

研究工作

IATPD 对淋巴细胞膜酪氨酸蛋白激酶的抑制作用

张光毅 冯志民* 魏 涌* 赵升皓 俞良莉** 王礼琛**

(徐州医学院生化教研室, 徐州 221002)

提 要

以人工合成的多肽 PGAT 为底物, 鉴定了人外周血淋巴细胞膜 TPK。首次发现 IATPD 对该酶活性有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 约为 $300 \mu\text{mol/L}$; 改变其底物浓度, 测定酶活性并应用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图, 结果表明, IATPD 对该酶活性的抑制作用与 ATP 呈竞争性, 与 PGAT 呈非竞争性。

关键词 人外周血淋巴细胞膜, TPK, IATPD, 竞争性抑制, 非竞争性抑制

自 Hunter 等人^[1]发现酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, TPK) 以来, 现在已知有三种类型 TPK^[2]: 逆转录病毒基因和相应的细胞原癌基因产物, 某些生长因子 (EGF, PDGF, IGF-1 和胰岛素) 的受体和正常组织细胞中的其他 TPK。值得注意的是, TPK 活性低的突变株其转化效率亦低, 而缺乏 TPK 活性的突变株则失去其转化能力^[3]。因此, TPK 在细胞增殖和转化过程中可能起着至关重要的作用。

根据上述观察, 推测 TPK 的抑制剂将可能是有效的抗癌药物, 同时在研究 TPK 的结构与功能及其天然底物的鉴定上也有重要作用。近年来, 已发现氟代硫酰苯甲酰-5'-腺嘌呤核苷 (FSBA)^[4]、氨基吡啶^[5]、懈皮素^[6]和染料木素^[7]等化合物具有拮抗 TPK 活性的作用, 而且 Imoto 等人^[8]已报道某些化合物确实既具有抑制 TPK 活性又具有抗癌作用。

本文以人工合成多肽 Poly(Glu, Ala, Tyr)_n (6:3:1) (PGAT) 为底物, 鉴定了人外周血淋巴细胞膜 TPK, 发现 1-异丙基-6-氨基噻吩并 (3, 4-d) 嘧啶-2, 4-二酮 (IATPD) 与 ATP 竞争抑制该酶活性。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料与试剂

正常人新鲜全血取自徐州市中心血站。

PGAT, Na_3NO_4 , 磷酸丝氨酸, 磷酸苏氨酸, 磷酸酪氨酸和二甲基亚砷 (DMSO) 均系 Sigma 公司产品; 二硫苏糖醇 (DTT), SDS 为 Serva 产品; Tris 为 Merck 产品; 丙烯酰胺和双丙烯酰胺为 Fluka 产品; Triton X-100 为 Rohm-Meas 产品; 纤维素薄层层析薄膜和 X-Omat AR 胶片为 Kodak 产品; Ficoll 系上海试剂二厂产品; (γ - ^{32}P)ATP 北京信通公司产品; Na_2ATP 系本室自制 (含量 84.9%); IATPD 由中国药科大学有机化学教研室提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 人外周血淋巴细胞膜 TPK 的制备参考 Trevillyan 等人法^[9], 略有修改。新鲜全血加终浓度为 0.129mol/L 柠檬酸钠抗凝, 等量 Hank's 液 (pH7.28) 稀释, 用 Ficoll-泛影

* 南京铁道医学院生化教研室。

** 中国药科大学有机化学教研室。

收稿日期: 1991-03-04

葡胺分离液 (12ml 9% Ficoll, 5ml 33.9% 泛影葡胺) 2000r/min, 常温离心 20min, Hank's 液和红细胞溶解液 (0.206% Tris, 0.747% NH_4Cl , pH7.65) 洗涤, 1500r/min, 离心 10min, 收集细胞, 置于匀浆液 [50mmol/L Tris-HCl, pH7.36, 1mmol/L 乙二醇双 (α -氨基乙基) 醚四乙酸 (EGTA), 1.5mmol/L MgCl_2 , 100mmol/L NaF, 0.5mmol/L 苯基甲基磺酰氟 (PMSF), 250mmol/L 蔗糖, 5mmol/L DTT] 中, 超声波破碎细胞, 1000g 离心 10min (4℃), 上清液再经 100000g 离心 90min (4℃), 沉淀溶于少量增溶液 (10mmol/L Tris-HCl, pH7.0, 0.5% Triton X-100) 中, 用作 TPK 活性的测定。

