维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0103-03

PKC同工酶研究进展

余 刚，罗 勇 综述；彭国光，董为伟 审校

（重庆医科大学临床学院神经内科 重庆 400016）

【中图图书分类法分类号】R345 【文献标识码】B 【收稿日期】1999-05-06

蛋白激酶C(Protein Kinase C, PKC)是最早被确认的蛋白激酶之一；Nishizuka等在1977年首先将大鼠脑组织中的蛋白激酶确认为PKC，发现它具有组蛋白激酶活性，并能被限制性蛋白水解酶所激活。随后的研究证明，PKC在神经细胞功能的调节中（如神经递质的释放、突触塑性、神经内分泌、基因表达、细胞变性及凋亡等）起着较为关键的作用。

1 PKC同工酶的分类及分布[1-4]

PKC是一类钙、磷脂依赖性磷酸化酶，广泛存在于动物、微生物等有机体内，并分布在几乎所有的组织和器官中。迄今为止，根据同工酶的结构、酶的特性、激活剂的不同等将其分为四大类至少十三种PKC亚型：cPKCs(classical PKC): α、βⅠ、βⅡ、γ；nPKCs(novel PKC): ε/η、δ、ε、θ、μ；aPKCs(atypical PKC): τ/λ、ζ；PRKs(PKC-Related-Kinase):PRK1、PRK2。PKC分布极为广泛，各同工酶的分布又有特殊性。到目前为止，已发现至少有7种同工酶存在于脑组织中，而PKCγ为脑和脊髓所独有；PKCδ、PKCε、PKCζ等在脑组织中含量也非常丰富。

2 PKC同工酶的基本结构[1,2,4-7]

PKC同工酶其cDNA分析表明，该多肽链其氨基端一半序列为调节域（Regulatory Domain），其羧基端一半序列为催化域（Catalytic Domain），两者之间通过一个可被蛋白酶水解的V_3区（铰链区，Hinge Domain）连接，该区在酶的激活过程中发生降解，从而使PKC活性部位暴露。调节域含有C_1、C_2/V_0、V_1和V_2四个区；酶催化域含有C_3、C_4、V_4及V_5四个区，与其它蛋白激酶有部分相同的同源性基因。在C_1的氨基端还含有假底物位点（Pseudosubstrate site），PRK无此区。PKCμ在氨基端还有引导(Leader)和跨膜(TM)序列，其氨基酸残基数量较其它同工酶增加。

PKC为一条单链多肽；其各区结构如下：

C_1区 (C_1 domain): cPKCs和nPKCs含有C_1区，C_1区内有两个半胱氨酸和组氨酸残基富集区，它们组成两个重复的锌指样模体(Zine-finger motif)C_1a、C_1b；PRK缺乏C_1区，aPKCs仅含有一个锌指样模体，因而两者均表现出DAG或佛波酯非依赖性活化形式。经突变分析研究证实：C_1区的两个锌指样结构其作用并非均等：PKCδ C_1a膜体，高度保守的脯氨酸残基突变对PKCδ与佛波酯的亲和力几乎无影响；而C_1b同一氨基酸残基突变可造成佛波酯与PKCδ亲和力减少125倍。

C_2区（C_2 domain）：仅有cPKCs含有C_2区，它位于cPKCsC_1区的羧基端，cPKCs活性受磷脂酰丝氨酸调节，因而推测C_2区可能是Ca^{2+}的结合位点。最近的研究表明：从PKCβ分离出的C_2区的确以Ca^{2+}依赖的形式结合磷脂（Phospholipid）。尽管nPKCs、aPKCs、PRKs无C_2区，但aPKCs和nPKCs的V_0区以及PRKs的HR_2区可类似于C_2区的功能（因V_0区与HR_2区缺乏与Ca^{2+}结合的天冬氨酸残基，而表现出Ca^{2+}非依赖形式）；V_0、HR_2区的一般功能可能是促使蛋白-蛋白之间的相互作用。一类蛋白（即the receptors for activated PKCs；RACKs）被证实与PKCs的C_2区相互作用；它不是PKCs的底物，但其对特定的膜位点上的PKCs的激活似乎很重要。

