

## 蛋白激酶C家族的研究与进展

杨晓红 柳惠图

(北京师范大学生物系细胞室 100875)

蛋白激酶C(PKC)自1977年发现以来便成为信号传递和肿瘤发生机制研究的一个热点。PKC是一个多功能的蛋白激酶,在体内它可直接被磷脂酰肌醇代谢的中间产物二酰基甘油(DG)所激活。肿瘤促进剂佛波酯(phorbol ester)与DG有相似的结构,在体内或体外都可直接激活PKC,所以PKC可能作为佛波酯的受体与肿瘤发生有密切联系。PKC激活后通过磷酸化特定的受体蛋白产生许多依赖钙的细胞效应,如调节细胞膜上的离子通道,神经递质释放,肌肉收缩,血小板激活,生长因子活化以

及激素的分泌。除此之外,PKC还能使细胞发生长期效应如促进基因表达以及细胞的增殖与分化<sup>[1]</sup>。

### 一. PKC家族分子结构的差异

近年来分子克隆和酶学研究表明,在哺乳动物组织中存在的PKC是由多基因家族编码的。最初,人们从牛、鼠、兔、人脑进而从人脾中发现了编码 $\alpha$ -、 $\beta$ I-、 $\beta$ II-、 $\gamma$ -亚类的cDNA克隆,部分基因组分析指明, $\beta$ I-和 $\beta$ II-亚类具有高度的顺序同源性,是由同一

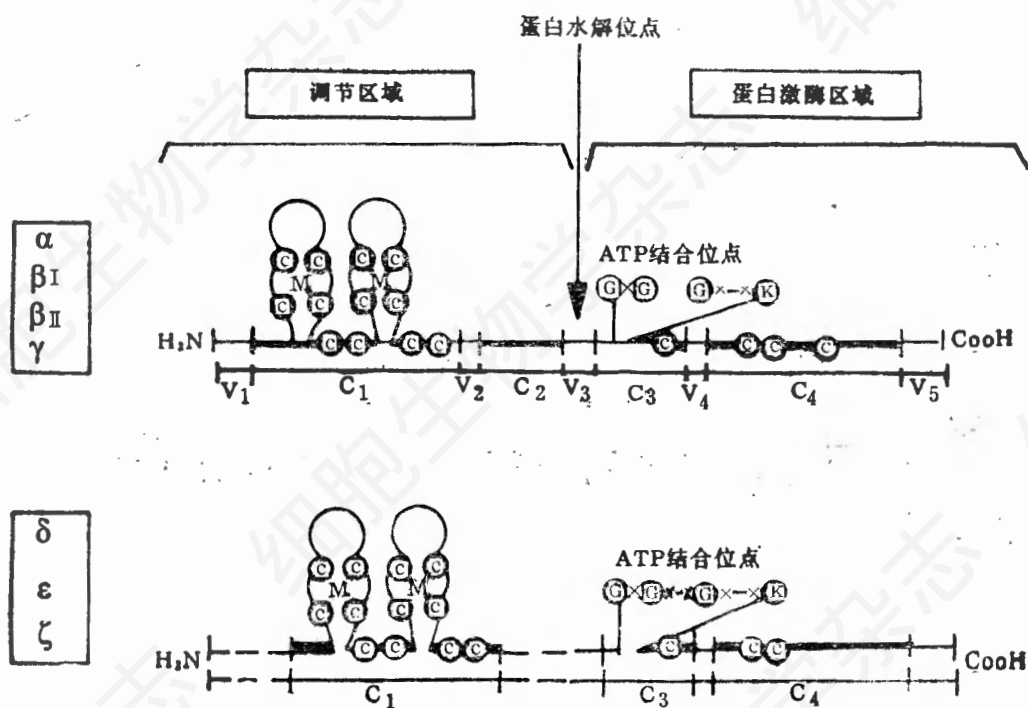


图1 PKC家族的分子结构

mRNA 的不同剪接而来。最近,以 $\alpha$ -、 $\beta$  I-、 $\beta$  II-、 $\gamma$ -cDNA混合物作为探针由大鼠脑cDNA文库中分离出编码3个PKC亚类的cDNA克隆,它们是 $\delta$ -、 $\epsilon$ -、 $\zeta$ -PKC。这些亚类与前面提到的那4种亚类间存在着相近而又不完全相同的分子结构。