1.2.2 TPK 活性的测定 参照 Trevillyan 等人^[9]和 Kong 等人^[10]法。总体积为 50 μl , 反应体系含有: 20mmol/L Tris-HCl, pH7.0, 50mmol/L MgCl_2 , 25 $\mu\text{mol/L}$ Na_3NO_4 , 0.1% Triton X-100, 50 $\mu\text{mol/L}$ (γ - ^{32}P) ATP (1500cpm/pmol), 2mg/ml PGAT, 5 μg 酶样品。通过加酶样品启动反应, 30℃ 水浴保温 5min, 取 20 μl 反应液滴加在新华 I 号滤纸片 (2cm $\times$ 2cm) 上, 立即将滤纸片投入冰冷的 10% 三氯乙酸 (TCA)-2% 磷酸溶液洗涤两次; 再用冰冷的 5% TCA 溶液洗涤两次, 最后用冰冷的无水乙醇洗涤一次, 每次各 20min。吹干滤纸片, 用液闪计数器测定其放射性强度。

IATPD 溶于 DMSO 中, 当反应体系加入不同浓度该药物时, 以加等量 DMSO 时酶活性为 100%。

1.2.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和放射自显影 SDS-PAGE 按 Leammli 法^[11]。凝胶在 56℃ 1mol/L KOH 溶液中保温 2h, 进行碱处理^[10]。用 X-Omat AR 胶片于 -30℃ 进行放射自显影。

1.2.4 磷酸氨基酸分析 根据放射自显影图谱, 切下含 ^{32}P 标记的 PGAT 凝胶, 重蒸水抽提, 冰冻干燥。加 6mol/L HCl 溶液, 充氮气, 在 110℃ 水解 2h。水洗, 冰冻干燥, 重复一次。用标准磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸和磷酸酪

氨酸 (各 1mg/ml) 混合液溶解所得水解样品, 取 10 μl 点样于纤维素薄层层析薄膜上, 1000 V, 4℃, 在 pH3.5 缓冲液^[1] (吡啶: 乙酸: 水 = 1:10:189) 中, 电泳 60min。60℃ 烘干, 茚三酮显色, -30℃ 进行放射自显影。

1.2.5 蛋白质浓度的测定 按 Bradford 法^[12], 以牛血清白蛋白为标准。

2 结 果

2.1 人外周血淋巴细胞膜 TPK 的鉴定

2.1.1 PGAT 的磷酸化 图 1 表示, 在人外周血淋巴细胞膜 TPK 催化下, 人工合成多肽 PGAT 被磷酸化的放射自显影图谱。



图 1 PGAT 磷酸化的放射自显影图谱
Fig. 1 Autoradiogram of phosphorylation of PGAT by human peripheral blood lymphocyte membrane TPK