HR_1区（HR_1 domain）：HR_1区最初被作为PRK_1、PRK_2的同源区而确认，它含有3个重复的大约55个氨基酸模体：HR_1a、HR_1b、HR_1c；HR_1a结合活化的GTP-RhoA复合物，HR_1b也结合RhoA，但这种结合力很弱，可以以活化的GTP-RhoA或无活性的GTP-RhoA形式存在；HR_1c不与RhoA结合，其功能不清楚。

基金项目：国家自然科学基金重点项目（编号：39730170）

作者介绍：余 刚（1971- ），男，助教，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

V_5区（V_5 domain）：V_5区大约只有55个氨基酸残基，所有PKC同工酶均有V_5可变区；V_5区在调节PKCs的磷酸化方面起着重要作用。

假底物位点（Pseudosubstrate site）：除PRKs外，所有PKCs同工酶的氨基端C_1区均存在一个假底物位点，其与真底物位点的差别在于磷酸化位点的丙氨酸取代了丝氨酸/苏氨酸残基，因而不被磷酸化，从而封闭酶的活化中心，这种假底物位点的自我抑制作用是多种蛋白激酶所共有的自身活性调节机制之一。对于PRKs而言，其缺乏C_1区，研究发现，HR1a模体起假底物位点的作用，当Rho与PRKs结合时，能够使HR1a从PRKs的催化区释放出来，从而激活PRKs。

C_3区含酶的催化域和ATP结合域(ATP-binding-domain)。C_4区与PKCs识别磷酸化的底物有关。V_1区可能与PKC的底物选择性有关，PKC各同工酶V_1区的结构及组成的差异决定了各同工酶底物的多样性。V_3区为铰链区，连接PKC的调节域和催化域，它还含有钙依赖中性蛋白酶和酪氨酸酶的作用部位，其它各区功能尚不清楚。

3 PKC的激活和限制性调节（down-regulation）

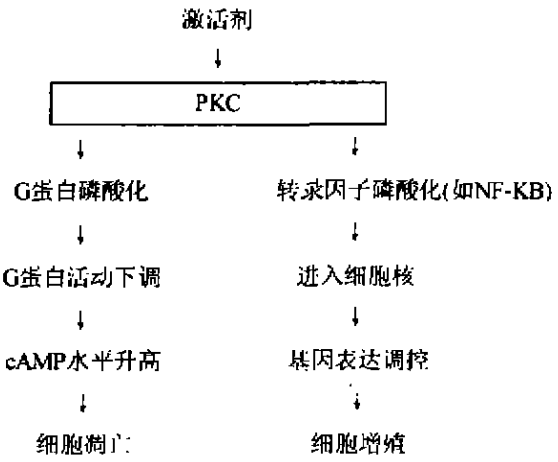
由于假性底物的存在，静息状态下PKC均以无活性的形式存在于胞浆中，在外界刺激作用下，PKC移位（translocation）到细胞膜而被激活。短暂的PKCs激活，在信号传导通路中所致的短期事件（如离子内流、分泌等）方面似乎起着重要作用；持续的PKC激活，可能在细胞增殖、分化及肿瘤发生等方面起着重要的作用。PKC是促癌剂PMA（phorbol,12-myristate-13-acetate，即佛波醇-12-豆蔻酰-13-乙酸）细胞内受体，PKC的过度表达导致细胞生长紊乱，并且触发肿瘤的形成。PKC的激活被认为是Ca^{2+}和磷脂依赖性的，尤其是PS及其应激状态的各种产物（如DAG等）在PKC的激活及其发挥生理机能中有着至关重要的作用。异常持续的PKC激活，可导致细胞功能失调。为保持细胞间功能的协调，机体常通过内源性机制使PKC的活性下调[2,4]，PKC被激活后活性下调的现象称为“PKC的限制性调节”。PKC的限制性调节可能与以下因素有关：①PKC的酶性降解：激活的PKC对钙激活的中性蛋白酶（Calpain）更敏感，Calpain可以从PKC的V_3区将PKC降解成45-49KDa和36 KDa的两个片段使PKC灭活；②应激释放和/或激活：PKC内源性抑制剂（如多胺、神经节苷酯等）参与了缺血条件下PKC的活性下调；③外界刺激信号激活磷酸酶，使膜磷脂结构、组分发生改变，并影响PKC的活性；④降解率的增加也引起PKC的限制性调节[8]。PKC的活性下调还有激酶专一性和亚型专一性。夏保云等[9]发现PMA对人7721肝癌细胞只引起PKC而不引起PKA和TPK（酪氨酸蛋白激酶）的下调，PKC的非特异性抑制剂槲皮素和特异性抑制剂D-鞘氨醇能大部分取消PMA对PKC的下调，用HL-60细胞能证明PMA只对含量丰富的PKCα和PKCβ II亚型而不对含量很少的PKCβ I 亚型发生下调，说明PMA对蛋白激酶的下调有激酶和亚型专一性。

