

蛋白激酶 C 蛋白质抑制剂对细胞增殖的影响

王盛武 于秉治

(中国医科大学生物化学教研室, 沈阳 110001)

提 要

在生物体内许多不同组织细胞中陆续发现存在有蛋白激酶 C(PKC) 的内源性蛋白质类抑制剂。应用某些 PKC 抑制剂所作的研究结果表明, PKC 抑制剂能够促进神经母细胞瘤细胞的分化, 促进脑损伤后轴突的再生和功能的恢复, 抑制细胞的生长, 特别是对癌细胞的生长抑制和细胞毒性尤为明显, 而在精子中发现的 PKC 抑制剂可能在受精或受精卵发育过程中起某种十分重要的作用。

关键词 蛋白激酶, 磷酸化, 抑制剂

由于蛋白激酶 C(PKC) 广泛地参与肿瘤的促进作用、癌基因激活、蛋白质磷酸化、信号转导过程中的反馈机制和细胞对生长因子的应答等过程, 国际上, 已把注意力集中到寻找这种蛋白激酶的抑制剂上来^[1]。并且发现某些抗癌药物本身(如 ALP: ackynsopholip 和 tamoxifen) 就是 PKC 的抑制剂^[2]。

1 PKC 内源性蛋白质类抑制剂的发现、分布及特性

有关 PKC 抑制剂的报道很多, 许多是合成的化合物, 如: 氯丙嗪(chlorpromazine) 三氟吡啶(trifluoperazine), Tamoxifen, 氨基吡啶(aminoacridines), 氨磺酰异喹啉(isoquinolinesulfonamides) 和各种合成的肽, 也有一些是从生物分离得到的, 如亚德里亚霉素(adriamycin)、(神经)鞘氨醇(sphingosine)、桑吉瓦霉素(sangivamycin)、伴刀豆球蛋白 A(concanavalin A)、defensins、staurosporine 等等^[3]。值得注意的是许多内源性蛋白质类抑制剂也相继被发现。Schwantke 和 Lepeuch 报道鼠脑中有一种 PKC 的蛋白质类抑制剂, 其分子量为 20000, 存在于可溶性组分中。这种抑制剂对热和蛋白酶敏感, 在酸性环境中相对稳定并直接与组蛋白竞争^[4]。Mcdo-

nald 和 Walsh 从牛脑中发现了一种 PKC 的抑制剂, 其分子量为 17000。并证明其是一种 Ca^{2+} 结合蛋白, 在某些方面与钙调蛋白相似, 但其抑制活性更强^[5]。对这种抑制剂的研究较多, 其一级结构已被确定下来。计算分子量为 13690, 含有 125 个氨基酸残基^[3]。此后, Huch 等人又从牛脑中分离出一种 40 kD 的热稳定性蛋白质, 对 PKC 有抑制作用^[6]。Balazovich 等在人的嗜中性白细胞中发现了一种 PKC 的内源性抑制剂, 这种抑制剂主要与颗粒性膜相联系并对蛋白酶和热敏感^[7]。Nagata 等在肥大细胞瘤 P-815 的细胞中发现了两种 PKC 的抑制剂, 一种是蛋白质, 分子量为 64000 其抑制活性较弱但对 PKC 特异。另一种分子量为 23000, 不象是一种蛋白质, 其既抑制 PKC 也抑制 cAMP 依赖性蛋白激酶^[8]。此外钙调蛋白、肌钙蛋白 C 和 S-100 蛋白质也被发现能够抑制 PKC^[9]。某些实验现象还表明内源性抑制剂可能存在于人类血小板、前骨髓细胞白血病细胞及大鼠心肌中^[8]。我们对血小板提取液的研究也证实了这一点。最近, M. E. Kathleen 在假孕大鼠卵巢中发现了一种 PKC 的内源性抑制剂^[9]。1989 年于秉治等人从牛精子中发现