1. 不存在 PGAT 时;
In the absence of PGAT;
2. 存在 PGAT 时
In the presence of PGAT

2.1.2 磷酸化氨基酸分析 抽提凝胶中磷酸化的 PGAT, 酸解, 高压电泳后进行放射自显影, 结果表明, PGAT 中的酪氨酸被磷酸化 (图 2)。

由此可见, 人外周血淋巴细胞膜 TPK 催

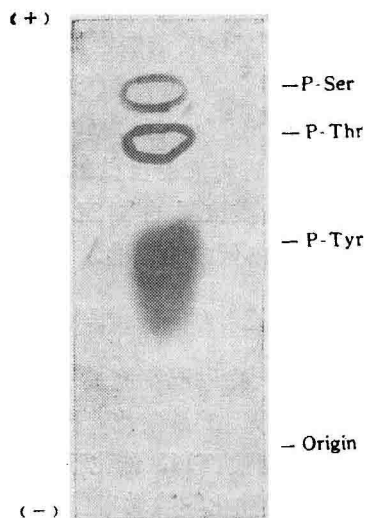


图 2 磷酸氨基酸分析

Fig. 2 Analysis of phosphoamino acid of the phosphorylated PGAT by human peripheral blood lymphocyte membrane TPK
 P-Ser: 磷酸丝氨酸 Phosphoserine; P-Thr: 磷酸苏氨酸 Phosphothreonine; P-Tyr: 磷酸酪氨酸 Phosphotyrosine

化了 PGAT 中酪氨酸磷酸化。

2.2 IATPD 对 TPK 的抑制作用

图 3 表示, 随着反应体系中 IATPD 浓度的增加, 人外周血淋巴细胞膜 TPK 活性逐渐下降, IC_{50} 约为 $300 \mu\text{mol/L}$, 在 1 mmol/L 时, 其活性仅为最大活性的 20%。

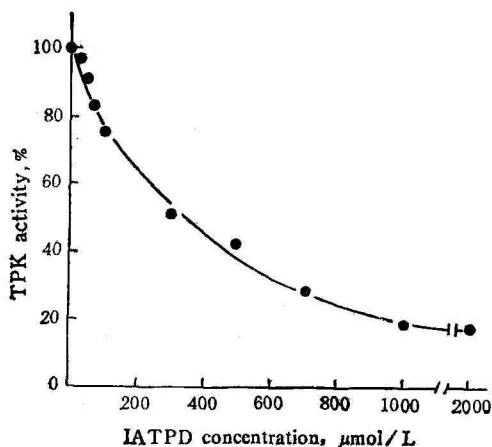


图 3 IATPD 对 TPK 活性的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of the activity of human peripheral blood lymphocyte membrane TPK by IATPD

为了进一步证实 IATPD 对 TPK 活性的抑制作用, 在反应体系中加入不同浓度的 IATPD, 反应终止后进行 SDS-PAGE 和放射自显影, 其结果见图 4。由图 4 看出, IATPD 对

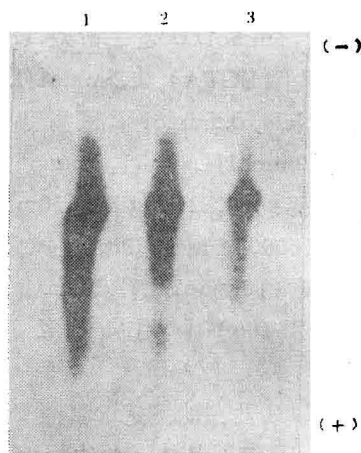


图 4 IATPD 抑制 TPK 活性的放射自显影图谱
Fig. 4 Autoradiogram of the activity of human peripheral blood lymphocyte membrane TPK inhibited by IATPD

IATPD 浓度 ($\mu\text{mol/L}$): 1.0; 2.300; 3.1000
 IATPD concentrations ($\mu\text{mol/L}$) were: 1.0; 2.300; 3.1000.

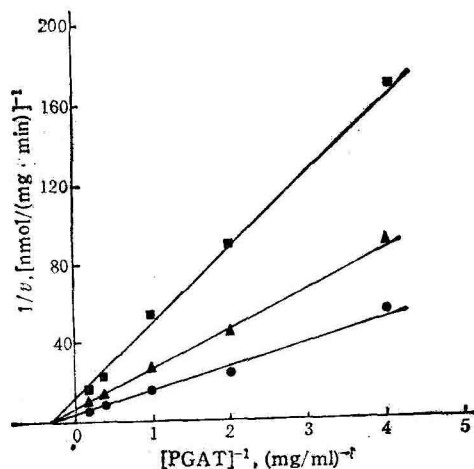


图 5 TPK 起始速度对 PGAT 浓度的双倒数图
Fig. 5 Double reciprocal plots of initial velocities versus PGAT concentrations

