

- 1977.
- b) Miyoshi, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5473, 1980.
- [20] a) Caruthers, M. H. et al.: in "Genetic Engineering" (ed. by Setlow and Hollaender), Vol. 4, pp 1—17, Plenum Publishing Corporation, 1982.
- b) Alvarado-Urbina, G. et al.: *Science*, **214**, 279, 1981.
- [21] Chow, P. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2807, 1981.
- [22] Cramer, F. and H. Köster: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **7**, 473, 1968.
- [23] Crea, R. and Horn, T.: *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2331, 1980.
- [24] Chattopadhyaya, J. B. and Reese, C. B.: *ibid.*, **8**, 2039, 1980.
- [25] Frank, F. et al.: *ibid.*, **11**, 4365, 1983.
- [26] 汤锦炎等: 《生物化学与生物物理学报》, **13**, 307, 1981.
- [27] 中国科学院上海细胞生物学研究所三室核酸研究组: 《生物化学与生物物理学报》, **10**, 203, 217, 235, 1978.
- [28] a) Stawinski, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **4**, 353, 1977.
- b) Narang, S. A. et al.: *Methods in Enzymology*, **68**, 90, 1979.
- [29] Fritz, H. J. et al.: *Biochemistry*, **17**, 1257, 1978.

[本文于1983年11月21日收到]

蛋白激酶对细胞的正常生长分化及恶性转化的调控

施 产 甫

(南京铁道医学院科研所)

蛋白质转录后的磷酸化/去磷酸化可逆修饰,是调节控制蛋白质的酶学活性或生物学功能的重要途径。使蛋白质磷酸化的酶称为磷酸基转移酶或蛋白激酶。首先发现的是糖元磷酸化酶^[1]。目前已知用磷酸化/去磷酸化方式调节酶活性的酶类达三十多个。蛋白激酶还能催化许多非酶蛋白的磷酸化。多数蛋白激酶的活性是通过与相应特异的调节因子相互作用控制的。这些特异的调节因子常是细胞外信号的接续信使。据此可将蛋白激酶分为如下几类^[2,3]:

1. 依赖 cAMP 的; 2. 依赖 cGMP 的; 3. 依赖钙调节素的; 4. 依赖磷脂的; 5. 非特异性的或不依赖信使的。

以前认为,蛋白激酶仅催化靶蛋白分子上丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化。Eckhart 等^[4]首先发现了多瘤病毒 60K (即分子量 6 万的蛋白质)大 T 抗原上酪氨酸残基被磷酸化的迹象。随后,许多实验室相继报道了酪氨酸残基磷酸化型蛋白激酶(简称 Tyr-P 型蛋白激酶)的活性不但与多种肿瘤病毒基因、细胞原癌基因、特异生长因子有关,甚至还与分化诱导剂二甲亚砜等的生物学作用有密切关系,所以受到人们

的重视。Tyr-P 型蛋白激酶活性的调节一般不依赖 cAMP、cGMP, 磷脂以及钙调节素。其中某些成员(如肿瘤基因产物)尚未发现与何种信使信号有联系,按分类可列入上述的第 5 类。另一些成员则与特异的因子受体复合物发生关系(如生长因子),故无法归入上述的任何一类。本文就最近发现的两类蛋白激酶, Tyr-P 型蛋白激酶以及依赖磷脂的蛋白激酶与细胞的正常发育分化和恶性转化的关系作一概述。

一、Tyr-P 型蛋白激酶与病毒肿瘤基因

Tyr-P 型蛋白激酶的踪迹,首先在一株肿瘤病毒感染的细胞中被发现^[4]。由于磷酸化酪氨酸(Tyr-P)的丰度在正常或被转化的细胞中均只占总磷酸化量的百分之零点几(表 1),而且 Tyr-³²P 和 Thr-³²P 在电泳中的迁移速度很接近,所以,直到 1979 年才发现有 Tyr-P 型激酶活性。

Rous 肉瘤病毒(RSV)的转化基因产物 PP60^{src}是具有 Tyr-P 型激酶活性的代表^[5-8]。RSV 转化的细胞中 Tyr-P 的丰度是未感染细胞的 6—10 倍。这主要是由于细胞多肽的修饰

所致。在转化的小鸡细胞的免疫沉淀提取物中,有一个 50K 的磷蛋白与 PP60^{src} 共沉淀。Tyr-P 也存在于 PP60^{src} 本身(自我磷酸化),在二个磷酸化位点的一个上^[5]。PP60^{src} 尚能使一些外源蛋白质底物(如酪蛋白、肌动蛋白、 α -微管蛋白、 β -微管蛋白、desmin)仅在酪氨酸残基上磷酸化^[6]。用温度敏感突变株 LA29 感染的细胞研究 Tyr-P 丰度的变化,发现当细胞从“限制性”温度(正常表型)移到“允许”温度(转化表型) 60 分钟后, Tyr-P 的丰度便增加到最大值的 60%;而重新移入“限制性”温度 60 分钟后, Tyr-P 的丰度便很快降到接近基础值^[7]。这些数据有力地说明,转化蛋白 PP60^{src} 对细胞多肽的 Tyr-P 修饰是 RSV 转化细胞的一个关键步骤。