所有这些PKC亚类都由一个单肽链组成,由图1所示, $\alpha$ -、 $\beta$  I-、 $\beta$  II-和 $\gamma$ -这4个亚类都含有4个恒定区( $C_1$ - $C_4$ )和五个可变区( $V_1$ - $V_5$ ), $\beta$  I-和 $\beta$  II-只是在可变区 $V_5$ 羧基端约50个氨基酸残基上有差别。 $\delta$ -、 $\epsilon$ -、 $\zeta$ -亚类缺少恒定区 $C_2$ ,但它们的分子量并未因此发生变化。

酶的氨基端是调节区,每个亚类的 $C_1$ 区都有一段富含半胱氨酸的重复顺序,而 $\zeta$ -亚类只有一个富含半胱氨酸的顺序,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(zincfinger)的保守顺序相似,最近研究发现这一富含半胱氨酸的顺序与佛波酯和DG的结合有关。 $C_2$ 区可能包含 $Ca^{2+}$ 的结合位点。酶的羧基端是蛋白激酶区域,恒定区 $C_3$ 有ATP结合位点。 $C_4$ 区亦含有相似的顺序,但其意义尚不清楚。酶的调节区和催化区可被一种依赖 $Ca^{2+}$ 的中性蛋白酶(Calpain)所激活,这种水解发生在 $V_3$ 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,可能与PKC分子的下降调节(down regulation)有关<sup>[2]</sup>。

## 二、PKC 家族不同的酶学特征

酶学研究结果表明PKC家族是由两组基因编码的同功酶。由第一组基因编码的相应蛋白已从各种组织中纯化出来,并根据它们从羧基磷灰石柱上洗脱下来的先后顺序分别称为I-、II-和III-型,分别由 $\gamma$ -、 $\beta$  I +  $\beta$  II-、 $\alpha$ -PKC基因所编码。这些亚类在酶学特征上存在着一些差异,在磷脂酰丝氨酸(PS)及 $Ca^{2+}$ 存在下,DG对I型和III型PKC的激活活性远

小于其对II型PKC的激活活性。相反,游离的花生四烯酸(AA)对II型PKC的激活又小于对I型PKC的激活,后者在微摩尔AA存在下便可发生,而III型PKC必须在高浓度AA存在时方能激活<sup>[2]</sup>。第二组基因包括 $\delta$ -、 $\epsilon$ -和 $\zeta$ -亚类,它们在分子结构上缺乏 $Ca^{2+}$ 结合位点 $C_2$ 区,因而不依赖于 $Ca^{2+}$ ,且催化反应的底物也不同。另外 $\zeta$ -亚类与其他PKC亚类有一不同的特点即不能与佛波酯TPA(12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)结合<sup>[3]</sup>。被 $\delta$ -、 $\epsilon$ -和 $\zeta$ -亚类编码的相应蛋白还未从多种组织中分离鉴定,因而对这3个亚类的研究还处于起步阶段。