ATP 浓度是 $50 \mu\text{mol/L}$.
 ATP concentration was $50 \mu\text{mol/L}$.
 IATPD 浓度 ($\mu\text{mol/L}$): $\bullet$ — $\bullet$ 0; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ 300; $\blacksquare$ — $\blacksquare$ 600
 IATPD concentrations ($\mu\text{mol/L}$) were: $\bullet$ — $\bullet$ 0; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ 300; $\blacksquare$ — $\blacksquare$ 600

TPK 活性的抑制作用呈剂量依赖性。

2.3 IATPD 抑制 TPK 的机理

固定 ATP 浓度, 改变 PGAT 的浓度, 测定在不同浓度 IATPD 时 TPK 活性, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 结果表明, IATPD 对人外周血淋巴细胞膜 TPK 的抑制作用与 PGAT 呈非竞争性(图 5)。

固定 PGAT 浓度, 改变 ATP 浓度, 测定在不同浓度 IATPD 时 TPK 活性, 作 Lineweaver-Burk 双倒数图, 结果表明, IATPD 对人外周血淋巴细胞膜 TPK 活性的抑制作用与 ATP 呈竞争性(图 6)。

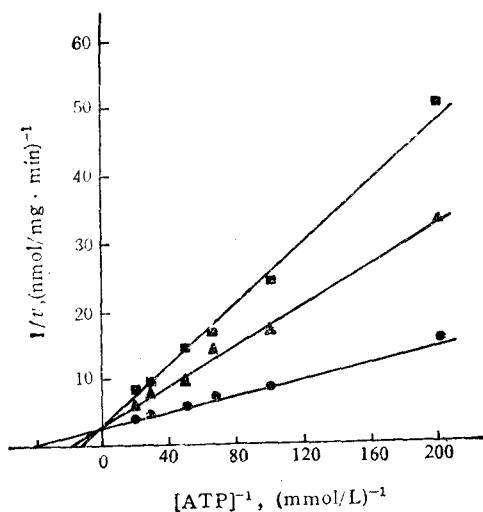


图 6 TPK 起始速度对 ATP 浓度的双倒数图
Fig. 6 Double reciprocal plots of initial velocities versus ATP concentrations

PGAT 浓度是 2mg/ml.

PGAT concentration was 2mg/ml.

IATPD 浓度 ($\mu\text{mol/L}$): $\bullet$ — $\bullet$ 0; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ 150; $\blacksquare$ — $\blacksquare$

350

IATPD concentrations ($\mu\text{mol/L}$) were: $\bullet$ — $\bullet$ 0; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ 150; $\blacksquare$ — $\blacksquare$ 350

3 讨 论

在淋巴细胞中, 目前已经进行鉴定的 TPK 有多种类型, T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞有不同 TPK 组成, 甚至 T 和 B 淋巴细胞本身也各有不同的 TPK, 这些 TPK 之间的关系尚不清楚,

有待进一步研究。但是, 在淋巴细胞中, 研究得较清的 TPK 是 PP56^{lck}, 它是 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞所共有的一种成分^[13]。本文所采用的淋巴细胞是人外周血 T 和 B 淋巴细胞的混合细胞, 因此, 所报道的 TPK 活性应包含这两种淋巴细胞膜的 TPK 活性。据报道^[13], 人外周血淋巴细胞有较高的 TPK 活性, 但是, 淋巴细胞中 TPK 的生理功能还不清楚。有人认为^[13], PP56^{lck} 可能与维系淋巴细胞的分化状态有关, TPK I 和 TPK II 在细胞增殖过程中可能在淋巴细胞周期的调节中具有重要作用。