经检定, PP60^{src} 及其蛋白激酶活性大部分位于转化细胞膜的内表面上^[8]。

Fujinami 肉瘤病毒 (FSV) 的转化蛋白 P140 是一个融合基因产物,由鸟类肉瘤病毒 (FSV) 的部分 gag 基因和 FSV 特异顺序(与 RSV 的 src 顺序无关)组成。P140 的激酶活性与 PP60^{src} 相似,如不依赖环核苷酸,能磷酸化自身以及外源蛋白质底物^[9]。使用温度敏感病毒株的实验显示, P140 的这种酶活性亦是温度敏感的^[10]。

已证明具有 Tyr-P 型蛋白激酶活性的肿瘤病毒转化基因产物,尚有鸟类肉瘤病毒 PRC II 的 P105、Y-73 的 P90、Abelson 鼠白血病病毒的 P120、Snyder-Pheilen 猫肉瘤病毒的 P185、Gardner-Arnstein 猫肉瘤病毒的 P95 等^[11,12]。有报道指出^[13], FSV、PRC II 和 FeSV (猫肉瘤病毒,即上文的 Snyder-Theilen 株和 Gardner-Arnstein 株)的转化蛋白之间在结构上和免疫学上有相关性;但 RSV、Y73、Abelson 鼠白血病病毒与 FSV/PRCII/FeSV 的转化蛋白之间无同源性,因而认为这些肿瘤病毒中至少有四类特异的 Tyr-P 型转化机制。

必须指出,酪氨酸磷酸化的增加既不是转化的一个普遍机理,也不是转化中不可避免的继发细胞反应。在 Kirsten 肉瘤病毒、Moloney

肉瘤病毒、SV40 病毒转化的小鼠细胞中,感染鸟类髓细胞增生症病毒 MC29 的小鸡胚胎细胞中,多瘤病毒转化的大鼠和仓鼠细胞中,蛋白质上磷酸酪氨酸的丰度并无增加。还有,化学致癌物苯并芘转化的 3T3 细胞和 20-甲基胆固醇转化的两个鹤鹑细胞株中,也无磷酸酪氨酸的增加^[7]。可见肿瘤形成机理的多样性和复杂性。

略有例外的是 Harvey 大鼠肉瘤病毒和 Kirsten 大鼠肉瘤病毒的癌基因 ras^H 和 ras^K。它们属于一个基因属,有很大的同源性。其癌基因的产物为分子量 21K 的蛋白质。P21 亦具有蛋白激酶活性,它以 GTP 或 dGTP 作为磷供体,但不能利用 ATP 或 dATP,没有检出 P21 磷酸化外源蛋白质的活性。P21 本身是磷蛋白,但是它只能催化苏氨酸残基的磷酸化^[14]。可见 P21 与 Tyr-P 型蛋白激酶之间差别很大。P21 虽不属于 Tyr-P 型蛋白激酶,但有材料指出, P21 在某些细胞中的显著升高,与这些细胞的恶性转化有密切的关系^[15,16]。

综上所述,目前已知的十七个不同的急性转化型肿瘤病毒基因中,已经检定并证实能编码 Tyr-P 型激酶活性的有六个,它们是 src, fps, fes, yes, ros, abl。另外能编码非 Tyr-P 型激酶活性的有两个,它们是 ras, fms。六个编码 Tyr-P 型蛋白激酶的癌基因中的四个已被克隆化。并发现它们有显著的结构相似性。在相应于酶催化活性部分的碱基顺序中,有 50% 以上的同源性。

二、Tyr-P 型蛋白激酶与原癌基因

正常细胞中含有微量的 Tyr-P。Tyr-P 虽仅占总磷酸化量的 1/3000 左右(其余为磷酸化丝氨酸和磷酸化苏氨酸),但说明了正常细胞中有一定量的 Tyr-P 型蛋白激酶活性(见表 1)。

在研究肿瘤病毒转化基因的过程中,发现正常细胞中存在与病毒肿瘤基因 V-onc 同类的细胞原癌基因 C-onc^[17]。已知至少有十七个 C-onc 对应于十七类不同的 RNA 肿瘤病毒的 V-onc。C-onc 在细胞 DNA 中以单拷贝顺序存在(ras 基因例外,它构成一个多基因属)。它们的

