

PK-C 的研究进展

刘建军*

崔肇春

(江苏徐州第二卫校生化组)

(大连医学院生化教研室)

提 要

蛋白激酶 C(PK-C), 一种独特的磷脂敏感性, Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶。它广泛传递多种细胞外信息通过细胞膜, 调节细胞内许多依赖于 Ca^{2+} 的代谢过程。无论是在细胞释放、溶解、膜运输、受体的增效与去敏、平滑肌的收缩, 还是在调控细胞分化、增殖、癌变的过程中都起着关键性的作用。

Stanley Cohen 主要由于发现了表皮生长因子(EGF)而获得了1986年诺贝尔生理学、医学奖。现在知道, EGF 刺激细胞增殖的能力除与活化它本身的受体酪氨酸蛋白激酶外, 还与另一种蛋白激酶的活化密切相关^[1]。这个酶正是蛋白激酶 C。激酶催化蛋白质磷酸化反应是蛋白质发挥广泛生物学作用的一条重要途径。自六十年代后期 cAMP 依赖性蛋白激酶(A-PK)被发现以来, cGMP 依赖性蛋白激酶(G-PK), 钙-钙调蛋白依赖性蛋白激酶(PK- Ca^{2+} -CaM), 以及八十年代初酪氨酸蛋白激酶(T-PK)相继被发现, 对于它们在细胞反应中的重要调节作用受到关注和重视, 深入研究正在进行。但近二年来, 尤以 PK-C 的研究取得了令人瞩目的进展, 它与其它几类蛋白激酶的作用也有着密切联系。国内从事 PK-C 研究单位屈指可数, 有关报道不太多见。本文概述了该酶近二年来在各方面的研究进展。

PK-C 的发现、分布及特性

Takai 1977 年^[2]第一次从牛的小脑组织中获取这个酶。二年后, Takai 又进一步证明它是一种用 Ca^{2+} 刺激, 磷脂依赖性蛋白激酶。它广泛分布在动物的各种组织中, 以脑和脾脏的含量最高。除脑组织外, 可从其它组织细胞的

可溶性部分获取该酶, 并且是以无活性的形式存在。当细胞受到刺激时, 酶以依赖于 Ca^{2+} 的方式明显移位结合在细胞膜上。用鼠 C₃H, 10T1/2 细胞试验, 可看到酶在胞质与膜之间转移定位, 其效应与细胞增殖密切相关。White 最近报道在由佛波脂(Phorbol ester)和 Ca^{2+} 载体 A23187 引起的 RBL-2H₃ 细胞的降解过程中, 酶的这种转移定位的现象非常明显^[3]。用赤霉素处理植物细胞(马铃薯茎)可使胞质中酶大大减少, 与细胞膜结合的酶显著增加。植物激素的作用可能与此效应有关^[4]。PK-C 的准确亚细胞定位尚不清楚, 因为在提取过程中存在着高浓度的 Ca^{2+} 螯合剂。最近用高度纯化酶的单克隆抗体免疫细胞化学法对鼠脑各种细胞分析结果表明: 酶的亚细胞定位随细胞种类不同而异, 但在细胞核中极少含有或完全没有^[5]。纯化酶的方法步骤都较复杂, 费时, 得率低。用脾的 PK-C 单克隆抗体免疫化学亲和层析法制备此酶得率较高。从心脏, 脑, 脾等不同组织提取的酶都已纯化成匀质, SDS-PAGE 显示出一条区带。各种组织来源的酶的分子量有不同(MW. 72,000—82,000), 均由一条多肽链组成, 其催化特性并无不同。对 PK-C 的

* 现为大连医学院生化教研室研究生。

cDNA 克隆分析表明,有三种分别称为 α , β , γ 的三种 PK-C 的同工酶,三者的 mRNA 表达具有严格的组织特异性^[6]。PK-C 的基因可能是多重的,对鼠脑 PK-C 克隆分析表明,C 末端催化部分有 224 个氨基酸与 A-PK, G-PK 具有 40% 的同源性^[7]。