4 PKC同工酶功能及调节剂（modulators）

PKC作为细胞信号转导的中心环节，在肿瘤发生、细胞凋亡、神经传导、递质释放、突触塑性、长时程增强效应(Long-term potentiation, LTP)等方面起着重要作用。PKC通过诱导C-Jun蛋白的羧基末端的一个关键氨基酸残基去磷酸化，使DNA结合能力增强。通过这种方式，TPA可激活PKC，进而增加AP-1（activating protein-1,为C-Jun和C-fos形成的二聚体）活性，促使B3.1+TRα1细胞凋亡[10]。Suen等[11]观察到PKC能使突触后NMDA受体（NRs）磷酸化，从而激活NRs，而NRs的底物（substate）是与学习和记忆有关的LTP；Western blot实验表明：仅PKCγ能与NR1形成复合物，说明PKC众多同工酶中，是PKCγ通过磷酸化作用，来调控NRs活性，从而发挥其突触塑性作用。PKC也能使大鼠新皮质脑片的Na^+通道磷酸化，从而调控持续的Na^+流，发挥其促进神经元兴奋性的作用[12]。PKC还可通过激活PLA_2，促进花生四烯酸释放等机制发挥对钾离子通道的调节作用[13]。原癌基因bcl-2要发挥其抗凋亡功能也需要PKC的磷酸化，因bcl-2蛋白有PKC的磷酸化位点[14]。Mayne等[15]提出，激活PKC是促进细胞凋亡，还是抑制细胞凋亡，与所研究的细胞类型及不同的同工酶有关。他们发现，PKCε能阻止被TNF-α和calphostin C诱导的U937细胞发生细胞凋亡，也能避免顺铂诱导的HT58人类淋巴细胞发生细胞凋亡及细胞毒性（顺铂所致）。在血清剥离的ND7细胞系培养基内加入PKC激动剂PMA，可导致ND7细胞系凋亡[16]。PKC促进细胞凋亡，或抑制细胞凋亡，其可能机制如图示[17]。

PKCζ不能被DAG或佛波酯激活，它可能与神

维普资讯 http://www.cqvip.com



经酰胺激活NF-kB转录因子有关，而神经酰胺能诱导细胞凋亡[18]；Par-4基因（它的表达与细胞生长抑制和凋亡密切相关）能特异结合aPKCs的调控区，从而抑制aPKCs的活性，在NIH-3T3细胞，Par-4表达升高，而NIH-3T3细胞形态学发生改变，以致发生细胞凋亡，说明aPKCs在细胞的增殖与存活方面起着重要作用[19]。PKCα在调控细胞间联系及抑制凋亡、肿瘤发生方面起着一定作用，它的异常活化及基因突变在垂体肿瘤发生中起重要作用；PKCβ在转移性肺癌中表达明显增加，PKCβI的表达升高导致HT29结肠癌细胞生长抑制，但它也表现出另一方面的作用，它导致裸鼠R6成纤维细胞向肿瘤细胞转化；PKCβII在暴露于高水平葡萄糖的血管内皮细胞中表达增加，表明它可能与糖尿病诱导的血管功能缺失有关；PKCε表现出促进肿瘤形成的癌基因功能，PKCδ的激活能使黄体HSP-27（热休克蛋白-27）高度磷酸化[20]；它也具有抑制肿瘤形成的作用；PKCδ在诱导凋亡时，能被ICE/CED3样蛋白酶激活；PKCμ在正常组织表达较低，而在恶性肿瘤人肺癌细胞A549中mRNA表达较正常增加32倍；PKCθ几乎在所有T淋巴细胞表达，它可能在T细胞信号通道起特有的作用；PKCι/η似乎与表皮细胞增殖有关[2,21]。