并纯化出一种 PKC 的蛋白质抑制剂, 经过一系列的实验研究表明, 该抑制剂无蛋白水解酶、磷酸酶活性, 抑制作用也不是由于干扰底物作用而来。通过 Line-Weaver-Burke 曲线分析表明, 它对 PKC 的活性呈反竞争性抑制, 并证明其作用位点在 PKC 分子的催化区。用聚丙烯酰胺凝胶电泳测得其分子量为 63000 左右, 等电聚焦电泳测得其等电点为 pH 4.5 左右, 进一步用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对其测定时发现, 在分子量约为 15600 左右的地方有紧紧靠近的两条带, 因而, 很可能该抑制剂是四聚体^[10]。应用放射自显影法研究该抑制剂对输精管平滑肌中 PKC 内源性底物磷酸化的影响, 结果表明, 它对 51kD 蛋白质的磷酸化有选择性抑制作用。从而证明该 PKC 抑制剂无论在体外还是在体内都能明显抑制 PKC 的活性。

2 PKC抑制剂对细胞分化及增殖的影响

关于 PKC 内源性蛋白质类抑制剂的生物学作用研究不多, 因为它不象其它试剂(如氨磺酰异噻啉等)能容易地穿透细胞膜。蛋白质类抑制剂的输送需要显微注射等特殊的技术, 不过, 我们可以通过对一些易透过细胞膜的小分子 PKC 抑制剂生物学作用的研究, 对 PKC 内源性蛋白质类抑制剂在细胞中可能的生物学作用有一个大致的了解。现仅就 PKC 抑制剂对细胞分化及增殖的影响简介如下:

F. Vicente elipo 等人报道, H-7 (已知较特异的 PKC 抑制剂)能够明显诱导神经 2a 细胞形态和功能的分化, 这表现在轴突/细胞数和乙酰胆碱酯酶活性的显著增加。他们认为由于佛波醇酯能诱导 PKC 的向下调, 因而某些研究所报道的佛波醇酯诱导轴突形成可能是 PKC 活性抑制的结果^[11]。值得注意的是能抑制 PKC 活性的神经节苷脂不但能够在许多细胞系中诱导轴突的形成, 并且还能加速在体内脑损伤后轴突的再生和功能的恢复^[12]。这对于神经再生的研究, 无疑, 将具有十分重要的意义。

D. D. Peter 等人发现, Staurosporine 和它的类似物 K_{252a} 能够阻断完整细胞(血小板和 T 细胞)的 PKC, 并且阻止单核细胞对白细胞介素 2 (IL2) 的增殖反应^[13]。

L. S. Victoria 等人的研究结果表明: 长链(sphingoid)碱对中国仓鼠卵巢细胞的生长抑制和细胞毒性作用可能是 PKC 抑制的结果^[14]。另据报道, PKC 抑制剂如棕榈酰肉碱(palmitoylcarnitine), S-taurosporine, H-7 都能抑制 HL-60 细胞的生长并具有细胞毒性^[15,16], 因此, 生长抑制和细胞毒性可能是对 PKC 抑制作用的共同反应^[14]。

Tamoxifen 作为一种独特的抗癌剂能够抑制乳腺癌的生长, 且副作用较小。虽然 Tamoxifen 已经应用了 20 年, 它的作用方式一直不清楚。随着 PKC 在肿瘤促进过程中所起关键性作用及在体外 Tamoxifen 对 PKC 活性抑制作用的发现和证实, 人们对这一问题有了新的认识, 一系列研究表明, Tamoxifen 对完整细胞中 PKC 功能的抑制可能就是其抗肿瘤作用的主要机制^[17]。

前已述及, 于秉治等 1989 年从牛精子中分离并纯化出一种 PKC 的蛋白质抑制剂。应用此种抑制剂所进行的实验研究表明: 该种 PKC 抑制剂对培养的 L₉₂₉ 细胞和 Hela 细胞的生长增殖有显著的抑制作用, 但对肿瘤细胞的生长抑制作用明显高于非肿瘤的纤维母细胞。并且该抑制作用有细胞周期特异性, 似乎在细胞周期早期阶段的某一时相, 此 PKC 抑制剂的作用更强些。这种抑制剂对细胞生长的抑制作用, 即使在极低的浓度下 (10ng/ml) 也能表现出来, 这提示它在生理环境中, 特别是在精卵结合及其后受精卵发育的过程中可能会起某种十分重要的作用^[17]。

