

蛋白激酶 C 的分子异质性

汪 策 周宝宏

(同济医科大学病理生理学教研室, 武汉)

提 要

蛋白激酶 C (PKC) 是由多种亚类组成的蛋白质大家族; 这个家族成员具有各自独立的酶学特性、不同的组织表达及胞内定位; 在加工与调节对外来信号起反应的生理与病理应答过程中, 不同亚类的激酶有不同的功能。

关键词 蛋白激酶 C, 第二信使, 三磷酸肌醇

自 1977 年发现蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 以来, 人们对它的研究取得了惊人的进展。众所周知, 当配体与细胞表面受体结合后, 肌醇磷脂被水解产生甘油二酯(或称为二酰基甘油, diacylglycerol, DG) 及三磷酸肌醇 (inositol-1, 4, 5-trisphosphate, IP_3)。DG 与 IP_3 现均认为是第二信使。前者的作用主要是激活 PKC, 从而使许多细胞内蛋白发生磷酸化; 后者主要使胞浆 Ca^{2+} 浓度升高。现已清楚, PKC 是不均一的分子, 它存在着许多亚类

(Subspecies)。对 PKC 亚类的研究刚刚起步。有些文章曾对 PKC 作了一些介绍, 但对 PKC 分子异质性却未涉及^[1]。本文拟对这方面的进展作一介绍。

一、PKC 的家族成员

迄今已发现 PKC 家族有 7 个亚类^[2-4], 各自特性如表 1 所示。这 7 个 PKC 亚类中, 有 α 、 β_1 、 β_{11} 及 γ 四种亚类是从各种 cDNA 文库中发现的, 发现时间相对较早^[5-7]。最近用混合的

法, 进行广泛和深入的航天医学和生理学研究, 并将开展国际间的合作。

本文曾蒙庄祥昌和余和璋教授审阅, 特表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Covault C. *Aviation week & space technology*, 4 Jan. 1988: 26
- 2 Nicogossion A E. *Space physiology and medicine (NASA-SP447)*. NASA Scientific and Technical Information Branch, 1982: 220—279
- 3 Convection V A *et al.* *ASEM*, 1981; 52(4): 251
- 4 Blomqvist G G *et al.* *The Physiologist*, 1983, 26(6) (suppl): s-81
- 5 Медкова И Л *et al.* *Космич Биол и Авиакосм Мед*, 1985; 19(1): 42
- 6 Miller M P *et al.* *Aerospace Med*, 1964; 35(12): 1194
- 7 Lollgen H *et al.* *ASEM*, 1984; 55(10): 887
- 8 Семенов В Ю *et al.* *Косм Биол и Авиакосм Мед*,

1985; 19(1): 6

- 9 Frost J D *et al.* *NASA-CR-151160*, 1976: 1--25
- 10 Frost J D *et al.* *NASA-CR-151560*, 1977: 1—56
- 11 庄祥昌等. *空间科学学报*, 1982; 2(4): 327
- 12 阎晓霞等. *空间科学学报*, 1988; 8(3): 215
- 13 沈芸云等. *中国应用生理学杂志*, 1987; 3(4): 279
- 14 刘成林等. *航天医学与医学工程*, 1988; 1(12): 109
- 15 Чинкин А С *et al.* *Косм Биол и Авиакосм Мед*, 1987; 21(3): 49
- 16 Генин А М *et al.* *Косм Биол Мед*, 1972; 6(4): 26
- 17 Kakurin L I *et al.* *ASEM*, 1976; 47(10): 1083
- 18 Potfier J M *et al.* *Acta Astronautica*, 1986; 13(1): 47
- 19 Mikhailov V M *et al.* 著, 李士婉译. *国外医学, 军事医学分册*, 1985; (3): 191
- 20 Kalandarov S *et al.* *Space Biology and Aerospace Medicine*, 1986; 20(5): 45

【本文于 1989 年 3 月 7 日收到】

表 1 哺乳动物 PKC 亚类特征

亚 类	α	β_1	β_{11}	γ	δ	ϵ	ξ
氨基酸残基	672	671	673	697	673	737	592
分子量	76799	76790	76933	78366	77517	83474	67740
层析亚份	III 型	II 型	II 型	I 型	未定	未定	未定
染色体定位(人)	17	16	16	19	?	?	?
激活剂 ¹⁾	PS + DG + Ca^{2+} AA + $\text{Ca}^{2+2)}$	PS + DG + Ca^{2+}	PS + DG + Ca^{2+}	PS + DG + Ca^{2+} AA	PS + DG + (Ca^{2+})	PS + DG + (Ca^{2+})	PS + (DG + Ca^{2+})
组织表达	几乎所有组织	某些组织与细胞	许多组织与细胞	仅于脑、骨髓	许多组织	仅在脑 ³⁾ ?	许多组织 ³⁾