PKC各亚类分子结构的差异反映出它们对激活剂及抑制剂所产生的反应是不同的。如在TPA诱导有抗性的突变体人早幼粒细胞HL-60分化过程中,其抗性与II型PKC活性极大降低密切相关,而I型和III型无明显变化,说明TPA对HL-60的诱导分化作用可能是通过激活II型PKC实现的<sup>[4]</sup>。一些酸性磷脂如PS、磷脂酸、心磷脂和磷脂酰甘油在蛋白质磷酸化时是PKC的激活剂,但在缺乏二价阳离子时可选择性抑制PKC亚类的活性,其中I型最敏感,III型最不敏感,PKC亚类对磷脂诱导失活作用的差异可能源于它们的催化亚基与磷脂的结合力不同<sup>[5]</sup>。另外,抗菌剂Magainin可选择性抑制II型PKC活性而对I型和III型PKC无明显作用<sup>[6]</sup>。另一种PKC选择性抑制剂Suramin(I > II = III)是人类免疫缺陷病毒(HIV)逆转录酶的拮抗剂,在爱滋病患者中可以检测到,最近有报道认为HIV感染与PKC介导的磷酸化事件有关,从而为研究PKC在爱滋病防治中的作用提供了线索<sup>[7]</sup>。

## 三、PKC 家族在不同组织及细胞中的差异分布及表达

结合免疫组织化学、免疫印迹、RNA印迹、原位杂交及羧基磷灰石柱层析技术研究表明PKC亚类的分布是有组织和细胞特异性的,

表 I 从哺乳动物组织中分离的 PKC 亚类

亚类	$\alpha$	$\beta$ I	$\beta$ II	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	$\zeta$
氨基酸残基	672	671	673	697	673	737	592
分子量	76799	76790	76933	78366	77517	83474	67740
柱层析亚型	Type III	Type II		Type I	?	?	?
激活剂	PS + DG + Ca <sup>2+</sup> AA + Ca <sup>2+</sup>	PS + DG + Ca <sup>2+</sup>		PS + DG + Ca <sup>2+</sup> AA	PS + DG + (Ca <sup>2+</sup> )	PS + DG + (Ca <sup>2+</sup> )	PS + (DG + Ca <sup>2+</sup> )
组织分布	广泛	一些组织 和细胞	许多组织 和细胞	脑和脊髓	多种组织	脑?	多种组织
染色体定位	17	16		19	?	?	?

见表 I。

$\gamma$ -PKC 只分布于脑和脊髓, 尤其在大脑皮质、海马回及杏仁回中含量极高, 至今尚未在其它组织中检测到。在小脑中  $\gamma$ -PKC 定位于 Purkinje's 氏细胞的细胞体、树突及轴突中, 免疫电镜结果表明除核被膜外  $\gamma$ -PKC 与细胞的膜结构有关, 它可能在神经系统一些特异生理效应如神经递质释放、离子通道调节等过程中发挥作用<sup>[8]</sup>。

$\beta$  I 与  $\beta$  II 亚类分布于脑及其他许多组织, 包括内分泌组织和垂体。正常情况下,  $\beta$  II 活性远超过  $\beta$  I 亚类。免疫细胞化学分析表明  $\beta$  I 和  $\beta$  II 亚类在同一组织中表达形式是不同的, 如大鼠小脑皮层中  $\beta$  I 亚类主要存在于颗粒细胞, 而  $\beta$  II 主要存在于分子层。它们的亚细胞定位也不同, 如在神经细胞中,  $\beta$  I 亚类经常与质膜相连, 而  $\beta$  II 亚类则定位于高尔基体附近。许多组织如肝、肾、脾、肺、心及睾丸均含有不同比例的  $\beta$ -PKC 亚类<sup>[8]</sup>。用免疫组织化学方法发现  $\beta$ -PKC 位于鼠运动神经元和神经-肌肉接点处, 与该接点处的神经递质释放有关, 可能在鼠的运动神经中起调节作用<sup>[9]</sup>。

与其他 PKC 亚类相比,  $\alpha$ -PKC 广泛地分布于很多组织和细胞中, 它可能在细胞的基本生理效应如基因表达中起调控作用。很多组织以不同比例同时表达  $\alpha$ -、 $\beta$  I- 和  $\beta$  II- 亚类。这些亚类有着不同的亚细胞定位和生理功能。