我们以人外周血淋巴细胞膜 TPK 为靶酶, 筛选了各种药物对其活性的影响, 发现 TPD [噻吩并 (3,4-d) 嘧啶-2,4-二酮] 类对其活性有抑制作用, 其中 IATPD 则有较强的抑制效应。动力学分析表明, IATPD 抑制人外周血淋巴细胞膜 TPK 活性与 ATP 呈竞争性, 而与 PGAT 则呈非竞争性。显然, IATPD 与 ATP 呈竞争性抑制 TPK 活性, 是由于该化合物具有类似嘌呤的结构, 因而能与 ATP 竞争结合 TPK 上的 ATP 结合位点引起的。

参 考 文 献

- Hunter T, Sefton B M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 1311
- Hunter T, Cooper J A. *Ann Rev Biochem*, 1985; 54: 897
- Bishop J M. *Ann Rev Biochem*, 1983; 52: 301
- Kamps M P, Taylor S S, Bartholomew A et al. *Nature*, 1984; 310: 589
- Davis R J, Czech M P. *J Biol Chem*, 1985; 260: 2543
- Gschwendt M, Horn F, Kittstein W et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 124: 63
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S et al. *J Biol Chem*, 1987; 262: 5892
- Imoto M, Umezawa K, Komuro K et al. *Jpn J Cancer Res (Gann)*, 1987; 78: 329
- Trevillyan J M, Nordstrom A, Linma T J. *Biochimica Biophysica Acta*, 1985; 845: 1
- Kong S K, Wang J H. *J Biol Chem*, 1987; 262: 2597
- Leamml U K. *Nature*, 1970; 227: 680
- Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248
- Hall B S, Hoffbrand A V, Wickremasinghe R G. *FEBS LETT*, 1987; 223: 6

INHIBITION OF THE ACTIVITY OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE MEMBRANE TPK BY IATPD

Zhang Guangyi Feng Zhimin Wei Yong Zhao Shenghao
Yu Liangli Wang Lichen

(Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002)

ABSTRACT

In this paper, TPK activity from human peripheral blood lymphocyte membrane was measured using synthetic PGAT as substrate. The kinase activity was more strongly inhibited by a synthetic compound, 1-isopropyl-6-amino-thieno (3,4-d) pyrimidine-2, 4-dione (IATPD); IC_{50} was about $300 \mu\text{mol/L}$. Lineweaver-Burk plots revealed that IATPD was competitively with ATP and noncompetitively with PGAT to inhibit the kinase activity.

Key words human peripheral blood lymphocyte membrane, TPK, IATPD, competitive inhibition, noncompetitive inhibition

SDS-蛋白复合物的性质及其液相色谱分离研究

徐 明 波 姚 志 建

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提 要

利用一些常用的蛋白质液相色谱的分离方法, 首次系统地研究了 SDS-蛋白复合物的性质及其液相色谱分离规律, 并对有关的原理进行了探讨。该项研究为膜蛋白及基因工程产生的包涵体蛋白的研究提供了重要的参数。

关键词 SDS-蛋白复合物, 液相色谱分离, 白介素-2

由于色谱技术的发展, 特别是高效液相色谱在蛋白质分离纯化中的应用日益广泛, 使得可溶性蛋白质的分离纯化变得易于进行, 即使很微量的可溶性蛋白质, 也可用特异性亲和层析的方法进行纯化。然而对于膜蛋白的纯化却一直没有系统的和有普遍适用性的分离纯化方法。近年来由于基因工程技术的发展, 使大量的真核蛋白在原核细胞中表达, 其产物通常以包涵体的形式存在, 类似于膜蛋白的存在方

式^[1]。对包涵体蛋白的纯化目前理论方面尚不成熟, 经常是根据经验法进行摸索, 本文以包涵体混合蛋白中的白介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 为纯化的目标蛋白对包涵体蛋白进行分离研究。

纯化包涵体蛋白首先将它们溶解和变性, 溶解的方法包括高浓度尿素、盐酸胍、非离子性