1) 用小牛胸腺 HI 组氨酸作为磷酸受体确定每亚类的激活剂

2) PS: 磷脂酰丝氨酸; DG: 甘油二酯; AA: 花生四烯酸

3) 组织表达仅通过 Northern 印迹分析出

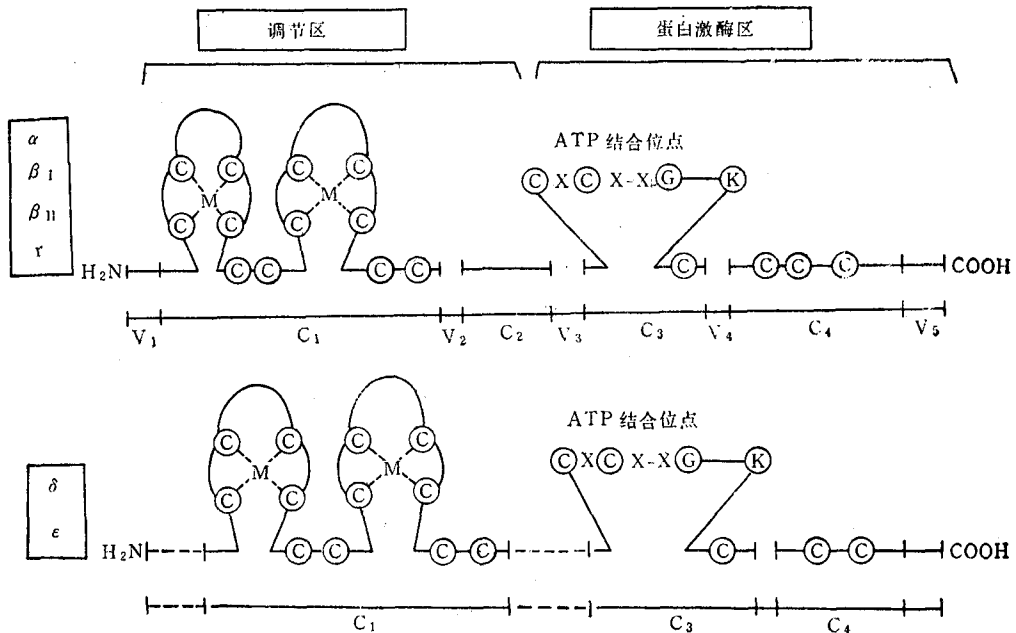


图 1 PKC 亚类的共同结构

C、G、K、X 及 M 分别代表半胱氨酸、甘氨酸、赖氨酸、任意氨基酸及金属。C₁~C₄ 为四个保守区, V₁~V₅ 为五个可变区。两组的主要区别在于 δ 、 ϵ 及 ξ 亚类缺乏 C₁ 区

α 、 β_{11} 及 γ 的 cDNA 探针在低严谨条件下, 从大鼠脑文库中分离出另外三种亚类 (δ 、 ϵ 及 ξ)^[4,8]。 ϵ 的 cDNA 克隆还从兔文库中分离出来。这三种亚类有着共同的结构, 且与 α 、 β_1 、 β_{11} 及 γ 四种亚类结构相关却又不同, 因而 PKC 又可粗分为二组, 即一组为 α 、 β_1 、 β_{11} 及 γ 亚类; 另一组为 δ 、 ϵ 及 ξ 亚类。两组的结构如

图 1 所示。

从图 1 可见, PKC 氨基端 1/2 为调节区 (regulatory domain), 羧基端 1/2 为蛋白激酶区 (protein Kinase domain)。 C₁~C₄ 为保守区, 其中 C₁ 区含有富含半胱氨酸的随机重复顺序 Cys-x₂-Cys-x₁₃₍₁₁₎-Cys-x₂-Cys-x₇-Cys-x₇-Cys, 此处 x 代表任何一种氨基酸。 该顺序与