目前对于  $\delta$ -、 $\epsilon$ -、 $\zeta$ -亚类所编码的 PKC 在细胞中的定位尚不清楚, 只发现在小牛中性白细胞及兔脑神经细胞的核仁中存在着与  $\zeta$ -亚类有关的 PKC<sup>[10,11]</sup>。另外, 大鼠 GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> 细胞中存在并表达对 Ca<sup>2+</sup> 不依赖的  $\epsilon$ -亚类<sup>[12]</sup>, 用特异性抗体对鸡胚胎神经元细胞抽提物进行免疫印迹分析, 发现有  $\epsilon$ -亚类存在, 用胰岛素处理可使  $\epsilon$ -PKC 活性升高<sup>[13]</sup>。对于这些 PKC 亚类在组织及细胞中的分布与定位还有待于进一步的研究。

#### 四、PKC 家族与生长调控

PKC 激活可使体内许多与增殖有关的蛋白磷酸化, 如活化质膜上 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交换蛋白, 提高细胞中的 pH 值。已证实细胞内 pH 之升高对细胞分裂是个重要信号<sup>[14]</sup>。

实验表明不同亚类在不同类型细胞中具有不同效应, 当用一些促肝因子如 CCl<sub>4</sub> 处理增殖的肝细胞时选择性激活了 III 型 PKC, II 型 PKC 在此过程中维持不变<sup>[15]</sup>。而在 HeLa 细胞中用  $\alpha$ -干扰素处理时 II 型 PKC 被激活, III 型 PKC 不受影响<sup>[16]</sup>。

很多研究结果表明, 肿瘤细胞中的 PKC 活性高于正常细胞, 增殖细胞中的 PKC 活性高于静止状态的细胞。随着研究的深入, 人们用基因工程的技术进一步证实了 PKC 确实是细胞转化与分化、肿瘤的发生和抑制过程中的关键物质。在鼠成纤维细胞 R<sub>1</sub> 中过表达  $\beta$  I-PKC 和在 NIH 3 T 3 细胞中过表达  $\gamma$ -PKC,

都可导致细胞出现某些转化特征,如在 TPA 刺激条件下,细胞形态发生变化,在单层培养时密度提高且能形成集落,可在软琼脂中形成集落,而且接种于裸鼠有成瘤性<sup>[17,18]</sup>。但在小鼠成纤维细胞 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T 1/2 中过表达同样的  $\beta$  I-亚类时,虽然也可使细胞在 TPA 处理时能发生形态改变及生长速率提高,却不能使细胞在软琼脂中形成集落,注射到裸鼠中也不能成瘤<sup>[19]</sup>。另外,在 Swiss/3 T 3 细胞中过表达  $\alpha$ -PKC 亚类,发现细胞并未出现形态转化特征,在软琼脂中也不能生长,但生长速率提高,尤其是在低血清浓度培养条件下<sup>[20]</sup>。从这些结果可以看出,不同的 PKC 亚类似乎通过激活不同的细胞通路影响不同细胞的生长,使这些正常细胞出现不同程度的转化和癌变。

最近采用免疫细胞化学方法发现过表达 PKC 细胞中转化特征与细胞骨架重新组装有关。如细胞骨架中  $\alpha$ -PKC 亚类集中在粘着斑处,当它激活时可使粘着斑蛋白(Vinculin)磷酸化,从而使粘着斑退化和微丝解聚。这可能提示了 TPA 通过 PKC 对于细胞形态变化、细胞骨架重新组装以及细胞接触依赖性的多重作用机制<sup>[21]</sup>。

另外,PKC 亚类在促进肿瘤细胞分化的过程中也发挥重要作用。当 MELC 和 HL-60 细胞被诱导分化时,细胞中总体 PKC 水平下降,但  $\beta$ -亚类的活性却是上升的。当在 MELC 细胞中过表达外源  $\beta$ -PKC 时,诱导分化作用明显加强<sup>[22,23]</sup>。令人瞩目的是 PKC 过表达时可抑制肿瘤细胞的增殖。Weinstein 等在鼠结肠癌细胞中过表达  $\beta$  I-PKC 亚类,发现在 TPA 处理下癌细胞生长受到抑制,细胞成瘤性降低。这个结果为研究 PKC 亚类可能做为肿瘤的抑制基因提供了线索<sup>[24]</sup>。