表 1 正常和转化的细胞中各种磷酸化氨基酸的丰度

细胞株	温度℃	总标记的百分比		
		磷酸丝氨酸	磷酸苏氨酸	磷酸酪氨酸
未感染的细胞	36	92.19	7.77	0.03
未感染的细胞	41	91.42	8.53	0.04
SR-RSV-A 感染的细胞	36	92.48	7.24	0.28
SR-RSV-A 感染的细胞	41	92.73	6.96	0.31
未感染的细胞	38	92.40	7.55	0.04
tdsR-RSV-D 感染的细胞	38	92.22	7.75	0.04
SR-RSV-D 感染的细胞	38	92.02	7.66	0.32

注: SR-RSV: Schmidt-Rucppin RSV 株。td: 转化缺陷型 (引自 Hunter, T. et al.: *PNAS. USA.*, 77, 1314, 1980)

基因顺序在脊椎动物进化中有高度的保守性, 这说明 C-onc 基因产物在生物正常发育分化的过程中具有十分重要的作用^[18]。在正常细胞中已检测到原癌基因中某些成员的转录物。并且, 有的由原癌基因编码的蛋白质也已被证实^[17]。目前认为, 急性转化病毒可能是一种重组物, 其中所含的转化基因来自正常细胞的 C-onc。即 C-onc 被插入到肿瘤病毒的基因组中, 形成了病毒的成份 V-onc^[18]。已发现某些 C-onc 例如 C-src 的产物 pp60^{C-src}, 不但分子大小和化学结构与 PP60^{V-src} 相似, 能紧紧地结合在细胞膜上, 而且具有 Tyr-P 型蛋白激酶活性^[5,7]。已知十七个 V-onc 中有六个能编码 Tyr-P 型蛋白激酶, 因此在正常细胞中也至少有六个不同的 C-onc 能编码 Tyr-P 型蛋白激酶。

三、Tyr-P 型蛋白激酶与生长因子

真核生物体中除激素和促激素外, 尚含有多种生长因子, 如上皮细胞生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、神经生长因子 (NGF)、血小板衍生的生长因子 (PDGF) 等, 它们在调节细胞的增殖分化和细胞间的联络应答方面起重要的作用。其中以上皮细胞生长因子 EGF 研究得最为深入^[19]。

在 A431 细胞 (人上皮样癌细胞株) 中, EGF 能增加数种膜蛋白的磷酸化, 特别是 P170

和 P150^[20]。EGF 对这两个蛋白的磷酸化反应特别强烈, 而且仅对 EGF 特异, 对其他的生长因子和激素均无效。环核苷酸及其衍生物无论在有无 EGF 情况下均不促进 ³²P 的掺入^[21]。为 EGF 所促进的激酶是 Tyr-P 型, 但它也能催化丝氨酸、苏氨酸残基的磷酸化。在加入 EGF 1 分钟内, Tyr-P 的增加便达到峰值, 并能维持数小时。Tyr-P 的增加是已知的细胞对 EGF 的最快速的反应。A-431 的膜制备物尚能磷酸化外源的蛋白质, 如对 EGF 反应敏感的组蛋白。正常人的胎盘和培养的人包皮成纤维细胞膜制备物的内源成份中, 也发现 EGF 能促进 ³²P 的掺入^[20]。EGF 结合活性和激酶活性可以共纯化。目前尚未确定具有激酶活性的究竟是 EGF 受体的一个功能区呢, 还是紧密相连却有区别的种类。有证据表明, EGF 的受体蛋白在结构上与具有 Tyr-P 型激酶活性的 V-onc 产物有联系。

二甲亚砜 (DMSO) 也能选择性地增加大鼠肝微粒体分部中 EGF 受体的磷酸化。并且, 象 EGF 一样, DMSO 选择地刺激受体蛋白上酪氨酸残基的磷酸化。最大刺激作用是在 15—25% 的 DMSO 浓度范围, 其磷酸化的强度和速度与 EGF 相似^[22]。DMSO 是一个多效应性的极性溶剂, 它能诱导 Friend 细胞的分化, 也能提高正常红细胞前体对低剂量的促红素的敏感性, 并能促进人肺细胞和鼠神经母细胞癌细胞的分化^[24]。可见特异的 Tyr-P 型蛋白激酶对正常的或有异常趋向的细胞分化均有重要的作用。

血小板衍生的生长因子 (PDGF) 是另一个能激发 Tyr-P 型蛋白激酶活性的生长因子。PDGF 为分子量约 3 万的多肽, 是所有间充质起源细胞的主要促进生长因子。在相应的细胞表面存在与它高亲和的特异受体。PDGF 能够特异地诱导靶细胞膜上分子量为 130K 和 175K 的膜蛋白上酪氨酸残基的磷酸化^[25]。最近有报道^[26,27], PDGF 与 sis 致癌基因的产物在实质上完全相同。sis 成为第一个生理功能已知的致癌基因。胰岛素与其受体结合后, 也能激活 Tyr-P