PK-C 的激活机制及激活剂与抑制剂

最早报道酶的激活是被一种 Ca^{2+} 依赖性中性蛋白酶水解所致。无活性的酶原水解后产生一个不依赖于 Ca^{2+} 、磷脂和甘油二酯,并具有催化活性的分子量为 51000 的片段。在 Ca^{2+} 存在下,磷脂中以磷脂酰丝氨酸的激活作用最大,而鞘磷脂和脑苷脂对酶则无激活作用。这暗示,磷脂在膜上的不对称分布可影响酶的活性。至今已发现很多酶的激活剂和抑制剂(见表 1)。无论是在细胞还是亚细胞水平,促瘤剂佛波酯 TPA(12.0-tetradecanoyl phorbol-1.3acetate) 已公认为酶的特异性激活剂。体外实验表明,仅仅表现肿瘤促进活性的佛波酯衍生物才是酶的有效激活剂。在研究 PK-C 激活机制中, Bazzi^[9] 最近得出三点结论 ①磷脂的选择性与底物和磷脂相互作用特性有关。②PK-C 的最适底物是膜结合蛋白质。③选择的实验条件不同,即使是用一种底物也可能获得相反结果。目前尚未发现酶的特异性抑制剂。早二年已证明一些与膜磷脂相互作用的药物如氯吩嗪、丙咪嗪、酚妥拉明、的卡因等都能不同程度抑制酶,但这类药物也能抑制 PK- Ca^{2+} -CaM。一些抗精神病药物如三氟吡哪嗪,氟非啦嗪,羟哌氟丙嗪等也能有效地抑制 PK-C,但上述药物早已公认为一类 CaM 拮抗剂。而且有报道说 CaM 本身还能抑制 PK-C。在嗜硷性细胞中, PK-C 抑制剂 H_7 , H_8 能抑制 TPA 引起的组胺释放,而对由 CaM 拮抗剂 W_7 , Ca^{2+} 载体 A23187 引起的组胺释放无抑制效应^[10]。提示这两类拮抗剂可能作用于不同的生化通道。多胺对 PK-C 的抑制作用可能具有某种生理意义,因细胞内多胺浓度很高(1—10 mmol/L), PK-C 受多胺抑制作用是否与细胞

生长分化有关仍需进一步了解。新近发现的抑制剂有从牛脑中分离获得的一种热稳定性 40 KD 蛋白;白血病淋巴细胞中的一种能抑制白细胞增殖的抑制蛋白及从微生物中获取的 K252a^[11],后者能在 TPA 刺激的血小板中抑制血小板和 40KD 蛋白的磷酸化和 5-HT 的分泌。一些抗癌药物如 ALP(Ackynsopholip)和 Tamoxifen 等都是酶的抑制剂,药物的抗肿瘤作用可能与抑制 PK-C 有关^[12]。仅仅用亲脂性来解释酶的抑制和激活作用是不完全的,好几类抗白血病药物都能抑制 PK-C 底物蛋白的磷酸化。这暗示,酶可能有与药物作用的其它部位。PK-C 激活剂、抑制剂的结构-活性关系的研究也将对抗肿瘤药物的研制及临床应用提供新的理论指导。

表 1 PK-C 的激活剂和抑制剂

激活剂	抑制剂	抑制剂
Ca^{2+}	TFP	Diaminodecane
$\text{Sr}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$	W7/W5	Alkyllysophospholipid
$\text{La}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$	R-24571	Tamoxifen
phorbol ester	Adriamycin	H7/H9
DG/PS	PolymyxinB	CP-46.655-1
PI/PA	cytotoxinI	多胺
conA.	cytotoxinA-IV	肝素/棕榈脂
compd. 48/80	Palmitoylarnitine	肉毒硷/视黄酸
	Spermine	牛脑 40KD 蛋白
	K252a	Tamoxifen

PK-C 的生理意义

一、PK-C 与细胞信号通道 各种细胞外信号如激素,神经递质等都可能通过二条途径从细胞表面进入细胞内,这就是 PK-C 的激活和 Ca^{2+} 的动员。由于一种信号配体和一种受体的相互作用而使这两条途径变得非常有效而引起随后发生的细胞内种种反应^[13]。近二年来,愈来愈多的证据表明,是依赖于信号的 4,5 二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP_2) 被分解产生的甘油二酯 (DG) 和三磷酸肌醇 (IP_3) 激活了上述二条信号传递途径。正是 DG 活化了 PK-C,而 IP_3 则立即介导了 Ca^{2+} 的动员。DG 和 IP_3 目前也被认为是两种新的第二信使,它们广