### 五、PKC 家族在信号传递及基因表达中的作用

近年来,人们认为以受体机制为媒介的磷脂肌醇类代谢是将多种细胞外信号传到细胞内

的重要途径。外界信号通过激活对 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP<sub>2</sub>)特异性的磷脂酶 C(PLC)促进 PIP<sub>2</sub> 水解成 1,4,5-三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)和 DG。IP<sub>3</sub> 可以促使细胞内钙的动员从而导致细胞内自由钙浓度升高。DG 可直接激活 PKC,导致细胞内一系列反应。最近发现磷脂酰肌醇代谢(PI 代谢)并不是产生 DG 的唯一通路,磷脂酰胆碱(PC)也可水解产生 DG,这一过程需要磷脂酶 D 的催化作用。用佛波酯处理稳定过表达  $\beta$  I-PKC 亚类的鼠成纤维细胞,可引起 DG 水平和磷脂酶 D 活性上升,而肌醇脂却不发生变化,说明  $\beta$  I-PKC 亚类与磷脂酶 D 活性的调节有关。因此,PKC 可同时参与调节 PI 代谢和 PC 代谢,当 PI 代谢停止时就可通过 PC 水解产生 DG<sup>[25]</sup>。

PKC 通过其在信号传递系统磷酸化一系列靶蛋白而最终影响细胞的基因表达。一些实验结果说明,PKC 可能参与一些基因的表达及原癌基因的激活。如 PKC 可能通过直接或间接地磷酸化一些转录因子复合物如 AP<sub>1</sub>/c-jun, c-fos, 从而导致特定基因如金属硫蛋白基因的转录。见图 2<sup>[26]</sup>。最近 Lenardo 的实验可以较直接地反映 PKC 在基因表达中的作用。NF- $\kappa$ B 是存在于 B 细胞中  $\kappa$  轻链的增强因子,它在细胞质中因与抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合而没有活性,在 PKC 作用下 I $\kappa$ B 从 NF- $\kappa$ B 因子上脱离下来,使 NF- $\kappa$ B 成为激活状态,从细胞质移位到细胞核,在核中与特定 DNA 识别位点相互作用,从而介导一些基因的表达,如白细胞介素-2 以及它的受体,还有  $\beta$ -干扰素等<sup>[27]</sup>。

迄今为止,PKC 调节基因表达的精确机制尚未阐明,尤其对于 PKC 亚类与基因调节的关系还是一个有待开发的领域。从免疫化学和免疫组织化学的结果看,在核中有 PKC 分布,尤其是 II 型 PKC,因此核中的 PKC 亚类是否与肿瘤发生有关,是否与核事件特别是基因表达有关,其作用机制是什么? 这些问题正是今后研究的热点。