由于PKC同工酶在细胞功能方面的重要性，而可能被视为干预治疗的靶区。然而，由于缺乏特异的PKC同工酶抑制剂，同工酶功能的研究及在临床应用方面受到很大局限。目前PKC的众多抑制剂中，绝大多数均为非特异性抑制剂(对PKC同工酶而言，也抑制其他蛋白激酶如cGMP、cAMP依赖的蛋白激酶等)。PKC的调节剂(即抑制剂、激活剂)可分为：作用于催化区(C_3，C_4)和调节区(C_1，C_2)两类。其中激活剂phorbol esters,TPA,brostatins、AA,calphostinc等及抑制剂staursporine、H7, GF109203X等（均为非特异性）已作为研究PKC功能的常用工具药。到目前为止，仅发现GO6976、ly333531为特异性抑制cPKCs的抑制剂[2,11]，而对于某一种同工酶抑制剂，尚未见报道。据预测，特异性PKC同工酶抑制剂的发现将用于治疗自身免疫性疾病、类风湿关节炎、器官移植、糖尿病、多发性硬化、阿尔采默氏病、心脑血管疾病(尤其在脑缺血等方面)等。

参 考 文 献

[1] Mellor H , Parker PJ. The extended Protein Kinase C superfamily[J]. Biochem J. 1998; 332(Pt2):281-292.

[2] Nishizuka Y. Protein Kinase C and Lipid signaling for sustained cellular responses[J]. FASEB J.1995;9:484-496.

[3] Johannes FJ. Prestle J. Eis P. et al. PKC- is a novel, atypical member of the Protein Kinase C family[J]. J Biol Chem. 1994; 269:6140-6148.

[4] Hofmann J. The potential for isoenzyme-selective modulation of Protein Kinase C[J]. FASEB J.1997; 11:649-669.

[5] Flynn P. Mellor H. Palmer R. et al. Multiple interactions of PRK1 with RhoA[J]. J Biol Chem.1998; 273(5):2698-2705.

[6] Wu SL. Staudinger J. Olson EN. et al. Structure expression, and properties of an atypical Protein Kinase C (PKC3) from Caenorhabditis elegans[J]. J Biol Chem J . 1998; 273(2):1130-1143.

[7] Dekker LV. Parker PJ. Regulated binding of the Protein Kinase C substrate GAP-43 to the vo/c2 Region of Protein Kinase C [J]. J Biol Chem. 1997; 212(19):12747-12753.

[8] 陈康宁，蒋为伟。蛋白激酶C和脑缺血[J]。国外医学·内科学分册，1996; 23(4):164-167.

[9] 夏保云、李 忠，张 帆，等。佛波酯引起蛋白激酶C下降调节的专一性[J]。中国生物化学与分子生物学报，1998; 14(2):218-221.

[10] Lianos S, aelles C. Azorin I. et al. The cerbA protooncogene induces apoptosis in glial cells via a Protein Kinase C-and bc1-2-suppressible mechanism[J]. J Neurochem, 1998; 70:2315-2326.

[11] Suen PC. Wu K. Xu JL. et al. NMDA receptor subunits in the postsynaptic density of rat brain:expression and phosphorylation by endogenous Protein Kinases[J]. Brain Res Mol Brain Res. 1998; 59(2):215-228.

[12] Astman N. Gutnick MJ. Fleidervish IA. Activation of Protein Kinase C increases neuronal excitability by regulating persistent Na^+ current in mouse neocortical slices[J]. Neurophysiol. 1998; 80(3):1547-1551.

（下转第109页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

[6] Matsura H.et al, J Thoracic Cardiovase Surgery 1993;105(1):45.

[7] Kirklim JW.et al.N Engl J meal.1979;301:135.

[8] 顾瑞华，于 昂、王仲能，等、体外循环心脏不停跳下心内手术[J]. 天津医药，1992;(2):105-107.

[9] 何 巍，林 辉，陈络伍，等、心脏跳动中二尖瓣置换术[J]. 中华胸心血管外科杂志，1996;11:678.

[10] 何 巍，林 辉，覃家锦，等、心脏跳动中房室缺修补术的方法体会[J]. 临床心血管病杂志，1995;11(s)114-117.

[11] 黄旭中，张尔永，蒂 力，等. 体外循环心脏不停跳心内直视术[J]. 华西医学，1994;9(2):219-220.

[12] Molina JE， moller JH, Dunnian A, et al: Repair of complete atrioventricular canal in the beafing nomworking heart using patch tecnmigue[J]. International conference on thoracic and cardiovascular surgery Beijing, 1986;62-63.