在许多金属-蛋白质及与转录调节有关的 DNA 结合蛋白中发现的半胱氨酸-锌-DNA 结合指形区 (Cysteine-Zinc-DNA-binding finger) 的保守顺序相似。但目前尚无证据表明 PKC 象这种保守顺序一样能结合 DNA。现知 ξ 亚类 C_1 区仅含一段富含半胱氨酸的顺序。有假设称 C_1 及 C_2 区为 Ca^{2+} /DG、磷脂的结合位点,但未被证实。此外,羧基端 1/2 处的 C_3 及 C_4 区为酶活性区。类似于其他的蛋白激酶,该区有较大的决定簇^[4,8]。 C_3 区有一 ATP 结合顺序 Gly-x-Gly-x-x-Gly...lys。 C_4 区亦含有相似的顺序 Gly-x-Gly-x-x-Gly...(x),但其意义尚不清楚。 δ 、 ϵ 及 ξ 三亚类较 α 、 β_1 、 β_{11} 及 γ 亚类缺一 C_2 区。除 $C_1 \sim C_4$ 区外,还有 $V_1 \sim V_5$ 五个可变区。 β_1 与 β_{11} 具有高度的顺序同源性,两亚类可能是由一个 mRNA 断裂而形成的,它们的不同处仅在羧基末端处 V_5 区内的 50 个氨基酸残基。

PKC 可为 Ca^{2+} 依赖的新生蛋白酶——钙依蛋白酶 (Calpain) 的限制性蛋白水解所激活(溶解激活),这种水解发生在 V_5 区的一个或两个位点上,导致 PKC 释放全部酶性激活片段,这些片段产生后很快从细胞中消失。这种蛋白水解可能与 PKC 分子本身的下向调节有关。PKC 的这种溶解激活可用图 2 表示。

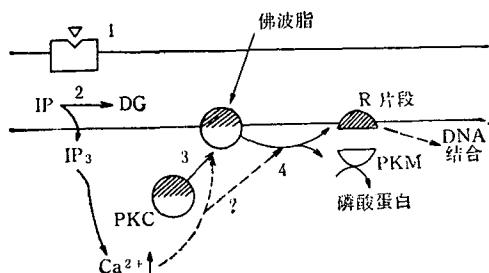


图 2 蛋白激酶 C 的溶解激活模型

1. 激动剂与受体反应,激活磷脂酰肌醇系统
2. 产生 DG 和 IP_3
3. 在 DG 或佛波脂存在下,胞浆 PKC 与膜结合
4. PKC 被分解为 R 片段和 PKM, PKM 为 Ca^{2+} 、磷脂非依赖性,具有激酶活性

二、各类 PKC 的不同的定位与表达

早在 1983 年,就有人发现 PKC 在脑中的分布并不均一^[9]。后来,Ohno 等^[6]用特异的寡核苷酸探针行 Northern 印迹分析表明 PKC 亚类只特定地在某一种组织中表达。新近在许多实验室,用亚类特异性抗体、生化、免疫及细胞化学等方法已广泛地检测了多种 PKC 亚类在不同组织中表达的相对活性及各自型别。对 α 、 β 及 γ 了解得最多, δ 、 ϵ 及 ξ 则相对较少^[10-14]。

现知,大鼠 PKC- γ 仅在脑及脊髓中表达。尤其集中在海马、大脑皮质及杏仁核。大鼠出生后约三周,脑中 PKC- γ 表达达到最大值。对猴 PKC- γ 研究表明其分布与大鼠类似,只是在小脑皮质(蒲肯野细胞、树突细胞及轴突)中亦含 PKC,且 PKC- γ 位于蒲肯野细胞轴突的末梢,但不存于突触后细胞。通常,PKC- γ 与这些细胞的膜结构有关。但在核膜及线粒体膜上则几乎不含 PKC- γ 。这一亚类的功能研究不多,可能与一些特化神经元功能,如海马回的长期电位 (long-term potential) 有关。

β_1 与 β_{11} 亚类分布于脑及其他许多组织,包括内分泌组织如胰岛与垂体(这些组织中 β_{11} 比 β_1 要多)。多克隆抗体细胞化学分析表明,同一组织中 β_1 与 β_{11} 表达的形式不同,如大鼠小脑皮质中 β_1 亚类主要存于颗粒细胞,而 β_{11} 主要存于树突及蒲肯野细胞突触前神经末梢的分子层。免疫电镜观察表明某些组织中, β_{11} 还存在于高尔基体膜上。许多组织如肝、肾、脾、肺、心及睾丸均含有不同比例的 β 亚类。

PKC- α 分布广泛。几乎遍及全身细胞。有些组织如肺、心、肾上腺皮质及血小板含有数种 PKC 亚类。许多细胞亦含有一种以上 PKC 亚类如 T 细胞及各种克隆的细胞系同时表达 α 、 β_1 及 β_{11} 亚类。PKC 亚类在细胞内的分布情况还取决于细胞的增生状态^[16]。