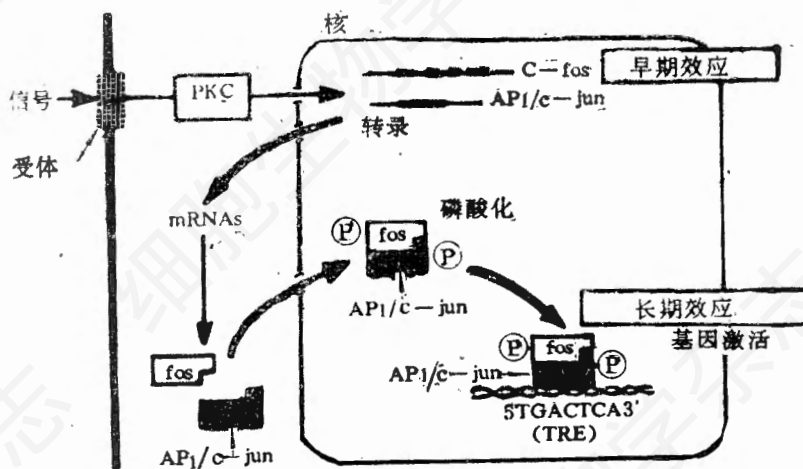


图2 PKC 调节基因表达的假想机制

## 六、PKC 家族的新成员—PKC-L

随着对 PKC 亚类研究工作的进展, PKC 家族的成员也在不断扩大。最近从人角质化细胞及人肺组织的 cDNA 文库中分离得到一个新的为 PKC 编码的 cDNA, 被定名为 PKC-L<sup>[28]</sup>。在分子结构上它也缺少可能包含  $Ca^{2+}$  结合位点的 C<sub>2</sub> 区, 其激活过程不依赖  $Ca^{2+}$ 。PKC-L 在肺组织中含量丰富, 在心和皮肤组织中也有少量分布, 而在脑组织中含量极微。另外, 它在人的一些细胞系如人表皮样瘤细胞系中也有表达。不难看出, 对编码各 PKC 亚类的 cDNA 进一步分离和分类, 将使我们能更加深入地了解 PKC 家族在细胞生命活动中的调节作用。

### 摘 要

蛋白激酶 C 是磷脂酰肌醇代谢中的关键物质, 它通过在信号传递系统中磷酸化一系列靶蛋白而最终影响细胞的基因表达。蛋白激酶 C 是一组由多基因家族编码的同功酶。目前至少已发现了它的 7 种亚类, 它们是  $\alpha$ -、 $\beta$  I-、 $\beta$  II-、 $\gamma$ -、 $\delta$ -、 $\epsilon$ -、 $\zeta$ -PKC。本文从这些亚类的不同分子结构, 不同酶学特征及其组织细胞分布与生理效应, 特别是在细胞增殖调控中的不同作用进行了阐述与讨论。

## 参 考 文 献

- [1] Nishizuka, Y., 1986, *Science*, 233: 305—312.
- [2] Ogita, K. et al., 1990, *The Biology and Medicine of Signal Transduction*, 218—224, Raven Press, New York.
- [3] Weinstein, J. B., 1990, *The Biology and Medicine of Signal Transduction*, 307—316, Raven Press, New York.
- [4] Nishikawa, M. et al., 1990, *Cancer Res.*, 50: 621—626.
- [5] Huang, K. P. et al., 1990, *J. Bio. Chem.*, 265 (2): 738—744.
- [6] Nakabayashi, H. et al., 1990, *FEBS Lett.*, 267 (1): 135—138.
- [7] Mohoney, C. W. et al., 1990, *J. Bio. Chem.*, 265 (10): 5424—5428.
- [8] Nishizuka, Y., 1989, *JAMA*, 262 (13): 1826—1833.
- [9] Hietanen, M. et al., 1990, *Neurosci. Lett.*, 115: 126—130.
- [10] Hagiwara, M. et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 168 (1): 161—168.
- [11] Stasia, M. J. et al., 1990, *FEBS Lett.*, 274 (1—2): 61—64.
- [12] Kiley, S. et al., 1990, *J. Bio. Chem.*, 265 (26): 15704—15712.
- [13] Heidenreich, K. A. et al., 1990, *J. Bio. Chem.*, 65(25): 15076—15082.
- [14] Ober, S. S. et al., 1987, *J. Cell. Physiol.*, 132 (2): 311—317.