[13] 韦世锋，郑陈光，付乾昌，等. 常温心脏不停跳心内直视手术300例[J]. 中国胸心血管外科临床杂志，1997;4(3):159-160.

[14] Masuda M, Yonenaga K, shikik, et al. Myocardial protectien in coronary occlmsion by retrograde cardioplegic perfusion via thecoronary sinus in dogs[J]. J Thorat cardiovasc snrg. 1986;92:255-263.

[15] Young Z, Saikkonen M, Tum T, et al. Technical aspects of simultanjeous antegrade/refrograde normothemic blood cardioplegia[J]. J Extre corport Technol,1996.23:48-53.

[16] 黄海洁，彭劲松，胡振快，等. 心脏不停心内直视手术的体外循环管理[J]. 广西医科大学学报，1998;15(3):87-88.

[17] 刘道波，况竹生，熊荣生，等. 浅低温心脏不停跳心内直视手术119例报告[J]. 心肺血管病杂志，1998;17(4):264-266.

[18] 林 辉，何 巍，彭青云，等. 逆行灌注心脏不停跳主动脉瓣及联合瓣膜替换术[J]. 美国中华医药杂志，1998;4(2):13-15.

[19] 朱永波，殷桔林，张殿堂，等. 浅低温体外循环不阻断主动脉心内直视手术的评价[J]. 中华实验外科杂志，1997;14(6):381-382.

[20] 蒂念国，张国报，肖诗亮，等. 心脏不停跳心内直视术的心肌保护效果[J]. 中华实验外科杂志，1997; (s):60-61.

[21] 李 强、心脏停跳与不停跳方法行心内直视手术对CK、CK-MB影响的初步观察及探讨[J]. 重庆医科大学学报，1999;24(3):278-279.

[22] 林 辉，何 巍，郑陈光，等. 心脏不停跳法防止换瓣术后的心排血量综合征的研究[J]. 中华实验外科杂志，1998,15(1):44-45.

[23] 李朝先，向小勇，李 强，等. 浅低温体外循环心脏跳动中的心内直视手术[J]. 四川医学，1998.19(5):370.

[24] Menasche P. et al, Ann Thorac Surg 1992;54:472

[25] 杨辰坦，刘成砰，张凯伦，等. 浅低温体外循环心脏不停跳心内直视手术的探讨[J]. 同济医科大学学报，1998;27(3):209-210.

[26] 贾治仁，姚建民，成礼润，等. 胸部小切口心脏不停跳心内直视手术[J]. 中华外科杂志，1998;36(6):358-359.

幽门螺杆菌(Hp)是一种革兰氏阴性的微需氧

（上接第105页）

[13] 郭 颖，程桂芳. 花生四烯酸对钾离子通道的调节作用[J]. 生理科学进展，1997; 28(2):125-128.

[14] liu T eng XM， Carr B et al. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function[J]. J Biol Chem, 1997; 272(18):11671-11673.

[15] Mayne GC urray AW. Evidence that Protein Kinase C mediates phorbol ester inhibition of Calphostin C-and tumor necrosis factor--induced apoptosis in U937 histiocytic lymphoma cells[J]. J Biol Chem. 1997; 273(37):24115-24121.

[16] Mailhos C. Howard MK. Latchman DS. et al. A common pathway mediates retinoic acid and PMA-dependent programmed cell death (apoptosis) of neuronal cells[J]. Brain Res. 1994; 644:7-12.

[17] 邓友平，肖培根. 蛋白激酶C在细胞凋亡中的作用[J]. 《国外医学》生理病理与临床分册，1997; 17(2):122-124.

[18] 卢 琳，吴厚生. 脂类第二信使[J]. 国外医学·生理病理与临床分册[J]，1997;17(2):103-105.

[19] Diaz-Meco MT. Municio MM. Frutos S. et al. The product of par-4 gene induced during apoptosis nteracts selectively with the atypical isoforms of Protein Kinase C[J]. Cell. 1996; 86:777-786.

[20] Maizels ET eters CA. Kline M. et al. Heat-shock protein -25/27 phospho- rylation by the isoform of Protein Kinase C[J]. Biochem J. 1998; 332:703-712.

[21] 何志巍，姚开泰. 蛋白激酶C同工酶分子结构及功能研究进展[J]. 生理科学进展，1998; 29(4):307-313.