三、PKC 亚类的某些特性

各 PKC 亚类的酶学特性均不相同,因而

功能也有不同。在羟磷灰石层析柱上可见三种活性(I、II 及 III),分别代表 $\text{PKC-}\gamma$, $\beta_1 + \beta_{11}$ 及 α 亚类活性。其他几种亚类活性亦可见。这些活性有微弱的差别: 在磷脂酰丝氨酸及 Ca^{2+} 存在下, DG 对 $\text{PKC-}\gamma$ 及 α 的激活活性远小于其对 $\text{PKC-}\beta_1 + \beta_{11}$ 混合物的激活活性; 相反,游离的花生四烯酸(AA)对 $\text{PKC-}\beta$ 的激活又小于 AA 对 $\text{PKC-}\gamma$ 的激活,后者在微摩尔 AA 存在下便可发生。而 $\text{PKC-}\alpha$ 则须在高浓度 AA 存在时方能激活。众所周知, PKC 的激活物是在细胞表面受体受刺激所起的反应过程中产生的。不同的 PKC 亚类可能是由一系列磷脂代谢产物如 DG、AA 及 lipoxin A 所激活。此外,心、肺及血小板等组织的 PKC 对磷脂、DG 及 Ca^{2+} 的反应敏感性程度有差别。

蛋白激酶的功能是使靶蛋白质发生磷酸化,各种 PKC 亚类均有自己生理性底物,但迄今还未搞清楚这一问题。今后对 PKC 研究的重点应是探讨 PKC 在体内激活的机制以及寻找每一 PKC 亚类作用的生理性靶蛋白。

四、PKC 的双重功能及意义

PKC 的功能极其多样化。其参与分泌、细胞脱颗粒、离子通道调节、受体与信号转导装置的相互作用的调节、平滑肌收缩、基因表达与细胞增生等一系列与生命现象密切相关的过程。PKC 功能的多样化与不同的 PKC 亚类的激活有关。PKC 与 Ca^{2+} 通路的相互协同作用是各种细胞对外界刺激起反应的基础^[18,19]。

PKC 有着双重的功能 (dual action): 其一是 PKC 激活后对细胞的正增强作用 (positive forward action)。这种作用在基因表达的调控如 IL-2 受体的诱导、某些原癌基因的激活及生长调控等方面起重要作用; 其二是 PKC 对细胞信号加工过程中各步提供的负反馈控制 (negative feedback control) 作用。如在细胞的短期反应 (Short-time response) 中, PKC 能降低 1,4,5- IP_3 诱导的 Ca^{2+} 水平上升, 这种负反馈控制可发生在信号通路的每一步(图3); PKC 通过阻断受体介导的磷脂水解而抑制 Ca^{2+}

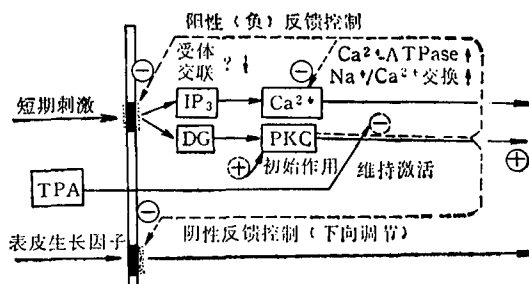


图3 PKC 及 TPA 双功能模式图

该图重点表明 PKC 在细胞调节过程中的负反馈功能以及 TPA 在初始激活 PKC 阶段的正作用与维持激活阶段的负作用(促使 PKC 降解)

流动或通过激活 IP_3 磷酸酶使 IP_3 水解而抑制 IP_3 及 DG 的产生; 通过激活 Ca^{2+} 转运 ATP 酶及 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白而刺激胞内 Ca^{2+} 的清除。在细胞的长期反应 (long-time response) 中, 如细胞增生, PKC 可使表皮生长因子 (EGF) 受体发生磷酸化, 这导致 EGF 与其受体的高亲合性结合快速下降, 并抑制配体诱导的酪氨酸磷酸化, 使受体受到功能上的“下向调节”; T 细胞在用十四烷酸佛波酯 (TPA) 及 Ca^{2+} 载体刺激后, PKC 使 T 细胞表面的抗原受体 (TCR) 发生磷酸化, TCR 受到连续的下向调节从而阻止 T 细胞对抗原刺激的进一步增生反应。