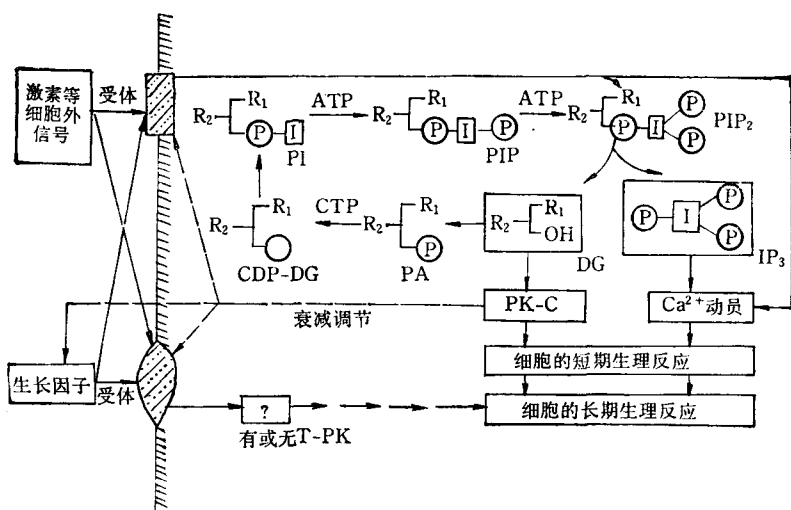


图1 肌醇磷脂转换和信号传递引起细胞生理反应

I: 肌醇 PI: 磷脂酰肌醇 PIP: 4-磷酸磷脂酰肌醇 PIP₂: 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 DG: 甘油二酯 @: 磷酸基团 R₁, R₂: 脂酰基

泛参与调控细胞种种代谢过程。特别是 EGF 和某些癌基因产物也能影响肌醇磷脂代谢来调控细胞增殖与癌变，这也是近二年来研究的热门课题之一。钙调蛋白 (CaM) 系统的广泛多功能调节细胞反应需要胞内 Ca^{2+} 升高到微摩尔水平, (Ca^{2+} 的基础水平为 $10^{-6} - 10^{-8} \text{mol/L}$) 而 IP_3 动员内质网 Ca^{2+} 的作用正好发生在 CaM 被激活之前。看来两者作用密切相关, 承先启后。所以说到第二信使, IP_3 则应排在 Ca^{2+} 之前。诚然, 引起 Ca^{2+} 动员的机制不止一种, 但 Ca^{2+} 信号和 DG 信号都是短暂易逝的, Ca^{2+} 可被 Ca^{2+} -ATP 酶及 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白迅速将

Ca^{2+} 逐出, 部分 Ca^{2+} 重吸收入钙池而维持胞内 Ca^{2+} 的平衡。DG 则可被 DG 激酶和脂酶进一步转换和降解。由两者介导的两条信号通道在调控细胞功能中都是必不可少的, 在信号跨膜传递时常表现为协同作用, 有时却相互独立, 互不干涉。

二、调节质膜的功能 有证据表明, PK-C 可使离子通道、离子泵、离子交换蛋白等膜蛋白磷酸化来调节离子的运转和细胞的增殖 (图 2), 也有人观察到一旦酶被激活, 立即出现 Ca^{2+} 的逐出作用。在心肌细胞内质网实验中可观察到 Ca^{2+} -ATP 酶可能就是 PK-C 的靶分子, 由