- [15] Sasaki, Y. et al., 1990, *The Biology and Medicine of Signal Transduction*, 345—351, Raven Press, New York.
- [16] Pfeffer, L. M. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 6537—6541.
- [17] Houskey, G. M. et al., 1988, *Cell*, 52: 343—354.
- [18] Persons, D. A. et al., 1988, *Cell*, 52: 447—458.
- [19] Krauss, R. S. et al., 1989, *Oncogene*, 4: 991—998.
- [20] Eldar, H. et al., 1990, *J. Bio. Chem.*, 265(22): 13290—13296.
- [21] Jaken, S. et al., 1989, *J. Cell. Bio.*, 109: 697—704.
- [22] Melloni, E. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 4417—4420.
- [23] Hashimoto, K. et al., 1990, *FEBS Lett* 261 (1): 31—34.
- [24] Choi, P. M. et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10 (9): 4650—4657.
- [25] Pai, J. K. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 598—602.
- [26] Vogt, P. K. et al., 1989, *Trend Biochem. Sci.*, 14: 172—175.
- [27] Lenardo, M. J. et al., 1989, *Cell*, 58: 227—229.
- [28] Bacher, N. et al., 1991, *Mol. Cell. Biol.*, 11(1): 126—133.

## 开花的探索——植物开花的分子遗传学研究

Rebecca Chasan

开花是一个复杂的、发生在植物生活史上的一个重大变化：从无限型的营养生长过渡到有限的生殖结构的生长。花的形成要经历几个明显的阶段（参阅评论：Schwarz-Sommer 等人，1990；Meyerowitz, 1991）。首先，茎顶端分生组织停止形成叶子，而开始形成花序或花分生组织。下一步，花原基起源于这些花分生组织。接着，出现四轮花器官各自的原基——花萼\*、花瓣、雄蕊和心皮，并逐渐特化。最后，花器官原基分化出与其相应的细胞及组织类型。环境因子，如日照长度和温度都影响这些过程，但对于开花控制的遗传基础还不大了解。

在过去的几个世纪里，园艺学家已经收集并描述了许多开花植物的突变体。在这些突变体中，花的形态发生改变，常常是显著的改变（参阅评论：Meyerowitz 等人，1989；Coen, 1991）。通过最近的一些研究，分离到一些具有类似的花发育变态的拟蓝芥及金鱼草的突变体（例如，Haughn 和 Somerville, 1988）。开花这一过程，在从花芽发育的极早期的花原基发端到花芽发育后期的花器官分化的各个不同的阶段受到各种不同突变的影响。

Schultz 和 Haughn (1991) 描述了拟蓝芥的一个基因，该基因看来作用于开花过程中较早的阶段。称叶状基因 (LFY)。在野生型拟蓝芥中，侧生花枝和花都

出自主花序轴；在较低的节位，形成带苞叶的侧生花枝，而在较高的节位则形成花。在 *lfy* 突变的植株中，许多花为有苞叶包被的花序轴样结构所取代，使整个植株看上去都是枝叶。就是有花形成，那些花也是不正常的，通常只具有心皮样或花萼样的细胞类型。因此，LFY 基因可控制从花序到花分生组织这一转变。金鱼草中的花茎基因 (*floricaula*) (Coen 等人，1990)，其突变体也具有类似上述的表型。

双重突变的分析进一步证实了 LFY 基因对开花的重要性。无花瓣基因 2 ( $AP_2$ ) 是与花器官轮特性有关的基因，其等位基因纯合植株在原应长花萼的花器官轮上不长花萼，而是发育出心皮 (Kunst 等人，1989)。Ify, ap 2 双重突变的植株类似 *lfy* 单一突变的植株，这表明 ap 2 突变要影响第一轮花器官的特性，野生型 LFY 基因的产物是必不可少的。该结果意味着 LFY 基因在 AP 2 基因前起作用，作用的方式或是通过对花分生组织发育的正调节，或是通过对花序分生组织发育的负调节。

Bowman 等人 (1991) 探索了拟蓝芥花发育的后期阶段，即花器官形态建成中细胞特异类型的分化。为

\* 按照花器官在花托上的着生位置，可分为四轮，从第一轮到第四轮，依次为花萼、花瓣、雄蕊、心皮 (译者注)。