TPA 对 PKC 的作用也有双重效应: 在最初阶段, TPA 能激活 PKC (图3), 为正效应; 在 PKC 维持激活阶段, TPA 则促使 PKC 发生降解, 此为负效应。这一点上, TPA 与 DG 大不相同, 因为 DG 只刺激 PKC 活性。

Nishizuka^[21] 曾发现, 在微摩尔的 Ca^{2+} 、磷脂酰丝氨酸及 DG 或 TPA 存在下, 激活的钙依蛋白酶 I (Calpain I) 能裂解 PKC, 在共同表达数种 PKC 亚类的单个细胞中, 各 PKC 亚类以不同比率消失, 表明钙依蛋白酶 I 对 PKC 亚类作用有底物特异性。如果从细胞中去除 PKC, 便解除 PKC 对细胞的负反馈控制, 在极端情况下, 导致丝裂原刺激的细胞发生失控的增生, 这就与肿瘤的发生有关^[20]。这就是所谓肿瘤发生的连续作用假说 (Sequential acti-

干扰素作用机理和 2-5A 系统

黎荣松 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所)

提 要

诱导基因表达是干扰素发挥生物效应的主要方式。干扰素诱导基因表达可有多途径,被诱导基因的 5' 端序列与诱导过程有关。干扰素诱导的 2-5A 合成酶合成的 2-5A 有多种生物活性,能模仿干扰素的许多功能,2-5A 可能是高等动物细胞内的一种生长分化调节因子。

关键词 干扰素, (IFN), 2'-5' 寡聚腺苷酸合成酶, (2-5OASE), 2'-5' 寡聚腺苷酸 (2-5A)

干扰素 (IFN) 和 IFN 基因系统广泛存在于从鱼到人几乎所有脊椎动物。IFN 主要生物功能有: (1) 抗病毒。(2) 抗细胞生长繁殖。(3) 影响细胞分化。(4) 免疫调节。(5) 抗肿瘤。IFN 的生物功能多种多样,其作用途径也绝非单一,因而研究其作用机理时绝不能受单一或统一模式的束缚。但其作用的基本过程却是一样的,即: IFN 先与靶细胞表面受体结合,或内部化或不内部化,改变细胞结构和组分(如 cAMP 和 cGMP, 它们与 IFN 生物功能的关

on): 即 TPA 对 PKC 短期激活,接着负性作用使 PKC 发生长时间降解,从而使 PKC 失去负反馈控制,导致肿瘤发生。因而 PKC 通路在细胞调节中有着极其重要的意义^[22]。

系很复杂),诱导或改变基因表达,最后发挥其效应。本文主要谈两点: 一、IFN 刺激的基因表达。二、2-5A 系统及其生物功能。

IFN 刺激的基因表达

1. IFN 刺激表达的基因

早期的实验证明 IFN 发挥生物功能依赖对蛋白质生物合成的抑制,但对细胞内某些 RNA 和蛋白质的生物合成则起促进作用。现在知道 IFN 刺激的某些基因的表达是其发挥

参 考 文 献

- 1 刘建军,崔肇春,生物化学与生物物理进展,1988; 15:422
- 2 Ono Y *et al.* *Science*, 1987; 236: 1116
- 3 Kikkawa U *et al.* *FEBS Lett*, 1987; 217: 227
- 4 Ono Y *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 6927
- 5 Kikkwa U *et al.* *FEBS Lett*, 1987; 223: 212
- 6 Ohno S *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 2093
- 7 Ono Y *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1988; 16: 5199
- 8 Ohno S *et al.* *Cell* 1988; 53: 731
- 9 Nagle DS, Blumberg PM. *Cancer Lett*, 1983; 18: 35

- 10 Monchy-Rosen D *et al.* *PNAS USA*, 1987; 84: 460
- 11 Saito N *et al.* *J Neurosci*, 1988; 8: 340
- 12 Hashimoto T *et al.* *J Neurosci*, 1988; 8: 1678
- 13 Kosaka Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 151: 973
- 14 Shearman MS *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1988; 16: 307
- 15 Hidaka H *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 4523
- 16 Shearman MS *et al.* *FEBS Lett*, 1988; 234: 387
- 17 Asaoka Y *et al.* *FEBS Lett*, 1983; 231: 221
- 18 Housey GM *et al.* *Cell*, 1988; 52: 343
- 19 Persons DA *et al.* *Cell*, 1988; 52: 447
- 20 Young S *et al.* *Eur J Biochem*, 1988; 173: 247
- 21 Nishizuka Y. *Science*, 1986; 233: 305
- 22 Nishizuka Y. *Nature*, 1988; 334: 601

[本文于1989年4月12日收到]