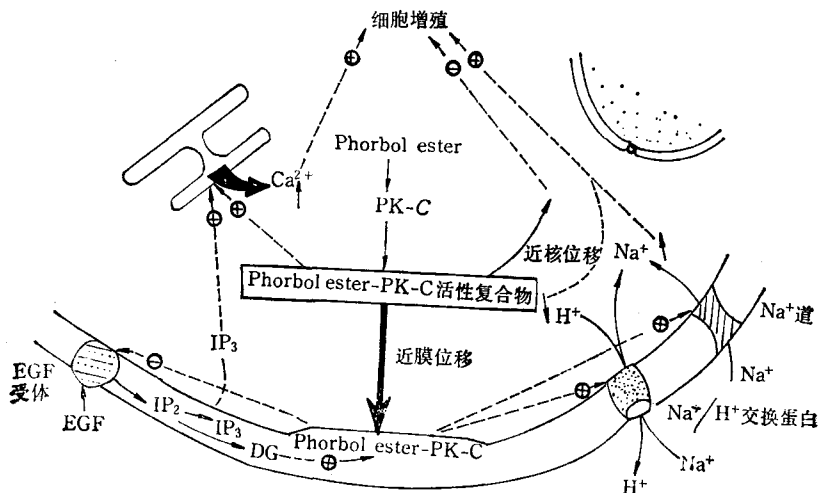


图2 PK-C 调节质膜的作用与细胞增殖关系

于 PK-C 的激活而促进了 Ca^{2+} 的动员和细胞增殖。PK-C 也参与促进 Ca^{2+} 进入神经细胞的作用,微量佛波酯或酶进入袋状神经细胞可以观察到 Ca^{2+} 流电位敏感性的增加及 Ca^{2+} 通道的复活。活体注射佛波酯和酶于猫的脊髓运动神经元,可促进由 Ca^{2+} 介导的 K^+ 流和快速的 Na^+ 流^[4]。 Na^+/H^+ 交换蛋白则明显表现出是佛波酯或可渗透性 DG 激活的另一个靶分子,因此酶也能增加细胞原生质的 pH。尤其有趣的是磷酸化了的 PK-C 膜蛋白底物还能拮抗磷酸酶的作用,而使磷酸化作用的效应持续一段更长时间。这样由 Ca^{2+} 发动的生理效应

则可由 PK-C 的作用而持续,从而维持细胞的长期生理效应。

三、与其它受体相互关系和衰减调节(Down Regulation) 细胞的信号系统在各种组织中都存在着广泛的差异性。但大部分组织看来至少有两类主要的受体传递信息横穿细胞膜。一类与触发 cAMP 的产生有关,另一类则引起了肌醇磷脂的转换及 Ca^{2+} 的动员。对于细胞反应则可以粗分为好几种模式(图 3),在许多组织的双直接控制系统中,上述两类受体显示出相互中和作用。而在单直接控制系统中,一类受体则可以加强另一类受体的作用。

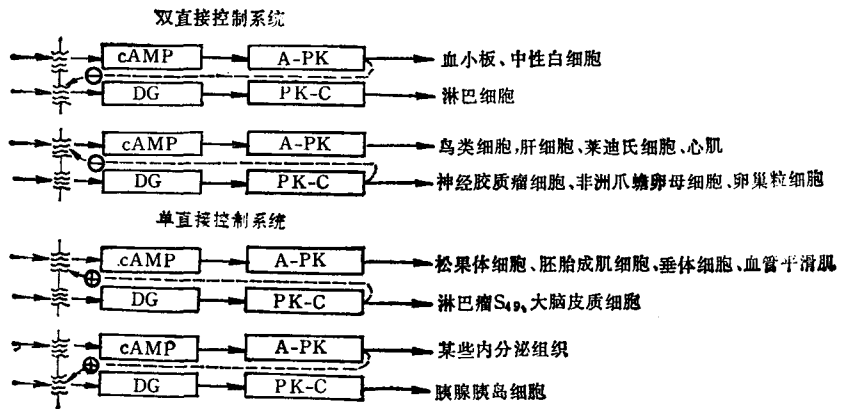


图 3 两类信号传递系统的相互作用模式

在生物调节系统中,正常情况下负反馈调节紧随在正的信号之后发生,从而防止细胞的反应过度。PK-C 的一种主要的功能是明显地与膜表面受体的负反馈调节相关,这种调节又称为衰减调节。从肝细胞和平滑肌的研究证据表明:PK-C 对肾上腺素受体和血管紧张素 II 的作用均表现出负的调节作用。酶使 EGF 受体磷酸化后而导致受体结合 EGF 活性下降可能也属于这种调节机制。在用佛波脂 PDBU (Phorbol, -12,13-dibutyrate) 处理主动脉平滑肌细胞实验中,TPA 却不能引起 DNA 的合成,也不能抑制由 WBS 引起的 DNA 的合成,显然,PK-C 的这种灵敏的衰减调节起了某种作用^[45]。促癌剂佛波酯显著地减少 EGF 和许多正在进行有丝分裂的细胞的结合,这可能也

与酶的这种衰减调节有关。

PK-C 的底物蛋白与生理效应

PK-C 有着广泛特异的底物蛋白,在体外实验的基础上至今已确定包括有 EGF 受体、白细胞介素 II 受体等各种受体、 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^+/K^+ ATP 酶等膜蛋白、肌钙蛋白、微管蛋白等细胞骨架蛋白,以及各种酶类和某些致癌病毒等四十种以上的底物蛋白。从而证明 PK-C 对包括有内分泌系统、外分泌系统、神经系统、肌肉系统及各类细胞体系发挥着广泛的调节细胞反应的作用。酶的底物蛋白也严格不同于 A-PK, G-PK, T-PK, 及 PK-Ca^{2+} -CaM 的底物。近年来有报道说酶还可使癌基因产物 PP60^{src} 蛋白磷酸化,后者不仅具有 T-PK 活