型蛋白激酶活性^[22]。究竟胰岛素受体本身就是一个 Tyr-P 型蛋白激酶还是有一个蛋白激酶与胰岛素受体紧密相连,尚有待研究。由于人们对胰岛素的生物学作用已有详细的了解,因此胰岛素受体复合物,是研究磷酸化和去磷酸化引发靶蛋白功能变化的一个较理想的材料。

四、依赖磷脂的蛋白激酶与促癌物

依赖磷脂的蛋白激酶是近几年发现的一类新型蛋白激酶,称为蛋白激酶 C。它普遍存在于真核生物中,严格地依赖磷脂和 Ca^{++} 。不饱和的二酰基甘油能显著增大蛋白激酶 C 的活性,表明此酶活性在体内能被膜结构的改变和磷脂代谢所调节,因而它可能在传递越膜信号方面起重要作用。

许多促癌物主要作用在与细胞膜相连的受体上。已在许多物种和组织中检出 TPA、双菇烯,吲哚生物碱等促癌物的可饱和的,高度亲和的受体。Castagna 等^[28]的实验结果说明,促癌物 TPA 通过与细胞膜上的受体结合并激活蛋白激酶 C 而起作用。没有促癌活性的 TPA 衍生物不能激活蛋白激酶 C。无磷脂存在时,TPA 也不能激活蛋白激酶 C。这些发现很快被进一步证实和发展^[3]。有人推测,蛋白激酶 C 很可能就是 TPA 的受体,或者至少是受体复合物的一部分。而二巯基甘油则可能是这些促癌物的细胞内源类似物。因为细胞与外源促癌物结合后,激活了磷脂酶,促进膜磷脂的更新。而磷脂的中间代谢产物二巯基甘油是蛋白激酶 C 的有效激活剂。由此推测,在肿瘤发生中食物脂的作用可能是通过改变细胞膜的特性来影响蛋白激酶 C 的活性。

综上所述,某些类型的蛋白激酶,特别是 Tyr-P 型蛋白激酶以及依赖磷脂的蛋白激酶;它们在调节细胞生长、分化和细胞间信息交流等方面具有十分重要的作用。另一方面,各种致癌、促癌因素可引起这些蛋白激酶基因的过量或不适当的表达,从而导致细胞内一些关键代谢的紊乱,进而促进或诱发了细胞的恶性变。此假说极好地统一了目前有关细胞的正常发育

分化、化学致癌、促癌和肿瘤病毒学研究方面的知识。问题的核心是,任何情况下,某些关键蛋白质或酶的磷酸化的变化将导致它们的功能或酶学活性的显著改变。

参 考 文 献

- [1] Fische, E. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **216**, 121, 1955.
- [2] Krebs, E. G. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 923, 1979.
- [3] Weinstein, I. B.: *Nature*, **302**, 750, 1983.
- [4] Eckhart, W. et al.: *Cell*, **18**, 925, 1979.
- [5] Hunter, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 1311, 1980.
- [6] Collet, M. S. et al.: *Nature*, **285**, 167, 1980.
- [7] Sefton, B. M. et al.: *Cell*, **20**, 807, 1980.
- [8] Krzyzek, R. A. et al.: *J. Virol.*, **36**, 805, 1980.
- [9] Feldman, R. A. et al.: *Cell*, **22**, 757, 1980.
- [10] Pawson, T. et al.: *Cell*, **22**, 767, 1980.
- [11] Barbacid, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 5158, 1980.
- [12] Van de Ven, W. J. M. et al.: *Virology*, **101**, 185, 1980.
- [13] Beemon, K.: *Cell*, **24**, 145, 1981.
- [14] Shih, T. Y. et al.: *Nature*, **287**, 686, 1980.
- [15] DeFeo, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 3328, 1981.
- [16] Chang, E. H. et al.: *Nature*, **297**, 479, 1982.
- [17] Cooper, G. M.: *Science*, **218**, 801, 1982.
- [18] Bishop, J. M.: *Cell*, **23**, 5, 1981.
- [19] Carpenter, G. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 193, 1979.
- [20] King, L. E. et al.: *Biochemistry*, **19**, 1524, 1980.
- [21] Fernandez-Pol, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 9742, 1981.
- [22] Kola ta, G.: *Science*, **219**, 377, 1983.
- [23] Rubin, R. A. et al.: *Science*, **219**, 61, 1983.
- [24] Friend, C. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1309, 1978.
- [25] Bo, E. K. et al.: *Nature*, **295**, 419, 1982.
- [26] Waterfield, M. D. et al.: *Nature*, **304**, 35, 1983.
- [27] Weiss, R.: *Nature*, **304**, 12, 1983.
- [28] Castagna, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 7847, 1982.

[本文于1983年7月20日收到]