筛选出的催化性抗体可利用 NaIO_4 为辅助因子实现相似的化学反应^[13]；另一例子是酮还原成醇的反应，催化性抗体利用 NaCNBH_3 为辅助因子实现了通常酶促反应中需要以 NADPH 或 NADH 为辅酶才能完成的催化反应^[13]。

5 催化性抗体的应用

催化性抗体应用最有价值的领域为医药科学，已有利用催化性抗体催化可卡因分解^[14]及催化前药还原的报道^[15]。

在新药的开发中，将药物设计成前药 (prodrug) 的形式，通常有利于药物更好地发挥药效并降低药品的毒副作用。但前药的设计除了要考虑修饰的化学结构对药品本身药理、毒理作用的影响外，还要考虑在体内如何利用酶将其还原成有效结构，进而发挥药效。故酶在机体中的存在与否、数量多少及分布情况均影响前药的设计。利用催化性抗体技术不仅能产生和酶具有相似催化功能的催化性抗体，还能产生具有新催化特性的催化性抗体这一特点，用催化性抗体替代酶催化前药在体内的还原，可大大简化前药设计中的顾虑。如能将催化性抗体技术和蛋白融合技术结合在一起，设计出既具有催化功能，又具有组织特异性的融合抗体 (chimeric antibody)，将使前药的优点得以更好地发挥。

此外，利用催化性抗体直接作为药物治疗酶缺陷症患者等，也具有广泛的前景。限制催化性抗体应用的主要原因除了其催化活性较低

和花费较大外, 一个重要的原因是诱导的催化性抗体多为鼠源性的单克隆抗体, 鼠源性的单克隆抗体在体内可诱导机体产生抗抗体, 并使催化性抗体失活. 这是鼠源性单克隆抗体制剂应用中的共性问题. 如果利用诱导物直接刺激机体产生相应的多克隆催化性抗体^[16], 则有望解决这一问题. 虽然已有直接在机体中诱导产生多克隆催化性抗体的报道^[17], 但因成功率较低等原因, 离应用的差距还较远.

6 机体中的催化性抗体

抗体在机体中广泛存在, 但它们是否也具有某种催化功能并与机体的某些病、生理过程有关呢? 这方面的研究还不多见. 但在患自身免疫性疾病的患者体内发现, 自身抗体 (autoantibody) 可具有水解特定多肽^[18]、DNA^[19]的功能, 虽然这种特定的水解反应和其自身病理过程的关系还不清楚. 最近我们利用多种免疫化学方法证明, 从未接触过链霉素的机体中普遍存在部分可以和链霉素结合的 IgG (streptomycin binding IgG, SMBIgG), 并通过 HPLC 分析发现人体中的 SMBIgG 可能催化链霉素分解^[20], 有关 SMBIgG 和链霉素耳毒性关系的研究正在进行之中. 上述研究结果亦提示, 正常机体中完全可能存在特异的催化性抗体, 并在特定的病理、生理过程中起某种特殊的作用. 对这一问题进行深入地研究, 特别是催化性抗体和机体病理、生理过程关系的研究, 将有助于加深对抗体在体内生理功能的理解.

参 考 文 献

- 1 Tramontano A, Janda K D, Lerner R A. Catalytic antibodies. *Science*, 1986, **234**: 1566~ 1570
- 2 Pollack S J, Jacobs J W, Schultz P G. Selective chemical catalysis by antibody. *Science*, 1986, **234**: 1570~ 1573
- 3 Thomas N R. Hapten design for the generation of catalytic antibodies. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, **47**: 345~ 372
- 4 Lerner R A, Benkovic S J, Schultz P G. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science*, 1991, **252**: 659~ 667
- 5 Haynes M R, Stura E A, Hilvert D *et al.* Routes to cataly-

sis: structure of a catalytic antibody and comparison with natural counterpart. *Science*, 1994, **263**: 646~ 652