从上可见, PKC 内源性蛋白质类抑制剂广泛存在于许多组织细胞中(包括正常组织细胞, 肿瘤细胞, 精子及卵巢)。由于 PKC 在调控细胞分化, 增殖, 癌变的过程中都起着关键性的作用, 所以应用 PKC 抑制剂来控制细胞的分化, 增殖以及用来治疗癌症都是可能的。上述实验

结果也证实了这一点。而在牛精子中发现的 PKC 抑制剂对于阐明精子成熟,受精及受精卵发育的机制等问题都具有十分重要的意义,例如,在哺乳动物的精子中,主要的核蛋白是富于精氨酸和半胱氨酸的鱼精蛋白,并且鱼精蛋白中所有丝氨酸残基在成熟的精子中都完全脱磷酸。若以这种与 DNA 相结合的鱼精蛋白为底物时,PKC 的活化条件就变得非常简单,既不需要 Ca^{2+} ,也不需要磷脂及甘油二酯。可想而知,如果没有一个抑制因素存在,精子中的 PKC 就可能始终处于活化状态,并很容易使鱼精蛋白磷酸化,从而,促进 DNA 的复制。然而,在正常状态下,只有在受精后当发生了一系列的生理变化后,DNA 才能复制。可见,很可能这种抑制剂直接参与了受精卵发育的调控。有关这一问题尚待深入研究。此外,有关该抑制剂的结构,分布等,也需要进一步探讨^[18]。

总之,在进一步研究 PKC 生物学作用的同时,深入并广泛地研究 PKC 在生物体内的抑制作用及其对细胞分化,增殖的影响,对于揭开

细胞增殖、癌变之谜,促进有关受精卵发育机制、神经再生等方面的研究,无疑,将具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Wennogle L P *et al.* In: Weber G *et al.* eds. *Advance in Enzyme Regulation*. Oxford: Pergamon, 1988; 27: 287
- 2 Horgan K *et al.* *Biochem Pharmacol*, 1986; 35: 4463
- 3 Pearson J D *et al.* *J Biol Chem*, 1990; 265(8): 4585
- 4 Schwantke N, Lepeuch C J. *FEBS Lett*, 1984; 177: 36
- 5 McDonald J R, Walsh M P. *Biochem J*, 1985; 232: 559
- 6 Hucho F *et al.* *FEBS Lett*, 1987; 211: 207
- 7 Balazovich K J *et al.* *J Immun*, 1986; 137: 1665
- 8 Nagata K I *et al.* *Comp Biochem Physiol*, 1988; 90B: 125
- 9 Eyster K M. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 168 (2): 609
- 10 于秉治等. 中国医科大学学报, 1989; 18(4): 241
- 11 Felipe V *et al.* *J Biol Chem*, 1990; 265(17): 9599
- 12 Mahadik S P *et al.* *J. Neurosci Res*, 1988; 20: 479
- 13 Davis P D *et al.* *FEBS Lett*, 1989; 259(1): 61
- 14 Stevens V L *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1990; 1051: 37
- 15 Nakaki T *et al.* *Cancer Res* 1984; 44: 1908
- 16 Matsui T *et al.* *Cancer Res* 1986; 46: 563
- 17 金壮, 于秉治等. 中国医科大学学报, 1989; 18(supper): 5
- 18 于秉治等. 中国医科大学学报, 1989; 18(2): 86

会议通知

第五次全国离心机学术会议征文通知

由湖南仪器仪表厂离心机分厂与我会共同主持召开的第五次全国离心机学术会议,计划于 1993 年秋在湖南省长沙市召开(张家界为分会)。现广泛征集论文。凡在生物学、医学、农林水产、化学化工等领域,有关离心分离技术,用离心力场的实验研究方法,超高速旋转机械等方面的研究论文(含工程学、标准化和管理科学等方面),凡未公开发表或没在学术会上交流过的,均为征集范围。请把 500 字左右的摘要在 1993 年 4 月底以前邮到我会。该会不对任何团体或个人另发邀请。35 岁以下论文作者免收注册费与会务费,此年龄

段者请在论文摘要中注明年龄。信封上请注明“征文”字样。

中国仪器仪表学会

离心机专业委员会

实验室仪器学会

通信地址: 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

中国科学院生物物理研究所 四室

转离心机专业委员会

联系电话: 2020077—561

电报挂号: 北京 2028

传真: 2027837