性引起细胞恶变,而且还能使 PI 磷酸化促进肌醇磷脂代谢产生 DG 而进一步活化 PK-C^[6]。现在知道至少有七种致癌基因产物具有特异的 T-PK 活性。这些肿瘤蛋白与肿瘤发生和生长关系也是当前研究的热门课题。因此探索 PK-C 与致癌基因表达产物之间的关系无疑也具有重要意义。某些原癌基因如小鼠肉瘤病毒 (c-fos) 及可以引起人类淋巴瘤的雏鸡白血病病毒 (c-mys) 也都是 PK-C 作用的靶分子。有趣的是这两种原癌基因都定位于细胞核中。酶的磷酸化作用对于致癌基因表达与肿瘤发生之间的关系仍有待于进一步了解。存在于急性单核细胞性白血病中的两种分子量分别为 73KD 和 51KD 的 PK-C, 它们的内源性底物蛋白曾受到人们关注, 它们是否就是肿瘤蛋白及在白血病发生中的作用仍不清楚。通常 PK-C 和 A-PK 都沿着细胞的不同信号通道传递信息, 两者对底物蛋白磷酸化作用的位点也不同。如 PK-C 使小鼠肝糖元合成酶磷酸化的位点以及被磷酸化后的效应明显不同于被其它激酶的磷酸化。磷酸化后的糖元合成酶并

没失去活性,有趣的是还可阻止 A-PK 和 PK-Ca²⁺-CaM 及磷酸酶激酶的进一步磷酸化^[47]。用一种人工合成的七肽研究表明, 缺乏 6 位酪氨酸残基, 即使是同一种酶也不能使 4 位丝氨酸残基磷酸化。这表明磷酸化位点附近的氨基酸顺序是个关键因素^[48]。最近用糖元合成酶, 核糖体 S₆ 蛋白及 EGF 受体的多肽类似物作 PK-C 底物的体外实验也得到这种相同的结果。另外 PK-C 还可使胰岛素受体的 β 亚基磷酸化, 从而减少后者的 T-PK 活性; PK-C 还通过对 CaM 依赖性蛋白磷酸酶的磷酸化来调节后者的去磷酸化效应; 通过对肌球蛋白轻链激酶的磷酸化来抑制皮肤血管平滑肌的收缩^[49]。

PK-C 与 DG, 肿瘤促进剂和细胞癌变

甘油二酯活化 PK-C 的报道较多, DG 的结构活性研究表明至少有一条不饱和脂酰基的甘油二酯才具有活性。某些人工合成的 DG 如 1-油酰基-2-乙酰基甘油可以容易地插入完整细胞膜直接激活酶。某些佛波酯如 TPA, PMA

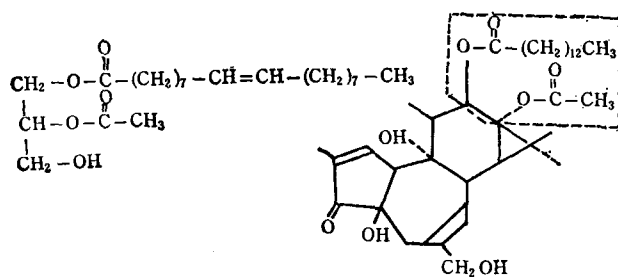


图 4 合成的 DG 与肿瘤促进佛波脂 TPA 的结构

等都是肿瘤促进剂。

TPA 分子上有一个类似于 DG 的结构, 如图 4 虚线方框所示。无论是在体内还是体外实验 TPA 都可以直接激活 PK-C。到目前为止的种种实验证据表明, PK-C 本身就是 TPA 的受体, 酶和 TPA 结合后大大增加酶对 Ca²⁺ 和磷脂的敏感性, 引起酶在生理 Ca²⁺ 浓度下就被激活, 动力学分析表明, 这种激活作用类似于 DG。低浓度的 TPA (0.01 μ mol/L 或更少) 就

能取代 DG。在人白血病 HL60 等细胞系中用免疫细胞化学分析法可以看到 TPA 与酶结合成 TPA-酶活性复合物后向细胞膜位移, 并结合于膜上, 从而诱导 HL60 细胞的分化与成熟^[20]。有关酶的这种作用模式也有人提出了一种新的流动受体学说。佛波酯和 DG 作用的差别是前者很难降解, 后者易消逝。目前还没有足够的证据说明 PK-C 就是佛波脂的唯一靶分子。近二年来引人注目的是表皮生长因子的