- 6 Roberts A V, Stewart J, Benkovic S J *et al.* Catalytic antibody model and mutagenesis implicate arginine in transition state stabilization. *J Mol Biol*, 1994, **235**: 1098~ 1116
- 7 Miyashita H, Hara T, Tanimura R *et al.* A common ancestor for multiple catalytic antibodies generated against a single transition state analog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 6045~ 6049
- 8 Stewart J D, Roberts V A, Thomas N R *et al.* Site directed mutagenesis of a catalytic antibody: an arginine and a histidine residue play key roles. *Biochemistry*, 1994, **33**: 1994~ 2003
- 9 Jackson D K, Prudent J R, Baldwin E P *et al.* A mutagenesis study of a catalytic antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 58~ 62
- 10 Guo J, Huang W, Zhou G W *et al.* Mechanistically different catalytic antibodies obtained from immunization with a single transition state analog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1694~ 1698
- 11 Krebs J F, Siuzdak G, Dyson H J *et al.* Detection of a catalytic antibody species acylated at the active site by electrospray mass spectrometry. *Biochemistry*, 1995, **34**: 720~ 723
- 12 Lewis C, Kramer T, Robinson S *et al.* Medium effects in antibody-catalyzed reaction. *Science*, 1991, **253**: 1019~ 1022
- 13 Schultz G P, Lerner R A. From molecular diversity to catalysis: Lessons from the immune system. *Science*, 1995, **269**: 1835~ 1842
- 14 Landry D W, Zhao K, Yang G X-Q *et al.* Antibody-catalyzed degradation of cocaine. *Science*, 1993, **259**: 1899~ 1901
- 15 Miyashita H, Karaki Y, Kikuchi M *et al.* Prodrug activation *via* catalytic antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 5337~ 5340
- 16 Stephens D B, Wilmore B H, Iverson B L. Polyclonal antibodies and catalysis. *Bioorg Med Chem*, 1994, **2**: 653~ 658
- 17 Stephens D B, Iverson B L. Catalytic polyclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **192**: 1439~ 1444
- 18 Paul S, Volle D J, Beach C M *et al.* Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science*, 1989, **244**: 1158~ 1162
- 19 Gabibov A G, Golobov G V, Makarevich O I *et al.* DNA-hydrolyzing autoantibodies. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, **47**: 293~ 302
- 20 胡昌勤, 胡 新, 金少鸿. 链霉素结合 IgG 的发现及在不同个体中的分布. *生物化学与生物物理学报*, 1997, **29**: 251~ 258

Catalytic Antibody and Its Recent Research Advances. HU Changqin (*National Institute*

for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China).

Abstract On the basis of the transition-state theory, catalytic antibodies could be induced in body by using a transition-state analogue as hapten which was selected according to the specific reaction mechanism. A fuller description is given on the principle of hapten design for generation

of catalytic antibodies, the relationship between catalytic antibodies and non-catalytic antibodies and the comparison of catalytic antibodies with enzymes. The application prospects of catalytic antibody in medicine science and the limitations in the application are also discussed.

Key words catalytic antibody, antibody, enzyme, transition-state analogue

多肽噬菌体展示

唐为钢 甘人宝 王克夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 噬菌体展示技术已被广泛地应用于生物学研究的各个方面. 利用它可融合表达多肽、蛋白质结构域和蛋白质. 尤其是多肽噬菌体展示, 已被作为一种便利的研究工具去发现和研究那些与受体、酶、凝集素、抗体、核酸以及其他生物分子亲和的多肽配基和酶的底物专一性, 该技术在药物的发现, 疫苗的设计等医学领域也有着潜在的应用价值.

关键词 噬菌体展示, 固定化的靶分子, 多肽噬菌体展示

最近几年, 噬菌体展示技术发展迅猛, 它在抗体的抗原决定簇、蛋白质的抑制剂和激活剂、酶的底物专一性、蛋白质折叠、药物和疫苗的设计、基因的表达调控、免疫系统内的分子识别等研究领域有着广泛的应用. 所谓噬菌体展示 (phage display), 即用分子克隆的方法将外源核酸片段以融合蛋白的形式表达于噬菌体颗粒的外表面上. 一般地, 噬菌体展示实验操作可概括为两步: a. 建库; b. 筛库. 首先通过人工合成、cDNA 法、DNase I 随机水解法等来制备各种序列不一的核酸片段, 然后将其克隆于载体 (噬菌体或噬菌粒) 中, 随后通过感染或超感染大肠杆菌, 使其分泌出融合表达有外源片段的噬菌体, 合称为建库. 之后, 用固定化的靶分子 (immobilized target) 去筛选与它亲和的噬菌体. 称之为筛库. 噬菌体展示技术具有两个明显的优点, 其一是噬菌体易于扩增, 其二是融合表达的外源多肽或蛋白质

的氨基酸序列可通过测噬菌体 DNA 的序列而推知. 噬菌体展示可融合表达多肽、蛋白质结构域和蛋白质, 展示于噬菌体上的融合多肽称为噬菌体多肽. 本文将讨论占有重要地位的融合表达多肽的噬菌体展示——多肽噬菌体展示. 多肽噬菌体展示库依据外源融合多肽的构象是否被限制, 可分为两类, 一类为构象限制的肽库, 即用一对二硫键将外源融合多肽环化; 另一类为构象不限制的肽库, 即没有束缚外源融合多肽构象的二硫键. 依据外源融合多肽是以单拷贝形式还是多拷贝形式表达于噬菌体外膜上, 可相应地分为单价多肽噬菌体展示和多价多肽噬菌体展示. 以下将从两个方面并举出代表性的实例来介绍和评析渗透到各个生物学研究领域的多肽噬菌体展示. 首先, 将概述用来筛选与各种生物分子结合的多肽配基的多肽噬菌体展示库, 称之为配基噬菌体展示