受体是一种特异的酪氨酸蛋白激酶,后者能使某些组织细胞膜上的肌醇磷脂磷酸化,促进肌醇磷脂代谢产生 DG 而活化 PK-C^[21]。有意义的是活化的 PK-C 又可使 EGF 受体磷酸化,从而使 EGF 与受体的结合活性减少。这样看来,PK-C 的活化与 EGF 和 TPA 关系密切,后者表现的促进细胞增殖及促癌作用似乎都要通过激活 PK-C 来实现。最近有人却在小鼠主动脉平滑肌细胞实验中观察到,TPA 通过激活 PK-C 抑制了血小板衍生生长因子(PDGF),全血清(WBS),和 EGF 三者引起的 DNA 的合成^[22]。这表明,酶不仅有促进细胞增殖的作用,还具有拮抗细胞增殖的作用。Kolota 曾指出种种生长促进物质最起始的活动都是使蛋白质磷酸化。TPA 可能也是以这种方式发挥肿瘤促进作用。因此进一步研究 PK-C 与促癌剂佛波酯促癌机制之间的关系对于揭示细胞分化,增殖,癌变的机制都非常有意义。

PK-C 的意义和前景

有关 PK-C 的研究报道国外近二年来有如雨后春笋,尤以酶与细胞分化、增殖及癌变的关系的研究引人瞩目。某些生长因子,肿瘤促进剂,癌基因产物都可能通过干扰膜磷脂酰肌醇转换系统来影响酶的活性,或是改变酶与膜的结合等共同作用机制来调节细胞生长,肿瘤发生及肿瘤促进作用^[23]。Haddock 最近报道酶与催乳素受体结合可刺激淋巴瘤细胞的有丝分裂作用^[24]。目前仍不清楚的是 Ca^{2+} , 磷脂是如何与酶相互作用而导致酶的激活,许多底物蛋白被酶磷酸化后的效应仍有待于进一步了解。另外由受体介导的肌醇磷脂转换机制仍不明确,有可能 GTP 和它的受体蛋白也参与了这个过程。看来现在讨论 Ca^{2+} 的功能与 PK-C 功能两者之间的关系还为时过早,因为每一种信号通道都起着各种各样的作用。尤其由 PK-

C 催化的磷酸化后引起的效应对种种由 Ca^{2+} 介导的细胞反应都产生重要的调控作用。进一步探索 PK-C 的作用机制及酶的底物蛋白磷酸化后的生理效应对于我们深入了解细胞信号传递的生化基础,揭示细胞分化,增殖与癌变的机制都有不可估量的重要意义。

参 考 文 献

- [1] Cochol. C.: *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 2553.
- [2] Takai, Y.: *J. Biol. Chem.*, 1977, **252**, 7603.
- [3] White, K. N. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, 1987, **15**, 700.
- [4] Ladyzhenskaya, E. P. et al.: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 1987, **292**, 763.
- [5] Mochly-Rosew Daria, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, **84**, 4660.
- [6] Ohno, Shigeo C. et al.: *Nature*, 1987, **325**, 161.
- [7] Housey, Gerard M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, **84**, 1065.
- [8] Myung, L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 14867.
- [9] Mohammad, D. et al.: *Biochemistry*, 1987, **26**(16): 5002.
- [10] Thueson, D. O. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, **144**(2), 732.
- [11] Yamada, Kojii et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, **144**(1), 35.
- [12] Horgan, K. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 1986, **35**, 4463.
- [13] Nishizuka, Y. et al.: *Science*, 1984, **225**, 1365.
- [14] Zhang, L.: *Neurosci. Lett.*, 1987 **77**(3), 287.
- [15] Kariya, K. et al.: *FEBS Lett.*, 1987, **219**(1), 119.
- [16] Gould, K. L. et al.: *Cell*, 1985, **42**, 849.
- [17] Nakaba, Yashi, H. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, **252**(1), 81.
- [18] Knodo, Hiroki et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, **142**(1), 155.
- [19] Inagaki, Masaki et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, **254**(1), 136.
- [20] Girard Peggy, R. et al.: *Cancer Res.*, 1987, **47**(11), 2892.
- [21] Miwako, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, **129**, 375.
- [22] Kariya, K. et al.: *FEBS Lett.*, 1987, **217**(1), 67.
- [23] Anderson, W. B. et al.: *Contrib. Oncol.*, 1986, **23**, 17.
- [24] Russen, D. et al.: *J. Immunol.*, 1987, **138**(1), 276.

[本文于 1987 年 8 月 22 日收到]